

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

SERVICIO GENERAL DE CITOMETRÍA



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

**“LINFOCITOSIS MONOCLONAL DE CÉLULAS B:
FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN EN LA POBLACIÓN
GENERAL DE SALAMANCA Y ANÁLISIS DE LAS
CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENÉTICAS DEL CLON
LINFOIDE B”**

TESIS DOCTORAL

Wendy Grey Nieto Pérez

2012



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

D. Alberto Orfao 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 doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. Wendy Grey Nieto Pérez titulado “*Linfocitosis monoclonal de células B: frecuencia de presentación en la población general de Salamanca y análisis de las características fenotípicas y genéticas del clon linfoide B*”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca. Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 18 de Abril del año 2012.

Fdo: Dr. Alberto Orfao de Matos



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

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

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. Wendy Grey Nieto Pérez titulado “*Linfocitosis monoclonal de células B: frecuencia de presentación en la población general de Salamanca y análisis de las características fenotípicas y genéticas del clon linfoide B*”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca. Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 18 de Abril del año 2012.

Fdo: Dra. Julia Almeida Parra

*“Por muy larga que sea la tormenta, el sol siempre
suele a brillar entre las nubes”*

Khalil Gibran

A mi juesma y mi sobri
A "toda" mi familia
A mis amigos
A Dennis

A mis padres, por toda su dedicación, ejemplo y amor

Glosario de Abreviaturas

- Ac:** anticuerpo
ADN: ácido desoxirribonucleico
Ag: antígeno
AID: desaminasa inducida por activación (del inglés *Activation-Induced Deaminase*)
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
BCR: receptor de la célula B (del inglés *B Cell Receptor*)
BLIMP-1: proteína de maduración inducida por linfocitos B (del inglés *B lymphocyte-induced maturation protein-1*)
BSAP: proteína activadora específica de célula B (del inglés *B cell lineage-specific activator protein*)
CCL: quimiocina tipo CC o β
CCR: receptor de quimiocina CC
CDF: célula dendrítica folicular
CDR3: región 3 determinante de la complementariedad (del inglés *Complementarity Determining Region*)
c-Kit: receptor transmembrana con actividad tirosin quinasa
CpG: dinucleótido citidina-guanidina no metilado
CSH: célula madre hematopoyética (del inglés *Hematopoietic Stem Cell*)
CXCL: quimiocina tipo CXC o α
CXCR: receptor de quimiocinas CXC
FISH: hibridación in situ fluorescente (del inglés *fluorescence in situ hybridization*)
FSC: dispersión frontal de luz (del inglés *forward light scatter*)
GL: ganglios linfáticos
GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto
HLA: antígeno leucocitario humano o molécula de histocompatibilidad (del inglés *Human Leukocyte Antigen*)
Ig: inmunoglobulina
IGVH: región variable de la cadena pesada de las Igs
IL: interleuquina
IRF-4: factor regulador de interferon 4 (del inglés *Interferon Regulatory Factor 4*)
LB: linfoma de burkitt
LBDCG: linfoma B difuso de célula grande
LCM: linfoma de células del manto
LCMv: variante de linfoma de células del manto
LF: linfoma folicular
LLC-B: leucemia linfática crónica B
LLCBP: linfoma linfocítico de célula B pequeña
LLP: linfoma linfoplasmocítico
LMB: linfocitosis monoclonal de célula B
LNH-B: linfoma no-Hodgkin B
LPL-B: leucemia prolinfocítica B
LZME: linfoma de la zona marginal esplénica
MALT: linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas
MM: mieloma múltiple
MO: médula ósea
MW: macroglobulinemia de Waldenström
OMS: organización mundial de la salud
RAG: genes activadores de recombinación (del inglés *recombination activating gene*)
SCF: factor de células madre (del inglés *Stem Cell Factor*)
smIg: inmunoglobulina de superficie
SLPC-B: síndrome linfoproliferativo crónico B
SP: sangre periférica
SSC: dispersión lateral de luz (del inglés *sideward light scatter*)
TdT: deoxinucleotidil transferasa terminal (del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase*)
TL: tricoleucemia
TLR: receptor tipo toll (del inglés *Toll-Like Receptor*)
TL-V: variante de tricoleucemia
VCAM-1: molécula vascular de adhesión celular 1 (del inglés *Vascular Cell Adhesion Molecule*)
VIH: virus de inmunodeficiencia humana
VLA-4: antígeno de activación de aparición tardía 4 (del inglés *Very Late Antigen*)
XBP-1: proteína 1 de unión de segmentos X (del inglés *X-box binding protein 1*)

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1.- ONTOGENIA Y DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS B	3
1.1.- Diferenciación linfoide B en la MO (maduración B independiente de Ag)	4
1.2.- Maduración linfoide B dependiente de Ag	8
1.3.- Identificación y caracterización de subpoblaciones linfoides B de SP de adultos sanos	11
1.3.1.- Identificación y distribución relativa de las poblaciones linfoides B presentes en SP de adultos sanos	11
1.3.2.- Caracterización inmunofenotípica de las poblaciones de células B de SP de adultos sanos	14
1.3.2.1.- Moléculas asociadas a BCR	15
1.3.2.2.- Moléculas asociadas a la respuesta inmune B dependiente de células T	17
1.3.2.3.- Moléculas que dirigen el tráfico de las células B	18
1.3.2.4.- Receptores de señalización tipo <i>toll</i>	19
1.3.2.5.- Otras moléculas asociadas a línea linfoide B	20
1.3.2.6.- Diferencias fenotípicas entre plasmablastos y CP	21
1.4.- Linfocitos B y senescencia	22
1.4.1.- Concepto de Inmunosenescencia	22
1.4.2.- Cambios en la distribución de las subpoblaciones linfoides B relacionados con la edad	23
1.4.3.- Cambios moleculares relacionados con la senescencia de células B	25
1.4.4.- Impacto de la inmunosenescencia en la función B	28

2.- SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS B (SLPC-B)	30
2.1.- Concepto, clasificación y características generales	30
2.2.- Origen de los SLPC-B de acuerdo con la célula normal de la que derivan	33
2.3.- Leucemia linfática crónica de células B (LLC-B)	38
2.3.1.- Características inmunofenotípicas	39
2.3.2.- Características genéticas	40
2.3.3.- Características moleculares	42
2.3.4.- Factores pronósticos	44
2.4.- SLPC-B con expresión leucémica diferentes a la LLC-B	47
2.4.1.- Leucemia prolinfocítica B (LPL-B)	47
2.4.2.- Tricoleucemia (TL)	50
2.5.- Linfomas no Hodgkin B (LNH-B) con expresión periférica	51
2.5.1.- Linfoma de células del manto (LCM)	51
2.5.2.- Linfoma folicular (LF)	54
2.5.3.- Linfoma B difuso de células grandes (LBDCG)	56
2.5.4.- Linfoma de Burkitt (LB)	57
2.5.5.- Linfoma de la zona marginal esplénica (LZME) y linfoma de la zona marginal nodal (LZMN)	59
2.5.6.- Linfoma de la zona marginal extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)	60
2.5.7.- Linfoma linfoplasmocítico (LLP) y macroglobulinemia de Waldenström (MW)	61
2.6.- Incidencia de bi(multi) clonalidad en SLPC-B	63
3.- LINFOCITOSIS MONOCLONAL DE LINFOCITOS B (LMB)	64

3.1.- Concepto	64
3.2.- Antecedentes históricos	65
3.3.- Criterios diagnósticos y clasificación de la LMB	70
3.4.- LMB tipo LLC-B	72
3.4.1.- Características inmunofenotípicas y genéticas	72
3.4.2.- Características moleculares de los genes <i>IGHV</i>	74
3.5.- LMB tipo “no-LLC-B típica”	76
3.5.1.- Características inmunofenotípicas y genéticas	76
3.5.2.- Características moleculares de los genes <i>IGHV</i>	80
3.6.- Significado clínico de la LMB: relación entre LMB y leucemia linfática crónica-B (LLC-B)	80
3.6.1.- Riesgo de transformación de LMB a SLPC-B clínicamente manifiesto	83
3.6.2.- Factores de riesgo de transformación maligna en la LMB	85

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 89

III. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS 95

Artículo 1: Elevada frecuencia (12%) de detección de linfocitos B clonales similares a los de la leucemia linfática crónica en la sangre periférica de adultos sanos, mediante el empleo de técnicas altamente sensibles de citometría de flujo multiparamétrica.

Artículo 2: La presencia de un pequeño número de linfocitos B clonales fenotípicamente similares a los de la leucemia linfática crónica es un hallazgo sistemático en la sangre periférica de adultos sanos. 109

Artículo 3: Linfocitosis monoclonal de linfocitos B de tipo no-LLC-B en la población general: prevalencia y características fenotípicas y genéticas. 119

IV. DISCUSIÓN 135

V. CONCLUSIONES 159

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 165

I. Introducción

1. - ONTOGENIA Y DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS B

El proceso de diferenciación linfoide B se lleva a cabo en dos etapas principales, en diferentes localizaciones. En una primera etapa ocurre la "maduración B independiente de antígeno" (Ag), en la cual tiene lugar la diferenciación desde un precursor hematopoyético inmaduro al linfocito B maduro inmunocompetente (célula B *naïve* o virgen); inicialmente, este proceso ocurre en el saco vitelino y en el hígado fetal, desplazándose de forma completa después del nacimiento a la médula ósea (MO) (1). Cuando el linfocito B maduro se pone en contacto con su antígeno en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos -GL-, tejido linfoide asociado a mucosas -MALT-, bazo y la propia MO) sufre un segundo proceso de maduración (fase de "maduración B dependiente de Ag") encaminado a la generación de células B efectoras (células plasmáticas) y de memoria (2, 3).

En el micromedioambiente del órgano linfoide B primario del adulto (la MO) los precursores linfoides B deben competir, tanto por factores inductores de diferenciación celular (p. ej.: citocinas específicas de línea celular, ligandos del receptor antigénico de la célula B (BCR) y, receptores de membrana de células del estroma), como por el propio espacio físico adecuado a su maduración a linfocito B (4, 5), que expresa un BCR completamente funcional (6). Los linfocitos B *naïve* recién producidos abandonan la MO a través de la sangre periférica (SP) y alcanzan los órganos linfoides secundarios, desde donde recirculan constantemente hasta su muerte, que caso no exista contacto con Ag, tiene lugar al cabo de unos pocos días. Si por el contrario, el LB *naïve* reconoce de forma específica a su antígeno a través del BCR en un ambiente adecuado, se pondrá en marcha la llamada reacción del centro germinal (CG) en el órgano linfoide secundario. En ella tiene lugar una intensa proliferación linfocitaria, junto a una serie de procesos clave en la respuesta B específica de antígeno que ocurren en la zona oscura del CG: la

hipermutación somática y el cambio del isotipo (“*switch*”) de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig). Posteriormente, en la *zona clara* del CG, los LB que han acumulado mutaciones somáticas en los genes que codifican para las regiones variables de su Ig y que generan un incremento de su afinidad por el Ag, son seleccionados positivamente y abandonan el CG (7). Por el contrario, si este proceso de maduración lleva a que la afinidad del LB por su Ag sea menor, los LB mueren por apoptosis dentro del propio CG.

Las células B con afinidad incrementada por el Ag que abandonan el CG (células post-CG) pueden diferenciarse hacia dos tipos de célula B: (i) linfocitos B de memoria que permanecerán mayoritariamente en el bazo o recirculan a través de la SP, y; (ii) células B pre-efectoras (plasmablastos) que buscarán nichos de supervivencia en otros órganos linfoides secundarios, preferentemente en la MO o en el tejido MALT, para posteriormente originar la célula efectora secretora de anticuerpos (Acs) -célula plasmática (CP)- (8).

A continuación, en esta introducción revisaremos de forma más detallada los eventos más relevantes que ocurren en ambas fases de la maduración linfoide B, prestando especial atención a aquellos que permiten definir los distintos estadios fenotípicos y funcionales de las células B.

1.1. - Diferenciación linfoide B en la MO (maduración B independiente de Ag)

La formación de las células B tiene lugar en la cavidad del hueso esponjoso, donde la maduración ocurre en sentido radial, desde el endostio hacia el seno venoso central (5, 9). En este espacio, las células del estroma medular interactúan entre sí,

formando una red intersinusoidal (5, 10) en la que se incluyen osteoblastos, osteoclastos (11), linfocitos T (12) y otros leucocitos (p.ej.: células dendríticas) (13, 14). De este modo, conforman un nicho específico que proporciona el microambiente necesario para el desarrollo de la célula B, a través tanto de contactos directos célula-célula (mediados por moléculas de superficie) como de proteínas solubles (citocinas).

Según el estado de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las Ig y la expresión de una gran variedad de proteínas de superficie e intracelulares, hasta la fecha se han identificado en MO, cinco compartimentos madurativos B diferentes (Figura 1): precursores pro-B, pre-B-I, pre-B-II, linfocitos B inmaduros (o transicionales) y células B *naïve*. El proceso mediante el cual los precursores de MO adquieren un compromiso madurativo a línea linfocítica B se iniciaría con el establecimiento de interacciones entre la célula precursora hematopoyética (CPH) y células del estroma, a través de uniones VLA-4/VCAM-1 y c-Kit/SCF (*stem cell factor*) (4, 5, 15) que inducirían la diferenciación a **célula pro-B** (4-6, 10). La célula pro-B expresa CD45 y CD22 de forma débil, junto con marcadores de célula precursora como CD34 y niveles elevados de CD38, mientras que CD19 todavía no se expresa en esta etapa madurativa (6, 7, 16). El compromiso definitivo hacia la línea linfocítica B ocurre cuando estas células migran a nichos medulares que contienen células estromales capaces de producir y secretar interleucina (IL)-7. La interacción de la IL-7 con su receptor (CD127) expresado en la célula pro-B promueve la activación de varios factores de transcripción (PAX-5, PU.1, EBF-1, E2A) (17, 18) y la proliferación de las células precursoras (5, 9, 19). A su vez, los factores de transcripción activados inducen la síntesis de la enzima nuclear deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) y de los productos de los genes activadores de la recombinación (*RAG1* y *RAG2*), produciéndose *rag1* y *rag2*; ambas proteínas son necesarias para la recombinación somática entre los genes de los segmentos D y J (de

Diversidad y de Unión) del locus de la cadena pesada de las Ig (*IGH*) (20-22), de manera que durante la fase de célula pro-B se reordenan los segmentos génicos *DH/JH* en ambos cromosomas (Figura 1).

La célula pro-B se multiplica y al expresar Pax-5, compromete su linaje a línea B transformándose en **célula pre B-I**. En este estadio madurativo se detecta por primera vez expresión de CD19, conjuntamente con un patrón fenotípico $CD10^{++}CD38^{++}CD34^{+d}CD22^{+}CD79a^{+}$ y positividad para la enzima nuclear nTdt (Figura 1) (6, 23, 24). Durante esta fase, la unión de un segmento "*IGH_V*" (de variable) a un punto de unión *IGH_{DJ}* ya reordenado completaría el reordenamiento del locus *IGH*.

La generación de la cadena pesada $Ig\mu$ es debida a la unión de un exón *VDJ* funcional de los que se han formado, al exón de la región constante de *IGH*. La proteína $Ig\mu$ así generada se acumula en el citoplasma, identificando este fenotipo ($CyI\mu^{+}$) la **célula pre-B-II** (Figura 1) (6). Respecto a la célula pre-BI, la célula pre-B-II expresa niveles más elevados de CD19 y CD45, muestra menor reactividad para CD10, CD34 y nTdT, y expresa $CD20^{+}$ de forma heterogénea (6). En esta etapa, la cadena $Ig\mu$ se expresa en la membrana celular de forma débil conjuntamente con las moléculas VpreB y $\lambda 5$ (que actúan como sustitutos de la cadena ligera de la Ig, cuyo loci no ha sido todavía reordenado en estos estadios de maduración), y las proteínas de señalización $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ (CD79a-CD79b). Todos estos elementos ($Ig\mu$, VpreB/ $\lambda 5$ y CD79a-CD79b) conforman el pre-receptor de la célula B (pre-BCR), presente por tanto en pequeñas cantidades en la célula pre-BII. A este nivel tiene lugar una primera selección positiva de precursores B (confirmando así que la cadena $Ig\mu$ generada es funcional) mediante la cual se eliminan aquellas células que presentan reordenamientos *IGH* no funcionales y que constituyen aproximadamente la mitad de las células pre-B generadas (10, 25). Además, el pre-BCR induce la expansión proliferativa de las células pre-B-II (26) que

hayan logrado un reordenamiento productivo de la cadena pesada y el inicio del reordenamiento de los genes de la cadena ligera de las Ig (*IGL*) (10, 25).

Si dicha célula logra un reordenamiento productivo de los genes de la cadena ligera, alcanza la fase de **célula B inmadura/transicional**, caracterizada por la expresión de la molécula IgM completa en la membrana de la superficie celular (Sm). En este momento, el linfocito B inmaduro ya tiene un fenotipo cercano al del linfocito B *naïve* maduro, incluyendo expresión fuerte de CD20 y CD45; no obstante, se diferencia del linfocito B maduro en que aún conserva una expresión débil de CD10 y reactividad fuerte para CD38 (Figura 1), y en que además expresa niveles más elevados de sIgM, menor cantidad de sIgD y presenta positividad homogénea para CD5 (6). Durante la fase de linfocito B inmaduro tiene lugar el proceso de selección negativa, con la finalidad de eliminar aquellos linfocitos B que expresan BCR autorreactivos (27, 28). No obstante, antes de su eliminación definitiva las células B inmaduras que reconocen un Ag propio en la MO disponen de una segunda oportunidad para reordenar su loci *IGL* y "reeditar" su BCR, de manera que solo si después de este proceso de "edición" del receptor las células B inmaduras siguen siendo autorreactivas, son inducidas a morir por apoptosis, o quedan en un estado de incapacitación funcional o anergia (10). Por el contrario, si la célula expresa un BCR no autorreactivo (ya sea en la primera o en la segunda oportunidad de reorganización de sus genes), esta sigue adelante en su maduración hacia **linfocito B naïve maduro** (10). Esta célula coexpresa SmIgM y SmIgD, ha perdido la expresión de CD10, CD38 (Figura 1) y posteriormente también de CD5 (6), y finalmente abandona la MO a través de las venas del endotelio alto para alcanzar la SP y dirigirse a los órganos linfoides secundarios.

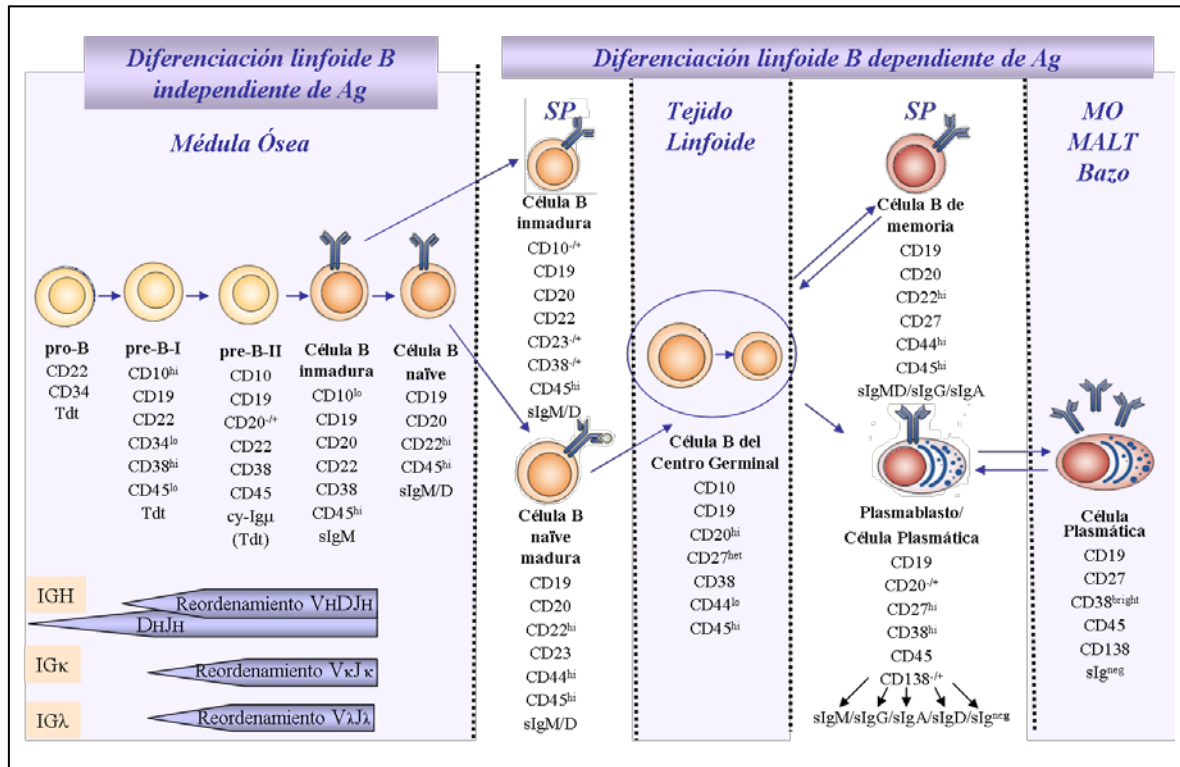


Fig 1. Maduración linfoide B. Características inmunofenotípicas de los diferentes estadios de maduración de la célula B de humanos en la médula ósea, sangre periférica (SP) y órganos linfoides secundarios. Las barras horizontales representan las fases de la diferenciación B en las que se produce reordenamiento de las cadenas pesadas (IGH) y ligeras (κ y λ) de las inmunoglobulinas durante el proceso de maduración (Adaptada de Pérez-Andrés et al(29) y van Zelm et al(7))

1.2. - Maduración linfoide B dependiente de Ag

La célula B naïve CD27⁻CD20⁺CD19⁺CD38⁻sIgM⁺sIgD⁺ (Figura 1) que sale de la MO, circula a través de SP y entra en los órganos linfoides secundarios (por ejemplo, a través de las venas endoteliales llega a en la zona T del GL), donde puede encontrarse o no con su Ag. En el caso que no haya interacción con el Ag, el linfocito B naïve abandona el GL a través de las venas linfáticas y recircula continuamente entre la SP y los órganos linfoides secundarios, muriendo por apoptosis al cabo de varios días. Por el contrario, si la célula B naïve reconoce a su antígeno presentado por las células dendríticas foliculares (CDF) y entra en contacto con células T activadas específicas de

Ag, se activa y migra al CG (2, 3), donde las células B están continuamente migrando entre la zona oscura (rica en **centroblastos**) y la zona clara (rica en **centrocitos**) (30). En la zona oscura la célula B sufre una proliferación intensa y rápida y en ella tienen lugar los procesos de hipermutación somática (HMS) de *IGV* y el cambio del isotipo de *IGH*; en la zona clara la célula B se reencuentra con el Ag, produciéndose la maduración de la afinidad de su BCR por el mismo; con ello se aumenta la supervivencia y proliferación de aquellos clones de células B que presentan una elevada afinidad del BCR por el Ag inductor de la respuesta B (2, 3).

En la actualidad podemos distinguir los linfocitos B del CG de otras células B del GL, gracias a que las primeras expresan un patrón de proteínas diferente. En concreto, los linfocitos B del CG expresan niveles más elevados de CD10, CD38, CD95 y HLADR, junto a menor cantidad de CD44 y *Cybcl2*; todo ello, junto a la positividad heterogénea de marcadores relacionados con la maduración del compartimento de células B efectoras/memoria (como CD27), permite distinguir las células B del CG de los linfocitos B *naïve*, las células B de memoria y los plasmablastos (2). Además, se ha sugerido que los centroblastos expresan CXCR4 (31) y CD77 (32) de forma más intensa que los centrocitos, si bien no se ha llegado a un consenso sobre cuáles son las diferencias fenotípicas exactas entre estas dos subpoblaciones de linfocitos B del CG (2).

Como hemos mencionado previamente, la célula B que tiene una afinidad incrementada por su Ag, abandona el CG y puede diferenciarse bien hacia **linfocito B de memoria** (que permanece mayoritariamente en lugares de drenaje de Ag, como la zona marginal del bazo y de los folículos linfoides, y el epitelio de las mucosas de las amígdalas, y una minoría recircula a través de la SP) o bien hacia **plasmablastos**, que a su vez se diferencian a **CP** productora de anticuerpos (Ac) (8). La diferenciación del

linfocito B hacia una célula secretora de Ac se promueve tras la sobreexpresión de factores de transcripción como el factor regulador de interferón 4 (irf-4), la proteína de maduración inducida por linfocito B (Blimp) y la proteína 1 de unión de segmentos X (Xbp-1), que reprimen a los factores de transcripción Pax-5, bcl6 y mitf (factor de transcripción asociado a microftalmia). Este nuevo programa de expresión génica inhibe futuros procesos de hipermutación somática y de cambio del isotipo de la cadena pesada de la Ig, estimulando la secreción de Acs junto a cambios en el patrón de expresión de proteínas de la superficie celular y en las propiedades de “*homing*” de la célula B (3, 33).

La CP es una célula efectora terminalmente diferenciada, que muere por apoptosis al cabo de unos días, a no ser que logre asentarse en nichos específicos de la MO o en tejidos tipo MALT, donde se induce su supervivencia y mantiene de forma prolongada su capacidad de secreción de Acs (33). El compartimento medular de CP tiene unas características fenotípicas bien definidas, claramente diferentes al resto de los compartimentos linfoides B. Así, junto a la elevada expresión de CD38 y la positividad para CD138 y CyIg (habitualmente de tipo IgG o IgA y en menor proporción IgM), la célula plasmática normal de MO carece de reactividad para la mayoría de los antígenos asociados a línea B (CD5⁻, CD20⁻/FMC7⁻, CD22⁻, CD23⁻, CD24⁻, CD25⁻, CD79b⁻), excepto CD19, CD21, CD27 y CyCD79a (34-36). Además, la CP expresa Blimp1, una proteína que desempeña un papel clave en la diferenciación del linfocito B a CP productora de Acs (33, 37). Una proporción variable de CP normales de MO puede expresar de forma débil marcadores asociados a otras líneas hematopoyéticas, como CD13, CD28, CD33 y CD56 (34, 38-40).

Además de estar presentes en los tejidos linfoides referidos, gran parte de las poblaciones linfoides B descritas en este apartado circulan también en sangre, donde por

tanto podemos encontrar poblaciones en tránsito: aquellas que acaban de salir del órgano linfoide primario (linfocitos B inmaduros y *naïve*) o que simplemente no han reconocido antígeno (linfocitos B *naïve*), y poblaciones linfoides B post-CG (células B de memoria y CP). Teniendo en cuenta que este trabajo de tesis doctoral se centra en la detección y caracterización de células B aberrantes/clonales en muestras de sangre periférica, consideramos conveniente revisar en más detalle en esta introducción la distribución y las características fenotípicas más relevantes de las subpoblaciones linfoides B presentes en la SP de adultos, como marco de referencia a la hora de poder identificar alteraciones en estos compartimentos de células linfoides B circulantes.

1.3. - Identificación y caracterización de subpoblaciones linfoides B de SP de adultos sanos

1.3.1. - Identificación y distribución relativa de las poblaciones linfoides B presentes en SP de adultos sanos

La subpoblación de linfocitos B más representada en SP normal de adultos son los **linfocitos B maduros *naïve***, que constituyen entre 60% y 70% de todas las células B circulantes. Estas células se caracterizan por coexpresar SmIgM y SmIgD, son CD27⁺ y carecen de mutaciones somáticas en la región *IGH*. Por el contrario, los **linfocitos B de memoria** ($\approx 30\%$ - 40% de todas las células B de SP) han sufrido fenómenos de HMS y aproximadamente la mitad de ellos muestran además cambio de isotipo de *IGH*, reflejado en la expresión de SmIgA y SmIgG en entre 20% y 25% de las células B de memoria de SP de adulto (41, 42). La otra mitad de las células de memoria coexpresan SmIgM y SmIgD; recientemente se ha identificado además, dentro de las células B de

memoria SmIgM⁺ una población minoritaria con mutaciones somáticas, caracterizada por expresar únicamente smIgM en ausencia de smIgD (smIgM⁺smIgD⁻) (43).

Desde el punto de vista fenotípico, la identificación de los linfocitos B de memoria se ha basado durante mucho tiempo en la expresión de CD27 (44), ya que la expresión de este marcador se correlaciona de forma directa con la presencia de mutaciones somáticas en los genes de las Ig (41, 45, 46). No obstante, recientemente se han identificado subpoblaciones de linfocitos B de memoria SmIgG⁺ y SmIgA⁺ que son CD27⁻ (47); en concreto, alrededor de 20% de las células B de memoria sIgG⁺ y 10% de las células B de memoria sIgA⁺ de SP de adultos sanos, no expresan CD27 (29). Actualmente se desconoce el origen concreto de estas células B de memoria CD27⁻ y su relación con los linfocitos B de memoria CD27⁺; no obstante, datos preliminares sugieren que la frecuencia de mutaciones somáticas es más baja en las poblaciones CD27⁻ y que podría deberse a mecanismos de generación de memoria diferentes a la vía clásica del centro germinal (47, 48). Recientemente se han identificado en humanos subpoblaciones de LB de memoria sIgE⁺(48); no obstante, estudios realizados en modelos murinos sugieren que las CP secretoras de IgE podrían originarse directamente a partir de LB de memoria SmIgG1⁺ (49), aunque esta posibilidad sigue siendo motivo de controversia y está por demostrar de forma definitiva (50).

Además de los linfocitos B *naïve* y de memoria, también pueden identificarse en la SP de adultos células de línea B con características morfológicas, fenotípicas y funcionales de CP (51-53). Esta subpoblación es muy minoritaria, ya que representa aproximadamente el 1%-3% (1-5 células/ μ L) del total de células B circulantes en adultos sanos, en condiciones normales (29, 51-53). Se cree que la mayoría de estas células corresponden a **plasmablastos** recién generados en los GL, que circulan en la

sangre durante un corto periodo de tiempo, hasta que puedan alcanzar un nicho en la MO, bazo o tejido MALT (54).

Junto con estos plasmablastos, en ciertas condiciones de activación inmune también es posible detectar **CP maduras** circulantes que han abandonado la MO y las mucosas (51, 52). A diferencia de lo que ocurre con los linfocitos B de memoria, la IgA es la inmunoglobulina de superficie (sIg) más frecuentemente expresada por el plasmablasto/CP de SP (50%-80%), lo que sugiere que la mayoría de éstas CP circulantes podrían originarse en respuesta a productos de bacterias comensales de la mucosa gastrointestinal (51, 55); alrededor de 20% y 15% de las CP circulantes, expresan SmIgM y SmIgG, respectivamente, mientras que entre 15% y 20% de los plasmablastos/CP circulantes de SP no expresan sIg (Figura 1) (29, 51, 53). Además, recientemente se ha descrito la presencia de plasmablastos/CP sIgD⁺ sIgM⁻ (<5% del compartimiento de plasmablastos/CP) en la SP de adultos sanos (53), cuya presencia se ha asociado con respuesta inmune en vías respiratorias altas (55).

Además de todas las poblaciones linfoides B antes referidas, en la SP de adultos sanos se detecta también de forma sistemática, aunque en muy baja frecuencia (del 2%-4% del total de células B en adultos; alrededor de 1-5 células/ μ L) **linfocitos B inmaduros** (Figura 1) (29, 42, 53). Estas células se identificaron inicialmente como la contrapartida fenotípica de las llamadas células B "transicionales" del ratón, y hoy se sabe corresponden a linfocitos B inmaduros que abandonan la MO durante el proceso de selección negativa. Así, estas células muestran características fenotípicas de un linfocito B SmIg⁺ inmaduro [CD19⁺, CD10⁺, CD24⁺, CD38⁺] que coexpresa SmIgM y SmIgD, carece de mutaciones de los genes *IGH* y presenta una capacidad *in vitro* para proliferar y diferenciarse a célula secretora de Ac claramente inferior a la de las células B *naïve* maduras (42, 56, 57). En realidad se trataría de un compartimento celular heterogéneo,

constituido por células que abandonan la MO y que pueden estar en diferentes fases de maduración, entre los estadios de célula B inmadura y de linfocito B *naïve* maduro (58). En este sentido, merece destacar que el número de linfocitos B inmaduros se encuentra aumentado en la SP de los niños (59, 60) y de pacientes con enfermedades autoinmunes y otras enfermedades de base inmunológica (p.ej. lupus eritematoso sistémico, inmunodeficiencia común variable y enfermedades linfoproliferativas ligadas al cromosoma X) y durante el proceso de regeneración de MO tras trasplante hematopoyético (61), generalmente asociado a una disminución del número de linfocitos B de memoria (42, 56, 57). Existe la posibilidad (aún no demostrada) de que en humanos algunas de estas células puedan concluir su maduración en la periferia, actuando como células B reguladoras humanas (62), o que puedan sufrir un proceso de transformación neoplásica. Finalmente, merece reseñar que este compartimento de células B inmaduras tiene una ratio κ/λ ligeramente más elevada que las otras subpoblaciones de células B circulantes (alrededor de 2,0 vs 1,5, respectivamente) (29).

1.3.2. - Caracterización inmunofenotípica de las poblaciones de células B de SP de adultos sanos

A continuación se describen de forma detallada las principales moléculas (de membrana y/o intracelulares) que expresan las distintas subpoblaciones linfoides presentes en la SP de adultos y descritas en el apartado anterior. La mayoría de las moléculas a las que haremos referencia se encargan de regular el desarrollo y contribuir a las funciones de las células B, como es el caso de los correceptores y otras moléculas asociadas al receptor para antígeno, las moléculas que participan en la interacción

linfoide B-T durante la respuesta inmune y moléculas que dirigen el tráfico de las células B, entre otras (1) (Figura 1 y Tabla 1).

Tabla 1. Características inmunofenotípicas de las diferentes subpoblaciones de células B presentes en SP (29).

	Antígeno	Linfocito B inmaduro/transicional	Linfocito B <i>naïve</i>	Linfocito B de memoria	Plasmablasto/CP
Moléculas asociadas a BCR	CD5	++	-/+	-	-
	CD19	+	+	+	+d
	CD20	++	++	++	+d/-
	CD21	+ / ++	++	++	-
	CD22	+	+	+	-
	CD45	++	++	++	+ / ++
	CD81	++	+	+	+
	sIgH	++	+	++	+d/-
Moléculas asociadas a la respuesta inmune B dependiente de célula T	CD23	-/+	-/+	-	-
	CD25	-	-	+	-
	CD27	-	-	+	++
	CD40	++	++	++	+
	CD86	-	-	-	+
	CD95	-	-	-/+	+
	CD200	ND	+	-	ND
HLA-DR	++	++	++	+ / ++	
Moléculas que dirigen el tráfico de la célula B	CCR6	+	+	+	-
	CXCR4	-/+d	+	+	-/+d
	CXCR5	+	+	+	-/+d
	CD138	-	-	-	-/+d
Receptores de tipo <i>toll</i>	TLR9	ND	+	++	++
Otras moléculas asociadas a línea linfoide B	CD10	+	-	-	-
	CD24	+	+d	+	-
	CD38	+	-/+d	-/+d	++ / +++
	CD43	-	-	-	+
	CD53	+	+	++	+d

Intensidad de expresión: (-) negativo; (+d) positivo débil; (-/+) expresión heterogénea de negativo a positivo; (+) positivo; (++) positivo fuerte; (+++) positivo muy fuerte; ND: no descrito.

1.3.2.1. - Moléculas asociadas a BCR

Entre las proteínas de membrana más relevantes asociadas al BCR (SmIg/CD79 α/β), cuya función es clave en la transducción de señales a partir del reconocimiento antigénico mediado por este receptor, se encuentran las moléculas

correceptoras CD19, CD21, CD81 y CD225, las proteínas coestimuladoras CD20 y CD45 (63, 64), y las moléculas CD5 y CD22 que se ha sugerido podrían actuar como reguladores negativos de la señalización a través de BCR (64-66).

Los **linfocitos B inmaduros** y los **linfocitos B naïve** de SP expresan ambos niveles elevados y homogéneos de la mayoría de las moléculas asociadas al BCR (p.ej.: CD19, CD20, CD22 y CD45). Se diferencian entre ellos porque los linfocitos B inmaduros expresan niveles más elevados de CD81 (53) y SmIgM y más bajos de SmIgD (29, 42, 53, 57) y CD21 (58) y muestran positividad homogénea para CD5 (42), en comparación con los linfocitos B naïve. Se ha sugerido -a partir de estudios en los que se observa una baja respuesta *in vitro* de los linfocitos B inmaduros mediada por BCR-, que la positividad para CD5 y la expresión débil de CD21 en esta población celular, podría inhibir su activación en la circulación periférica (42, 57). La gran mayoría (~90%) de los linfocitos B naïve son CD5⁻, aunque se sabe que un subgrupo minoritario de este compartimento celular expresa CD5, sin que se conozca hasta el momento si los linfocitos B naïve CD5⁺ son o no funcionalmente diferentes de los CD5⁻.

La expresión de moléculas asociadas a BCR en la subpoblación de **linfocitos B de memoria** circulantes es muy similar a la de los linfocitos B naïve, con la excepción de CD5, ausente en las células de memoria (29, 53). En general, la mayoría de los LB circulantes (naïve y de memoria) expresan CD21 de forma intensa, si bien un porcentaje minoritario de ambas subpoblaciones (≈3% de los linfocitos B naïve y 4% de los linfocitos B de memoria) son CD21^{+débil} (67); este rasgo se asocia además a un fenotipo ligeramente diferente de los linfocitos de memoria CD21^{+débil} respecto a los CD21^{+/+}: células CD11c⁺/CD95⁺/CD23⁻ vs. CD11c⁻/CD95⁻/CD23^{-/+}, respectivamente (29).

En los **plasmablastos/CP** circulantes la expresión de moléculas asociadas a BCR es muy baja o está ausente. Así, estas células expresan de forma débil SmIg (el 15% de las CP de SP son incluso SmIg⁻), CD19 y CD45, en ausencia de reactividad para CD5, CD20, CD21 y CD22. Una excepción sería CD81, que permanece positivo en los plasmablastos/CP de SP (53).

1.3.2.2. - Moléculas asociadas a la respuesta inmune B dependiente de células T

Los **linfocitos B inmaduros, naïve y de memoria** expresan niveles elevados y homogéneos de la proteína coestimuladora CD40 y de las moléculas HLA de clase II (p.ej.: HLADR) (42, 53); por el contrario, no expresan la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25), que solo estaría presente en un pequeño subgrupo de linfocitos B de memoria (53, 68). La distinción entre células *naïve* y de memoria -en lo que respecta a la expresión de este grupo funcional de moléculas-, puede hacerse gracias a su diferente patrón de expresión de CD27, CD23 y CD200. Como hemos mencionado anteriormente, la mayoría de los linfocitos B de memoria son positivos para CD27 (41, 46), mientras que las células inmaduras y *naïve* son CD27⁻. A su vez, CD23 se expresa en la mayor parte (~70%) de los linfocitos B inmaduros y en una subpoblación de los LB *naïve*, siendo negativo en el compartimento de células B de memoria. Finalmente, los linfocitos B inmaduros y *naïve* son CD200⁺, mientras que las células B de memoria son mayoritariamente CD200⁻.

El compartimento de **plasmablastos/CP** circulantes muestra un cambio claro en el perfil de expresión de las moléculas asociadas a la respuesta B timodependiente vs. los linfocitos B *naïve* y de memoria (53); así, estas células pasan a expresar niveles más

bajos de CD40, carecen de CD25, expresan HLADR de forma heterogénea, y muestran una expresión elevada de las moléculas coestimuladoras CD27 y CD86 (53). Además, la mayoría de los plasmablastos/CP de SP son CD95⁺ (53), en contraposición con los linfocitos B de memoria circulantes, que no expresan este receptor de muerte, lo cual probablemente es reflejo de que las células efectoras de vida corta (como los plasmablastos) están programadas para morir (69), a no ser que encuentren un nicho de supervivencia (p.ej.: en la MO) (70).

1.3.2.3. - Moléculas que dirigen el tráfico de las células B

El tráfico fisiológico de los linfocitos B hacia diferentes tejidos -como el de los leucocitos en general-, está dirigido por las quimiocinas, de manera que ciertas combinaciones de quimiocinas y sus receptores orientan a las células B hacia tejidos específicos del organismo (71). A modo de ejemplo, las quimiocinas CXCL12 (SDF-1), CXCL13, CCL20 y CCL19 atraen a los linfocitos B que expresan sus receptores (CXCR4, CXCR5, CCR6, y CCR7, respectivamente) hacia el GL (71). De forma similar, CXCR4 puede dirigir al linfocito B hacia la MO en respuesta a la secreción de CXCL12 por parte de las células del estroma medular (70, 71), mientras que CCR9 y CCR10 participan en el *homing* de los linfocitos B hacia los tejidos periféricos (p.ej.: tejido MALT) atraídos por las quimiocinas CCL25 y CCL28 (51), y CXCR3 dirige a los linfocitos B a zonas de inflamación (71).

Como cabría esperar, las distintas subpoblaciones de linfocitos B circulantes presentan patrones de expresión de receptores de quimiocinas diferentes. Los **linfocitos B naïve** y las **células B de memoria** circulantes expresan CXCR4, CXCR5, CCR6 y CCR7, siendo en éstas últimas la intensidad de expresión de estos receptores un poco

menor (53, 72). Así mismo, los **linfocitos B inmaduros** de SP expresan CCR6 (53) y con menor intensidad, también CXCR4 y CXCR5 (56). Por el contrario, en las **CP** de SP se observa una expresión heterogénea (de negativo a positivo débil) de CXCR4, CXCR5 y CCR6 (53, 55, 73). Además, algunos autores han descrito un aumento en la expresión de CCR9 y CCR10 en los **plasmablastos** circulantes (51, 52, 73), aunque este hallazgo no ha podido ser confirmado por otros grupos (53).

1.3.2.4. - Receptores de señalización tipo *toll*

Los receptores tipo *toll* o TLR (*toll-like receptors*) son un grupo de glicoproteínas que reconocen patrones moleculares altamente conservados, presentes en microorganismos patógenos (*pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*). Este mecanismo de reconocimiento permite a la célula poner en marcha un sistema rápido de defensa, aunque inespecífico, complementario pero diferente del inducido por BCR. No obstante, la señalización a través de estos receptores refuerza la activación del linfocito B y otras células inmunes que contribuyen a la respuesta específica (74). Hasta la fecha se han descrito 13 subtipos distintos de TLR en mamíferos (incluidos humanos), que se designan desde TLR1 a TLR13. Las células B humanas expresan en la membrana TLR1 y TLR6-10 (74) y presentan niveles intracelulares elevados de TLR9 (14). TLR9 es una proteína endosomal que reconoce secuencias citidina-guanidina no metiladas (nucleótidos CpG); en el linfocito B del CG, las secuencias CpG procederían de Ags procesados internamente, después de su reconocimiento específico a través del BCR (74). El hecho de que los linfocitos B de memoria/efectores expresen niveles intracitoplasmáticos de TLR9 más elevados que las células B *naïve* (14), junto con la observación de que TLR9 no necesita activar BCR para promover el cambio de isotipo

de la Ig en los linfocitos B de memoria (75), sugieren que este receptor podría tener un papel relevante durante la respuesta inmune secundaria.

1.3.2.5. - Otras moléculas asociadas a línea linfoide B

Las moléculas CD10, CD24 y CD38 intervienen en la señalización intracelular de la célula B, y característicamente se sobreexpresan de forma transitoria durante su maduración, tanto en la MO como en el CG (Tabla 1). Respecto a sus funciones, CD10 y CD38 tienen actividad enzimática sobre ciertos péptidos de señalización (CD10) (76) y Ca^{2+} (CD38) (77), induciendo un cambio en su concentración intracelular; CD24 parece estar asociado con la restricción de señales de activación de la célula B a partir de receptores no específicos de Ag (p.ej.: TLR) (78). La molécula CD53 es una tetraspanina que proporciona una señal positiva de supervivencia celular (79), aunque su ligando y las etapas de desarrollo de la célula B en las que participa permanecen aún sin definir de forma precisa. Así mismo, se ha señalado que la molécula CD43 actuaría como un marcador de activación B, pero restringido a los compartimientos de CP y precursores Pro-B (80).

Las células B inmaduras de SP conservan marcadores que son sobreexpresados durante las fases tempranas del desarrollo de la célula B en la MO (CD10, CD24 y CD38), y dejan de expresarlos (CD38/CD10) o los expresan de forma débil (CD24) en los LB *naïve* y de memoria (42, 53). Así, cuando las células B inmaduras abandonan la MO, las moléculas CD10, CD38 y CD24 pasan a expresarse de forma heterogénea a lo largo de las etapas siguientes de su maduración (expresión intensa en las células más inmaduras, y más baja a medida que se diferencian hacia linfocitos B *naïve*); posteriormente, CD10 y CD38 vuelven a expresarse en el linfocito B del centro

germinal, de forma transitoria (CD10) o con intensidad progresivamente más alta en su diferenciación a CP (CD38). De forma similar, CD53 se expresa de forma intensa en los LB *naïve*, y su expresión va disminuyendo a medida que la célula madura hacia CP (81). Por el contrario, los linfocitos B circulantes inmaduros, *naïve* y de memoria son CD43⁻, mientras que las CP son CD43⁺ (53).

1.3.2.6. - Diferencias fenotípicas entre plasmablastos y CP

Desde el punto de vista fenotípico, se han identificado algunas diferencias entre las CP que se encuentran en nichos de la MO y los plasmablastos/CP circulantes en la SP. Los plasmablastos/CP circulantes expresan de forma débil y homogénea CD19 y CD45, expresan de forma heterogénea SmIg, CD20 y CD138, son CD56⁻ y muestran unos niveles de CD38 ligeramente más bajos, en comparación con las CP de MO (Figura 1 y Tabla 1) (51-53); además, más del 75% de los plasmablastos/CP circulantes expresan SmIg de forma débil (53). Por el contrario, las CP de MO se caracterizan por la ausencia de marcadores pan-B (p.ej.: CD20 y CD22), expresión heterogénea de CD19 y CD45, expresión fuerte de CD38 y CD138, y son SmIg⁻; además, una pequeña parte de ellas expresan CD56 de forma débil (82, 83).

Pese a estas diferencias fenotípicas, en la SP resulta complicada la distinción entre los plasmablastos recién generados en órganos linfoides secundarios y las CP que abandonan la MO y recirculan en SP (53). Aún así, estudios recientes han observado que en la SP de sujetos sanos se diferencian dos poblaciones de CP con distinta expresión de CD138 (CD138⁺ y CD138^{-/+d}); las CP que expresan esta molécula de forma más intensa muestran un perfil fenotípico característico de una célula más madura (expresión más fuerte de CD38 y CyIg, y expresión más débil de CD45) (53). Sin

embargo, merece reseñar que ambos compartimentos celulares (tanto los plasmablastos recién generados como los plasmablastos/CP circulantes) expresan el marcador de proliferación Ki-67 de forma intensa (53), lo que sugiere que estas células aún no han completado su maduración. A su vez, los plasmablastos recién generados después de una vacunación específica (p. ej.: con toxina tetánica) son CD38⁺⁺/CD138⁺/CD20⁻, comparado con el grupo de plasmablastos/CP circulantes presentes de forma sistemática en la SP de sujetos sanos no vacunados (52). Por tanto, la expresión de CD138 parece estar más relacionada con la maduración post-CG (53) o la migración hacia la MO (84), que con la discriminación entre los plasmablastos recién generados que salen de los órganos linfoides secundarios y las CP circulantes que abandonan la MO.

1.4. - Linfocitos B y senescencia

1.4.1. - **Concepto de inmunosenescencia**

El término **inmunosenescencia** hace referencia a los cambios estructurales y funcionales del sistema inmune relacionados con la edad avanzada; estos cambios se manifiestan en una disminución evidente de la respuesta frente a las infecciones a medida que avanza la edad (la infección es la tercera causa de muerte en sujetos mayores de 65 años), en un aumento de la susceptibilidad a padecer cáncer y en un incremento de la incidencia de enfermedades autoinmunes (85-87)

En los últimos años se han realizado numerosos estudios centrados en conocer en profundidad los mecanismos de senescencia inmune, la mayor parte de los cuales se han llevado a cabo en modelos murinos (88-92). Si bien es verdad que muchos de ellos han contribuido enormemente a que conozcamos mejor los eventos que inducen

respuestas inmunes deficientes, sabemos que existen diferencias entre el ser humano y el ratón, por lo que sería necesaria una comprensión clara de estas diferencias para poder extrapolar conceptos de una especie a otra (85). A su vez, el conocimiento preciso de los mecanismos que llevan a la inmunosenescencia en el ser humano constituiría la base fundamental para el desarrollo de estrategias encaminadas a paliar los efectos de la edad sobre la función inmune. En los siguientes apartados de esta Introducción se revisan específicamente los cambios relacionados con la inmunosenescencia de los linfocitos B, así como los mecanismos moleculares involucrados conocidos hasta la fecha, y las consecuencias de estos cambios sobre su función en la respuesta inmune.

1.4.2. - Cambios en la distribución de las subpoblaciones linfoides B relacionados con la edad.

En ratones ancianos se ha descrito una disminución evidente de los progenitores comprometidos hacia la línea linfoide B (88, 93, 94), pese a que en términos globales el número de CPH se encuentra incrementado con la edad (95). Aunque no se conocen bien los mecanismos subyacentes que explican este cambio, se ha sugerido que la reducción del número de progenitores linfoides a medida que avanza la edad sería consecuencia de una combinación de factores, entre los que cabe destacar: (a) factores intrínsecos de la CPH (96), ya que se ha visto en ratones ancianos que el perfil de expresión génica de estas células está fundamentalmente orientado hacia genes que promueven su compromiso hacia la línea mieloide, y; (b) factores dependientes del micromedioambiente de la MO, ya que se ha referido que las células estromales de MO de ratones ancianos tiene una capacidad de producción de IL-7 disminuida respecto a la de las células estromales de ratones jóvenes (97), posiblemente unida a una menor

sensibilidad de los progenitores linfoides a la IL-7 (98). Además se ha referido que la expresión de Rag-2 en las células Pro-B murinas se vería influenciada por el ambiente medular (99). La contribución relativa de todos estos factores es aún bastante imprecisa. En cualquier caso, lo que sí está claro es que el envejecimiento se asocia con una reducción en la liberación de células B desde la MO, que a su vez conlleva una disminución en la producción de linfocitos B maduros, con un mantenimiento paradójico del número total de linfocitos B (89); esto se ha achacado, bien a una disminución de la migración de los linfocitos B maduros al bazo y otros órganos linfoides secundarios y un aumento en su retorno a la sangre (89), bien a una posible expansión homeostática de aquellos linfocitos B que han reconocido Ag, como los linfocitos B de memoria y los linfocitos B de la zona marginal (ZM). (93)

Frente a la amplia información disponible en el ratón, los trabajos realizados en este campo en el ser humano son mucho menos numerosos. Además, en estos últimos estudios se pone de manifiesto, en contraposición con lo descrito en el modelo murino, que el porcentaje y número absoluto de linfocitos B totales circulantes disminuye claramente con la edad (100-102), aunque existe una gran variabilidad entre los diferentes sujetos analizados (donantes sanos) (103-105). La literatura es menos clara (e incluso contradictoria) en lo que se refiere a los cambios en la distribución de las subpoblaciones de linfocitos B con la edad. Así, algunos trabajos sugieren que el número de linfocitos B de memoria (identificados de forma genérica como células CD19⁺/CD27⁺) aumenta (106, 107), mientras que otros estudios encuentran una disminución de este compartimento celular (100-102) a medida que avanza la edad. Algo similar ocurre con la subpoblación de linfocitos B de memoria que no han sufrido cambio isotópico (células CD19⁺IgM⁺IgD⁺CD27⁺): mientras unos grupos han visto que esta población está reducida en la SP de personas de edad más avanzada (108), otros

autores no han encontrado diferencias numéricas significativas en esta población celular entre jóvenes y ancianos (101). En contrapartida, parece más claro que los linfocitos B de memoria que han experimentado el cambio isotípico (definidos como células SmIgD⁻CD27⁺) estarían reducidos (en números relativos y absolutos) en el anciano (101, 108); por el contrario, trabajos recientes sugieren que la población de linfocitos B de memoria SmIgD⁻CD27⁻ (47, 109) estaría aumentada en individuos ancianos (107).

Todas estas discrepancias pueden deberse, al menos en parte, a las diferentes técnicas empleadas para el análisis de los linfocitos B y sus subpoblaciones mayoritarias -incluyendo el empleo de distintos criterios de identificación de las subpoblaciones linfoides B-, además de otros factores dependientes de las series estudiadas, como diferencias en la distribución de los grupos de edad, en el tamaño de la cohorte y en el origen étnico de las poblaciones incluidas en el estudio y el área geográfica de la que proceden.

1.4.3. - Cambios moleculares relacionados con la senescencia de células B

En los procesos de desarrollo, maduración, mantenimiento y función de los linfocitos B intervienen múltiples vías de señalización, que al ponerse en marcha activan una serie de factores de transcripción, que finalmente conducen a la expresión de los genes necesarios para cada proceso. Pese al papel fundamental de las proteínas de señalización y los factores de transcripción en el control de cada etapa de diferenciación de la célula B, la información disponible en el momento actual sobre la expresión y función de estas moléculas en el proceso de senescencia de los linfocitos B en humanos, es muy escasa (85).

Existen algunos datos obtenidos de modelos murinos, a partir de estudios centrados en analizar los procesos de hipermutación somática y cambio isotípico en función de la edad. Frasca y cols (110) demostraron que las células B esplénicas de ratones ancianos estimuladas con anti-CD40 e IL-4 tenían una menor capacidad de realizar el cambio de isotipo de Ig, en comparación con células B de ratones jóvenes. Este defecto se asoció a la enzima AID (citosina deaminasa inducible por activación), ya que vieron que su actividad estaba muy reducida en ratones mayores (110). Estos mismos autores demostraron en un trabajo posterior (111) que el defecto de la enzima AID dependería de un déficit de expresión del factor de transcripción E47 (fundamental para inducir la activación de AID) (110), a su vez condicionado por un aumento en la expresión de la proteína tristetraprolina (un regulador negativo de la estabilidad del ARNm de E47), observada en los linfocitos B de ratones ancianos (112).

En humanos también se han llevado a cabo algunos estudios moleculares sobre la capacidad de respuesta funcional de los linfocitos B, en relación con la edad. Así, la respuesta proliferativa B a través de la vía de CD40 parece estar disminuida con la edad (113). También se sabe que en donantes sanos con edad más avanzada, los linfocitos B estimulados *in vitro* (con anti-CD40 e IL-4) tienen una capacidad significativamente menor de secreción de IgG, y de realizar el cambio de clase de Ig, respecto a células B de sujetos jóvenes. Al igual que en el ratón, estos hallazgos se han atribuido a una menor capacidad de inducción de AID, que posiblemente también sea consecuencia de un defecto de expresión del factor de transcripción E47 en células B de individuos ancianos (101), aunque los datos resultan más controvertidos que en el modelo murino. Por tanto, es posible que la regulación post-transcripcional de E47 sea un proceso multifactorial, que tiene como última consecuencia el fracaso del cambio isotípico observado en las células B de los sujetos ancianos.

La posibilidad de que exista un defecto inherente en la señalización a través de la vía de CD40/IL-4 de las células B senescentes -independiente de la función de E47-, no se ha investigado en profundidad. La expresión de CD40 no está reducida en las células B de ratones ancianos (114, 115) ni de humanos (116); sin embargo, la intensidad de la señal generada a partir de la estimulación de CD40 es progresivamente más débil, a medida que avanza la edad. (115). Así mismo, estudios recientes (117) realizados en ratones, han demostrado que el envejecimiento disminuye no sólo la respuesta sérica específica contra el virus de la influenza *in vivo*, sino también *in vitro*, asociándose a una menor expresión de AID a nivel de ARNm. De acuerdo con estos hallazgos, la expresión de AID en células B estimuladas podría predecir la capacidad de las células B para generar una respuesta óptima frente a la vacuna de la gripe.

Otros factores de transcripción que participan en los procesos de maduración de los linfocitos B también podrían tener un papel relevante en la inmunosenescencia B. Como hemos mencionado en apartados anteriores de esta introducción, entre los factores de transcripción relevantes en las etapas tempranas de la maduración B destaca PAX-5, también conocido como BSAP (*B-cell-specific activator protein*). Hasta la fecha, solo se ha estudiado el papel de PAX-5/BSAP en el proceso de senescencia de los linfocitos B en modelo murino, pero no en humanos. En estos trabajos, en los que se evaluó la expresión de ARNm de *PAX-5a* y de la proteína BSAP en ratones, no se encontró ningún cambio, ni en el estado del ARNm ni en los niveles de la proteína, entre ratones de 18-20 meses y ratones jóvenes (2 meses); sin embargo, sí se pudo comprobar que la capacidad de BSAP para unir secuencias de ADN en el promotor de CD19 estaba claramente disminuida en los ratones ancianos (118). Este último hallazgo podría contribuir a explicar la disminución de los progenitores comprometidos hacia la línea linfocítica B que se evidencia en ratones ancianos, y pone de manifiesto la

importancia de entender los cambios que ocurren en la expresión de los factores de transcripción de las células B, relacionados con la edad.

Más limitada aún, es la información de que disponemos acerca de los posibles cambios en la expresión y función de factores de transcripción que participan en etapas más tardías de la diferenciación linfoide B (p.ej.: *bcl6*, *irf4*, *xbp1* y *blimp1*) en relación con la inmunosenescencia. En el único trabajo publicado al respecto, realizado en modelo murino, se vio que la expresión de *blimp1* a nivel de ARN (inducido tras estimulación *in vitro* de linfocitos B con lipopolisacáridos) era similar en ratones jóvenes y ancianos (110).

En resumen, los resultados preliminares derivados de un número relativamente limitado de estudios recientes muestran la existencia de un defecto intrínseco en la capacidad de las células B de sujetos ancianos de llevar a cabo el proceso de recombinación somática para el cambio de isotipo de Ig. Así mismo, en relación con este defecto funcional, se ha constatado la existencia de una disminución o alteración funcional del factor de transcripción E47 como consecuencia del envejecimiento; esto podría ser debido a una disminución de la estabilidad del ARNm, la cual lleva a una disminución de AID, que a su vez se refleja en la disminución del cambio de clase de Ig en las células B activadas. Un mejor conocimiento de estos y otros cambios asociados a la inmunosenescencia B, resulta fundamental para el establecimiento de nuevas dianas diagnósticas y terapéuticas, cuya finalidad sea mejorar la respuesta inmune "humoral" no solo en ancianos, sino también en sujetos inmunodeprimidos y en el contexto de la respuesta inmune frente a vacunación (117).

1.4.4. - Impacto de la inmunosenescencia en la función B

Estudios recientes basados en la secuenciación de la región *CDR3* de *IGH*, han demostrado que el repertorio de los linfocitos B se va haciendo progresivamente más restringido a medida que avanza la edad, y que esta pérdida de diversidad resultaría de la expansión de algunos clones dentro de ese repertorio B más limitado (119). Desde hace tiempo se conoce que tanto en ratones como en humanos de edad avanzada, es frecuente detectar una Ig monoclonal en pequeña cuantía en plasma, situación que desde hace décadas se conoce con el término de "gammapatía monoclonal de significado incierto" (GMSI) (120, 121). En concreto, en humanos la GMSI tiene una prevalencia de alrededor del 2% en sujetos mayores de 50 años, aumentando hasta casi el 7% en sujetos por encima de los 80 (122). En el momento actual parece evidente que la GMSI constituye una condición previa al desarrollo de una neoplasia maligna de CP (mieloma múltiple) (123), habiéndose referido de hecho una tasa de progresión anual a mieloma de aproximadamente un 1%; no obstante, la gran mayoría de los sujetos con GMSI no llegan a desarrollar la neoplasia maligna. Inicialmente se sugirió que la GMSI podría resultar de la expansión de pequeños clones de linfocitos B reactivos (algunos trabajos describen incluso la presencia de expansiones oligoclonales linfoides B en estos pacientes), pero en el momento actual se desconoce el verdadero significado de la emergencia de estas poblaciones con la edad (124).

Además de la restricción progresiva del repertorio de células B, se ha sugerido que con el envejecimiento se deteriora también la capacidad de los linfocitos B para producir Ac eficaces. Experimentos realizados *in vitro* han demostrado que la secreción de IgG se reduce con la edad tanto en ratones (125) como en humanos (101). Sin embargo, *in vivo* se ha visto que en humanos la cantidad de IgG e IgA (pero no de IgM) plasmática aumenta con la edad, (126) a pesar de la reducción en el número de células B y de los defectos en el proceso de cambio de isotipo, antes descritos. Esta aparente

paradoja podría reflejar un aumento en la producción de Ac de baja afinidad en personas ancianas, o la activación de vías anómalas de señalización tras el reconocimiento antigénico. Además, se sabe que con la edad existe un aumento de niveles de autoanticuerpos (127); una posible explicación a esta observación es que exista un descenso del proceso de selección positiva, de manera que si el número de células B que se producen en la MO del anciano es progresivamente menor, habría menos competición por la supervivencia con un menor umbral para la selección de células B y el consiguiente incremento de células B autorreactivas. Alternativamente, la producción de autoanticuerpos podría ser consecuencia de un estímulo específico inducido por un Ag externo, ya que se ha comprobado que, en sujetos de edad avanzada se incrementan los niveles de autoanticuerpos en respuesta a la inmunización por influenza, de forma paralela a la detección de Ac específicos del virus (128).

La principal consecuencia práctica de estos cambios, en términos de estrategias de salud pública, es la pobre respuesta de los ancianos frente a la vacunación. La mayor parte de las vacunas anti-infecciosas disponibles son menos eficaces en los adultos de edad más avanzada que en los jóvenes, tanto en lo que se refiere a vacunas que inducen preferentemente una respuesta T (como la vacuna de la gripe) como a aquellas con respuesta predominantemente de anticuerpos (como la vacuna contra el *pneumococco sp*) (129).

2. - SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS B (SLPC-B)

2.1. - Concepto, clasificación y características generales

Los síndromes linfoproliferativos crónicos B (SLPC-B) constituyen un amplio grupo de enfermedades clínica y biológicamente heterogéneas, que tienen en común el originarse a partir de la expansión clonal de células linfoides B de apariencia morfológicamente madura, bloqueadas en estadios relativamente avanzados de su diferenciación (130-132). Esta expansión y acumulación celular puede cursar con expresión predominante en MO y/o en SP, o puede tener lugar preferentemente en los órganos linfoides secundarios (133). La relativa facilidad con la que puede accederse a la célula tumoral a partir de una punción venosa de SP, MO o tejido linfoide, junto con el desarrollo de una gran variedad de técnicas para el análisis de las características biológicas de dicha célula, han impulsado de forma notable los avances en el diagnóstico y evaluación pronóstica de los SLPC-B. Así, la clasificación diagnóstica actual de los SLPC-B incluye, además de los criterios clínico-biológicos, citomorfológicos e histológicos convencionales, la información derivada de los estudios inmunofenotípicos y de análisis genéticos/moleculares, para la definición de entidades diagnósticas concretas (133-137) (Tabla 2).

De igual manera, el término de SLPC-B con expresión leucémica engloba tanto las neoplasias linfoides crónicas B primariamente leucémicas como los linfomas leucemizados (135). De este modo, y de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), dentro de los SLPC-B primariamente leucémicos se incluyen la leucemia linfática crónica B (LLC-B), la leucemia prolinfocítica B (LPL-B), y la tricoleucemia (TL), tanto en sus formas clásicas como atípicas y variantes (134). En estas tres entidades habitualmente se infiltra primero la SP y/o la MO, aunque a menudo se observa también afectación del bazo y/o de los ganglios linfáticos (132). A su vez, entre los linfomas primarios que más frecuentemente cursan con leucemización, merece destacar el linfoma folicular (LF), el linfoma de células del

manto (LCM), el linfoma de la zona marginal esplénica (LZME), el linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) y el linfoma linfoplasmocítico (LLP)/macroglobulinemia de Waldeström (MW) (135); en estas entidades son habitualmente los ganglios linfáticos y/o el bazo, los órganos inicialmente afectados (132). El linfoma linfocítico de célula B pequeña (LLCBP), aunque debuta como un linfoma ganglionar, presenta características superponibles a la LLC-B, por lo que queda englobado en la clasificación de la OMS junto con esta entidad (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las neoplasias linfoides de células B maduras propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Adaptado de Harris, N.L., et al (134)

Leucemias crónicas de célula B maduras / periféricas

Leucemia linfática crónica de célula B/linfoma linfocítico de célula B pequeña
 Leucemia prolinfocítica de célula B
 Tricoleucemia

Linfomas de célula B maduras / periféricos

Linfoma de la zona marginal esplénica
 Linfoma de la zona marginal extranodal tipo MALT^a
 Linfoma de la zona marginal nodal
 Linfoma folicular
 Linfoma de células del manto
 Linfoma B difuso de célula grande
 Linfoma plasmablástico
 Linfoma de Burkitt
 Linfoma de célula B inclasificable
 Linfoma linfoplasmocítico/macroglobulinemia de Waldeström

Neoplasias de células plasmáticas

Mieloma múltiple / plasmocitoma

^a Tejido linfoide asociado a mucosas.

2.2. - Origen de los SLPC-B de acuerdo con la célula normal de la que derivan

Las células B neoplásicas de pacientes con SLPC-B reflejan en general las características de células B normales de distintos tejidos linfoides, bloqueadas en estadios concretos de la maduración B (138, 139). Por consiguiente, los estudios inmunofenotípicos de los SLPC-B han estado dirigidos a la identificación de aquellas características fenotípicas de las células neoplásicas que, por su similitud con las células normales, permiten establecer la línea B de la célula expandida y su correspondiente estadio madurativo (138, 139). Ello implica que para la correcta tipificación de los diversos SLPC-B se hace necesario el conocimiento de las características normales de las células B, no solo de SP o MO (cuyas características fenotípicas han sido descritas en los apartados anteriores de esta introducción), sino también de otros tejidos linfoides; en la actualidad, la información disponible acerca de las características fenotípicas de los linfocitos B de tejido linfoide normal o reactivo sigue siendo relativamente escasa. Pese a esta limitación, hoy se conoce que las células de la zona marginal del tejido ganglionar normal o reactivo, muestran un fenotipo $sIgM^+/sIgD^+$, expresan bcl2 citoplasmático de forma intensa y tienen positividad variable para los antígenos CD5, CD10, CD23 y CD27, junto a una baja expresión de CD20 y CD38 y negatividad para Ki-67 -fenotipo característico de linfocitos B maduros en reposo- (140). La heterogeneidad fenotípica de estas células se debe a la coexistencia de diferentes subpoblaciones de células B. Así, una pequeña proporción de linfocitos B expresa niveles elevados de $sIgD$ y CD23 junto a cantidades intermedias de CD21, constituyendo el grupo de células B foliculares vírgenes ($sIgD^{++}$, $sIgM^{+débil}$, $CD23^+$, $CD21^+$), mientras que la subpoblación mayoritaria presenta niveles elevados de CD21 y

CD1d correspondiendo a células de la zona marginal (ZM) (sIgM⁺⁺, sIgD^{+débil}, CD23⁻, CD21⁺⁺, CD1d⁺⁺) (141).

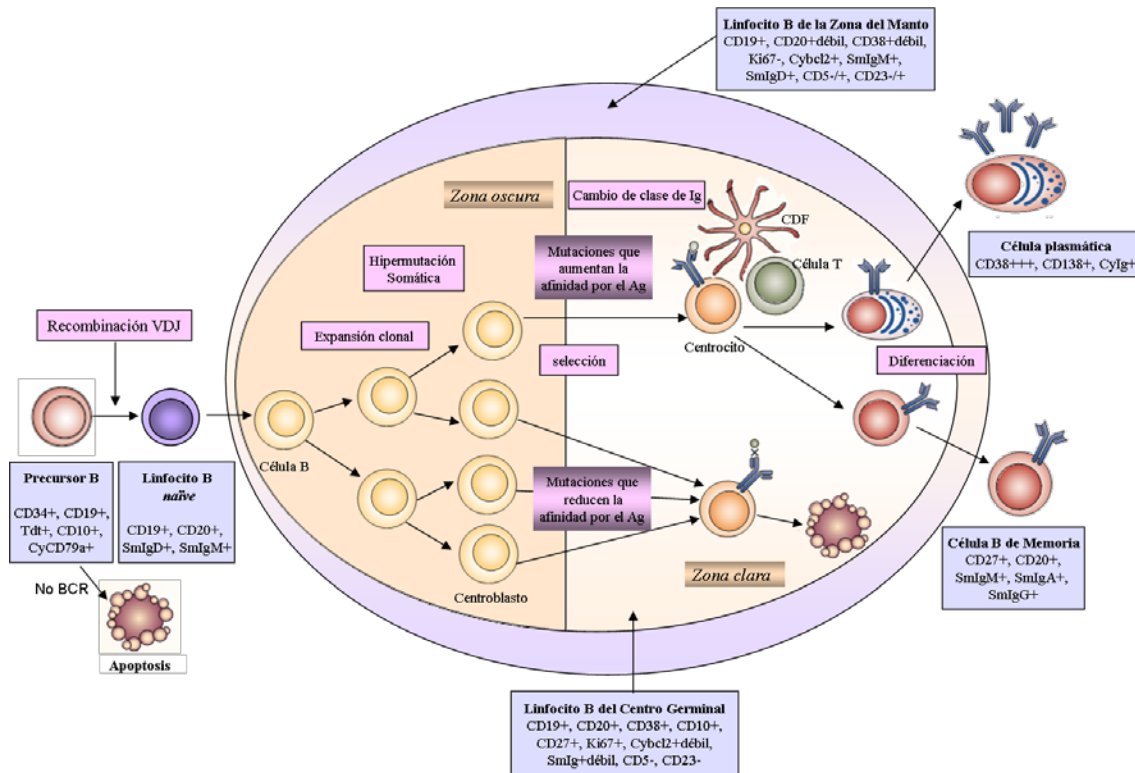


Fig 2. Diferenciación B en el Centro Germinal. Al entrar en el CG, las células B se activan y transforman en centroblastos que proliferan y maduran hasta convertirse en centrocitos. Estos eventos están acoplados a procesos de hipermutación somática de los genes de las Ig y al cambio de isotipo de la Ig producida. Las células B del CG que han acumulado mutaciones de Ig que incrementan su afinidad por antígenos son seleccionadas positivamente por los antígenos correspondientes y, por consiguiente, sobreviven y abandonan con éxito el CG. Por el contrario, las células que no son seleccionadas positivamente por antígenos sufren apoptosis dentro del CG y se eliminan. Las células que han abandonado el CG (células B post-CG) pueden tener uno de dos destinos: diferenciación a célula plasmática o diferenciación a célula B de memoria. Ag: antígeno; CDF, célula dendrítica folicular.

Tras el reconocimiento antigénico, la maduración de estas células depende de linfocitos T supone la formación del CG y la correspondiente transición de células B foliculares vírgenes a células efectoras (142). En el CG los linfocitos B son habitualmente CD5⁻ y CD23⁻ y muestran expresión débil de Smlg y bcl2 citoplasmático, junto a reactividad fuerte para CD10, CD20 y CD38 (Figura 2); además, estas células B pasan a expresar CD27 y tienen una elevada tasa proliferativa (45, 143). Por su parte,

las CP ganglionares tienen algunos rasgos fenotípicos diferentes de los plasmocitos de la MO, incluyendo expresión variable (de débil a intensa) de bcl2 citoplasmático, mayor proporción de células CyIgM⁺ y escasa reactividad para CD138 (29, 144).

De acuerdo con el modelo de la maduración linfoide B normal en lo que se refiere a si los linfocitos B han sufrido o no el proceso de hipermutación somática en los genes de Ig, se considera que los SLPC-B se originarían en células B que no han pasado por el CG (carentes de mutaciones en los genes de las Igs) o en células B del CG o post-CG (células B que han pasado a través del CG y que presentan mutaciones en los genes de las Igs) (Figura 3) (142, 145). Por ejemplo, el LF, el linfoma de Burkitt (LB) y el LBDCG serían SLPC-B derivados de las células B del CG, y de hecho muestran perfiles de expresión génica asociados a células B del CG, a excepción de algunos LBDCG cuyos perfiles de expresión génica se asemejan más a los encontrados en células B activadas *in vitro* (146, 147).

Como se muestra en la Figura 3, el CG está rodeado por una zona del manto compuesta por linfocitos B *naïve*, muchos de los cuales son CD5⁺. En el momento actual se piensa que la mayor parte de los LCM se originarían a partir de células B *naïve* CD5⁺ de la zona del manto; sin embargo, en aproximadamente 20-30% de los casos se detecta la presencia de mutaciones en los genes de la región variable de las Ig, lo que sugiere que la célula B ya habría pasado por el CG.

Finalmente, en la zona marginal de los órganos linfoides (Figura 3) se encuentra una población heterogénea de células B (cuyo origen es aún discutido), que incluye probablemente células B de memoria post-CG y células B *naïve* implicadas en la respuesta inmune independiente de células T. Actualmente se cree que los linfomas MALT (nodal y extranodal) derivarían de estas células B de la zona marginal. El LZME, comprende tanto a células B foliculares como células B de la zona marginal, y

en este linfoma a menudo los linfocitos B tumorales no presentan mutaciones en los genes de la región variable de las Igs (148).

Respecto a la LLC-B, el origen de la célula B tumoral ha sido muy debatido en el pasado. En aproximadamente la mitad de los casos las células B de la LLC-B presentan mutaciones en los genes *IGHV*, ausentes en la otra mitad de los pacientes. Actualmente se considera que las LLC-B que presentan genes *IGHV* mutados (en las que por tanto ya ha tenido lugar el proceso de hipermutación somática) derivarían de linfocitos B de memoria, presentes tanto en MO y SP como en los órganos linfoides secundarios, mientras que los casos no mutados presumiblemente derivan de células B *naïve* que no han pasado por el CG (149).

Aunque las células tumorales de los SLPC-B se asemejan fenotípicamente a las células B normales de su correspondiente estadio madurativo, es evidente que las células neoplásicas con frecuencia presentan alteraciones en los patrones de expresión de proteínas normales -fenotipos aberrantes- (150-152). En los SLPC-B, estas alteraciones fenotípicas consisten habitualmente en: i) expresión asincrónica de proteínas asociadas a maduración celular (asincronismos madurativos), ii) reactividad anormalmente elevada (sobre-expresión antigénica) o disminuida (sub-expresión antigénica) de un antígeno y/o iii) fenotipos asociados a características alteradas de dispersión de luz (FSC, dispersión frontal de luz o tamaño celular, y SSC, dispersión lateral de luz o complejidad interna de la célula) (150-152). A diferencia de lo que ocurre en las leucemias agudas, en los SLPC-B la expresión en las células neoplásicas de antígenos asociados a una línea celular distinta de la suya, constituye un hallazgo relativamente poco habitual (150-152).

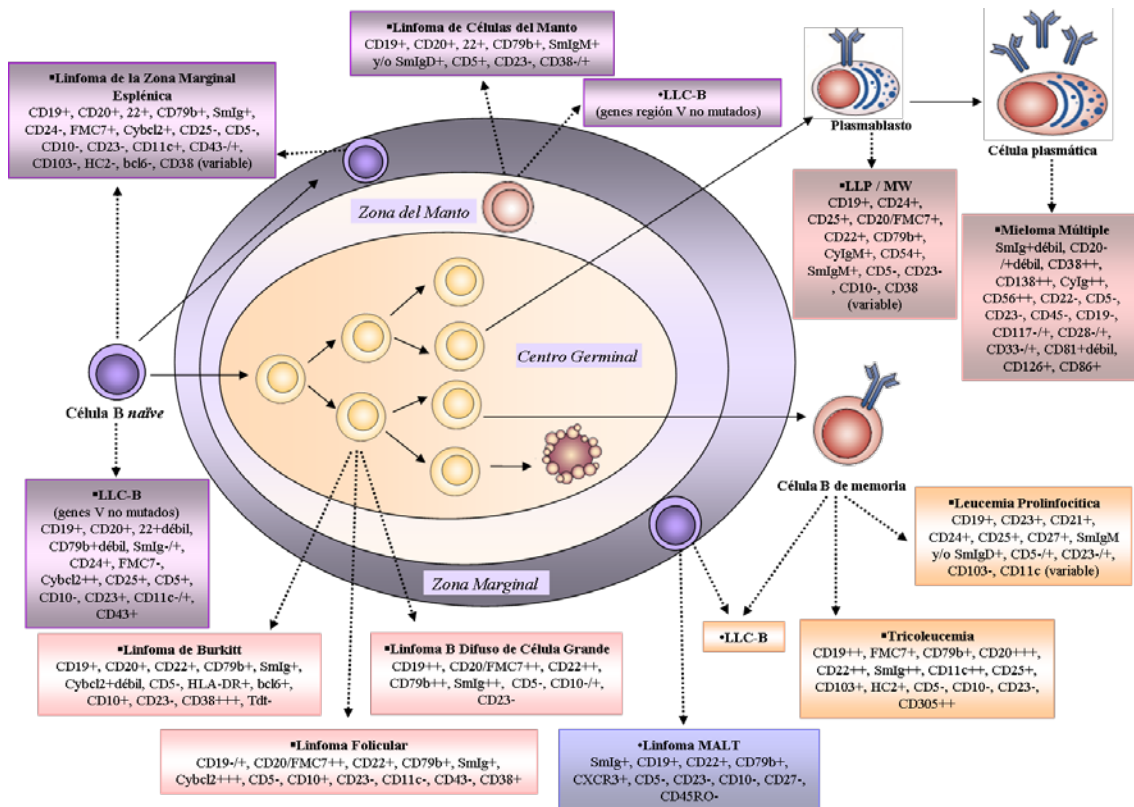


Fig 3. Origen celular de los síndromes linfoproliferativos crónicos B (SLPC-B). En función de las etapas de la maduración de las células B normales y de la ausencia o presencia de hipermutación somática, los SLPC-B pueden dividirse en: i) SLPC-B derivados de células B pre-CG y carentes de mutaciones en los genes de las Ig, (leucemia linfática crónica, linfoma de células del manto, y linfoma de la zona marginal esplénica), ii) SLPC-B derivados de células B que han pasado por el CG y que muestran mutaciones de Ig (linfoma folicular, linfoma B difuso de célula grande, linfoma de Burkitt), iii) SLPC-B derivados de células B post-CG (linfoma linfoplasmocítico, mieloma múltiple), y iv) SLPC-B derivados de células B de memoria (leucemia linfática crónica, tricoleucemia, leucemia prolinfocítica). Las líneas continuas indican etapas o estadios madurativos de la célula B normal y las líneas de puntos muestran los linfomas que presumiblemente se originarían a partir de cada estadio de la diferenciación normal. (Adaptado de Küppers (153))

Por todo lo anterior, en la actualidad la caracterización inmunofenotípica de los SLPC-B persigue no solo la identificación de las similitudes existentes entre la célula B neoplásica expandida y su contrapartida normal que permitan la identificación de la línea celular y estadio madurativo de la misma, sino también de sus diferencias (131). Estudios recientes en neoplasias de precursores B y algunos subtipos de SLPC-B sugieren que la expresión alterada de antígenos asociados a distintos estadios

madurativos en las células de pacientes con SLPC, podría reflejar alteraciones genéticas subyacentes o anomalías en la comunicación entre la célula expandida y su micromedioambiente (131).

En los apartados siguientes de esta Introducción se revisarán las características biológicas (fenotípicas, genéticas y moleculares) y los factores pronósticos más relevantes de los distintos SLPC-B, centrándonos especialmente en la LLC-B, que será nuestra referencia fundamental de estudio y comparación al revisar en la tercera sección de la Introducción de esta tesis doctoral a las *linfocitosis B monoclonales*.

2.3. - Leucemia linfática crónica de células B (LLC-B)

La LLC-B es un SLPC-B primariamente leucémico, caracterizado por la presencia de una linfocitosis monoclonal absoluta y progresiva $>5 \times 10^9$ células B/L. Estas células B presentan apariencia madura y se localizan en SP, MO y/u otros órganos linfoides (154). La LLC-B constituye la leucemia más frecuente en los países occidentales, de forma que representa aproximadamente el 30% de todas las leucemias y el 10% de todas las neoplasias hematológicas (155, 156), incrementándose claramente esta incidencia a medida que avanza la edad (157).

Aunque en la actualidad se desconocen las causas que originan la enfermedad, se sabe que la existencia de antecedentes familiares es uno de los factores de riesgo más evidentes que predisponen a padecer la neoplasia (158-160). En este sentido, entre el 6%-9% de los pacientes presentan antecedentes familiares de LLC-B (161-163), y alrededor del 9%-12% tienen antecedentes familiares de otros SLPC-B diferentes de la LLC-B (161-163). Estudios recientes han comparado las mutaciones de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGHV*) de pacientes con LLC-B

esporádica y familiar, y han comprobado que el repertorio de genes *IGHV* no presenta diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, lo que se ha interpretado como una evidencia de la existencia de un componente genético de la enfermedad, en lugar de una etiología medioambiental (164, 165); por otro lado, hasta la fecha siguen sin existir evidencias convincentes acerca del papel de los factores medioambientales relacionados con el desarrollo clínico de la enfermedad (155).

Desde el punto de vista clínico, la LLC-B es una enfermedad heterogénea, así, mientras que la mayoría de los pacientes que se diagnostican en la actualidad se encuentran asintomáticos, en ocasiones la enfermedad se manifiesta clínicamente como un SLPC típico y los pacientes presentan síntomas constitucionales (p. ej.: astenia), esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatías e infiltración extranodal, y no es infrecuente la presencia de anemia hemolítica autoinmune e infecciones (166). Además, la heterogeneidad de la LLC-B se refleja sobre todo en una evolución y pronóstico variables entre distintos pacientes, de forma que en aproximadamente la mitad de los casos sigue un curso clínico relativamente indolente, mientras que en la otra mitad de los pacientes progresa de forma más rápida de lo esperado. Pese a ello, hoy se cree que los pacientes con riesgo de progresión, diagnosticados en fase temprana de la enfermedad, podrían beneficiarse de un tratamiento precoz de la misma, antes de que la progresión ocurra. Por consiguiente, se hace necesaria la identificación de marcadores pronósticos fiables, sobre todo en las fases tempranas de la enfermedad, que permitan evaluar la utilidad de nuevas opciones de tratamiento, como el empleo combinado de quimioterapia y/o inmunoterapia, ya en las fases iniciales de la enfermedad (167).

2.3.1. - Características inmunofenotípicas

Las células neoplásicas de la LLC-B presentan un fenotipo característico, aunque a la vez relativamente heterogéneo, asociado a una escasa actividad proliferativa (168-170). En las formas típicas (LLC-B típica), las células B neoplásicas CD19⁺ coexpresan de forma constante CD5, CD23 y CD200, y muestran una reactividad débil - respecto a los linfocitos B maduros de SP normal- para CD20, CD22, CD79b, CD81 y SmIg, en ausencia de expresión de FMC7 (169, 171); además, las células B clonales de la LLC-B típica son positivas para CD21, CD24, CD25, CD27, CD39, CD40, CD45RA, CD62L, CXCR5 y sIgM, y expresan de forma intensa Cybcl2 (144, 172). En las formas atípicas de la enfermedad, este patrón fenotípico puede verse modificado, adoptando distintos perfiles (p.ej.: CD5⁻, CD23⁻, FMC7⁺, SmIg⁺ o CD79b⁺)(173). Tanto en la LLC-B típica, como en las formas atípicas, el patrón de expresión de otros marcadores como CD11c, CD38, CD45RO, CD49d, CD80, CD95, CD124, CD126, CD130 y ZAP-70 es heterogéneo y variable de unos casos a otros (172, 174). Además, merece destacar que la reactividad para algunos de estos últimos marcadores, como CD38 y CyZAP-70 (presente en casi la mitad de los casos), se ha asociado con el estado mutacional de los genes *IGH* -ausencia de mutaciones somáticas- y/o un peor pronóstico de la enfermedad (175-178). Además, la expresión de CD49d en las células tumorales de las LLC-B no mutadas se ha asociado también con un peor pronóstico (174, 179).

2.3.2.- Características genéticas

Al igual que ocurre con las características fenotípicas, genéticamente la LLC-B es también una enfermedad heterogénea, detectándose alteraciones cromosómicas en aproximadamente 50-80% de los pacientes (180-183). La alteración numérica más frecuente es la trisomía 12 (presente en el 15-25% de los casos), que puede aparecer

aislada o junto a otras anomalías (184). Ésta puede ser la primera alteración genética secundaria que, junto a otras anomalías cromosómicas, probablemente refleja una evolución clonal con progresión de la enfermedad; además, la presencia de trisomía 12 se ha asociado con una mayor frecuencia de LLC-B con morfología atípica y/o un incremento de la expresión de SmIg y/o FMC7/CD20 (184, 185). A su vez, la alteración estructural detectada con mayor frecuencia en los pacientes con LLC-B es la pérdida de material genético del cromosoma 13, por delección en la banda 13q14.3 presente en 35-60% de los casos, seguida de deleciones en el cromosoma 11 a nivel de 11q22.3~q23.3 (5-20% de los casos) y en el cromosoma 17p13 (5-16% de los casos) (168, 181, 183, 186).

En relación con estas alteraciones genéticas características de la LLC-B se han identificado algunos genes candidatos asociados a tumor; entre ellos destacan dos genes que codifican para micro-ARNs (miRNA) presentes en la región 13q14.3 (*miR-16-1* y *miR-15a*), el gen *ATM* en la región 11q22-23 y el gen *TP53* en la región 17p13 (183, 187, 188). Estos dos últimos genes están implicados en la regulación de la muerte por apoptosis y le confieren a la célula patológica resistencia a la quimioterapia, (p.ej.: resistencia a fludarabina), mientras que se ha sugerido que los genes *miR-16-1* y *miR-15a* regularían la expresión de la proteína anti-apoptótica bcl2 (189). Por otra parte, estudios recientes sugieren que la proporción entre la proteína bcl2 (inhibidora de la apoptosis) y las proteínas de la familia de bax (inductoras de la muerte celular) constituye uno de los mecanismos importantes en la homeostasis de la LLC-B, de forma que cuando la proporción bcl2/bax es alta, los linfocitos tenderían a acumularse más y además la enfermedad sería más resistente al tratamiento. Estos mismos estudios sugieren que este fenómeno podría estar asociado a la expresión de genes responsables de resistencia múltiple a fármacos (164).

En lo que respecta al impacto pronóstico de las alteraciones citogenéticas, merece destacar que la LLC-B con del(13q) o cariotipo normal suele presentar buen pronóstico; por el contrario, los enfermos con del(11q), del(17p) o cariotipo complejo, muestran una peor evolución asociada a una supervivencia significativamente más corta y además, en el caso de la del(17p) a ausencia de respuesta al tratamiento convencional. Las LLC-B con trisomía 12 presentan un pronóstico intermedio (181, 183).

Aunque inicialmente se describió la presencia de t(11;14) en algunas LLC-B, hoy se considera que dicha alteración es altamente sugerente de linfoma de células del manto (190, 191). Así mismo, en una pequeña proporción de las LLC-B ($\leq 5\%$) se ha descrito la presencia de t(14;18) típica de los linfomas foliculares, en cuyo caso es obligado hacer el diagnóstico diferencial entre ambas entidades. En casos aislados se ha detectado la presencia de t(14;19), relacionada con un cambio posicional del gen *BCL3* (192).

2.3.3 - Características moleculares

En los últimos años, se ha demostrado que el proceso de hipermutación somática de los genes *IGHV* es uno de los marcadores moleculares más importantes en la LLC-B, por su utilidad para definir dos subgrupos de pacientes con diferente pronóstico. Así, las LLC-B que muestran una identidad de los genes *IGHV* $\geq 98\%$ respecto a la línea germinal (LLC-B "no-mutadas") y que representan el 45% de los casos, presentan habitualmente un curso clínico más agresivo, con una supervivencia notablemente más corta; en ellas, la célula de origen de la leucemia parece ser una célula B *naïve* pre-centro germinal (193, 194). En contraposición, los pacientes con una identidad de los genes de *IGHV* $<98\%$ respecto a los genes de la línea germinal (LLC-B "mutadas") y

que suponen el 55% del total de LLC-B, presentan un curso clínico relativamente benigno y una supervivencia global más larga; se piensa que estos casos derivarían de una célula B de memoria post-centro germinal (193-195) (Figura 3). No obstante, estudios recientes han demostrado que en ambos grupos de pacientes las células tumorales tienen un fenotipo característico de una célula B que ha reconocido Ag - independientemente del proceso de hipermutación de los genes *IGHV*-, y muestran perfiles de expresión génica similares a los linfocitos B de memoria (196-199). En definitiva, el origen celular de ambos subtipos de LLC-B sigue siendo incierto.

Además del estado mutacional los genes *IGHV*, otro aspecto relevante de la enfermedad en relación con estos genes, es el hecho de que las células de la LLC-B muestren un uso preferencial de determinados genes *IGHV* (149, 196, 200, 201), hallazgo que apoya la hipótesis de la estimulación antigénica en la ontogenia de la enfermedad (202, 203). En concreto, se ha visto que los genes *IGHV* más frecuentemente compartidos por grupos de pacientes con LLC-B son los genes *IGHV1-69*, *IGHV4-34*, *IGHV3-7* e *IGHV3-21*, aunque sus frecuencias relativas varían entre las distintas cohortes de pacientes (149, 196, 200, 201). Así mismo, el proceso de hipermutación somática no parece ocurrir uniformemente en pacientes que expresan diferentes secuencias de los genes *IGHV*; p.ej.: aquellos casos que expresan el gen *IGHV1-69* se caracterizan por presentar muy pocas mutaciones, al contrario de lo que ocurre en los casos que presentan los genes *IGHV3-7*, *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, que generalmente muestran un patrón mutado (149, 196, 200, 201, 204). Además, parece que el uso del reordenamiento *IGHV3-21* confiere un peor pronóstico, independiente del estado mutacional del gen *IGHV* (200, 205), mientras que el uso de la región *IGHV4-34* se asocia generalmente a un curso clínico más indolente (204, 206).

Finalmente, merece destacar que trabajos recientes, (207, 208) en los que se ha secuenciado por completo el genoma de la LLC-B han permitido identificar 4 genes que se encuentran mutados de forma recurrente en los pacientes que presentan esta enfermedad: *NOTCH1*, *XPO1*, *MYD88* y *KLHL6*. Las mutaciones en *MYD88* y *KLHL6* se observan de manera predominante en los casos de LLC-B que tienen mutaciones en los genes de las Ig (*IGHV*), mientras que *NOTCH1* y *XPO1* fueron identificados principalmente en pacientes con Ig no mutadas. Al realizar un análisis detallado de los patrones de mutación somática de estos pacientes, junto con sus asociaciones clínicas y funcionales, se llegó a la conclusión de que las mutaciones recurrentes de *NOTCH1*, *MYD88* y *XPO1*, están directamente relacionadas con la presencia de cambios oncogénicos que podrían contribuir a determinar la evolución clínica de la enfermedad.

De igual forma, estudios realizados por este mismo grupo, permitieron identificar mutaciones en el gen *SF3B1* asociada a una mayor tasa de progresión y una menor supervivencia global de la enfermedad (208). En contrapartida, estos trabajos (207, 208) proporcionan una primera evaluación de las mutaciones somáticas presentes en la LLC-B y sus asociaciones más significativas con las características clínicas de la enfermedad y apoyan la hipótesis de que podrían existir diferentes vías de alteración molecular implicadas en la ontogenia y la progresión de la LLC-B.

2.3.4.- Factores pronósticos

La clasificación convencional de los pacientes con LLC-B para estadiaje de la enfermedad se basa en una serie de observaciones clínicas y pruebas de laboratorio establecidas desde hace años, propuestas por los grupos de trabajo de Rai y cols (209) y Binet y cols (210) (Tabla 3).

Ambos sistemas reflejan la carga tumoral global del paciente y permiten establecer el pronóstico en el momento del diagnóstico de la enfermedad (Tabla 4). Debido a su simplicidad y reproductibilidad, estos sistemas de clasificación han sido ampliamente adoptados durante décadas, y su valor pronóstico validado en numerosos estudios. Pese a ello, en la actualidad se considera que únicamente con la información proporcionada por estos sistemas de clasificación basados en el comportamiento clínico del paciente y el recuento de sus células sanguíneas, no es suficiente para predecir la supervivencia o la necesidad específica de tratamiento de los pacientes con LLC-B, al menos a medio y largo plazo (167, 211).

Tabla 3. Estadios clínicos de la LLC-B según las clasificaciones de Rai y cols (209) y de Binet y cols (210)

	Grupo de riesgo	Características clínicas	Mediana de supervivencia (meses)
Estadios de Rai			
0	Bajo	Sólo linfocitosis ^a	>150
I	Intermedio	Linfocitosis, linfadenopatía	101
II	Intermedio	Linfocitosis, esplenomegalia y/o hepatomegalia	71
III	Alto	Linfocitosis, anemia ^b (Hb<110g/L)	19
IV	Alto	Linfocitosis, trombopenia ^c (plaquetas <100x10 ⁹ /L)	19
Estadios de Binet			
A	Bajo	Sin anemia, ni trombopenia; < 3 áreas linfoides ^d involucradas	>160
B	Intermedio	Sin anemia, ni trombopenia; ≥ 3 áreas linfoides involucradas	84
C	Alto	Anemia ^b (Hb<100g/L) y/o Trombopenia ^c (plaquetas <100x10 ⁹ /L)	24

^a Recuento absoluto de linfocitos en sangre >5x10⁹/L

^b Con o sin aumento de tamaño de ganglios linfáticos, bazo o hígado

^c Con o sin anemia o aumento de tamaño de ganglios linfáticos, bazo o hígado

^d Cinco áreas linfoides posibles: axilar, cervical, inguinal, bazo e hígado

Por este motivo, a los sistemas de clasificación anteriores se han añadido otros factores, entre los que se incluyen parámetros biológicos que permiten estimar la evolución de la enfermedad de forma más precisa (Tabla 4). Entre estos nuevos parámetros pronósticos se encuentran el sexo y la edad del paciente (212). Respecto al sexo, se ha observado que las mujeres tienen una supervivencia más larga comparada con la de los varones, aunque la razón exacta de esta diferencia sigue siendo desconocida (212-214); respecto a la influencia de la edad en el pronóstico, esta no está clara, porque por un lado se ha visto que la supervivencia general es más larga en los jóvenes y más corta en los pacientes mayores (214-216), pero por otro las muertes relacionadas con la enfermedad ocurren más a menudo en pacientes más jóvenes (157, 214).

La morfología celular y el patrón histológico de infiltración de la MO se relacionan claramente con el pronóstico de la LLC-B: una morfología celular atípica definida por la presencia de prolinfocitos o linfocitos hendidos, se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad (217, 218); a su vez, un patrón de infiltración difuso de la MO se relaciona con una supervivencia significativamente más corta, en comparación con los pacientes en los que se evidencia un patrón de infiltración medular no difuso (219).

Los demás factores pronósticos están constituidos fundamentalmente por parámetros biológicos, a la mayoría de los cuales ya se ha hecho referencia en las secciones anteriores de esta memoria. De ellos (Tabla 4), se relacionarían con un peor pronóstico (curso clínico más agresivo y una supervivencia más corta) la ausencia de mutaciones somáticas en los genes *IGHV*, el aumento en la expresión de *ZAP-70* y de *CD38* en los linfocitos B neoplásicos y las deleciones y/o mutaciones que involucran los genes *TP53* y/o *ATM* (220). La importancia clínica del estudio combinado de las

mutaciones de *IGHV* y de la expresión de CD38 y ZAP-70 ha sido ratificada en otros estudios (221, 222). No obstante, la mayoría de los autores está de acuerdo en que antes de ser incorporados de forma definitiva al proceso de toma de decisiones terapéuticas en la práctica clínica, debe hacerse un esfuerzo de estandarización y de validación en ensayos clínicos prospectivos que incluyan series grandes de pacientes, teniendo en cuenta además que deben ser factores pronósticos independientes, y que permitan hacer una evaluación pronóstica de los pacientes con LLC-B de forma simple y reproducible (223-225).

Tabla 4. LLC-B: Factores pronósticos adicionales a los parámetros individuales incluidos en las clasificaciones de Rai y de Binet (211)

Factor Pronóstico	Riesgo clínico	
	BAJO	ALTO
Mayores		
Sexo	Femenino	Masculino
Estadio clínico	Binet A Rai 0, I	Binet B o C Rai II, III, IV
Patrón de infiltración de MO	Patrón no difuso	Patrón difuso
Morfología de los linfocitos	Típica	Atípica
Tiempo de duplicación linfocitaria	>12 meses	<12 meses
Expresión de CD38 (% células positivas)	<20-30%	>20-30%
Alteraciones genéticas	Ninguna del 13q (única)	del(11q) Pérdida/mutación <i>TP53</i>
Nivel sérico de timidin kinasa	Bajo (< 7,1UI/L)	Alto (> 7,1UI/L)
Estado de los genes <i>IGHV</i>	Mutado	No mutado
Expresión de ZAP-70	Baja	Alta
Otros		
Nivel de β 2-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)

MO: médula ósea

2.4. - SLPC-B con expresión leucémica diferentes a la LLC-B

Entre los SLPC-B primariamente leucémicos diferentes a la LLC-B, se incluyen, de acuerdo con la clasificación de la OMS (133), la LPL-B y la TL, tanto en sus formas clásicas como atípicas o variantes.

2.4.1. - Leucemia prolinfocítica B (LPL-B)

Durante años, el diagnóstico de sospecha de la LPL-B se ha basado en las manifestaciones clínico-hematológicas de la enfermedad: linfocitosis elevada (habitualmente $>100 \times 10^9/L$) a expensas de una población de linfocitos B grandes con nucléolo prominente –prolinfocitos- asociada a esplenomegalia con o sin adenopatías evidentes, y afectación de la MO (131, 226). Desde el punto de vista fenotípico, los prolinfocitos B son $CD19^+$, $CD20^+/FMC7^+$, $CD22^+$, $CD79b^+$ y expresan niveles elevados de SmIgM y/o SmIgD; además, respecto a la LLC-B, presentan menor reactividad para CD5 (20-30%), CD23 (10-20%) y CD25 (<50%), marcadores que con relativa frecuencia son negativos en la LPL-B (Figura 3) (227-229). Así, en términos globales el prolinfocito presenta un fenotipo superponible al de un linfocito B activado de SP, en un estadio madurativo posterior al de la LLC-B (130, 229). Aunque en algunos casos puede plantearse el diagnóstico diferencial con formas variantes de tricoleucemia (TL-V) (230, 231), los prolinfocitos se diferencian de los tricoleucocitos en que carecen de reactividad para CD103 y con frecuencia también para CD25, y expresan de forma más débil (aunque variable) CD11c y CD305 (LAIR-1) (132). Así mismo, debe hacerse el diagnóstico diferencial con el linfoma de células del manto (LCM), que puede presentar un cuadro clínico y morfológico sugerente de LPL-B; de forma característica las células B neoplásicas de los pacientes con LCM son $CD200^{-/+débil}$, $CD23^{-}$, $CD5^{++}/CD43^{+}$ (230) y presentan la translocación $t(11;14)(q13;q32)$ (230).

Finalmente, desde hace tiempo se conoce la existencia de formas variantes de LPL-B con características intermedias entre la LLC-B y la LPL-B (229, 232). Algunos de estos pacientes representan formas evolucionadas de LLC-B, mientras que otros presentan ya en el momento del diagnóstico un porcentaje variable de prolinfocitos (entre 11% y 55%) con características intermedias entre ambas entidades (133, 135, 229). Por todo ello, ante la sospecha de una LPL-B, debe realizarse un cuidadoso diagnóstico diferencial con otros SLPC-B, especialmente con el LCM, la LLC-B atípica y formas variantes de TL, siendo la verdadera incidencia de LPL-B claramente inferior a la descrita inicialmente.

La expresión de CyZAP-70 y CD38 en estos pacientes se da en alrededor del 50-60% de los casos, respectivamente; al contrario de lo que ocurre en la LLC-B, esta expresión no está relacionada con el estado mutacional de los genes *IGHV* (233).

En la LPL-B se han identificado diversas anomalías cromosómicas, entre las que destacan las alteraciones en el brazo largo del cromosoma 14 (a nivel de 14q32, locus en el que se localiza el gen *IGH*), presentes en el 60% de los casos. También se ha descrito la presencia de la t(11;14)(q13;q32) en el 20% de los enfermos con LPL-B, pero hoy se sabe que estos casos son en realidad LCM con morfología equívoca de prolinfocito (136, 234, 235). En la LPL-B parece existir una alta frecuencia de mutaciones somáticas en los genes *IGHV*, con predominio de la familia *IGHV3*, lo que sugiere una selección antigénica y que por tanto, al menos en algunos casos, el prolinfocito tendría un origen posterior al centro germinal (236, 237). Desde el punto de vista pronóstico, el valor del estado mutacional de los genes *IGHV* no está claro. Otras anomalías genéticas descritas en la LPL-B incluyen la t(6;12)(q15;p13) y deleciones en los cromosomas 1 y 6 (136, 235); además, en 50% de los casos se detectan mutaciones del gen *TP53* (238).

2.4.2. - Tricoleucemia (TL)

Pese a su morfología característica y a su fenotipo único, en la actualidad seguimos sin conocer con precisión cuál es la contrapartida normal del tricoleucocito. No obstante, sabemos que la célula neoplásica de la TL ha sufrido los procesos de recombinación *IGH V(D)J* e hipermutación somática (239), y que podría corresponder a una célula B de memoria activada y/o presentadora de antígenos. Fenotípicamente los tricoleucocitos son muy característicos, no planteándose habitualmente grandes problemas en el diagnóstico diferencial entre la TL y otros SLPC-B. Así, el tricoleucocito presenta características de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) de luz, anormalmente elevadas, reactividad para los antígenos CD25, CD103, LAIR-1 (CD305), CD123, T-bet, anexina A1 y HC2, junto a sobreexpresión de los marcadores CD11c, CD19, CD20, CD22 y CD72 (130, 230, 231, 240). Además, el tricoleucocito generalmente carece de reactividad para CD5, CD10, CD23 y CD24, es FMC7⁺ y CD79b⁺ y, aunque generalmente expresa SmIgM o SmIgD, también puede ser positivo para SmIgG o SmIgA (Figura 3) (241, 242). Se trata de una neoplasia de bajo grado en la que las células neoplásicas presentan una baja tasa proliferativa (243, 244).

Existe una forma variante de TL (230, 231, 241, 245) en la que, al igual que ocurre en la forma clásica, los pacientes generalmente presentan en el momento del diagnóstico esplenomegalia, anemia y trombopenia, pero asociadas a leucocitosis (y no a leucopenia, más típica de la TL clásica) en ausencia de monocitopenia (230, 231, 241, 245). Además, a diferencia de lo que ocurre en las formas clásicas, en la TL-V las células B neoplásicas generalmente carecen de expresión de los antígenos CD25 y HC2 (246). Si bien la ausencia de ambos marcadores puede plantear en ocasiones el diagnóstico diferencial con el linfoma de la zona marginal esplénica, las células

tumorales de la TL-V expresan CD103 y CD305 de forma clara, y tienen un patrón de expresión de CD24 diferente al de las células del LZME (246).

En consonancia con otros SLPC-B, la anomalía citogenética más frecuente en la TL consiste en alteraciones en el brazo largo del cromosoma 14 junto a trisomía 5, alteraciones estructurales que afectan a la región pericéntrica de los cromosomas 5 y 2 y anomalías en 1q42 (235, 247). Aunque existe sobreexpresión de la ciclina D1, ésta no se asocia con reordenamientos de Bcl1 o amplificaciones de PRAD1(248, 249). Desde el punto de vista molecular, se ha descrito recientemente la existencia de mutación (V600E) del gen *BRAF1* que estaría presente de forma sistemática en las formas clásicas de TL pero ausente en la TL-V (250, 251). Así mismo, en la TL se han observado además deleciones monoalélicas de los genes *TP53* y *BCL6* (247).

2.5. - Linfomas no Hodgkin B (LNH-B) con expresión periférica.

Inicialmente, los LNH-B con expresión periférica se incluyeron bajo el término de leucemia de células linfosarcomatosas. No obstante, hoy se sabe que corresponden a formas leucemizadas de distintos subtipos de LNH-B. En principio, todos los subtipos de LNH-B descritos hasta la fecha pueden leucemizarse, si bien la expresión periférica es más frecuente en algunos subtipos de LNH-B. Por ello, ante la sospecha de que una linfocitosis a expensas de linfocitos B clonales con fenotipo diferente a la LLC-B o la TL pueda corresponder a una fase de leucemización de un LNH-B, es aconsejable realizar la biopsia ganglionar, para esclarecer el diagnóstico de LNH-B y definir su correspondiente subtipo histológico.

2.5.1. - Linfoma de células del manto (LCM)

El LCM representa el 5-10% de todos los LNH del adulto (228). En la mayoría de los LCM, las células B neoplásicas presentan un tamaño pequeño o mediano y aspecto maduro, similar al de la LLC-B; a veces, el núcleo es hendido con contorno irregular, asociado o no a la presencia de nucleolos evidentes con cromatina dispersa y escaso citoplasma, en ausencia de sombras de Gümprrecht (252). Aunque estos rasgos citológicos contribuyen al diagnóstico diferencial entre ambas entidades, para ello es clave el estudio histológico ganglionar y el análisis fenotípico y genético de las células linfomatosas (253). Desde el punto de vista fenotípico, el LCM muestra características compartidas con la LLC-B, lo que sugiere que su origen podría ubicarse en un linfocito B en un estadio madurativo inmediatamente posterior al de la LLC-B, que histológicamente se localizaría en la zona del manto de los órganos linfoides secundarios. Aproximadamente el 25% de los pacientes con LCM presentan genes *IGHV* mutados (254), y esto ocurre con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedad ganglionar (90% vs. 40%) (254). A diferencia de la LLC-B, la presencia de mutaciones *IGHV* no se relaciona con la supervivencia (254, 255). El uso de *IGHV3-21*, y posiblemente *IGHV4-59*, podrían estar asociados con una mayor supervivencia de los pacientes (255).

En el LCM, las células B neoplásicas CD19⁺ generalmente coexpresan CD5, junto a otros marcadores pan-B como CD20, CD22 y CD24 (130, 132, 150, 232, 246). Por el contrario, a diferencia de la LLC-B, generalmente carecen de reactividad clara para CD23 y CD200, al igual que para CD11c que estaría ausente en la gran mayoría de LCM (256); así mismo, pueden presentar una positividad más intensa para SmIgM y/o SmIgD, CD18, CD20, FMC7, CD54 y sobre todo, CD79b; la reactividad para CD38 es variable, aunque en términos generales superior a la detectada en la LLC-B típica (Figura 3) (133, 135, 150, 257).

La variante blástica de LCM, asociada o no a la presencia de prolinfocitos en SP, muestra un fenotipo superponible con la forma clásica de LCM, asociada con frecuencia a un mayor tamaño y complejidad interna de las células B clonales (FSC y SSC), además de expresión de CD10 en algunos casos y tetraploidia de ADN, lo que podría llegar a plantear el diagnóstico diferencial con el LBDCG (258, 259).

Genéticamente, tanto en la forma clásica como en la variante blastoide, las células B se caracterizan por presentar la translocación $t(11;14)(q13;q32)$ en >95% de los casos (252); como consecuencia de esta translocación, el gen *PRAD-1/CICLINA D1* localizado en 11q13, se yuxtapone con la región de unión (J) del gen de la *IGH* en el brazo largo del cromosoma 14, en la región 14q32 (191), lo que implica un aumento de la síntesis de ciclina D1(191, 252).

Con ensayos moleculares convencionales, es posible detectar reordenamientos de *bcl1* en el 70% de los LCM (191, 260), mientras que más del 95% de los LCM muestran sobreexpresión de ciclina D1 (191). En los casos de LCM en los que no es posible demostrar genéticamente la existencia de reordenamientos del gen *BCL1*(260), es probable que el punto de ruptura se encuentre más allá de las regiones cromosómicas exploradas por los ensayos moleculares convencionales debiendo investigarse la presencia de la translocación mediante hibridación in situ fluorescente (FISH). A diferencia de las células del LBDCG (con el que a veces puede plantearse el diagnóstico diferencial, como se ha mencionado anteriormente), los linfocitos B neoplásicos del LCM son *bcl6* negativos. En el LCM, las células neoplásicas muestran una tasa proliferativa relativamente baja, aunque superior a la de la LLC-B (261). Desde el punto de vista evolutivo hoy se reconoce la existencia de formas indolente y agresiva de la enfermedad asociada a distintos patrones de expresión génica (262, 263). En función de definir claramente estos dos subtipos de LCM a través de criterios moleculares, estudios

recientes (262) compararon las características clínico-patológicas, la expresión génica y el perfil genómico de pacientes con enfermedad indolente vs pacientes con enfermedad convencional o agresiva. Lográndose identificar un patrón molecular de 13 genes (*RNGTT*, *HDGFRP3*, *FARP1*, *CSNK1E*, *SETMAR*, *HMGB3*, *LGALS3BP*, *PON2*, *CDK2API*, *DBN1*, *CNRI*, *CNN3* y *SOX11*), que se encuentran altamente expresados en el LCM agresivo, pero que están poco expresados o prácticamente ausentes (*SOX11*) en LCM indolente (262). Estos resultados permitieron concluir que los pacientes con LCM indolente mostraban una enfermedad leucémica sin infiltración ganglionar, ausencia de cariotipo complejo y, un alto porcentaje de mutaciones en el reordenamiento del gen *IGHV*, junto con ausencia de la expresión del gen *SOX11*; lo que puede permitir un manejo clínico más específico y menos agresivo para este tipo de pacientes (262).

2.5.2. - Linfoma folicular (LF)

De todos los linfomas primarios con infiltración de SP, el LF es el más frecuente. Se estima que la incidencia global de leucemización en el LF oscila entre 10% y 40% de los casos (264), aunque el empleo de técnicas sensibles como la citometría de flujo multiparamétrica y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), demuestran que las células B neoplásicas son detectables en la SP (al diagnóstico o a lo largo de la evolución de la enfermedad) en una mayor proporción de casos (264, 265). Estas células pueden confundirse en ocasiones con las de la LLC-B, siendo útil para su diagnóstico diferencial la demostración de la existencia de linfocitos con núcleo hendido (centrocitos) y la presencia de cierto grado de polimorfismo celular, que supone la coexistencia de células pequeñas y grandes (centrocitos y centroblastos,

respectivamente) en ausencia de sombras de Gümprrecht con fenotipo característico (264). La histología ganglionar es esencial para el diagnóstico definitivo de LF (132).

Las células B neoplásicas del LF presentan generalmente un fenotipo similar al del linfocito B del folículo linfoide normal. Así, además de presentar reactividad fuerte para SmIgM, CD20/FMC7, CD22 y CD79b, estas células coexpresan de forma prácticamente constante CD10, bcl6 y CD38 de intensidad intermedia (130, 143, 228, 246, 266). Por el contrario, habitualmente son negativas para CD5, CD11c, CD23, CD43, CD103, CD200, CD305 y HC2, y algunos casos muestran negatividad o expresión anormalmente débil de CD19 (143, 228, 246, 266); de forma característica, se observa sobre-expresión de bcl2 intracitoplasmático (Figura 3) (144). Aunque en la mayoría de los LF, las células B neoplásicas son de pequeño tamaño (FSC) y tienen escasa complejidad interna (SSC), en ocasiones se observa la coexistencia -e incluso el predominio- de células B clonales de elevado FSC y SSC, lo que puede llegar a plantear el diagnóstico diferencial con algunas formas de LBDCG CD10⁺/CD305⁻ (267). En la clasificación actual de la OMS (134) se incluye el LNH folicular cutáneo primario como un subtipo particular de linfoma centrofolicular. A diferencia del LF típico, las células neoplásicas de este subtipo suelen carecer de SmIg, con mayor frecuencia son CD10⁻ y expresan Cybcl2 de forma menos intensa.

Desde el punto de vista citogenético, 80-90% de los pacientes con LF muestran presencia de la translocación t(14;18), en la que el gen bcl2 localizado en el brazo largo del cromosoma 18 se transloca al cromosoma 14, en la región en la que se sitúan los genes que codifican la cadena pesada de las Igs y su promotor (134, 264, 268); la consecuencia de esta translocación es una sobre-expresión de la proteína bcl2 en el citoplasma celular (144). A su vez, la sobre-expresión de bcl2 en los linfocitos B centrofoliculares con t(14;18) inhibe la apoptosis, prolongando la supervivencia de las

células B neoplásicas, lo que conduce a un aumento progresivo de la masa tumoral (236, 269, 270), pese a que las células tienen una tasa proliferativa relativamente baja (271).

2.5.3. - Linfoma B difuso de célula grande (LBDCG)

El LBDCG representa en realidad un grupo heterogéneo de linfomas en los que su descripción parte de criterios morfológicos e histológicos. Sólo una pequeña proporción de todos los LBDCG (<5%) presenta infiltración de la SP en el momento del diagnóstico (264), generalmente asociada a la presencia de inmunoblastos grandes y/o centroblastos. En la mayoría de los casos, las células B neoplásicas presentan reordenamientos de los genes de las *IG* y mutaciones somáticas en las mismas (226). En la clasificación actual de la OMS (134), dentro del LBDCG se establecen múltiples variantes y subtipos, lo que refleja la gran heterogeneidad de este subgrupo de linfomas.

Los linfocitos B neoplásicos del LBDCG suelen tener unas características de dispersión de luz (FSC y SSC) elevadas (en comparación con los linfocitos B normales), asociadas a expresión intensa de moléculas pan-B, como CD19, CD20/FMC7, CD22, CD79b y SmIg, siendo una proporción elevada de casos CD10⁺/CD305⁻ (Figura 3) (130, 135, 257, 266). Entre estos últimos pacientes, se incluiría un subgrupo de casos en los que, además de CD10, las células tumorales sobreexpresan de forma clara *Cybcl2*, y que podría corresponder a aquellos pacientes que, de acuerdo con su patrón de expresión genómica estudiado con *microarrays* de oligonucleótidos, muestran características de célula B del CG y t(14;18)(q32;q21) (144, 272). Tanto CD5 como CD23 suelen estar ausentes, aunque se han descrito casos con expresión variable de ambos marcadores y que, en el caso de CD5, se han asociado con

un peor pronóstico de la enfermedad (133, 135, 273). Aquellos LBDCG que expresan CD5 se diferencian de los casos diagnosticados como variante blástica de LCM en que no expresan ciclina D1 y carecen de la t(11;14)(q13;q32). Algunos LBDCG presentan un contenido de ADN aneuploide por citometría de flujo (274) y generalmente tienen una tasa proliferativa intermedia o alta (274, 275), lo que contribuye a establecer el diagnóstico diferencial con otros SLPC-B. Puede observarse expresión de CD30, especialmente en la variante anaplásica de LBDCG (276)

En una elevada proporción (30%-40%) de pacientes con LBDCG se detectan reordenamientos del gen *BCL6* (277, 278), resultado de translocaciones cromosómicas en las que está involucrado el cromosoma 3 (concretamente la región 3q27) (277). El aumento de expresión de *bcl6* fuera del centro germinal se asocia con un bloqueo madurativo a expensas de células B grandes y con la activación transcripcional de genes de proliferación celular (236, 279). Desde el punto de vista pronóstico, la presencia de reordenamientos del gen *BCL6* se ha asociado a un comportamiento clínico favorable del LBDCG (278, 280-282).

Además, en otro porcentaje alto de casos (30-40%) se detecta la translocación t(14;18) o reordenamientos del locus *BCL2* (283, 284), lo que podría reflejar la ocurrencia de transformación de un LF previo (269), aunque esta translocación también se ha demostrado en LBDCG *de novo* (285), con fenotipo asociado a linfocito B del CG (285). Así mismo, se ha descrito la presencia de translocaciones y/o reordenamientos del gen *C-MYC* en un 5-10% de los LBDCG asociado o no a t(14;18) (286).

2.5.4. - Linfoma de Burkitt (LB)

El LB es un linfoma B de células grandes agresivo, que se asocia a estados de inmunodeficiencia grave, y cuyo pronóstico se relaciona en gran medida con el grado de extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico (287-289). Desde el punto de vista fenotípico, el LB es muy característico y con frecuencia reproduce los rasgos de los linfocitos grandes centrofoliculares, de manera que, además de expresar moléculas pan-B como CD19, CD20, CD22 y CD79b, los linfocitos neoplásicos son CD10⁺, CD77⁺ y bcl6⁺, y expresan CD38 de forma muy intensa (290); por el contrario, generalmente son negativos para CD5 y CD23 y muestran positividad débil para Cybcl2 (Figura 3) (144, 290). Es característico el hallazgo de una elevada tasa proliferativa, asociada a una mayor propensión a sufrir apoptosis espontáneamente *in vitro* por parte de las células B clonales (287, 291). Las características de dispersión de luz corresponden a las de un linfocito grande, habitualmente en ausencia de aneuploidia de ADN que lo justifique. Se ha descrito una forma variante, inicialmente conocida como linfoma Burkitt-*like*, con características histopatológicas intermedias entre las del LB y el LBDCG (133, 135). En la actualidad esta forma variante recibe varias denominaciones, como linfoma de célula B inclasificable, con características intermedias entre el LB y el LBDCG incluyendo la coexistencia de alteraciones genéticas características de ambas entidades (134). Aunque las células B de estos pacientes expresan antígenos pan-B en ausencia de CD5, a diferencia del LB, suelen ser CD10⁻ y muestran mayor expresión de Cybcl2, junto a positividad intensa para Ki-67 (133, 135).

En el 80% de los LB se detecta la presencia de la translocación t(8;14)(q24;q32), en la que el gen *C-MYC*, localizado en el brazo largo del cromosoma 8, se transloca al cromosoma 14, en la región en la que se sitúan los genes que codifican la cadena pesada de las *IG* y su promotor; de esta forma, esta translocación ocasiona una sobre-expresión

de la proteína c-myc (287, 292). En el 20% restante de los casos, *C-MYC* se yuxtapone, bien al gen *IGK* dando lugar a la t(2;8)(p11;q24) (10% de los casos), o al gen *IGL* originando la t(8;22)(q24;q11) (10% de los casos) (287, 292).

2.5.5. - Linfoma de la zona marginal esplénica (LZME) y linfoma de la zona marginal nodal (LZMN)

Clínicamente, el LZME presenta un curso benigno y en general los pacientes no necesitan un tratamiento inmediato. En la SP, los linfocitos B neoplásicos son morfológicamente más grandes que las células B normales, presentan un núcleo redondo, algo excéntrico, de contornos regulares, con cromatina condensada y a veces con nucléolo, junto a un citoplasma basófilo con proyecciones vellosas citoplasmáticas, generalmente dispuestas en un polo de la célula y menos numerosas que las de las células B de la TL, aunque más gruesas, largas y separadas (258). En el LZME, las células B neoplásicas tienen unas características fenotípicas que lo situarían en un estadio madurativo cercano al de la TL. En la mayoría de los casos, las células B muestran un fenotipo relativamente homogéneo, consistente en expresión fuerte de SmIg y CD79b y positividad para CD19, CD20/FMC7 y CD22 (148, 293). Al igual que en la TL, las células B clonales son positivas para CD11c, pero generalmente no supera los niveles detectados en una pequeña subpoblación (<5%) de células B circulantes CD11c⁺, de tamaño intermedio (151). Por el contrario, con frecuencia carecen de reactividad para CD103, HC2 y CD25, y tienen un patrón de expresión de CD24 y CD305 diferente del de los tricoleucocitos (Figura 3) (135, 293). Otros marcadores característicos de otros SLPC-B como CD5, CD10 y CD23, generalmente son negativos en el LZME; CD38 y CD43 se expresan únicamente en una pequeña proporción de los

casos (<25%), y no se observa reactividad para anexina A1, bcl6 o ciclina D1 (130, 228, 258, 293). Fenotípicamente, el linfoma de zona marginal nodal es similar al LZME, pero a diferencia de éste último, suele ser SmIgD⁺.

Las alteraciones citogenéticas más frecuentes del LZME corresponden a anomalías en los cromosomas 3 (trisomía 3) y 18 (translocaciones a nivel de 18q21) y deleciones del brazo largo del cromosoma 7 (148, 235, 294). Desde el punto de vista molecular, los genes que codifican para las regiones variables de las inmunoglobulinas presentan hipermutación somática (295, 296), hallazgo que es consistente con el origen de esta neoplasia en células B que ya han pasado por el CG.

2.5.6. - Linfoma de la zona marginal extranodal del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

El linfoma tipo MALT comprende aproximadamente el 7-8% de todos los linfomas de células B y más del 50% de los linfomas gástricos primarios (297, 298). En estos pacientes, las células B expresan SmIg (SmIgM, SmIgA o SmIgG) y en muchos casos, coexpresan CyIg del mismo isotipo, junto a antígenos B como CD19, CD20, CD22 y CD79b y CXCR3, habitualmente en ausencia de positividad para CD5, CD23, CD10, CD27 y CD45RO (299, 300). La expresión de CD11c y CD43 es variable (Figura 3) (299, 300). Algunos autores han asociado la expresión de CD5 con un comportamiento más agresivo de la enfermedad y un peor pronóstico (301, 302).

Los genes *IG* están reordenados y presentan mutaciones somáticas consistentes con su origen en células B post-CG (226). En el 30%-50% de los linfomas MALT se detecta la presencia de la translocación t(11;18)(q21;q21), en la que se ven involucrados los genes *API2*, localizado a nivel de 11q21 y *MLT1*, localizado en 18q21 (303). Con

menor frecuencia, se detecta la presencia de la t(14;18), que lleva a la sobre-expresión de *malt1* (304). De igual forma, la t(3;14) resulta en la expresión aberrante del factor de transcripción *foxp1* (305). También se pueden detectar las translocaciones t(1;14)(p22;q32) y t(1;2)(p22;p12), que involucran el gen *BCL10* a nivel del cromosoma 1p22 (304, 306, 307).

2.5.7. - Linfoma linfoplasmocítico (LLP) y macroglobulinemia de Waldenström (MW)

El LLP frecuentemente presenta infiltración de MO; por el contrario, la presencia de células B clonales en SP es menos habitual en esta entidad (130, 132, 228, 232, 246). En las muestras infiltradas (tanto en SP como en MO), a menudo coexisten desde linfocitos pequeños clonales a linfoplasmocitos típicos y células plasmáticas que expresan el mismo isotipo de cadena ligera de Igs (130, 132, 171, 228, 232, 246). En la mayoría de los casos se detecta un componente monoclonal, aunque a veces se necesitan métodos sensibles como la inmunofijación, para su identificación (133, 135, 308). La MW es una variante de LLP caracterizada por la presencia de paraproteinemia IgM (que excede la concentración de 15 g/L) y la acumulación de células linfoplasmocíticas en la MO. En los estadios avanzados de la enfermedad, los pacientes desarrollan organomegalias, anemia e hiperviscosidad sanguínea. La presencia del un componente monoclonal IgM diferencia la MW de otras neoplasias con diferenciación plasmocitoide (309). Debido a sus características morfológicas e inmunofenotípicas, la MW se incluyó dentro del grupo más amplio de LLP a partir de la clasificación REAL (Clasificación revisada Europea-Americana) de los linfomas y SLPC-B, (133).

El perfil fenotípico de los linfocitos B neoplásicos de los pacientes con LLP/MW generalmente es superponible al de los linfocitos B CD5⁻/CD23⁻ maduros predominantes en la SP: ausencia de reactividad para CD5, CD10 y CD23, expresión de marcadores pan-B (CD19⁺, CD20⁺/FMC7⁺, CD22⁺, CD24⁺), positividad constante para CD25 y CD54 y reactividad variable para CD38 (Figura 3) (130, 150, 246). Característicamente, en la MW se observa expresión de SmIgM en ausencia de SmIgD asociada a un predominio significativo de casos SmIgk⁺ sobre los SmIgl⁺ (cociente k/λ: 5/1) (309); además, en alrededor de la mitad de los casos de MW se detecta en la MO (junto con los linfocitos B maduros clonales) la existencia de células plasmáticas clonales CD38⁺⁺, CD56⁻, CD19^{-/+} que coexpresan CD20 e IgM de membrana y citoplasmática (309).

Respecto a sus características moleculares, el gen *IG* muestra reordenamiento clonal y la mayoría de los pacientes presentan mutaciones somáticas dentro del dominio *IGHV* (310). Aproximadamente 50% de los casos presentan la translocación t(9;14)(p13;q32) (311, 312) que involucra al *locus IGH* en el cromosoma 14q32 y al gen *PAX5* en el cromosoma 9p13 (311), y que puede ser de ayuda para el diagnóstico diferencial entre el LLP y otras variantes de LNH. Presumiblemente, la t(9;14) constituye la causa de la expresión alterada de *PAX5*, contribuyendo así al desarrollo tumoral. A diferencia de lo que ocurre en el LLP, en la MW no se detecta t(9;14) (313). Este hallazgo se relaciona con la ausencia de paraproteinemia IgM en los LLP, debido a que *PAX5* bloquea la producción del péptido J, un componente necesario para la formación de los pentámeros de IgM, responsables a su vez de la presencia de la hiperviscosidad observada en la MW (314). Por otra parte, *PAX5* inhibe además la transcripción del *locus IGH* (315).

En los LLP también se han descrito alteraciones en el cromosoma 7, que generalmente consisten en del(7q32), mientras que en la MW es relativamente frecuente la presencia de del(6q21) (313).

2.6. - Incidencia de bi(multi) clonalidad en SLPC-B

Los SLPC-B generalmente resultan de la expansión monoclonal de un único linfocito B transformado (131, 171, 228). Por consiguiente, los linfocitos B tumorales constituyen habitualmente un clon en el que todas las células están relacionadas por presentar las mismas alteraciones genéticas primarias, y/o idénticos reordenamientos VDJ del gen de la *IgH* junto a un uso restringido de la misma cadena ligera de las Ig (κ o λ) que la célula B neoplásica original (316). No obstante, las células B tumorales de un paciente pueden tener características genéticas y fenotípicas diferentes entre ellas, que se van adquiriendo durante la evolución de la enfermedad. En este sentido, la presencia simultánea en un mismo paciente de dos o más poblaciones de linfocitos morfológicamente diferentes (al diagnóstico o en diferentes momentos de la evolución de la enfermedad), generalmente se ha interpretado como consecuencia de la formación de nuevos subclones, resultantes de la adquisición de anomalías genéticas secundarias y/o a la existencia de diferentes bloqueos madurativos a lo largo de la diferenciación de las células B neoplásicas (317). Aunque en la mayoría de los SLPC-B, la existencia de varias subpoblaciones linfoides B patológicas es el resultado de la evolución intraclonal a partir de la expansión de una misma célula transformada (origen monoclonal), se han descrito auténticos casos de SLPC-B bi(multi)clonales, en los que coexisten varios clones no relacionados de poblaciones linfoides B neoplásicas (318-321). En la serie más larga de pacientes descrita hasta la fecha en la que se ha estudiado de forma

sistemática la presencia de bi o multiclonalidad (n=477 pacientes), se ha comprobado que en aproximadamente un 5% de los casos coexisten dos o más clones de células B no relacionados, con características fenotípicas, genéticas y/o moleculares diferentes entre ellos (322); en la mayoría de estos casos, la presencia de biclonalidad se sospechó al estudiar las características inmunofenotípicas de las células B neoplásicas por citometría de flujo, ya que cada una de las dos poblaciones de células B coexistentes expresaban diferente isotipo de cadena ligera de las Ig, además de otras diferencias en sus patrones fenotípicos. Además de la relativamente elevada incidencia de biclonalidad en este grupo de neoplasias, se ha constatado la existencia de otro grupo de pacientes en los que coexisten dos poblaciones de células B tumorales que presentan una gran heterogeneidad morfológica y/o diferente contenido de ADN, pero con características fenotípicas similares entre ellas; estos casos generalmente reflejan la existencia de diferentes estadios de evolución de un solo clon de linfocitos B neoplásicos, y corresponden a casos monoclonales que presentan evolución intraclonal (323).

3. - LINFOCITOSIS MONOCLONAL DE LINFOCITOS B (LMB)

3.1. - Concepto

La linfocitosis monoclonal de linfocitos B (LMB) es una entidad caracterizada por la presencia de pequeñas poblaciones de linfocitos B monoclonales ($<5 \times 10^9/L$) circulantes en la SP de adultos, por lo demás sanos -en ausencia de LLC-B u otro SLPC-B, procesos infecciosos o enfermedades autoinmunes- (324). Es una categoría diagnóstica de descripción relativamente reciente, incluida por el Grupo de Trabajo del Instituto Nacional del Cáncer/Taller Internacional de LLC-B (NCI-WG/IWCLL) en la

última revisión de las pautas de diagnóstico y tratamiento de la LLC-B (325); su significado clínico es por el momento desconocido.

La relación existente entre la LMB y la LLC-B u otros SLPC-B ha sido un área de investigación intensa a lo largo de la última década. En el momento actual parece claro -por los resultados obtenidos a partir de estudios poblacionales- que la LMB es un estadio que precede prácticamente siempre a la LLC-B, después de un período de "latencia" de varios años (326, 327); no obstante, aparentemente la mayoría de las LMB tienen una capacidad limitada de evolucionar a LLC-B, de manera que la tasa de progresión anual a LLC-B u otro SLPCB clínicamente manifiesto se sitúa en torno al 1% (328). Así mismo, se ha descrito un incremento en la prevalencia de casos de LMB en familiares de primer grado de pacientes con LLC-B (329-331). Todos estos hallazgos sugieren que la presencia de clones linfoides B circulantes en sujetos sanos podría ser un indicador útil para el diagnóstico precoz de la enfermedad; además, la observación de que la LMB antecede a la LLC-B (327) resalta la necesidad de estudiar los eventos moleculares tempranos que conducen al desarrollo de la LLC-B, cuyo conocimiento a su vez llevaría a la identificación de nuevas dianas terapéuticas, que retrasen e incluso prevengan la progresión a LLC-B.

3.2. - Antecedentes históricos

La citometría de flujo multiparamétrica junto al empleo de los contadores hematológicos, para la realización de hemogramas de rutina y recuento diferencial de leucocitos ha constituido en gran medida la herramienta metodológica fundamental que ha permitido la identificación y descripción de la LMB como una nueva entidad. Los primeros estudios, de mediados de los años 80 (332-334), ya describían en algunos

sujetos la presencia de un incremento de linfocitos B circulantes que cumplieran los criterios fenotípicos (pero no clínicos) característicos de LLC-B, y que aunque posteriormente podía evolucionar a una enfermedad maligna, habitualmente permanecía estable durante largos períodos de tiempo (335). A esta situación particular en la que se constataba la presencia de células similares a las de la LLC-B, en ausencia de otros criterios diagnósticos de la enfermedad, se le acuñaron diversos nombres como linfocitosis monoclonal benigna de células B (332), linfocitosis crónica idiopática persistente (333) o linfocitosis B monoclonal de significado incierto (334, 336). Aunque con menor frecuencia, en paralelo otros autores comprobaron la existencia de una situación similar en sujetos que presentaban linfocitos B CD5⁻ (332, 337-340).

En este periodo el empleo en paralelo de marcajes dirigidos a evaluar el desequilibrio en la relación $\kappa:\lambda$ de las cadenas ligeras de las Ig expresadas en las células B CD19⁺ con fenotipo de LLC-B, permitió confirmar la clonalidad de estas células B presentes en cantidad de ≥ 100 células/ μ L en individuos por lo demás sanos, que a veces presentaban linfocitosis reactivas de células T (328). Posteriormente, el empleo de técnicas de citometría de flujo multiparamétrica más sensibles, basadas en el análisis simultáneo de CD19, CD5, CD20 y CD79b, aumentaron la capacidad de identificación de células fenotípicamente similares a las de la LLC-B, presentes en SP en frecuencias de hasta 1 célula entre 10.000 leucocitos normales (341, 342). En definitiva, la sensibilidad progresivamente más elevada de la citometría de flujo, ha facilitado la identificación de pequeños clones linfoides B circulantes en sujetos que no presentaban evidencia de enfermedad, incluso en ausencia de linfocitosis B. Este hallazgo generó un problema diagnóstico, ya que estos sujetos no podían clasificarse como LLC-B, pero a la vez sería inapropiado considerarlos como individuos completamente normales. Es

entonces cuando surge por consenso internacional el término de "**Linfocitosis B monoclonal**" para la identificarlos y diferenciarlos de la LLC-B y otros SLPC-B (324).

Uno de los primeros estudios en los que se refiere el término LMB, fue el realizado entre 1991 y 1994 sobre población general, por el Centro Nacional para la Salud Medioambiental de EEUU, como parte de un amplio proyecto de investigación cuyo objetivo primordial se centró en determinar el impacto sobre la salud de un entorno de vertidos de desechos peligrosos (343-345). El protocolo de estudio consistía en un panel básico para el análisis inmunofenotípico de linfocitos de SP con marcadores inmunológicos agrupados en combinaciones dobles que inicialmente no incluían el análisis de la expresión de las cadenas ligeras de las Ig kappa y lambda. De un total de 1926 sujetos de entre 40 y 78 años incluidos en el estudio, 11 presentaban linfocitos B con fenotipo anormal en SP asociados en 10 de estos casos a un aumento del número total de células B circulantes.

Estudios posteriores confirmaron que estos linfocitos B fenotípicamente anormales mostraban expresión restringida de cadena ligera κ o λ de Igs en su membrana (346). Poco tiempo después del primer estudio de seguimiento un paciente fue diagnosticado de LLC-B muriendo debido a progresión de la enfermedad dos años después de haberle detectado la población anormal de células B. Un segundo sujeto fue diagnosticado de macroglobulinemia de Waldenström, permaneciendo en este caso la enfermedad estable hasta el último estudio de seguimiento referido. Varios años mas tarde, Rachel y cols (347) evaluaron también la presencia de linfocitos B fenotípicamente anormales en la SP de 5141 donantes de sangre de entre 18 y 79 años de edad; para ello, emplearon una estrategia metodológica similar a la descrita en el estudio anterior. En 7 casos de esta serie (0,14%) los autores detectaron linfocitos B clonales circulantes (335, 347). La principal novedad de este estudio respecto al llevado

a cabo por el Centro Nacional para la Salud Medioambiental de EEUU fue la demostración clara de que la LMB puede detectarse en ausencia de linfocitosis absoluta, ya que el grupo de estudio de donantes sanos presentaban recuentos sanguíneos de linfocitos normales.

Posteriormente, dos estudios independientes realizados, uno en el Reino Unido y el otro en Italia, investigaron la prevalencia de poblaciones linfoides B anormales en muestras de SP de sujetos con un recuento normal de linfocitos en SP utilizando técnicas de citometría de flujo más sensibles que las empleadas en los trabajos anteriores, basadas en marcajes cuádruples (124, 348). En el estudio del Reino Unido (348) se incluyeron un total de 910 pacientes ambulatorios de hospital (425 varones y 485 mujeres) con una mediana de edad de 57 años (rango: 40-90 años), recuentos sanguíneos normales, sin antecedentes oncológicos ni sospecha de padecer cáncer en ese momento. En 32 de los 910 casos (3,5%) los autores identificaron células B clonales circulantes con un fenotipo característico de LLC-B en SP. La frecuencia de detección de linfocitos B clonales era mayor en varones (proporción hombre:mujer de 2,2:1) y su frecuencia se incrementaba claramente con la edad, desde un 2,1% en sujetos de entre 40 y 60 años, hasta 5% de los mayores de 60 años. El recuento absoluto de células B con fenotipo de LLC era en general bajo (mediana de 13 células/ μ L; rango de 3 a 1458 células/ μ L) y en la mayoría de los casos estas células representaban una proporción muy pequeña del total de los linfocitos B (mediana de 11%, rango: 3% - 95%). Además, se identificaron 9 casos (1% de los 910 pacientes) en los que los linfocitos B fenotípicamente anormales eran CD5⁻. En estos casos la presencia de LMB CD5⁻, se identificó gracias a la existencia de un desequilibrio en el cociente Smlg κ /Smlg λ dentro de los linfocitos B totales, correspondiendo estos pacientes a individuos de edad más avanzada (mediana de edad de 78 años; rango: 49-88) (348).

El estudio italiano (124) se llevó a cabo sobre población general de una comunidad rural del área de Turín. En él se incluyeron un total de 500 adultos (mediana de edad de 74 años; rango: 65 - 98 años), de los cuales 231 eran varones y 269 mujeres, y a los que se les realizó un análisis rutinario de sangre. Todos los individuos incluidos en el estudio tenían recuentos sanguíneos normales sin evidencia de linfocitosis, no presentaban antecedentes oncológicos ni sospecha de padecer cáncer en el momento del análisis de sangre. Utilizando un protocolo sensible y específico para la identificación de células B clonales de tipo LLC, se detectaron células con fenotipo de LLC-B en el 5,5% de los individuos, porcentaje similar al referido en el estudio del Reino Unido para el grupo de sujetos mayores de 60 años (348). Las células con fenotipo de LLC-B representaban una pequeña proporción del total de linfocitos B CD19⁺ (mediana de 1,7%; rango: 0,7%-4%). Al igual que se había observado en el estudio británico, la frecuencia con la que se detectaban células B monoclonales aumentaba con la edad de los sujetos, siendo más alta en individuos de >75 años de edad (prevalencia de 2,4% para los sujetos de entre 65 y 74 años y de 5,7% para los de >75 años). Además existía también un predominio masculino, sobre todo en el último grupo etario. En este estudio se describió también la presencia de un pequeño porcentaje de casos de LMB CD5⁻ (1,4%). Por tanto, pese al diferente origen geográfico y al distinto criterio de selección de los sujetos estudiados (población general vs. pacientes ambulatorios de hospital), los dos grupos de investigación comunicaron resultados muy similares en lo que se refiere a la frecuencia de detección de linfocitos B clonales circulantes y su distribución por edad y sexo en adultos con recuentos normales de linfocitos en SP.

En paralelo con las series anteriores, se ha descrito también que los familiares de primer grado de pacientes con LLC-B presentan una prevalencia de LMB de tipo LLC-B bastante más elevada que la población general mayoritariamente no relacionada con

pacientes de LLC-B. Es bien sabido que los familiares de pacientes con LLC-B y otros SLPC-B tienen un mayor riesgo de desarrollar LLC-B (158, 349); de igual forma, los primeros informes de LMB provienen de estudios realizados con familiares aparentemente sanos de pacientes con LLC-B (350). Estudios más recientes han demostrado una elevada prevalencia de LMB de tipo LLC-B en individuos con historia familiar de LLC-B y recuentos sanguíneos normales (prevalencia de 13,5-18%) (329, 351). De hecho, el grupo británico que llevó a cabo el estudio descrito anteriormente aplicó la misma metodología de detección de poblaciones de LMB en la población general, a una serie de familiares de primer grado de pacientes con LLC-B, encontrando una prevalencia cuatro veces superior de LMB en este último grupo de sujetos con mayor predisposición genética a padecer LLC-B (348, 351). Además de estos estudios (329, 351) que muestran claramente que los parientes de primer grado de pacientes con LLC-B familiar tienen una prevalencia más alta de LMB que la población general, otros estudios recientes sugieren que también en los familiares de primer grado de pacientes con LLC-B esporádica se detecta con mayor frecuencia que en la población general, la presencia de pequeños clones de linfocitos B circulantes, especialmente entre sujetos con más de 60 años (330).

3.3. - Criterios diagnósticos y clasificación de la LMB

El motivo que ha llevado al establecimiento de la LMB como una nueva entidad diagnóstica ha sido doble. En primer lugar, englobar bajo una categoría diferente a la de los pacientes con SLPC-B, a todos aquellos sujetos en los que se detecta en SP una población clonal de linfocitos B pero que no cumplen los criterios diagnósticos actuales de dichos SLPC-B. En segundo lugar, la definición de la LMB como entidad suponía

también el poder disponer de una plataforma idónea para investigar la enfermedad y conocer el riesgo de progresión a un SLPC-B clínicamente manifiesto. Los criterios diagnósticos propuestos originalmente para la LMB (324) se describen en detalle en la Tabla 5.

Tabla 5. Criterios de diagnóstico y subclasificación de la linfocitosis monoclonal de linfocitos B (LMB) (324, 352)

I.- Criterios Diagnósticos de LMB

- 1) Identificación en sangre de una población de linfocitos B monoclonal^a mediante al menos una de las siguientes técnicas:
 - a) Restricción de cadena ligera de inmunoglobulina:
La proporción global de la relación de células B kappa⁺:lambda⁺ > 3:1 o <0.3:1 o >25% de células B con expresión débil o ausente de SmIg
 - b) Reordenamiento monoclonal del gen de las cadenas pesadas de las Igs (*IGHV*)
- 2) Presencia de un patrón inmunofenotípico específico de enfermedad linfoproliferativa^b
- 3) Recuento absoluto de células B <5x10⁹/L
- 4) Ninguna otra característica de SLPC-B o enfermedad infecciosa/autoinmune
 - a) Examen físico normal (ausencia de adenopatías u organomegalias)
 - b) Ausencia de síntomas B (p. ej.: fiebre, pérdida de peso y/o sudoración nocturna) atribuibles a LNH
 - c) Ausencia de enfermedades infecciosas/autoinmunes

II.- Criterios para subclasificación de LMB

- A) *Fenotipo tipo LLC-B*
Coexpresión de CD5 y CD19
Positividad para CD23, expresión débil de CD20; restricción de cadena ligera con expresión débil de SmIg (aunque es raro, algunas poblaciones B aberrantes pueden ser oligoclonales y en consecuencia, no presentar restricción de cadena ligera)
- B) *Fenotipo tipo LLC-B atípica*
Co-expresión de CD5 y CD19
Negatividad para CD23 o expresión intensa de CD20; restricción de cadena ligera con expresión de SmIg de intensidad moderada a elevada.
Excluir t(11;14), para descartar linfoma de células del manto
- C) *Fenotipo tipo no-LLC-B*
CD5 negativo
Expresión de CD20
Restricción de cadena ligera con expresión de SmIg de intensidad moderada a elevada

^aAl repetir los ensayos, la presencia de la población monoclonal de linfocitos B debe permanecer estable durante un periodo mínimo de 3 meses.

^bEn ausencia de un patrón inmunofenotípico específico de enfermedad, un desequilibrio en la relación de células kappa⁺:lambda⁺ puede ser el resultado de un proceso reactivo.
SmIg: inmunoglobulina de superficie. LNH: linfoma no-Hodgkin.

Además, en paralelo con la definición de criterios diagnósticos, se estableció un sistema de clasificación de la LMB (Tabla 5) mediante el cual se diferencian tres subtipos distintos de LMB en función de si el patrón fenotípico de los linfocitos B clonales identificados es similar o no al de la LLC-B. Las formas más frecuentes son las LMB de tipo LLC-B, caracterizadas por presentar un patrón fenotípico de LLC-B típica (coexpresión de CD5 y CD23 junto con expresión débil de CD20, CD79b y SmIgs). Los otros dos subtipos de LMB son mucho más raros y muestran ausencia de expresión de CD5 (LMB de tipo no-LLC-B) o positividad para CD5 en ausencia de un fenotipo típico de LLC-B consistente por ejemplo, en expresión fuerte de CD20, CD79b y/o SmIg (LMB con fenotipo de LLC-B atípica). Dentro de este último grupo -sujetos con poblaciones monoclonales CD5⁺ y CD23⁻- debe excluirse el diagnóstico de linfoma de células del manto mediante por ejemplo, el estudio genético/molecular de la translocación t(11;14) (Tabla 5).

En los siguientes apartados se describen las características fenotípicas, genéticas y moleculares más relevantes de cada uno de los dos subtipos principales de LMB (tipo LLC-B vs. no-LLC-B), y sus diferencias y similitudes con las células B tumorales de sus correspondientes SLPC-B.

3.4. - LMB tipo LLC-B

3.4.1. - Características inmunofenotípicas y genéticas

Como su nombre indica, las células clonales de la LMB tipo LLC-B tienen un fenotipo similar al de la LLC-B típica siendo CD5⁺, CD19⁺, CD20^{+débil}, CD23⁺, CD79b^{+débil}, SmIg^{+débil} y FMC7^{-/+débil} (348, 351). En los últimos años diversos trabajos

se han centrado en analizar las posibles diferencias en el perfil de expresión proteica de las células B clonales de la LMB respecto a las de la LLC-B, evaluando un número amplio de moléculas. De forma sistemática, no se han encontrado diferencias significativas entre ambas entidades. A este respecto, uno de los estudios más representativos ha sido el llevado a cabo recientemente por Rawstron y cols. (353) en el que se analizaron las posibles diferencias en el patrón de expresión de 18 marcadores de célula B en sujetos con LMB respecto a pacientes con LLC-B y otros SLPC-B, además de en sujetos sanos (353). En términos generales, el análisis no supervisado de los datos fenotípicos realizado por estos autores, confirmó la existencia de diferencias fenotípicas entre la LLC-B y otros SLPC-B, pero no entre la LLC-B y la LMB tipo LLC-B, formando estas últimas entidades un único *cluster*.

Desde el punto de vista genético, se ha demostrado la presencia de alteraciones en ~40% de las LMB tipo LLC-B vs >50% de las LLC-B. En general, en los estudios referidos en la bibliografía se ha detectado presencia de del(13q14) en una proporción significativa de LMB, siendo esta la anomalía genética más frecuentemente encontrada en este subtipo de LMB. En este sentido, merece destacar que en las LMB portadoras de esta alteración genética, casi invariablemente ésta sólo afecta a una parte de todas las células B clonales que oscilaba entre 5% y 90% de las células B clonales entre los pacientes ambulatorios con LMB y recuentos sanguíneos normales estudiados por el grupo de Leeds (328). Por el contrario, merece destacar que aquellas alteraciones genéticas asociadas a peor pronóstico en la LLC-B -del(11q) y del(17p)- solo estaban presentes en <20% de las células B clonales de una minoría de casos de LMB, asociadas en todos ellos a linfocitosis (Tabla 6). En la Tabla 6 se recoge a modo de resumen la frecuencia de las diferentes alteraciones genéticas presentes en células B de sujetos con

LMB tipo LLC-B respecto a la frecuencia encontrada en la LLC-B en las distintas series estudiadas hasta la fecha.

Tabla 6. Alteraciones genéticas presentes en las células B clonales de sujetos con LMB tipo LLC-B vs LLC-B (354)

	Delección 13q	Trisomía 12	Del(11q)	Del(17p)
LMB sin linfocitosis (HMDS, Leeds (328))	39(15/38)	18(4/22)	0(0/21)	0(0/10)
LMB sin linfocitosis y familiares de pacientes con LLC-B (Duke university (355))	67(5/9)	ND	ND	ND
LMB con linfocitosis (HMDS, Leeds (328))	58(19/33)	21(7/33)	6(2/33)	3(1/33)
LMB con linfocitosis (Mayo Clínic (356))	44(56/126)	18(23/126)	2(2/126)	3(4/126)
-----	-----	-----	-----	-----
LLC-B (183)	54(178/238)	16(53/325)	18(58/235)	7(23/325)

Resultados expresados como porcentaje de casos (n° de casos/total de casos)

ND: No determinado

3.4.2. - Características moleculares de los genes *IGHV*

Aunque los estudios referidos hasta la fecha deben considerarse como preliminares y sus resultados están lejos de ser definitivos, en ellos se sugiere la existencia de diferencias en el repertorio de las familias de los genes *IGHV* que expresan las células B clonales de las LMB sin linfocitosis (población general) vs LMB con linfocitosis (población hospitalaria). A su vez, los pacientes con LMB asociada a una linfocitosis absoluta presentan un repertorio *IGHV* similar al de las LLC-B mutadas, expresando en alrededor de la mitad de los casos las familias *IGHV3-07*, *IGHV3-23* e *IGHV4-34* (328); este patrón de expresión de genes *IGHV* típico de LMB con linfocitosis y LLC-B también se ha descrito en casos de LMB familiar (357). Además,

los sujetos con LMB y linfocitosis absoluta muestran predominantemente un patrón mutado de los genes *IGHV* (77-90% de los casos) (328, 356). Por el contrario, el repertorio de genes *IGHV* de los casos de LMB en adultos sanos sin linfocitosis parece diferente (358) al de la LMB "clínica" y la LLC-B, siendo en ellos poco frecuente el uso de las familias *IGHV1-69*, *IGHV4-34* e *IGHV3-23* (358). Algunos trabajos sugieren incluso el uso preferencial de la familia *IGHV4-59/61* en la LMB de la población general, no estando especialmente representadas éstas familias de genes *IGHV* en la LLC-B o la LMB con linfocitosis (358). No obstante, estos datos deben ser confirmados en series más amplias, que determinen si realmente las células B clonales de los sujetos con LMB de la población general (adultos sanos sin linfocitosis) muestran un repertorio diferente de expresión de los genes *IGHV*.

Por otra parte, merece destacar que en alrededor de 20-25% de las LLC-B se observan secuencias estereotipadas de CDR3 (región determinante de complementariedad 3) de la cadena pesada de las Igs, lo cual apoyaría la posible existencia de un reconocimiento de epítomos antigénicos repetitivos, compartidos entre pacientes que padecen LLC-B esporádica (no familiar) (199). Por el contrario, datos preliminares sugieren que estas mismas secuencias estereotipadas de la región CDR3 sólo estarían presentes en una pequeña fracción (<5%) de individuos sanos con LMB, constituyendo aparentemente ésta otra diferencia biológica con la LLC-B (358).

En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis propuesta por Ghia y cols (358), que sostiene que el repertorio *IGHV* de la LMB con recuentos muy bajos de células B clonales circulantes, podrían ser diferente al de la LLC-B y que dentro de estas LMB, aquellos sujetos que expresan ciertas familias *IGHV* tendrían un mayor riesgo de progresar a LLC-B.

3.5. - LMB tipo "no-LLC-B típica"

3.5.1. - Características inmunofenotípicas y genéticas

Como hemos referido anteriormente, la gran mayoría de los datos publicados hasta la fecha sobre LMB, se refiere a sujetos en los que las células B clonales muestran un fenotipo tipo LLC-B, al ser éste con diferencia el subtipo más frecuente de LMB. Por el contrario, la información disponible acerca de los otros dos subtipos de LMB, en los que las células B clonales circulantes tienen un fenotipo diferente del de la LLC-B típica es muy escasa (124, 324, 328). En parte, esto es debido a que estos casos son mucho menos frecuentes (entre 1% y 2,5% de las LMB), sobre todo en la población general (LMB sin linfocitosis) (327, 352, 354). De hecho, hasta el momento de iniciar el presente trabajo de tesis doctoral, solo dos grupos habían publicado series cortas de sujetos con esta entidad. Ghia y cols (124) recogieron en su trabajo de 2004 un total de 10 casos de LMB de tipo no-LLC-B típica, de los que 3 (30%) tenían un fenotipo superponible al de una LLC-B atípica ($CD5^+/CD20^{++}/CD23^+/sIg^{+d}$) y los 7 restantes eran LMB de tipo "no-LLC-B" $CD5^-,CD20^{++},CD23^-,SmIg^+$ (Tabla 7). En un trabajo posterior, Amato y cols describieron 7 casos de LMB de tipo no-LLC-B ($CD5^-/CD20^{++}/CD23^-$) (359) (Tabla 7). Los casos del grupo italiano (124) se identificaron a partir de un estudio realizado sobre 500 adultos sanos seleccionados de la población general sin linfocitosis (frecuencia de LMB tipo LLC-B atípica de 0,6% y de LMB tipo no-LLC-B de 1,4%), mientras que los del estudio de Amato eran pacientes hospitalizados por distintos motivos, en los que se detectó linfocitosis absoluta en un análisis de rutina. El resto de los casos de LMB de tipo no-LLC-B referidos en publicaciones científicas corresponden a casos aislados (≤ 2 sujetos por estudio)

identificados por otros grupos, de los que con frecuencia ni siquiera hay referencia clara a sus características fenotípicas (327, 340, 348, 358).

Salvo en el estudio de Amato y cols (359), no existe una descripción de las características genéticas de los casos de LMB no-LLC-B típica. Respecto a los casos referidos por Amato y cols (359) 5/7 presentaban alteraciones genéticas: en dos de estos cinco casos se detectó la presencia de un isocromosoma 17q con pérdida de p53, otros dos tenían alteraciones a nivel del cromosoma 7q y el quinto caso presentaba una delección en el brazo corto del cromosoma 12 (Tabla 7).

Tabla 7. Datos clínicos y características fenotípicas de las poblaciones de células B clonales de sujetos con LMB tipo no-LLC-B típica descritos en la bibliografía

Referencia	Grupo de estudio	Mediana de edad en años (rango)	Total de sujetos en el estudio	Prevalencia de LMB de tipo no-LLC (%)	Nº del caso ^a	Sexo	Edad (años)	Nº de linfocitos (x10 ⁹ /L)	Recuento absoluto de células LMB/µl	PERFIL INMUNOFENOTÍPICO												
										CD5	CD10	CD20	CD23	CD38	CD79b	CD103	FMC7	SIgκ	SIgλ	SIgM		
Rawstron y cols. Blood 2002 (351)	LMB de tipo no LLC-B en familiares de primer grado de pacientes con LLC-B	45 (23-79)	59	1,7%	18203	M	81	Normal	54	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓			
										El fenotipo se informó como compatible con LZM												
Rawstron y cols. Blood 2002 (348)	LMB de tipo no LLC-B CD5 ⁺ de pacientes ambulatorios de hospital del Reino Unido	NR (> 40años)	910	1%	No informado (n=9)	NR	78 ^b (49-88)	NR	NR	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓			
										Sin información detallada												
Ghia y cols. Blood 2004 (124)	LMB de tipo LLC-B atípica de población rural de Italia	74 (65-98)	500	0,6%	10	M	78	Normal	NR	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓		
					11	F	65	Normal	NR	+	-	++	+	NR	+d	NR	-	+	-	-	+d	
					12	F	68	Normal	NR	+	-	++	+	NR	+d	NR	-	+	-	-	+d	
					13	F	78	Normal	NR	-	-	++	-	NR	NR	NR	+	+	-	-	+d/+	
					14	F	78	Normal	NR	-	-	++	-	NR	+	NR	+	-	+	-	+d/+	
	LMB de tipo no LLC-B CD5 ⁺ de población rural de Italia	74 (65-98)	500	1,4%	15	M	76	Normal	NR	-	-	++	NR	NR	+	NR	NR	+	-	-	+d/+	
					16	M	80	Normal	NR	-	-	++	-	NR	+	NR	NR	+	+	-	+d/+	
					17	M	81	Normal	NR	-	-	++	-	NR	+	NR	+	+	-	-	+d/+	
					18 ^c	M	86	Normal	NR	-	-	++	-	NR	+	NR	+	+	-	-	+d/+	
					19 ^c	M	74	Normal	NR	-	-	++	-	NR	+	NR	+	+	-	-	+d/+	
Amato y cols. Am J Clin Pathol 2007(359)^{de}	LMB de tipo no LLC-B CD5 ⁺ de pacientes hospitalizados con linfocitosis (>3,5x10 ⁹ /L)	NA	NA	NA	1 ^f	M	75	8.2	NR	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
					2 ^f	M	72	5.3	NR	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	NR	
					3 ^f	F	75	4.3	NR	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	NR	
					4	M	56	9.4	NR	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	NR	
					5	F	80	3.6	NR	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	NR	
					6	F	72	4.8	NR	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	NR	
					7	M	79	4.1	NR	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	NR	
Dagklis y cols. Blood 2009 (358)	LMB de tipo LLC-B atípica en población rural (Italia)	55 (18-102)	1725	1,2%	No detallado (n=20)	NR		Normal	NR	✓		✓					✓	✓				
	LMB de tipo no LLC-B CD5 ⁺ en población rural (Italia)	55 (18-102)	1725	1,1%	No detallado (n=19)	NR	70-79 ^b	Normal	NR	+												
										Sin información detallada												
										Sin información detallada												
Landgren y cols. NEJM 2009 (327)	LMB de tipo no LLC-B CD5 ⁺ en una cohorte de sujetos que desarrollaron un SLPC ^g	NA	NA	NA	8 ^g	NR	NR	NR	NR	✓	✓		✓				✓	✓				
										-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	-	-	NR

^a Los números de esta columna corresponden al número del caso original (código de identificación) proporcionado en la publicación; ✓: indica que ese marcador se ha empleado en el artículo correspondiente (además de CD19), para caracterizar los linfocitos B). M: masculino; F: Femenino; LZM: linfoma de zona marginal. NR: no referido.

^b Mediana de edad / rango de edad. Expresión de antígenos inmunofenotípicos: –, ausencia de expresión; +d, expresión débil; +, expresión clara; ++, expresión fuerte. La información precisa (individualizada) acerca de la expresión de los antígenos CD11a, CD11c, CD22, CD24, CD25, CD27 y CD43 no se proporciona en ninguna serie, a pesar de que algunos de estos marcadores se han empleado para la caracterización inmunofenotípica (CD11a, CD22 y CD27 en (348, 351)).

^c Casos biclonales: en estos dos casos coexiste un clon de LMB de tipo LLC-B con un clon no-LLC-B típica (124).

^d No se proporciona información acerca de la intensidad de expresión de antígenos, excepto para las SmIg (359).

^e El porcentaje de células LMB de tipo no LLC-B respecto del total de células B está entre el 95% y el 99% (359). NA: no aplicable. Cariotipo (359): Caso 1: i(17)(q10); Caso 2: del(12)(p11.3p13.1); Caso 3: t(2;7)(p11;q22); Caso 4: +5; i(17)(q10); Caso 7: del(7)(q31q34).

^f Estos 3 casos también se han descrito en una publicación previa realizada por el mismo grupo (339).

^g Estudio prospectivo realizado sobre una cohorte de adultos durante un largo período de tiempo. Cuarenta y cinco individuos (de una cohorte total de 77.469 sujetos adultos) fueron diagnosticados de LLC-B unos 7 años después de la recogida de sus muestras de sangre; en 44/45 individuos se encontró un clon LMB en la SP recogida antes del diagnóstico; en uno de ellos (caso n° 8 de esta serie) el inmunofenotipo de LMB fue compatible con LMB de tipo no LLC-B CD5⁻ (327).

3.5.2. - Características moleculares de los genes *IGHV*

La información disponible acerca de las características moleculares (estado mutacional y patrón de expresión de familias *IGHV*) de los linfocitos B clonales de sujetos con LMB tipo "no-LLC-B típica" es por el momento muy limitada. Respecto al estado mutacional de la *IGHV*, Amato y cols (359) detectaron hipermutación somática (<98% de homología con la línea germinal) de los genes *IGHV* en 6 de los 7 casos referidos, lo que sugiere que estas poblaciones clonales derivan de células B del centro germinal o post-centro germinal. En este mismo trabajo se describe el uso de la región *IGHV3* en 3 de los 7 casos, familia que a su vez también se detecta con relativa frecuencia en linfocitos B CD5⁻ normales de SP (359, 360); los 4 casos restantes presentaban las familias *IGHV1*, *IGHV2* e *IGHV4*. En ninguno de estos casos se identificó el uso de genes *IGHV* comunes en la LLC-B (361).

3.6. - Significado clínico de la LMB: relación entre LMB y leucemia linfática crónica-B (LLC-B)

En 2005, cuando se establecieron los criterios diagnósticos de LMB no estaba claro si los individuos con LMB de tipo LLC-B tenían o no un riesgo más elevado de desarrollar LLC-B. No obstante, posteriormente se han referido varios estudios en los que se buscó determinar la posible relación evolutiva existente entre la LMB y la LLC-B. Las pruebas más evidentes acerca de la existencia de dicha relación provienen de estudios llevados a cabo sobre individuos aparentemente sanos, de familias con predisposición genética a padecer LLC-B (357). Como hemos referido anteriormente, en estos estudios se demostró que el perfil inmunofenotípico de las células B de las

LMB de tipo LLC-B es idéntico y superponible al de las células tumorales de la LLC-B, para un amplio número de marcadores (353). De igual manera, se observó que los linfocitos B clonales de casos con LMB con frecuencia presentan alteraciones genéticas asociadas en la LLC-B a buen pronóstico -del(13q14.3)- o pronóstico intermedio (trisomía 12), encontrándose estas anomalías en proporciones similares en ambas entidades, independientemente del número absoluto de células B clonales tipo LLC-B circulantes en las LMB (328, 362) (Tabla 8). Así mismo, de forma similar a lo que se observa en la LLC-B de buen pronóstico, los linfocitos B clonales de la gran mayoría de las LMB de tipo LLC-B poseen mutaciones somáticas de los genes *IGHV* (<98% de homología con la línea germinal), independientemente del número de células B clonales circulantes (Tabla 8). Además, como la LLC-B, en la que las células neoplásicas muestran un uso preferencial de algunas familias de genes *IGHV* respecto al repertorio de los linfocitos B normales de SP (204), algunos estudios recientes han sugerido que las LMB de tipo LLC-B asociadas a recuentos relativamente altos de células B clonales tienen un patrón de uso preferencial de familias *IGHV* del BCR similar al de la LLC-B (328, 362). Por el contrario, las familias *IGHV* de las LMB de tipo LLC-B que presentan recuentos bajos de células B clonales podrían ser diferentes al de la LLC-B. Estos hallazgos sugieren que, podrían existir algunos subtipos de BCR específicos capaces de inducir la expansión del clon B, mientras que la relación entre el número de células B con fenotipo LLC-B y no la capacidad de evolución a LLC-B sería menos evidente (358). De acuerdo con estos hallazgos, se comprobó también que sólo en las LMB con números elevados de linfocitos B clonales circulantes (>1000 células/ μ L), se detectaban alteraciones genéticas asociadas a mal pronóstico en la LLC-B, -del(11q) y del(17p)-, si bien dichas alteraciones normalmente sólo se encontraban en una pequeña proporción de las células B clonales de un grupo minoritario de sujetos con LMB y

linfocitosis absoluta (363). En conjunto, estos hallazgos sugieren la existencia de un gradiente progresivo desde la LMB con "bajos recuentos" de células B clonales a la LMB con linfocitosis B absoluta, y la LLC-B, siendo además la frecuencia relativa de estos procesos progresivamente menor.

Tabla 8. Características biológicas de las LMB tipo LLC-B de acuerdo con el número absoluto de linfocitos B clonales circulantes, en comparación con las LLC-B (Adaptado de Rawstron et al (364))

	Nº de células tipo LLC-B <10/ μ L	Nº de células tipo LLC-B >10 y <1000/ μ L	Nº de células tipo LLC-B >1000/ μ L	LLC-B
Prevalencia en la población adulta	>10%	3–5%	0,05%	<0,01%
Del(13q14)	36%	39%	44–58%	54%
+12	8%	18%	18–21%	16%
del(11q)	0%	0%	2–6%	18%
del(17p)	0%	0%	3%	7%
Casos mutados con <98% de homología de la IGHV con la línea germinal	50-70%	70–90%	77–90%	47–58%
Familias de genes <i>IGHV</i> más frecuentes	4-59/61	3-07, 1-69, 4-34, 3-23	3-07, 1-69, 4-34, 3-23	1-69, 3-07, 3-23, 4-34, 4-39
Ausencia de células B normales	No	Ocasional	Frecuente	Mayoría de los casos

De acuerdo con esta hipótesis, diferentes estudios recientes basados en series hospitalarias de LMB con linfocitosis, (327, 328, 356) han puesto de manifiesto un riesgo más elevado de los sujetos con LMB de progresar a LLC-B. La confirmación definitiva de la estrecha relación entre ambas entidades se ha obtenido a partir de los resultados de un ambicioso estudio prospectivo epidemiológico llevado a cabo por Landgren y cols sobre más de 77.000 adultos sanos de la población general de EEUU (327). Tras un periodo de seguimiento de más de 6 años, 45 de estos individuos fueron

diagnosticados de LLC-B; en 44 de ellos, se pudo comprobar la presencia de pequeños clones de linfocitos B en las muestras de sangre recogidas 6 o más años antes en el momento del reclutamiento. Ello sugiere que prácticamente todos los casos de LLC-B asientan sobre una situación previa de LMB, generalmente de tipo LLC-B (327).

No obstante lo anterior, el riesgo de que un individuo con LMB tipo LLC-B desarrolle leucemia es muy bajo. Así, en 2007 se señalaba que dada la elevada prevalencia de sujetos con LMB en la población general respecto a la prevalencia de la LLC-B (en estos estudios ya se mostraba que la prevalencia de la LMB es al menos 100 veces superior a la de la LLC-B), muy probablemente solo evolucionarían a LLC-B un pequeño porcentaje de casos con LMB (365). Obviamente, la primera cuestión que se planteó a continuación fue conocer qué proporción de casos de LMB evolucionan o se transforman en una LLC-B y qué factores o parámetros condicionan un riesgo más elevado de transformación de LMB a leucemia clínicamente manifiesta.

3.6.1. - Riesgo de transformación de LMB a SLPC-B clínicamente manifiesto

Desde el punto de vista práctico, es fundamental conocer el riesgo de progresión de LMB a SLPC-B para poder establecer la conducta clínica más adecuada a seguir en estos sujetos. Hasta la fecha, cinco grupos han centrado su interés en este objetivo. Así, Fung y cols estudiaron durante un promedio de 2,5 años la evolución a LLC-B de un total de 54 sujetos con LMB tipo LLC-B, en paralelo con 112 pacientes diagnosticados de LLC-B en estadio 0 de Rai. Tras ese periodo, ninguno de los 54 sujetos con LMB mostró transformación a LLC-B siendo su supervivencia libre de progresión más prolongada que la de los pacientes con LLC-B en estadio 0 de Rai

(326). Al incrementar el tiempo de seguimiento de los sujetos con LMB y linfocitosis, en estudios posteriores se ha constatado que algunos casos progresan a LLC-B clínicamente manifiesta o alcanzan cifras de linfocitos claramente asociadas a LLC-B. En este sentido, el grupo de Leeds tras un seguimiento medio de casi 7 años de una serie de 185 casos con LMB tipo LLC-B con linfocitosis comprobó la existencia de progresión a LLC-B clínicamente manifiesta (con linfadenopatía, esplenomegalia, anemia, trombopenia, duplicación del recuento de linfocitos en <6 meses, infecciones persistentes y/o sudoración nocturna) en un total de 28 casos (15%), de los que 13 (7%) requirieron tratamiento quimioterápico. A su vez, en un estudio similar de la Clínica Mayo, Mulligan y cols observaron un aumento del recuento absoluto de linfocitos totales superior a 30.000/ μ L en 18/220 LMB de tipo LLC-B (8%) (366) tras un seguimiento medio de 4 años. En conjunto, la tasa anual de sujetos con LMB tipo LLC-B que desarrollaron LLC-B subsidiaria de tratamiento fue del 1,1% en el estudio del grupo de Leeds (328) y del 1,4% en el estudio de la Clínica Mayo (325). En este sentido, merece destacar que tras un seguimiento medio de 5 años, este último grupo observó diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de tratamiento entre sujetos con LMB tipo LLC-B (n=302) y pacientes con LLC-B en estadio 0 de Rai (n=313), sin que estas se tradujeran en diferencias en la supervivencia global (325). Más recientemente, Rossi y cols comunicaron que 56/123 LMB de tipo LLC-B seguidas durante una mediana de 55 meses, pasaron con el tiempo a cumplir criterios de LLC-B (n=37) o linfoma linfocítico de célula B pequeña (LLBCP n=19). Este grupo es el que ha comunicado una tasa de progresión a LLC-B/LLCBP con necesidad de tratamiento citostático más alta: 4% al año en los primeros 7 años (367). Según estos autores, la elevada tasa de progresión observada en su serie podría ser debida a que el tiempo de seguimiento de los sujetos con LMB era más prolongado, y a

que realizaban un rastreo más riguroso de la presencia de adenopatías respecto al efectuado en estudios previos.

En resumen, los resultados de los estudios publicados hasta la fecha permiten afirmar que a los 5 años del diagnóstico de una LMB de tipo LLC-B (con linfocitosis), la mayoría de los individuos ($\approx 75\%$) van a mostrar un recuento estable de linfocitos en ausencia de enfermedad clínicamente manifiesta; por el contrario, alrededor del 1% de los casos desarrollará anualmente una LLC-B que requiere ser tratada. Curiosamente estos resultados son similares a los descritos previamente para sujetos con gammapatía monoclonal de significado incierto que evolucionan a mieloma múltiple (368, 369). No obstante, hay que tener en cuenta que el tiempo de seguimiento de las LMB tipo LLC-B sigue siendo relativamente corto. Ante estos hallazgos, se requiere que el control periódico de las LMB tipo LLC-B se realice a más largo plazo, para poder establecer con mayor precisión la verdadera tasa de progresión anual de LMB a LLC-B.

Respecto al riesgo de progresión de las LMB tipo no-LLC-B, hasta la fecha en nuestro conocimiento no existen datos fiables al respecto, al no existir series amplias de sujetos en los que se hayan detectado linfocitos B clonales de tipo no-LLC-B. Aún así, en el único trabajo en el que se refiere la evolución de sujetos con este tipo de LMB (359), en todos los casos ($n=7$) de LMB tipo no-LLC-B (con linfocitosis) los linfocitos B clonales permanecían en la sangre periférica después de un tiempo de seguimiento de entre 4 y 16 años, sin que ninguno de ellos hubiese sufrido progresión de la enfermedad y/o hubiese requerido tratamiento.

3.6.2. - Factores de riesgo de transformación maligna en la LMB

Algunos de los estudios referidos en el apartado anterior se han centrado, además de en establecer la tasa de progresión de LMB a SLPC-B clínicamente

manifiesto, en identificar factores de riesgo asociados a la transformación maligna, especialmente a LLC-B, centrándose en parámetros asociados al pronóstico de esta enfermedad. Así, en series relativamente pequeñas de casos, se ha observado una asociación entre la expresión de CD38 en los linfocitos B clonales y la necesidad de tratamiento futuro (356, 367) hallazgo que sin embargo no ha podido ser confirmado por otros autores (328). De igual forma, otros parámetros pronósticos en la LLC-B, como la presencia de mutaciones en los genes *IGHV*, la expresión de CD49d y la presencia de trisomía 12, del(11q 22-q23) y del(17p13) se han asociado también a una mayor tasa de progresión a LLC-B, en una pequeña serie de casos de LMB tipo LLC-B (367); de nuevo, estos resultados no han podido ser confirmados por otros grupos (328). Por el contrario, el único parámetro que de forma recurrente se ha asociado con un mayor riesgo de transformación a LLC-B es un recuento elevado de linfocitos, confiriendo una linfocitosis >4.000 células B clonales/ μL un riesgo de transformación anual a LLC-B de 1-2% (328, 364, 370). Ante esta situación, actualmente se aconseja realizar un seguimiento anual de todos los sujetos con LMB dirigido a vigilar la cifra de linfocitos de SP y la posible aparición de síntomas y signos de SLPC (p. ej.: fiebre o pérdida de peso, astenia, sudoración nocturna y adenopatías); por el contrario, no se recomienda la realización sistemática de otras pruebas analíticas o de imagen, que por el momento no han demostrado ser de utilidad (352).

El riesgo de progresión de los individuos con LMB de tipo LLC-B atípica o no-LLC-B está menos definido aún si cabe, y tampoco se conocen los factores asociados a un mayor riesgo de transformación a SLPC-B en estos casos. De momento, se recomienda hacer un seguimiento por parte de un hematólogo cada 3-6 meses, a aquellos individuos con LMB de tipo no-LLC-B con un fenotipo y/o estudio genético compatible con el de un linfoma de células del manto u otro subtipo de LNH agresivo,

en ausencia de adenopatías, u otra organomegalia y sin evidencia de infiltración en la biopsia de MO (371). Para los pacientes con LMB de tipo LLC-B atípica o LMB no-LLC-B con características fenotípicas de un subtipo de linfoma más indolente (p. ej.: linfoma de la zona marginal o linfoma folicular), se recomienda el seguimiento por un hematólogo cada 6-12 meses (352).

II. Hipótesis y

Objetivos

La linfocitosis monoclonal de células B (LMB) constituye una entidad de reciente descripción, caracterizada por la presencia de una expansión leve a moderada de linfocitos B (mono)clonales $<5 \times 10^9/L$ en la SP de individuos sanos, en ausencia de síntomas constitucionales (p.ej.: fiebre, sudoración nocturna, astenia, pérdida de peso), adenopatías y organomegalias palpables sugerentes de una enfermedad linfoproliferativa crónica subyacente. En la gran mayoría de los casos, los clones de linfocitos B de la LMB muestran características fenotípicas y genéticas superponibles a las de las células tumorales de la LLC-B, si bien, existe un pequeño porcentaje de adultos con LMB en los que, los clones de linfocitos B presentan un fenotipo distinto al de la LLC-B. Esta heterogeneidad fenotípica, ha motivado la subclasificación de las LMB en distintos grupos, en función de si el patrón fenotípico de los linfocitos B clonales es similar o no al de la LLC-B: las formas más frecuentes son las LMB de tipo LLC-B, caracterizadas por presentar un patrón fenotípico de LLC-B típica $CD5^+$, $CD23^+$, $CD20^{+débil}$, $SmIg^{+débil}$ y $CD79b^{+débil}$, y en menor medida las LMB $CD5^-$ o LMB de tipo no-LLC-B; además, se define un tercer grupo de LMB $CD5^+$ pero con un fenotipo que no es típico de LLC-B (LMB con fenotipo de LLC-B atípica).

Estudios recientes, en los que se han empleado técnicas de citometría de flujo multiparamétrica, han demostrado la elevada frecuencia con la que se detectan estas pequeñas poblaciones de células B clonales en la SP de adultos sanos, oscilando su prevalencia entre 3,5% y 7% (dependiendo de la sensibilidad de la técnica empleada para su detección y del número de células analizadas) de la población general con recuentos normales de linfocitos y un 13% de los adultos con linfocitosis absoluta. Así mismo, esta frecuencia se incrementa considerablemente hasta el 13% a 18% entre los familiares de primer grado de pacientes con LLC-B.

Aunque en la mayoría de los casos estas poblaciones clonales de células B muestran un curso clínico estable e indolente, su detección en individuos sanos resulta de gran interés y relevancia ya que de forma recurrente se ha observado una tasa de transformación de LMB con linfocitosis a LLC-B de alrededor del 1% anual, a la vez que existe evidencia de que prácticamente todas las LLC-B podrían ir precedidas de una LMB. Este último hallazgo sugiere que el desarrollo de la LLC-B (y posiblemente también de otros SLPC-B) como enfermedad clínicamente manifiesta, podría estar precedido de un periodo silente en el que podrían detectarse en SP pequeños clones de células B de supervivencia prolongada. Inicialmente, la expansión clonal de estas células B podría estar relacionada y/o condicionada por procesos de estimulación antigénica crónica mantenida a lo largo del tiempo; posteriormente, estas células podrían acumular alteraciones genéticas que, en el contexto de una dotación genética concreta, podrían conllevar una probabilidad incrementada de transformación neoplásica y de progresión maligna. Ello contribuiría a explicar la presencia de pequeñas subpoblaciones de células B (mono)clonales en una proporción significativamente alta de individuos aparentemente sanos, especialmente en adultos de edad avanzada.

Por todo lo anteriormente expuesto, la identificación de células aberrantes/clonales en adultos sanos, sin evidencia de síntomas y signos de SLPC-B, podría constituir una herramienta única de gran utilidad para el diagnóstico precoz de la enfermedad incluso en fases previas a la transformación neoplásica y la progresión maligna. Además, la identificación temprana de estas células facilitaría el estudio de los eventos y mecanismos involucrados en los procesos de progresión de la enfermedad y la identificación de marcadores fenotípicos, genéticos y moleculares hasta ahora desconocidos, que puedan contribuir a conocer la historia natural y la evolución de los

SLPC-B, a semejanza de lo que ocurre en sujetos con gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) de los que aproximadamente una cuarta parte progresa a mieloma múltiple u otro SLPC-B en los 10 años siguientes al diagnóstico de su gammapatía. En otras palabras, la caracterización exhaustiva de clon de linfocitos B expandido en sujetos sanos con LMB podría contribuir, no solo a establecer nuevas estrategias de diagnóstico precoz de este desorden linfoproliferativo, sino también a identificar grupos de riesgo que podrían beneficiarse de una intervención terapéutica temprana. En este sentido, merece destacar que de momento seguimos sin disponer de ningún marcador de riesgo de progresión de LMB a SLPC-B clínicamente manifiesto, especialmente en el caso de la LMB de la población general (sujetos sin linfocitosis), y así esclarecer si la LMB en sí constituye un proceso neoplásico pre-maligno o si por el contrario representa una condición fisiológica asociada a estimulación antigénica crónica y/o a la inmunosenescia de linfocitos B característica de edades avanzadas, constituyendo simplemente la contrapartida normal de las células B neoplásicas de la LLC-B y otros SLPC-B portadores de alteraciones adicionales que en la actualidad siguen siendo en gran medida desconocidas.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo doctoral nos hemos planteado como objetivo general del mismo, profundizar en el conocimiento de la linfocitosis monoclonal de células B de adultos sanos sin linfocitosis seleccionados de la población general de la provincia de Salamanca, a través de los siguientes objetivos específicos:

1.- Establecer la frecuencia de presentación de poblaciones linfoides B (mono)clonales en la circulación sanguínea de adultos aparentemente sanos, mayores de 40 años y con recuentos normales de linfocitos en SP, residentes en la provincia de

Salamanca, empleando técnica de citometría de flujo multiparamétrica de alta sensibilidad.

2.- Determinar si las poblaciones de células B CD5⁺ con fenotipo tipo LLC-B están presentes de forma sistemática en la SP de adultos de edad avanzada, reflejo de su posible origen y naturaleza fisiológica *vs* patológica.

3.- Caracterizar en detalle desde el punto de vista fenotípico y genético, cada una de las poblaciones de linfocitos B (mono)clonales detectadas en individuos aparentemente sanos, comparando los hallazgos encontrados con las características fenotípicas y genéticas de las células B neoplásicas de pacientes con SLPC-B clínicamente manifiesto.

4.- Investigar si en el plazo de al menos un año tras su identificación, se detectan alteraciones numéricas, fenotípicas y/o citogenéticas en el clon linfoide B de las LMB, con el fin de conocer su comportamiento evolutivo a corto plazo.

III. Material, Métodos y Resultados

En la presente sección de la memoria se describen los individuos estudiados, los materiales y métodos empleados, y los resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos propuestos, mediante la inclusión de los artículos publicados como consecuencia del trabajo realizado. Cada uno de los artículos referidos está precedido de un breve resumen en castellano que facilita una revisión rápida de la información contenida en los mismos.

Los artículos incluidos en este apartado son los siguientes:

3.1.- Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach.

Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, Sánchez ML, Jara-Acevedo M, Rasillo A, González M, Fernández-Navarro P, Vega T, Orfao A; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL.

Blood 2009; 114: 33-37.

3.2.- CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults.

Almeida J, Nieto WG, Teodosio C, Pedreira CE, López A, Fernández-Navarro P, Nieto A, Rodríguez-Caballero A, Muñoz-Criado S, Jara-Acevedo M, Romero A, Orfao A; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL.

Leukemia 2011; 25: 718-722.

3.3.- Non-CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis in the general population: prevalence and phenotypic/genetic characteristics.

Nieto WG, Teodosio C, López A, Rodríguez-Caballero A, Romero A, Bárcena P, Gutierrez ML, Langerak AW, Fernandez-Navarro P, Orfao A, Almeida J; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL.

Cytometry Part B – Clinical Cytometry 2010; 78B (Suppl 1): S24-S34

3.1.- ARTÍCULO 1: "Elevada frecuencia (12%) de detección de linfocitos B clonales similares a los de la leucemia linfática crónica en la sangre periférica de adultos sanos, mediante el empleo de técnicas altamente sensibles de citometría de flujo multiparamétrica".

ANTECEDENTES. La linfocitosis monoclonal de linfocitos B (LMB) se caracteriza por la presencia de linfocitos B monoclonales en pequeña cuantía ($<5 \times 10^9/L$) en la sangre periférica de sujetos adultos por lo demás sanos. Su identificación ha sido posible gracias a técnicas de citometría de flujo multiparamétrica, que además han puesto de manifiesto que en la gran mayoría de estos casos las células B clonales muestran un fenotipo superponible al de las células neoplásicas de la leucemia linfática crónica B (LLC-B). La frecuencia descrita en la literatura con la que se detectan células B clonales de "tipo LLC-B" en adultos sanos, varía entre 3,5% y 7% de los sujetos, dependiendo de la sensibilidad de la técnica de citometría de flujo empleada.

OBJETIVO. En el presente trabajo nos propusimos investigar la frecuencia de presentación de células B monoclonales en la sangre periférica (SP) de adultos sanos mayores de 40 años con recuentos sanguíneos normales, seleccionados aleatoriamente a partir de la población general residente en la provincia de Salamanca (España), empleando una técnica de citometría de flujo altamente sensible, basada por un lado en el empleo de combinaciones de anticuerpos monoclonales en 8 colores y por otra parte, en la evaluación de $>5 \times 10^6$ leucocitos/muestra.

MÉTODOS. En el estudio se incluyeron un total de 608 adultos sanos mayores de 40 años (edad media de 62 ± 13 años; 47% varones y 53% mujeres), con recuentos linfocitarios normales ($2,2 \pm 0,7 \times 10^9/L$). Estos sujetos se reclutaron a partir de la

población general de la provincia de Salamanca, siendo seleccionados aleatoriamente a partir del Sistema de Atención Primaria de Salud. En todos los casos se realizó un rastreo inmunofenotípico de la presencia de poblaciones B clonales circulantes, tras el marcaje de una muestra de SP (alrededor de 1-4 ml/individuo) mediante técnica de inmunofluorescencia directa, con las siguientes combinaciones de 8 anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos: i) CD20/ CD45/ CD8+sIgλ/ CD56+sIgκ/ CD4/ CD19/ CD3; ii) CD20/ CD45/ CyBcl2/ CD23/ CD19/ CD10/ CD5/ CD38, y; iii) CD20/ -/ SmIgλ/ SmIgκ/ CD19/ CD10/ CD5/ -. Posteriormente, las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences -BDB), en dos pasos consecutivos. En el primer paso se almacenó la información correspondiente a la celularidad global de la muestra ($\sim 1 \times 10^5$ células), mientras que en el segundo paso se almacenó únicamente la información correspondiente a los linfocitos B seleccionados a través de una ventana de adquisición específica de células CD19⁺ y/o CD20⁺, hasta adquirir $> 5 \times 10^6$ leucocitos totales/tubo. El análisis de los datos se realizó con el programa informático INFINICYTTM (Cytognos SL). Para considerar que un grupo de eventos constituía una población de linfocitos B clonales se requirió un número mínimo de 50 eventos celulares.

En los casos en los que se detectaron clones de linfocitos B circulantes se procedió a realizar su posterior caracterización fenotípica con un panel más amplio de anticuerpos monoclonales combinados en ocho colores. En estos casos, la confirmación del carácter clonal de la expansión linfoide se realizó mediante el análisis del patrón de expresión de las cadenas ligeras de las SmIgκ y SmIgλ (n=73), el reordenamiento del gen de la cadena pesada de las Ig (n=8) y/o mediante técnica hibridación *in situ* fluorescente (n=37); los estudios genéticos y moleculares se llevaron a cabo sobre la

fracción de células B aberrantes purificadas con un citómetro de flujo FACSaria (pureza mediana del 98%).

RESULTADOS. Mediante la estrategia descrita se detectó la presencia de células linfoides B clonales con un fenotipo similar al de la LLC-B en el 12% de los casos (73/608), lo que supone una frecuencia de LMB tipo LLC-B que prácticamente dobla a la descrita previamente por otros autores. Las células B clonales expresaban SmIgk en 48 de estos 73 casos (66%), y SmIgλ en 11 (15%); en los 14 casos restantes (19%) se evidenció la presencia de dos poblaciones B clonales distintas con fenotipo LLC-B. En general, las células B clonales representaban una proporción muy pequeña de la población total de las células B (mediana: 0,38%; rango intercuartílico: 0,14%-4,2%), lo que explica que no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas en el número absoluto de linfocitos B de SP entre sujetos con y sin LMB. Al igual que en otros trabajos, observamos que la prevalencia de LMB se incrementaba progresivamente con la edad: 5,1% de LMB en sujetos de entre 40 y 49 años, 5,2% en sujetos de 50 a 59 años, 17,5% en individuos de entre 60 y 69 años, 21,7% en sujetos de 70 a 79 años, 27,3% en el rango de 70 a 79 años y 75% de los adultos mayores de 90 años ($p < 0,05$). Por el contrario, no hallamos asociación entre la edad y el tamaño del clon o entre la presencia de células B clonales circulantes y el sexo del individuo. Merece destacar que en casi dos tercios de los casos (62%), el porcentaje de células B aberrantes/clonales detectado era inferior al límite máximo de sensibilidad alcanzado por otros grupos ($< 0,01\%$). La confirmación de clonalidad por métodos citogenéticos y moleculares pudo constatar en 18 casos, de los que todos excepto uno presentaban $> 0,01\%$ de células B aberrantes/clonales. Al igual que en otras series, identificamos casos que presentaban clones de células B de tipo no-LLC-B, con una frecuencia ligeramente superior o similar a la referida por otros autores: 14/608 casos (2,3%).

CONCLUSIONES. La incidencia de LMB tipo LLC-B en la población general de más de 40 años es significativamente superior a la descrita previamente por otros autores, incrementándose progresivamente a medida que aumenta la edad. Esta aparente discrepancia se debe a que en nuestra serie, la mayoría de los casos presentan niveles de linfocitos B clonales en SP que están por debajo del límite máximo de sensibilidad de las técnicas empleadas por otros grupos, lo que apoya la idea de que la detección de clones de linfocitos B circulantes depende en gran medida de la sensibilidad de la técnica de citometría de flujo empleada.

Brief report

Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia–like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach

Wendy G. Nieto,¹ Julia Almeida,¹ Alfonso Romero,² Cristina Teodosio,¹ Antonio López,¹ Ana F. Henriques,¹ Maria Luz Sánchez,¹ María Jara-Acevedo,¹ Ana Rasillo,¹ Marcos González,³ Paulino Fernández-Navarro,⁴ Tomás Vega,⁵ Alberto Orfao,¹ and the Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL⁵

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (CSIC-USAL) & Cytometry Service and Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca; ²Gerencia de Atención Primaria de Salud de Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León; ³Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca; ⁴Centro de Atención Primaria de Salud de Ledesma Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León; and ⁵Dirección General de Salud Pública y Consumo, Junta de Castilla y León, Castilla y León, Spain

Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) indicates the presence of less than $5 \times 10^9/L$ circulating monoclonal B cells in otherwise healthy subjects. Recently, it has been reported that circulating chronic lymphocytic leukemia (CLL)–like B cells can be detected using 4- or 5-multicolor flow cytometry in 5% to 7% of adults with normal lymphocyte counts. We investigated the frequency of circulating mono-

clonal B cells in 608 healthy subjects older than 40 years with normal blood counts, using a highly sensitive 8-color flow cytometry approach and systematic screening for total PB leukocyte count higher than 5×10^6 . We show that the frequency of PB monoclonal B cells is markedly higher than previously reported (12% for CLL-like B cells, found at frequencies of $0.17 \pm 0.13 \times 10^9$ cells/L), the incidence

progressively increasing with age. Most cases (62%) showed clonal B-cell levels below the maximum sensitivity of the techniques described by others ($< 0.01\%$), supporting the notion that detection of MBL may largely depend on the sensitivity of the flow cytometry approach used. (Blood. 2009;114:33-37)

Introduction

Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) is a relatively recent diagnostic category, that indicates the presence of low numbers of circulating monoclonal B cells ($< 5 \times 10^9/L$) in otherwise healthy subjects (absence of a history or signs of B-cell chronic lymphocytic leukemia [CLL] or any other lymphoproliferative or autoimmune/infectious disease).¹ Although this entity has been recently included in the revised National Cancer Institute Working Group/International Workshop on CLL (NCI-WG/IWCLL) guidelines for the diagnosis and management of CLL,² whether MBL represents an early stage of a chronic B-cell malignancy is still unknown,³⁻⁷ because no large series of subjects with MBL has yet been prospectively followed for a long period of time (> 10 years). In addition to MBL cases presenting with lymphocytosis, recently several groups have reported that low levels of peripheral blood (PB) monoclonal B cells can also be detected in healthy subjects with normal lymphocyte counts. Accordingly, Rawstron et al⁸ have found monoclonal B cells phenotypically identical to CLL cells at levels less than $3.5 \times 10^9/L$ in the PB of approximately 5% of healthy subjects (78/1520) older than 60 years, and a similar percentage of cases showing circulating CLL-like B cells has been found by Dagklis et al⁹ in cases older than 40 years (88/1322; 6.6%). In the present study, we investigated the frequency of circulating monoclonal B cells in a total of 608 healthy subjects older than 40 years and with normal blood counts who belong to a population living in Salamanca (western Spain), using a highly

sensitive multicolor flow cytometry approach. We show that the frequency of PB monoclonal B cells in these subjects is markedly higher than that previously reported (12% for CLL-like B cells).

Methods

Subjects of study

A total of 608 healthy subjects (284 men [47%] and 324 women [53%]) older than 40 years (62 ± 13 years, range: 40-97 years) randomly recruited from the Primary Health Care system region of Salamanca (Spain) were studied. The leukocyte and total lymphocyte counts were of 6.3 plus or minus $1.6 \times 10^9/L$ and 2.2 plus or minus $0.7 \times 10^9/L$, respectively, and the absolute B-cell number was of 0.16 plus or minus $0.1 \times 10^9/L$. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Cancer Research Center of Salamanca and all participants gave their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Immunophenotypic analyses

A total amount of approximately 4 mL EDTA-anticoagulated PB per case was immunophenotyped using a direct immunofluorescence stain-and-then-lyse technique,¹⁰ with the following antibody combinations: CD20-Pacific Blue (PB)/CD45-Pacific Orange (PO)/CD8-fluorescein isothiocyanate (FITC)+anti- κ -IgA-FITC/CD56-phycoerythrin (PE)+anti- κ -PE/CD4-peridin chlorophyll protein-cyanin 5.5 (PerCPCy5.5)/CD19-PE-cyanin 7

Submitted January 7, 2009; accepted April 22, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 6, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-01-197368.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

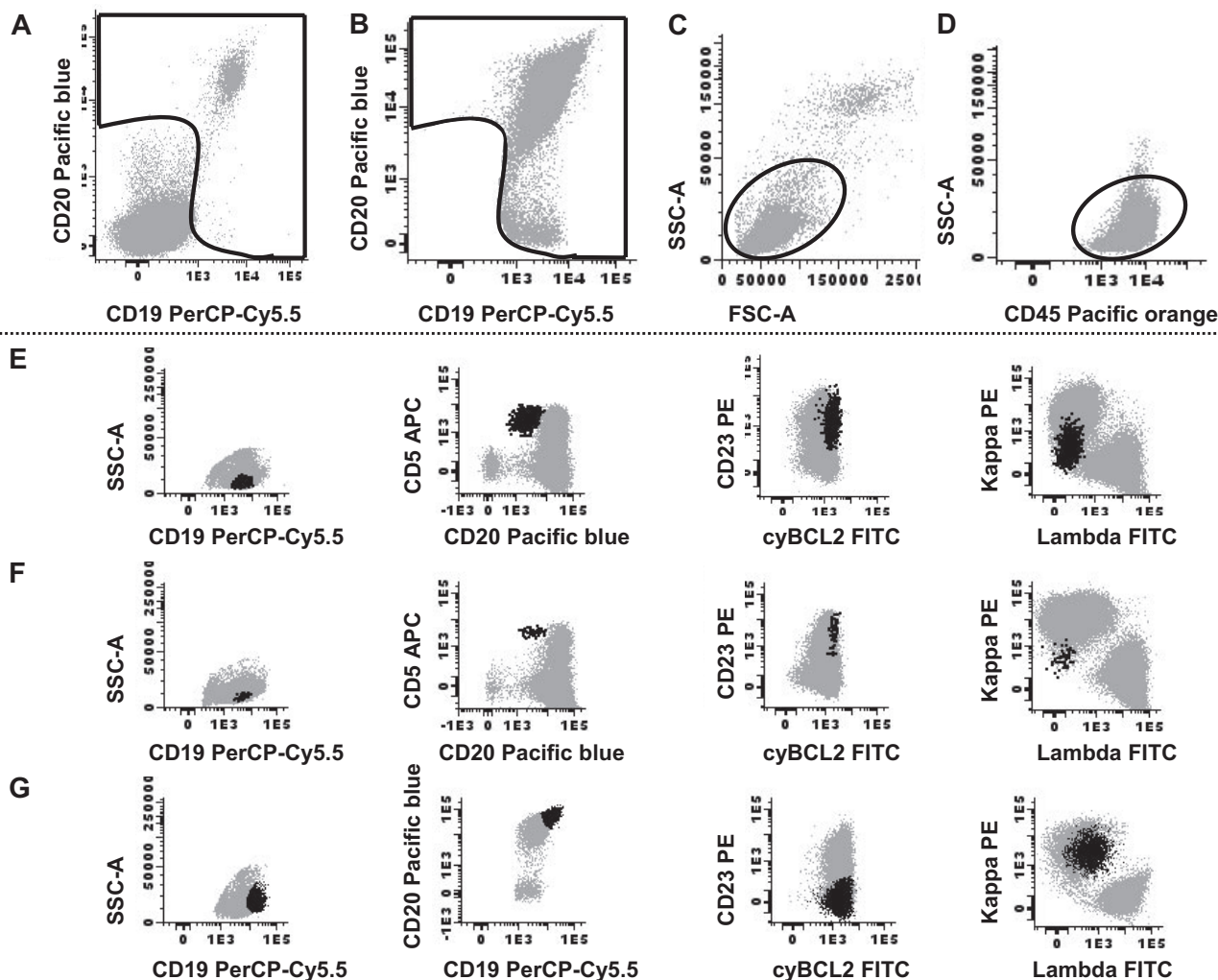


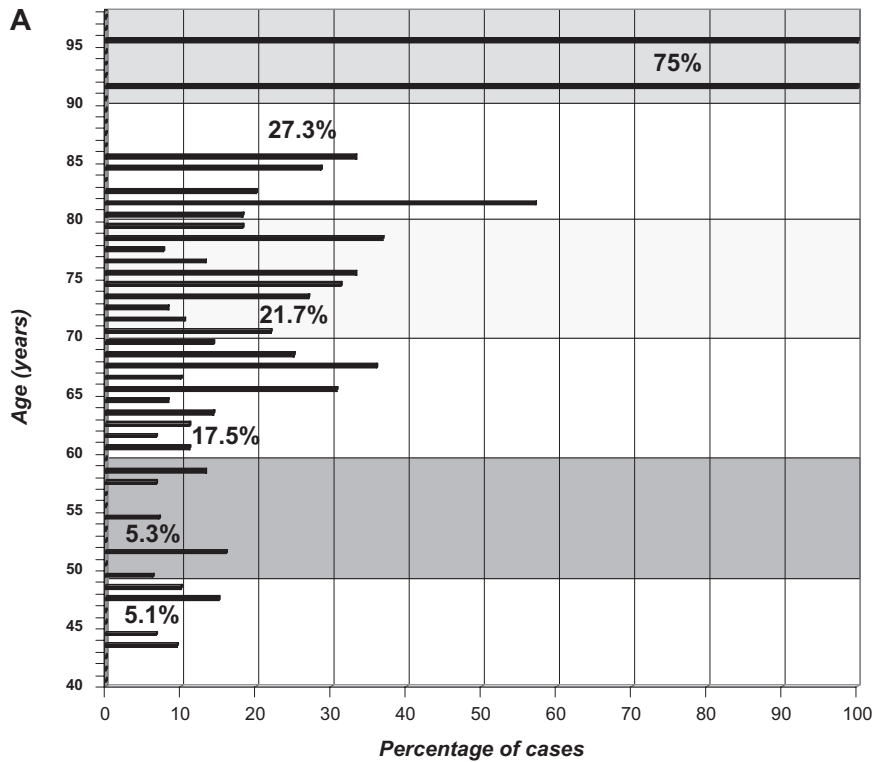
Figure 1. Immunophenotypic identification of peripheral blood B-cell clones in otherwise healthy adults. Top panels (A-D) illustrate the sequential gating strategy used to identify B cells in one representative sample: in a first acquisition step, a gate was drawn on the cell fraction positive for CD19 and/or CD20 (A); information from only those events included in this gate was stored in a second step for more than 5×10^6 total leukocytes (B); finally only those events included in a wide gate drawn on a FSC/SSC and CD45 versus SSC dot plots, corresponding to small and eventually large CD45^{hi} lymphocytes, were selected as B cells (C-D). Illustrative examples of 3 different samples displaying aberrant/clonal B cells are shown in panels E through G (aberrant/clonal B cells are shown as black dots, and residual polyclonal B cells are shown as gray dots): CLL-like cells present at low frequencies (0.01% of the whole cellularity of the sample and 0.7% of the whole B-cell population) are shown in panel E and CLL-like cells present at very low frequencies (0.0015% of the whole cellularity and 0.1% of the whole B-cell population) are displayed in panel F; non-CLL-like B cells proven to be clonal by polymerase chain reaction are shown in panel G.

(PECy7)/CD3-allophycocyanin (APC)/CD38-Alexa Fluor 700 (AF700); CD20-PB/CD45-PO/cytBcl2-FITC/CD23-PE/CD19-PerCPCy5.5/CD10-PECy7/CD5-APC/CD38-AF700; and CD20-PB/anti-sIgλ-FITC/anti-sIgκ-PE/CD19-PerCPCy5.5/CD10-PECy7/CD5-APC. Reagents were purchased from Becton/Dickinson Biosciences (BDB) except for CD19-PECy7 (Beckman/Coulter), CD20-PB (e-Biosciences), CD38-AF700 (Exbio), CD45-PO (Caltag Laboratories), and Bcl2-FITC, anti-sIgλ-FITC, and anti-sIgκ-PE (Dako). Intracytoplasmic expression of bcl2 was evaluated after staining for cell surface antigens, using the Fix & Perm reagent kit (Invitrogen), according to the instructions of the manufacturer. Data acquisition was performed on a FACSCanto II flow cytometer (BDB) using the BDB FACSDiva software (V6.1), through a double-step procedure: first, information on 1×10^5 events corresponding to the whole sample cellularity was stored; in a second step, information was stored on CD19⁺ and/or CD20⁺ gated events, containing a minimum of 5×10^6 leukocytes/tube (Figure 1A-D). Instrument setup and calibration were performed according to well-established protocols¹¹; to check for the consistent performance of the cytometer, and to ensure reliable and accurate results, a daily quality control program was strictly followed, based on the use of cytometer setup and

tracking (CST) beads and CST module (BDB), according to the recommendations of the manufacturer. As isotype controls were not used, those cells that did not express a certain marker were considered as negative control for positive cells. In tubes 2 and 3, in which CD3 was not present in the panel of antibodies, the possibility that coincident T-cell events were included within the CD19/CD20 gate was excluded by the pattern of FSC/SSC, together with a phenotype incompatible with B/T-lymphocyte doublets (ie, CD5⁺/CD19⁺/CD20^{lo} vs CD5⁺/CD19⁺/CD20^{hi}; Figure 1E-F). The minimum number of cellular events considered to constitute a clonal B-cell cluster was 50 (Figure 1F).

Analysis of IgH gene rearrangements

Assessment of clonality was performed on FACSsorted B cells (purity: $98\% \pm 0.8\%$) in 8 cases. Genomic DNA preparation, polymerase chain reaction amplification, heteroduplex analysis, and sequencing and analysis of IgHV genes were performed following well-established protocols, previously described in detail.¹²



B Peripheral blood absolute B-cell counts according to the age decades of otherwise healthy subjects without and with both CLL-like and non-CLL-like circulating clonal B cells

	AGE RANGE (years)						Total
	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	>90	
Cases showing no B-cell clones	0.17±0.10 (0.01-0.68)	0.16±0.09 (0.01-0.42)	0.16±0.08 (0.02-0.41)	0.14±0.09 (0.02-0.78)	0.10±0.06 (0.03-0.30)	0.02	0.16±0.13 (0.01-0.78)
CLL-like MBL cases	0.18±0.10 (0.08-0.40)	0.25±0.15 (0.07-0.46)	0.24±0.27 (0.08-1.27)	0.13±0.08 (0.03-0.32)	0.14±0.08 (0.05-0.29)	0.06±0.01 (0.05-0.307)	0.17±0.13 (0.03-1.27)
Non-CLL MBL cases	-	0.14	0.20±0.50 (0.15-1.18)	0.14±0.17 (0.03-0.43)	0.39±0.52 (0.09-1.01)	0.05	0.27±0.36 (0.03-1.18)

Results expressed as mean± standard deviation (range: minimum-maximum) of the absolute number of peripheral blood B cells (x10⁹/L). Single values indicate that only one case was studied. P-value >0.05 for all statistical comparisons performed.

Figure 2. PB B-cell counts and frequency of cases with monoclonal B cells in healthy subjects older than 40 years with normal lymphocyte counts, grouped according to age. (A) Frequency of PB monoclonal B cells in healthy subjects older than 40 years with normal lymphocyte counts, grouped according to age. Bars represent the percentage of cases within each age subgroup (from 40 to 97 years) displaying circulating B-cell clones. The numbers inside the picture represent the proportion of cases displaying circulating B-cell clones per decade: 40 to 49, 50 to 59, 60 to 69, 70 to 79, 80 to 89, and older than 90 years. (B) Peripheral blood absolute B-cell counts according to age of otherwise healthy adults without and with both CLL-like and non-CLL-like circulating clonal B cells.

Interphase fluorescence in situ hybridization studies

The most common genetic abnormalities associated with both CLL and non-CLL-B-chronic lymphoproliferative disorder were screened by multi-color interphase fluorescence in situ hybridization, performed on slides containing fixed, FACSsorted (purity: 98% ± 0.8%) aberrant B cells (n = 37), as previously described.¹³

Statistical methods

Descriptive and comparative statistics (either the Pearson χ^2 test or the Student *t* test or the Mann-Whitney *U* test) were performed using the SPSS

software program (SPSS 15.0; SPSS, Chicago, IL). *P* values less than .05 were considered to be associated with statistical significance.

Results and discussion

By applying a highly sensitive multicolor flow cytometry approach, we have found that the frequency of circulating monoclonal B cells with a CLL phenotype in healthy subjects older than 40 years showing normal lymphocyte counts was at least double than previously reported^{8,9} (73/608 subjects from a population-

based cohort; 12%); of note, the proportion of cases displaying circulating CLL-like monoclonal B cells remained stable throughout the recruitment period (12 months): 10%, 10.5%, 14%, and 12.2% in the first 150, 300, 400, and 500 cases, respectively. Forty-eight (66%) of those 73 cases expressed surface kappa light chain immunoglobulins (sIgk⁺) and 11 (15%) expressed sIgl⁺; such an imbalance in favor of sIgk⁺ cases was significantly different ($P < .05$) from the expected frequency for normal and CLL B cells. In the remaining 14 cases (19%), 2 clonal B-cell subsets were detected (one being sIgk⁺ and the other sIgl⁺ in 13 cases and 2 distinct sIgk⁺ B-cell subpopulations in 1 case). Interestingly, no statistically significant different PB B-cell counts were found between subjects with and without circulating clonal B cells (Figure 2B); actually, clonal B cells represented a minor proportion (median: 0.38%; interquartile range: 0.14%-4.2%) of the whole B-cell population. In line with other recent reports,^{4,9} the frequency at which PB clonal B-cell populations were detected progressively increased with age (Figure 1), whereas no association was found between age and the size of the clone, or between the presence of circulating clonal B cells and sex (11% of women vs 13.8% of men; $P > .05$). The higher frequency at which we detected PB clonal B cells in otherwise healthy subjects is most likely due to the higher sensitivity of the flow cytometry approach applied versus that used by others, as we have screened at least 10 times more PB nucleated cells/sample (5×10^6 /case vs 2×10^5 and 5×10^5 /case^{8,9}) and used 8-color staining panels versus 4-color⁸ or 5-color⁹ protocols. This is supported by the fact that in more than half of the cases (62%) the percentage of aberrant/clonal B cells was below the maximum sensitivity of the latter approaches ($< 0.01\%$). However, clonality was confirmed only by additional methods in 18 cases, all except one with more than 0.01% aberrant/clonal B cells (median percentage of CLL-like B cells: 0.10%; interquartile range: 0.025%-0.68%). Clonality was confirmed by the presence of clonal *IGH* gene rearrangements (8/8 cases tested) and/or the presence of concordant genetic abnormalities: del(13q14.3) in 10 of 37 cases tested (including 1 case showing 0.007% CLL-like cells) and/or trisomy 12 in 2 of 37 cases tested. *IGHV* sequencing was performed in 7 cases that used the following *IGHV* genes (% mutation from germ line): VH1-01 (4%); VH1-2 (0%); VH1-3 (1.5%); VH1-08 (1.8%); VH3-21 (0%); VH3-23 (0%); and VH5-51*01 (6%). There are insufficient data to make definitive conclusions about whether they show different VH repertoire versus CLL, as previously suggested.⁹ Of note, all biclonal cases analyzed displayed 2 different molecular markers. As in other series,^{3,9,14} we also detected additional cases showing non-CLL-like B-cell clones, at a frequency similar to that found in other studies⁹ (14/608; 2.3%), and not as high as we expected from our results on CLL-like MBL; a possible explanation is that the 8-color panel used here might not be optimal to detect aberrancies other than CLL-like, in

addition to the fact that for the unequivocal identification of certain B-cell chronic lymphoproliferative disorder groups (ie, those derived from marginal zone), neither specific nor highly suggestive phenotypic marker profiles exist. Because it has been suggested that there is no cutoff point that could be used for a 100% efficient discrimination of those subjects at risk of progression and that the fundamental biologic issue is the presence of a clonal population,¹⁵ the precise identification of cases having circulating clonal B cells using highly sensitive flow cytometry becomes a key question. Nevertheless, given the high frequency of such cell populations (> 100 times more frequent than CLL), and the fact that this frequency strongly depends on the sensitivity of the approach used, prospective, long-term follow-up studies¹⁶ are needed to define the natural history of MBL.

Acknowledgments

This work was financially supported by the following grants: FIS 06-0824 from the Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain; GRS206/A/08 from the Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, Valladolid, Spain; and RTICC RD06/0020/0035 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain.

Authorship

Contribution: W.G.N. performed research and analyzed data; J.A. designed research, analyzed data, and wrote the paper; A. Romero selected the cohort of subjects and performed the coordination with the Primary Health Care Group; C.T. and M.G. performed research and data analysis; A.L. analyzed data; A.F.H., M.L.S., M.J.-A., and A. Rasillo performed the techniques; P.F.-N. collected samples and data from healthy subjects; T.V. supervised the epidemiologic selection of subjects; and A.O. designed research, analyzed data, and wrote the paper. Members of the Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL directly collected samples and data from the cohort of the healthy adults recruited.

For a complete list of Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL participants, see the supplemental Appendix (available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Alberto Orfao, Laboratorio 11, Centro de Investigación del Cáncer, Av Universidad de Coimbra s/n, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain; e-mail: orfao@usal.es.

References

- Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005;130:325-332.
- 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;111:5446-5456.
- Ghia P, Prato G, Scielzo C, et al. Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood*. 2004;103:2337-2342.
- Rawstron AC, Green ML, Kuzmicki A, 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.
- Rawstron AC, Bennet 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.
- Landgren O, Albitar M, Ma W, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360:659-667.
- Shanafelt TD, Kay NE, Jenkins G, et al. B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. *Blood*. 2009;113:4188-4196.
- Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008;359:575-583.
- Dagklis A, Fazi C, Sala C, et al. The immunoglobulin gene repertoire of low-count CLL-like MBL is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood*. 2009;114:26-32.

10. Sánchez ML, Almeida J, Vidriales B, et al. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia*. 2002;16:1460-1469.
11. Perfetto SP, Ambrozak D, Nguyen R, Chattopadhyay P, Roederer M. Quality assurance for polychromatic flow cytometry. *Nat Prot*. 2006;1:1522-1530.
12. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, 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.
13. 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;74:139-149.
14. Amato D, Oscier DG, Davis Z, 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.
15. Mulligan CS, Thomas ME, Mulligan SP. Reply to Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia [letter]. *N Engl J Med*. 2008;359:2065-2066.
16. Vogt RF, Shim YK, Middleton DC, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis as a biomarker in environmental studies. *Br J Haematol*. 2007;139:690-700.

3.2.- ARTÍCULO 2: "La presencia un pequeño número de linfocitos B clonales fenotípicamente similares a los de la leucemia linfática crónica es un hallazgo sistemático en la sangre periférica de adultos sanos".

ANTECEDENTES. La leucemia linfática crónica B (LLC-B) es el tipo más común de leucemia en el mundo occidental. Afecta principalmente a adultos mayores de 40 años y se caracteriza por la presencia en sangre periférica (SP) de linfocitos B clonales ($>5 \times 10^9/L$) $CD5^+$, $CD23^+$ y $SmIg^{+débil}$, que además infiltran la médula ósea y frecuentemente también otros órganos linfoides. Por otro lado, la linfocitosis monoclonal de linfocitos B (LMB) se caracteriza por la presencia de un pequeño número ($<5 \times 10^9$ cel/L) de linfocitos B clonales circulantes en sujetos sanos, sin evidencia de enfermedad linfoproliferativa, autoinmune o infecciosa. En la mayoría de las LMB, los linfocitos B clonales son fenotípicamente similares a los de la LLC-B. Hoy sabemos que la LMB de tipo LLC-B es un hallazgo relativamente frecuente en la población general adulta de más de 40 años, situándose su incidencia entre el 5% y 12%, dependiendo de la sensibilidad de la técnica de citometría de flujo empleada para su detección. La relevancia clínica de la detección de LMB en sujetos sanos viene determinada por la comprobación de que aquellos sujetos con LMB y aumento del número absoluto de linfocitos en SP, presentan una tasa de transformación a LLC-B de alrededor del 1% al año, mientras que según datos recientes, prácticamente todas las LLC-B irían precedidas de una situación previa de LMB.

OBJETIVO. El presente estudio parte de la hipótesis de que, al aumentar la sensibilidad de la técnica, la frecuencia de detección de clones de linfocitos B circulantes y por tanto también de LMB en la población general, se incrementaría de forma significativa. Con el fin de comprobar esta hipótesis, en el presente trabajo

investigamos las variaciones en la frecuencia de LMB tipo-LLC-B en la población adulta mayor de 40 años de la provincia de Salamanca cuando se analizaban volúmenes crecientes de SP de cada sujeto.

MÉTODOS. En este trabajo evaluamos de forma retrospectiva un total de 639 muestras de adultos sanos >40 años que presentaban recuentos normales de linfocitos, procedentes del área de salud de Salamanca. En todos los casos se realizó un rastreo inmunofenotípico de la presencia de clones de linfocitos B tipo-LLC-B sobre muestras de SP empleando técnica de citometría de flujo de alta sensibilidad, basada en el análisis multiparamétrico de $>5 \times 10^6$ leucocitos con combinaciones de 8 anticuerpos monoclonales. A partir de los datos reales obtenidos de cada muestra de sangre analizada se construyó un modelo matemático predictivo con el fin de estimar el porcentaje de casos en los que se detectarían clones de linfocitos B constituidos por ≥ 50 eventos celulares, si se hubieran analizado volúmenes de muestra superiores a los realmente estudiados.

Posteriormente, en un subgrupo de 9 donantes sanos mayores de 70 años en los que no se identificaron células B clonales en la fase de rastreo inicial, se evaluó la presencia de clones de linfocitos B en la fracción de linfocitos B purificados mediante procedimiento inmunomagnético, a partir de 50 mL de SP; para ello empleamos una combinación de los anticuerpos CD20, CD45, anti-sIg- λ , anti-sIg κ , CD79b, CD19, CD5 y CD3.

RESULTADOS. El análisis de las 639 muestras correspondientes al estudio retrospectivo (volumen medio de SP de $1095 \pm 143 \mu\text{L}$; rango: 900 a $1200 \mu\text{L}$) mostró la presencia de linfocitos B clonales (>50 *eventos* celulares) con un fenotipo superponible al de la LLC-B (CD19⁺, CD5⁺, CD20^{+débil}, CD23⁺, CD79b^{+débil}, FMC7^{-/+débil}, SmIg^{+débil}, CD10⁻) en el 12,5% de los casos (80/639). Como ya se había descrito anteriormente

para los primeros 608 casos (Nieto *et al*, Blood 2009), la frecuencia de LMB tipo LLC-B se incrementaba de forma significativa con la edad: 5,4% en sujetos de entre 40 y 59 años, 15,5% entre los 60 y 69 años y 19,2% en los individuos de ≥ 70 años.

A partir de estos datos reales, obtenidos de ~ 1 ml de muestra de SP de cada individuo, el modelo matemático predictivo elaborado revelaba que si se hiciera un rastreo sobre volúmenes de sangre superiores a 46 mL, podrían detectarse clones linfoides B de tipo LLC-B en el 100% de la población general mayor de 70 años. Además, según este modelo, en el caso hipotético de que dicho volumen fuera rastreado y analizado para cada sujeto, la frecuencia estimada de individuos de la población general que portarían clones de tipo LLC-B sería del 32% para el rango de 40-59 años (intervalo de confianza del 18% al 46%) y del 62% para sujetos de entre 60 y 69 años (intervalo de confianza del 36% al 88%), con una proporción estimada del 100% para la serie completa. Para verificar esta hipótesis, se marcaron 50 mL de SP de 9 sujetos sanos >70 años, en los que no habíamos detectado células LMB al analizar 1 mL de sangre en el estudio anterior. Dicho análisis demostró la presencia de clones de linfocitos B de tipo LLC-B en las muestras de SP de 8 de estos 9 individuos. Además merece destacar que en 4 de ellos se identificaron 2 poblaciones distintas de células B de tipo LLC-B (una $\text{SmIg}\kappa^+$ y otra $\text{SmIg}\lambda^+$) asociadas en uno de estos sujetos a un cociente de células B $\text{CD}5^+$, $\text{SmIg}\kappa^+/\text{SmIg}\lambda^+$ normal.

CONCLUSIÓN. Nuestros resultados muestran que la presencia en SP de células B clonales con un fenotipo similar al de la LLC-B puede constituir un hallazgo habitual en la población general adulta, especialmente a partir de los 70 años. Ante estos hallazgos, se requiere de estudios adicionales que determinen si estas células constituyen la contrapartida fisiológica de la LLC-B, o si de acuerdo al concepto vigente

en la actualidad, representarían la célula tumoral ancestral sobre la que en algunos sujetos tendría su origen una LLC-B.

(UPN 23) and three patients did not show additional alterations (UPNs 24–26). However, one patient of the latter group had already presented an additional *NRAS* codon 12 mutation at initial MDS diagnosis. One patient developed a second *RUNX1* mutation along with trisomy 13 (UPN 22). Interestingly, both patients who gained a chromosome 13 (UPNs 1 and 22) had antecedent mutations in *RUNX1*. According to current literature, *RUNX1* mutations occur at a frequency of about 15% in MDS,⁷ thus the rate of *RUNX1* mutations is increased in our patient cohort, which is defined by leukemic evolution. Thus, our results suggest that the detection of *RUNX1* mutations in MDS comes along with a propensity to leukemic transformation. *FLT3*-ITDs occurred only after progression to s-AML in our cohort. Both patients who gained *FLT3*-ITDs in the progression from MDS to s-AML presented antecedent mutations in *RUNX1*. These two patients fit nicely into the two-hit hypothesis for the pathogenesis of AML with *RUNX1* mutations altering gene expression (type I mutation) and *FLT3*-ITDs leading to enhanced proliferation (type II mutation).⁸ In the present study, *RUNX1*, a known cancer gene, is located in a region affected by UPD. In this patient, a heterozygous *RUNX1* mutation has been found at MDS diagnosis. LOH of the remaining healthy *RUNX1* allele due to UPD was accompanied by progression to s-AML within less than 6 months after initial MDS diagnosis. The contribution of UPD to s-AML evolution sheds light on a novel aspect regarding the progression from MDS to s-AML. The second genetic hit is neither an additional mutation nor a cytogenetic alteration but rather the duplication of a *RUNX1*-mutated allele leading to LOH of the unaffected allele.

From a genetic point of view, MDS and AML show an overlapping pattern of cytogenetic and molecular genetic abnormalities. With the exception of AML-specific recurrent balanced rearrangement, mostly unbalanced abnormalities occur both in MDS and AML.

In conclusion, our data demonstrate that 60% (23/38) of patients acquired additional genetic abnormalities during progression from MDS to s-AML. One group (24%) preferentially gained additional chromosome abnormalities while the other group (26%) was characterized by additional molecular mutations. Four patients (11%) presented both additional cytogenetic and molecular genetic changes, one of which acquired UPD(21q) with *RUNX1*-LOH in the course of s-AML development. While *RUNX1* mutations already occurred at a high frequency at MDS stage, mutations in *FLT3* were seen only after progression to s-AML.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

Conflict of interest

S Schnittger, TH, WK and CH in part own the MLL Munich Leukemia Laboratory, which offers comprehensive leukemia diagnostics. JF, S Schindela, FD and AK are employed at MLL Munich Leukemia Laboratory and declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank all co-workers in our laboratory for their excellent technical assistance as well as all physicians for referring patient material to our center.

J Flach, F Dicker, S Schnittger, S Schindela, A Kohlmann, T Haferlach, W Kern and C Haferlach
 MLL Munich Leukemia Laboratory, Munich, Germany
 E-mail: claudia.haferlach@mll-online.com

References

- Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G *et al*. International Scoring System for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; **89**: 2079–2088.
- Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 2008; **111**: 1534–1542.
- Mohamedali A, Gaken J, Twine NA, Ingram W, Westwood N, Lea NC *et al*. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* 2007; **110**: 3365–3373.
- Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE, Levine RL, Loh ML, Li C *et al*. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* 2009; **23**: 1605–1613.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al*. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th edn. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, 2008.
- Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C *et al*. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; **113**: 6182–6192.
- Bacher U, Haferlach T, Kern W, Weiss T, Schnittger S, Haferlach C. The impact of cytomorphology, cytogenetics, molecular genetics, and immunophenotyping in a comprehensive diagnostic workup of myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2009; **115**: 4524–4532.
- Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; **3**: 179–198.

CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults

Leukemia (2011) **25**, 718–722; doi:10.1038/leu.2010.305; published online 14 January 2011

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common type of leukemia in the Western world. The disease is typically diagnosed in adults >40 years old, who show an expansion (>5 × 10⁹ cells per l) of clonal B-cells with a unique CD5⁺, CD23⁺, B-cell receptor (BCR)^{low} immunophenotype in peripheral blood (PB) and bone marrow, frequently in association with

involvement of other lymphoid tissues, disease symptoms and a heterogeneous clinical outcome. In parallel, monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL), typically characterized by an expansion of clonal CLL-like B-cells (<5 × 10⁹ cells per l), has been also frequently reported in otherwise asymptomatic subjects.^{1,2} Increasing evidence suggests that this could represent a pre-leukemic condition, as CLL frequently develops in individuals with previous history of MBL, and MBL cases progress to CLL at a rate of 1% per year.^{2,3}

Interestingly, in addition to MBL cases presenting with lymphocytosis, very low numbers of clonal B-cells with a CLL-like immunophenotype and cytogenetic profile, are also present in healthy subjects with normal lymphocyte counts.² Initially, a frequency of CLL-like clones among healthy adults of around 3–6% was reported. Despite this relatively high incidence, controversial results have been reported about the precise frequency of CLL-like MBL in the general population.^{2,4,5} Such variability has been related to genetic and microenvironmental differences, as well as to technical variables associated with different sensitivities of the distinct methods applied.^{4,5} Accordingly, we have recently shown that the actual frequency of MBL cases presenting with normal lymphocyte counts could increase to as high as 12% of the general adult population >40 years,⁴ depending on the sensitivity of the method and the volume of blood screened, in addition to age. Altogether, these observations raise the question about the actual frequency and significance of such small B-cell clones in normal subjects, as regards their pathological vs physiological nature.

Here, we provide further evidence about the great prevalence of small numbers of CLL-like B-cells among adults of increasing age, supporting the notion that they might be present among virtually every subject older than 70 years. Our results are based on the analysis of the frequency of CLL-like MBL in 639 healthy

adults (>40 years old) with normal lymphocyte counts, representative of the population living in the area of Salamanca (Western Spain), in whom we investigated the association between the frequency of CLL-like MBL and the volume of sample analyzed. These subjects included a series of 608 previously reported individuals plus 31 new subjects recruited according to the same criteria and who were investigated for the presence of CLL-like MBL in between 0.9 and 1.2 ml of PB, using previously described flow cytometry approaches;⁴ in a subgroup of nine donors aged >70 years, who did not show evidence of CLL-like B-cells in the screening phase, a second 50 ml PB sample was obtained and further investigated for the presence of CLL-like B-cell clones (see Supplementary text for more detailed information).

Overall, 80/639 subjects studied (12.5%) showed CLL-like clones defined by the presence of >50 cellular events with a CLL-like aberrant phenotype (CD19⁺, CD5⁺, CD20⁺^{dim} CD23⁺, CD79b⁺^{dim} FMC7[±]^{dim} Cybc12^{hi} and restricted expression of immunoglobulin light-chain⁺^{dim} in the absence of CD10) in the overall sample analyzed (median PB volume: 1200 µl; range: 900–1200 µl). Among these 80 MBL cases, the absolute count (median of 0.47 clonal B-cells per µl; interquartile range: 0.13–1.60 clonal B-cells per µl) and the percentage of CLL-like B-cells from all PB B-cells (median of 0.42; interquartile range: 0.13–1.42), lymphocytes (median of 0.027; interquartile range:

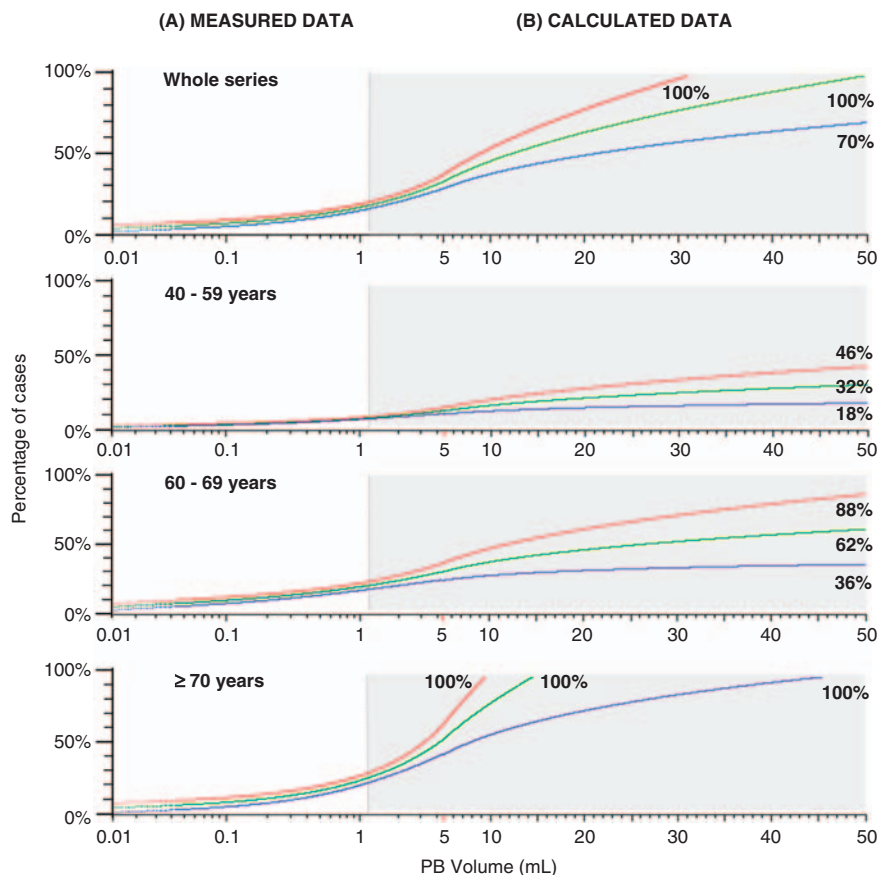


Figure 1 Real and calculated frequency of healthy subjects with detectable CLL-like B-cells on the basis of PB measurements and the statistical prediction model applied, respectively. Curves in the left (column A) correspond to the percentage of cases actually carrying CLL-like B-cells, after increasingly higher volumes of PB (up to 1200 µl of sample) were analyzed for each subject (MEASURED DATA); in turn, curves in the right (column B) correspond to the calculated percentage of cases with CLL-like B-cells, if increasingly higher volumes of PB had been stained (CALCULATED DATA). Both measured and calculated data are shown for the whole series ($n = 639$; upper curves) and for three groups of the same subjects stratified according to age (40–59 years, 60–69 years and ≥ 70 years are shown in intermediate upper, intermediate lower and lower panels, respectively). Green lines represent the (measured and calculated) percentage of cases with CLL-B-cells, whereas red and blue lines represent the higher and lower 95% confidence interval bounds.

0.010–0.101) and leucocytes (median of 0.008; interquartile range: 0.002–0.028) was similar to that reported for the first 608 cases.⁴ As for the initial 608 cases,⁴ a progressively higher frequency of individuals carrying CLL-like B-cell clones was detected in parallel to increasing age: 5.4% of subjects aged 40–49 years, 15.5% in the 60–69 age range and 19.2% in those older than 70 years.

Based on the sequence of acquisition of data in the flow cytometer for single PB leucocytes, then we determined for each MBL case the specific number of cells that were measured (and the corresponding volume of PB) to reach the pre-established threshold of 50 CLL-like B-cells to consider that case as MBL. As shown in Figure 1 (Column A), a progressive increase in the frequency of cases with CLL-like B-cell clones was detected, according to the volume of sample interrogated (from 1 to 1200 μ l) from 0 to 15.8–95% confidence interval (CI): 13.8–17.9%—, respectively. Upon grouping the subjects according to age, similar profiles were observed, but with significantly higher frequencies for adults aged \geq 60 years, and particularly those aged \geq 70 years vs subjects aged 40–59 years: 18.6% (95% CI: 15.8–21.4%) for cases \geq 60 and <70 years, and 24.8% (95% CI: 21.2–28.4%) for those aged \geq 70 years vs 6.7% (95% CI: 5.9–7.4%) for subjects <60 years (Figure 1, Column A).

According to the overall pattern of increase in the frequency of positive cases observed when progressively higher volumes of sample were measured, a mathematical model was then built to predict whether PB CLL-like B-cells could be detected in virtually every case, if larger volumes of PB had been screened for each subject (Figure 1, Column B). Based on the 95% lower CI bound, this model predicted that CLL-like B-cells could be detected in every subject >70 years if around 50 ml of their PB would had been analyzed (the lower limit of the 95% CI reached 100% for PB volumes of around 46 ml). According to this model, in the hypothetical case that the same volume of PB (46 ml) would be stained and analyzed for each subject in the other age groups, the estimated frequency of cases carrying CLL-like clones for subjects studied at 40–59 years of age was of 32% (95% CI: 18–46%) and of 62% for cases with 60–69 years (95% CI: 36–88%), with an estimated rate of 100% for the whole series (lower limit of the 95% CI of 70%) (Figure 1, Column B).

Based on this prediction, AutoMACS-enriched B-cell preparations were obtained from another \sim 50 ml of PB from nine subjects aged >70 years (median of 77 years, from 72 to 88 years) who did not show detectable CLL-like B-cells when between 0.9 and 1.2 ml of their PB had been analyzed, and were further investigated (Supplementary Material). Our results confirmed the presence of CLL-like B-cells in all but one of them (Table 1 and Supplementary Figure 1). Noteworthy, both slg κ + and slg λ + CLL-like B-cell populations were detected in 4/9 of these MBL cases, even with a normally balanced slg κ /slg λ ratio in one of them (Case no. 8 in Table 1). Based on these results it could be speculated that the systematic presence of CLL-like B-cells at very low numbers in adults with advanced age (for example, >70 years), more likely represents the normal counterpart of CLL malignant cells than a leukemic B-cell precursor.

In the last decades, an increased degree of genetic predisposition with familial cases has been reported for some CLL patients. However, this does not explain the occurrence of most (sporadic) CLL and/or MBL cases. In this regard, recent epidemiological data,⁶ together with studies showing that CLL and MBL B-cells frequently display stereotyped B-cell receptors,³ suggest that antigen-driven immunological responses

Table 1 Characteristics of CLL-like B-cells identified in 50 ml of PB from nine healthy subjects older than 70 years, who did not show MBL when 0.9–1.2 ml of PB had been screened

Case No.	Age (y)/Sex	Volume PB stained (ml)	No. of lymphocytes $\times 10^9$ per l	No. of total B-cells stained	No. of CLL-like B-cell populations ^a	slg light chain restriction	Ratio κ/λ ^b	No. of CLL-like events	% of CLL-like B-cells from WBC ($\times 10^{-3}$)	% of CLL-like B-cells from all PB B-cells	No. of CLL-like B cells per μ l
Monoclonal cases											
1	78/M	55	3.00	1 042 628	One	λ	NA	124	0.8	0.041	0.066
2	73/M	49	1.61	2 440 204	One	κ	NA	997	0.73	0.05	0.036
3	77/M	46	3.02	2 167 683	One	κ	NA	1 483	1.3	0.08	0.112
4	88/M	42	2.37	966 381	One	κ	NA	114	0.14	0.013	0.009
Multiclonal cases											
5	77/F	55	2.38	1 454 465	Two	κ	20	51	0.28	0.002	0.0018
6	72/F	55	1.22	936 185	Two	λ	0.72	73	0.014	0.001	0.0009
7	82/F	30	1.33	610 711	Two	λ	0.18	57	0.08	0.006	0.007
8	73/M	48	2.92	2 321 116	Two	κ	1.8	134	0.11	0.008	0.009
9	87/M	55	2.19	900 792	ND	λ	NA	112	0.18	0.02	0.009
						κ		374	0.95	0.01	0.004
						λ		217	0.49	0.016	0.032
						ND		NA	0.27	0.009	0.018
									<0.0006	<1.1 $\times 10^{-6}$	<1 $\times 10^{-6}$

Abbreviations: F, female; M, male; NA, not applicable; ND, not detected.

^aCLL-like B-cells were identified as those cellular events expressing CD19⁺, CD5⁺, CD20⁺dim, CD79b⁺dim and surface immunoglobulin light-chain Ig⁺dim.

^bRestricted to CLL-like B-cells (considered to be altered when ratio κ/λ > 3.1 or < 1:3).¹⁴

could contribute to trigger the expansion (and potentially also the malignant transformation) of small CLL-like B-cell clones. In contrast to CLL, information currently available about the immunoglobulin heavy chain variable repertoire of CLL-like MBL B-cell clones in the general population is limited and does not allow any definitive conclusion.⁷ However, preliminary data about the immunoglobulin heavy chain variable repertoire of CLL-like clones from subjects with MBL and normal B-cell counts, point out a relatively low frequency of usage of those immunoglobulin heavy chain variable segments, which are more frequently observed in CLL and MBL associated with absolute B-cell lymphocytosis.⁷ The potential association in these latter cases of CLL-like clones with a physiological process related to chronic immune stimulation would be further supported by the reported increase in the frequency of CLL-like clones with age.⁴ Previous studies have shown that marked age-related changes occur in the PB B-cell compartment, particularly among individuals >60 years, with a significant decrease in both memory B-cells and circulating plasma cells. Such changes cannot be attributable to a decreased B-cell production, but more likely they reflect either a decreased recruitment of naïve B lymphocytes or a low ability of the memory B-cell compartment to expand. In such a case, immunosurveillance against chronic immune stimuli could only be effective if long-living cells are formed, that is, antigen-specific B-cells could enter into a long-living 'senescent-like' status. Therefore, a crucial question remains about whether these changes are actually found under physiological conditions in every subject, at least once a certain age is reached. Based on the increasing frequencies of CLL-like clones detected for individual subjects through the measurement of increasing volumes of PB, we have built a mathematical algorithm that would allow prediction of the frequency of MBL cases carrying a small CLL-like clone, if larger volumes of blood from individual subjects would have been screened. Based on this model, our results suggest that the vast majority of healthy adults would have a detectable clone of CLL-like B-cells if larger blood volumes had been screened. In fact, the frequency of expected MBL cases among healthy subjects would raise up to 100% for subjects older than 70 years. Confirmation of the presence of CLL-like B-cell populations in 8/9 adults who were initially negative, through the analysis of large volumes of PB (for example, 50 ml), confirms this hypothesis; the exact frequency remains to be determined in this as well as in the other younger age-groups. Interestingly, among these cases, a high frequency of subjects in whom both $slgk^+$ and $slg\lambda^+$ CLL-like B-cells were present, was found. In-line with these findings, recent results in relatives of CLL patients also found multiclonal CLL-like B-cells in 4/6 MBL cases with low MBL counts.⁸ Altogether, these results support the hypothesis that the presence of CLL-like B-cells may be a physiological phenomenon in adults with normal lymphocyte counts. If this holds true, it could be expected that (i) CLL-like B-cell numbers would be lower among multiclonal vs monoclonal cases and (ii) the frequency of CLL-associated genetic abnormalities would significantly decrease at lower MBL counts. In-line with this hypothesis, in 14/35 fluorescence-activated cell sorter-purified CLL-like B-cell populations investigated for cytogenetic abnormalities (purity >97%) by interphase fluorescence *in situ* hybridization, cytogenetic changes were detected—trisomy 12 in 2 (6%) cases and del(13q) in 12 (36%) subjects—and these MBL cases showed an absolute number of CLL-like B-cells significantly higher than that found for the other 21 MBL cases in whom no cytogenetic abnormalities were detected by interphase fluorescence *in situ* hybridization: median of 32 (minimum–maximum

values of 8 and 56) and 11.5 (minimum–maximum values of 0.55 and 1172) CLL-like B-cells per μ l in those cases carrying trisomy 12 and del(13q), respectively, vs a median of 0.56 (minimum–maximum values of 0.1 and 8) CLL-like B-cells per μ l for the other cases with no cytogenetic abnormalities by interphase fluorescence *in situ* hybridization ($P=0.001$); notably, none of the cases carrying trisomy 12 and only 2/12 cases with del(13q) showed less than 1 PB CLL-like B-cell per μ l, whereas 11/21 cases without detectable genetic abnormalities were 'low-count' MBL (<1 circulating CLL-like B-cell per μ l). Whether the higher tendency to be monoclonal vs polyclonal, and to have detectable genetic abnormalities, as the number of CLL-like MBL cells increases would be relevant in the outcome of MBL, requires further investigation. Further studies in which the functional role of these CLL-like cells is investigated are necessary to confirm this hypothesis and determine the potential nature of the chronic antigen stimuli leading to the emergence of CLL-like B-cells in healthy adults and transformation to CLL; however, these are not easy to perform, because of the limited number of cells that can be obtained in cases with very low MBL counts.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work has been partially supported by the following grants: RTICC RD06/0020/0035-FEDER, PI06/0824 and PS09/02430 from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain; GRS206/A/08 from the Gerencia Regional de Salud de Castilla y León and Ayuda al Grupo GR37 de Excelencia de Castilla y León, Consejería de Educación, and SAN/1778/2009, Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain; FS/16-2008, from the Fundación Samuel Solórzano, University of Salamanca, Salamanca, Spain and Fundación Carolina, CNPq- Brazilian National Research Council, Brasília, Brazil and by a grant from FAPERJ—Río de Janeiro Research Foundation, Río de Janeiro, Brazil. AR-C is supported by Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer.

- J Almeida^{1,2}, WG Nieto^{1,2}, C Teodosio^{1,2}, CE Pedreira³, A López^{1,2}, P Fernández-Navarro⁴, A Nieto^{1,2}, A Rodríguez-Caballero^{1,2}, S Muñoz-Criado⁵, M Jara-Acevedo^{1,2}, A Romero⁶ and A Orfao¹ the Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL
- ¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (CSIC-USAL), Salamanca, Spain;
- ²Servicio de Citometría and Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain;
- ³School of Medicine and COPPE-PEE-Engineering Graduate Program, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil;
- ⁴Centro de Atención Primaria de Salud de Ledesma Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, Spain;
- ⁵Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain and
- ⁶Gerencia de Atención Primaria de Salud de Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, Spain
E-mail: orfao@usal.es

References

- 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.
- Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia* 2010; **24**: 512–520.
- 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.
- 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.
- 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; **78**(Suppl 1): S10–S18.
- Anderson LA, Landgren O, Engels EA. Common community acquired infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; **147**: 444–449.
- 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 neoplastic B-cells in monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Cytometry B Clin Cytom* 2010; **78**(Suppl 1): S19–S23.
- 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.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14⁺ cells from peripheral blood

Leukemia (2011) **25**, 722–726; doi:10.1038/leu.2010.306;
published online 18 January 2011

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a malignant disease characterized by the accumulation of mature CD5⁺ B cells in the blood, bone marrow and secondary lymphoid organs.¹ Unlike most tumor entities, there is only a small proportion of CLL cells that proliferate.² This has led to the hypothesis that the accumulation of CLL cells *in vivo* is not due to increased proliferation rates, but rather due to resistance to apoptosis.¹ In CLL, resistance to apoptosis is supported by microenvironmental signals, as CLL cells cultured without support *in vitro* rapidly undergo apoptosis. *In vitro*, apoptosis of CLL cells can be prevented by co-culture with supporting cells, either indirectly through soluble factors and/or by direct interaction through cell-surface receptors.³

From peripheral blood monocytes (PBMCs) of CLL patients, a subset of cells (CD14⁺ cells) differentiate *in vitro* into large, round, adherent cells ('Nurse-like cells', NLCs) that assist in survival of CLL cells.⁴ Cells that are morphologically and immunophenotypically similar to NLCs can also be differentiated from CD14⁺ PBMCs of healthy donors by cultivating them *in vitro* with CLL cells.⁵ *In vivo*, NLCs have been described to be present in the spleen and lymph nodes of CLL patients, suggesting that NLCs might promote survival of CLL cells also in these tissues.^{5,6} Several proteins that are involved in the pro-survival capabilities of NLCs have been identified: CXCL12,⁴ CXCL13,⁶ BAFF (B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family),⁷ APRIL (a proliferation-inducing ligand)⁷ and CD31 (PECAM1).⁸ NLCs have an expression profile of surface and cytoplasmic antigens that is distinct from that of other cells of the myelo-monocytic lineage.⁵ NLCs have a significantly higher CD68 expression compared with monocytes, macrophages and dendritic cells from healthy donors.⁵ What remains unclear is whether the differentiation of NLCs is specific to CLL or whether non-malignant B cells can also convert CD14⁺ PBMCs to cells with pro-survival capacities.

We hypothesized that if non-malignant B cells can convert CD14⁺ PBMCs to cells similar to NLCs, then lymphatic tissues

of both CLL patients as well as healthy donors should be positive for cells expressing markers present on NLCs like CD14 and CD68. In order to validate that cells presenting these markers are also present *in vivo*, we stained lymph node sections of CLL patients for cells positive for CD68 (Figures 1a–c) and CD14 (Figures 1e–g). We found that NLCs might indeed help in the survival of CLL cells in the lymph node as reported previously.⁶ Interestingly, non-malignant tonsil and lymph node sections from healthy individuals were positive for these markers as well (Figures 1d and h). Although it is known that NLCs have higher CD68 intensities than macrophages and dendritic cells, immunohistochemistry is not well suited for a quantitative analysis. Ideally, markers specific to NLCs will be required to make a definitive statement about the exclusive presence of NLCs in the lymphatic tissues of CLL. Nevertheless, our results give rise to the possibility that NLC-like cells are present in the lymphatic tissues of healthy individuals as well as CLL patients.

For functional analysis of a CLL-specific phenotype of NLCs, we generated these cells as previously described⁵ (please refer to Figure 2a for a schematic of the experimental setup). Similar to NLCs, after culture, *in vitro* CD14⁺ cells differentiated by CLL cells (CD14_{CLL} cells) as well as CD14⁺ cells differentiated by non-malignant B cells (CD14_B cells) were positive for CD68, CD14 and negative for both CD1a (blood-derived dendritic cell marker) and CD15 (granulocyte marker) (data not shown).

One of the central phenotypic capabilities of NLCs is their potential to support survival of CLL cells. However, so far it is unclear whether this competence is specific for CLL or can also be induced in monocytes by non-malignant B cells. In order to test whether CD14_B cells are capable of supporting survival, long-term allogeneic co-cultures of either CLL cells or non-malignant B cells with CD14⁺ PBMCs from healthy donors were initiated (Figure 2a). After 18 days of co-culture, survival of suspension cells was compared between continued co-culture on differentiated adherent cells (NLCs, CD14_{CLL} cells and CD14_B cells) and culture of suspension cells with medium alone.

All cultures with medium alone led to significant loss of viability of suspension cells (34.6 ± 16.1% (without

3.3.- ARTÍCULO 3: "Linfocitosis monoclonal de linfocitos B de tipo no-LLC-B en la población general: prevalencia y características fenotípicas y genéticas".

ANTECEDENTES. La linfocitosis monoclonal B (LMB) es una condición relativamente frecuente, caracterizada por la presencia de $<5 \times 10^9$ células B clonales/L en la SP de adultos sanos. En la gran mayoría de los casos, los linfocitos B clonales presentan características fenotípicas y genéticas similares a las de la leucemia linfática crónica B (LLC-B) (LMB tipo LLC-B), y solo en un pequeño porcentaje de las LMB (entre 1% y 2,5% de los adultos con y sin linfocitosis) se identifican clones linfoides B de "tipo no-LLC-B". Hasta la fecha, nuestro conocimiento acerca de las características clínico-biológicas de este último grupo de LMB es muy limitado, y además se restringe de forma casi exclusiva a casos que cursan con linfocitosis.

OBJETIVO. El objetivo del presente trabajo fue doble, centrándose por un lado en establecer la prevalencia de LMB de tipo no-LLC-B entre un grupo de 639 adultos mayores de 40 años (y con un recuento normal de linfocitos) seleccionados de forma aleatoria de la población adulta residente en el área de salud de la provincia de Salamanca, y por otra parte, en describir las características inmunofenotípicas y citogenéticas de las células B clonales de estos sujetos.

MÉTODOS. En conjunto, se incluyeron en el estudio un total de 639 adultos sanos mayores de 40 años (edad media de 62 ± 13 años; 46% varones y 54% mujeres), con recuentos linfocitarios normales ($2,1 \pm 0,7 \times 10^9/L$). En cada sujeto se obtuvo una muestra de sangre periférica (SP) (1-4 ml/individuo) para análisis mediante técnica de citometría de flujo de elevada sensibilidad, de la presencia de células B aberrantes/clonales. Para ello empleamos combinaciones de anticuerpos monoclonales

de 8 colores y se analizaron un mínimo de 5×10^6 leucocitos totales/muestra. En los casos en los que se identificaron células B clonales circulantes, se procedió a realizar su caracterización inmunofenotípica detallada con un panel más amplio de anticuerpos. La definición de LMB de tipo no-LLC-B se basó en la presencia de al menos una población de linfocitos B clonales, compuesta por un mínimo de 50 *eventos* celulares, en ausencia de un patrón fenotípico de LLC-B típica o atípica. La confirmación de la naturaleza clonal de estas células se realizó en un subgrupo de LMB mediante el análisis del reordenamiento del gen de la cadena pesada de las Ig y/o mediante hibridación *in situ* fluorescente sobre células B aberrantes previamente purificadas por citometría de flujo (pureza media de $98\% \pm 0,8\%$).

RESULTADOS. En 13 de los 639 adultos sanos mayores de 40 años estudiados (2,0%) se detectó al menos una población clonal de linfocitos B con características fenotípicas diferentes de las de la LLC-B; de ellos, 9 eran varones y 4 mujeres. Estos sujetos tenían una media de edad de 73 ± 10 años, claramente superior a la de los donantes sanos que no presentaban LMB (61 ± 13 años; $p=0,001$); además, la frecuencia con la que se detectaron clones linfoides B de tipo no-LLC-B aumentaba claramente con la edad: 0,4% de los sujetos de entre 40 y 59 años, 3% de los que tenían de 60 a 79 años, y 5,4% de los individuos mayores de 79 años. El número absoluto medio de células B clonales de tipo no-LLC-B fue de 180 ± 345 células/ μL (mediana: 47 células/ μL ; rango: 0,59-1132 células/ μL), representando éstas el $34,6\% \pm 34,5\%$ (mediana: 32%; rango: 0,45%-96%) del total de linfocitos B de SP de los sujetos con LMB de tipo no-LLC-B. Pese a la presencia de células B clonales entre los casos con LMB, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el recuento de linfocitos B totales entre estos sujetos y aquellos que no presentaban células B clonales circulantes. En 9 de los 13 casos de LMB de tipo no-LLC-B (69%) se identificó una única

población clonal de linfocitos B de tipo no-LLC-B, mientras que en los otros 4 casos (31%) se detectaron dos poblaciones diferentes de células B clonales, sumando en conjunto un total de 17 poblaciones celulares. Desde el punto de vista inmunofenotípico estas poblaciones se agrupaban del siguiente modo: **(i)** 9/17 poblaciones de tipo no-LLC-B (4 pertenecientes a casos monoclonales y 5 a casos biclonales) eran CD5⁻, de las cuales una mostraba un fenotipo superponible al de una tricoleucemia variante (coexpresión de CD25 y CD103 en parte del clon linfoide), y otras cuatro presentaban un fenotipo consistente con LMB de tipo linfoma no Hodgkin (LNH) derivado de la zona marginal (CD11c⁺/CD23⁻/CD25⁻/CD27⁻/CD103⁻); el perfil fenotípico de las 4 poblaciones restantes de LMB CD5⁻ no permitió su subclasificación según las similitudes fenotípicas con las categorías actuales de SLPC-B de la clasificación de la OMS (LMB de tipo no-LLC-B inclasificables) pese a que en una de ellas se identificó la presencia de la del(7q) en 80% de las células B clonales, sugerente de un perfil genético asociado a la zona marginal; **(ii)** tres poblaciones de LMB de tipo no-LLC-B mostraron expresión débil y heterogénea de CD5 siendo su perfil fenotípico compatible también con LMB de tipo LNH de zona marginal o linfoma linfoplasmocítico; **(iii)** Las 5 poblaciones linfoides B restantes expresaban CD5, dos de ellas, que se correspondían con casos biclonales en los que una población clonal era de tipo LLC-B y la otra de tipo no-LLC-B, mostraban un fenotipo de LMB de tipo LLC-B, mientras que las otras tres presentaban un perfil fenotípico concordante con LMB de tipo LNH de células del manto, asociado en una a la presencia de t(11;14).

La clonalidad de las poblaciones de LMB de tipo no-LLC-B se confirmó en 11 de 15 poblaciones clonales B purificadas mediante el análisis del reordenamiento de los genes de las *IGH*; no observándose uso preferencial de familias *IGHV* en estos casos.

En la mayoría de los sujetos con LMB de tipo no-LLC-B (12/13 casos) se realizó una reevaluación al año del primer estudio. En todos ellos seguían detectándose las poblaciones linfoides B clonales identificadas en el estudio inicial siendo en media sus niveles significativamente más elevados que los detectados inicialmente, tanto en términos relativos respecto al recuento total de leucocitos ($p=0,03$), como en números absolutos ($p=0,003$).

CONCLUSIONES. En términos globales, nuestros resultados muestran que 2,0% de la población general adulta mayor de 40 años es portadora de clones de linfocitos B circulantes fenotípicamente diferentes a los de la LLC-B. Con relativa frecuencia, estos subtipos de LMB de tipo no-LLC-B son biclonales y presentan un perfil inmunofenotípico superponible al de los LNH de la zona marginal, linfoma linfoplasmocítico o linfoma de células del manto, aunque en algunos casos resultan fenotípicamente inclasificables. De forma similar a lo que ocurre en la LMB de tipo LLC-B, la prevalencia de la LMB de tipo no-LLC-B se incrementa progresivamente con la edad, y predomina en el sexo masculino.

Non-CLL-like Monoclonal B-Cell Lymphocytosis in the General Population: Prevalence and Phenotypic/Genetic Characteristics

Wendy G. Nieto,^{1,2} Cristina Teodosio,^{1,2} Antonio López,^{1,2}
Arancha Rodríguez-Caballero,^{1,2} Alfonso Romero,³ Paloma Bárcena,^{1,2}
Maria Laura Gutierrez,^{1,2} Anton W. Langerak,⁴ Paulino Fernandez-Navarro,⁵
Alberto Orfao,^{1,2*} Julia Almeida;^{1,2} and the Primary Health Care Group
of Salamanca for the Study of MBL

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (CSIC-USAL), Salamanca, Spain

²Servicio de Citometría & Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

³Gerencia de Atención Primaria de Salud de Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Castilla y León, Spain

⁴Department of Immunology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

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

Background: Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) indicates $<5 \times 10^9$ peripheral blood (PB) clonal B-cells/L in healthy individuals. In most cases, MBL cells show similar phenotypic/genetic features to chronic lymphocytic leukemia cells—CLL-like MBL—but little is known about non-CLL-like MBL.

Methods: PB samples from 639 healthy individuals (46% men/54% women) >40 years old (62 ± 13 years) with normal lymphocyte counts ($2.1 \pm 0.7 \times 10^9/L$) were immunophenotyped using high-sensitive flow cytometry, based on 8-color stainings and the screening for $>5 \times 10^6$ total PB leukocytes.

Results: Thirteen subjects (2.0%; 9 males/4 females, aged 73 ± 10 years; absolute lymphocyte count: $2.4 \pm 0.8 \times 10^9/L$) showed a non-CLL-like clonal B-cell population, whose frequency clearly increased with age: 0.4%, 3%, and 5.4% of subjects aged 40–59, 60–79, and ≥ 80 years, respectively. One single B-cell clone was detected in 9/13 cases, while two B-cell clones were found in 4/13 ($n = 17$ MBL populations). Nine MBL cell populations showed a $CD5^-$ phenotype (usually overlapping with marginal zone-derived (MZL) or lymphoplasmacytic (LPL) non-Hodgkin lymphoma (NHL) B-cells, or an

Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL (direct responsibility for collection of samples and data from the cohort of healthy individuals recruited): Asensio Oliva Maria Carmen C.S. Santa Marta De Tormes, Barez Hernandez Pilar C.S. Garrido Sur, Carreño Luengo Maria Teresa C.S. Ledesma, Casado Romo Jose Maria C.S. Alba de Tormes, Cubino Luis Rocio C.S. F. Villalobos (Sancti Spiritus), De Vega Parra Jose C.S. Peñaranda, Franco Esteban Eloy C.S. Pizarrales-Vidal, Garcia Rodriguez Bernardo Lucio C.S. La Alberca, Garzon Martin Agustin C.S. Peñaranda, Goenaga Andrés Rosario C.S. Ledesma, Gomez Sanchez Francisco C.S. Periurbana Norte, Gonzalez Moreno Josefa C.S. Guijuelo, Guarido Mateos Jose Manuel C.S. Vitigudino, Hernandez Sanchez Maria Jesus C.S. Vitigudino, Jimenez Ruano Maria Josefa C.S. Garrido Norte, Jimeno Cascon Teresa Basa C.S. Elena Ginel Diez (Tejares), Merino Palazuelo Miguel C.S. Fuentes de Oforo, Miguel Lozano Ruben C.S. Garrido Norte, Montero Luengo Juan C.S. San Juan, Muriel Diaz M^a. Paz C.S. Miguel Armijo, Pablos Regueiro Araceli C.S. Vitigudino, Ramos Monge Aurora Esther C.S. Ledesma, Rodriguez Medina Ana Maria C.S. Alba De Tormes, Sanchez Alonso Begoña C.S. Aldeadavila De La Ribera, Sanchez Bazo Begoña C.S. Aldeadavila De La Ribera, Sanchez Sanchez Teresa C.S. Aldeadavila De La Ribera, Sanchez White Nicolas C.S.F. Villalobos (Sancti Spiritus), Sandin Perez Rafael C.S. San Jose, Sanz Santa-Cruz Fernando C.S. Pizarrales-Vidal, Velasco Marcos Maria Auxiliadora C.S. Elena Ginel Diez (Tejares).

Alberto Orfao and Julia Almeida equally contributed to this work.

Grant sponsor: Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid, Spain; Grant numbers: RTICC RD06/0020/0035-FEDER, PI06/0824, PS09/02430; Grant sponsor: Gerencia Regional de Salud de Castilla y León; Grant number: GRS206/A/08; Grant sponsor: Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain; Grant number: SAN/1778/2009; Grant sponsors: Fundación Samuel Solórzano, University of Salamanca, Salamanca, Spain; Grant number: FS/16-2008; Grant sponsor: Consejería de Educación, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain; Grant number: Ayuda al grupo GR37 de Excelencia de Castilla y León. A.R.-C. is supported by Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer.

*Correspondence to: Alberto Orfao, Centro de Investigación del Cáncer, Av. Universidad de Coimbra s/n, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca 37007, Spain.

E-mail: orfao@usal.es

Received 28 March 2010; Revision 26 April 2010; Accepted 18 May 2010

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/cyto.b.20543

unclassifiable NHL), but CD5^{-/+d} ($n = 3$) and CD5⁺ ($n = 3$ non-CLL-like MBL, consistent with a mantle-cell lymphoma (MCL)-like phenotype, and $n = 2$ CLL-like) MBL were also identified; iFISH supported the diagnosis in most cases. No preferential IGHV usage of B-cell receptor could be found. Twelve cases reevaluated at month +12 showed circulating clonal B-cells, at mean levels significantly higher than those initially detected.

Conclusions: Non-CLL-like MBL cases frequently show biclonality, in association with MZL-, LPL-, MCL-like, or unclassifiable phenotypic profiles. As with CLL-like MBL, the frequency of non-CLL-like MBL increases with age, with a clear predominance of males. © 2010 International Clinical Cytometry Society

Key terms: monoclonal B-cell lymphocytosis; MBL; non-CLL-like MBL; chronic lymphocytic leukemia; CLL; flow cytometry

How to cite this article: Nieto WG, Teodosio C, López A, Rodríguez-Caballero A, Romero A, Bárcena P, Gutierrez ML, Langerak AW, Fernandez-Navarro P, Orfao A, Almeida J; and the Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. Non-CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis in the general population: Prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytometry Part B* 2010; 78B (Suppl. 1): S24-S34.

Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) is a relatively frequent condition characterized by the presence of $<5 \times 10^9$ clonal B-cells/L in peripheral blood (PB) in otherwise healthy subjects, in the absence of symptoms and signs of a B-cell chronic lymphoproliferative disorder (B-CLPD) (1). Although most studies that have been published so far have focused in the analysis of cases presenting with absolute lymphocytosis (2-6), several reports indicate that MBL could be a relatively frequent condition in the general population. In this regard, an overall frequency of between 3.5% and 14% of adults older than 40 years has been reported, depending on the sensitivity of the assay used to detect the B-cell clones and population age (2,6-10).

A more detailed analysis of circulating clonal B-cells typically shows that in most cases their immunophenotype and genetic features largely overlap with those of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL)—CLL-like MBL (2-10). However, in a smaller fraction of MBL cases, between 1% (6,7) and around 2.5% (9,10), in healthy adults with normal and increased lymphocyte counts, non-CLL-like B-cell clones are also detected. Until now, non-CLL like MBL has been arbitrarily divided into two major groups: CD5⁺ and CD5⁻ MBL cases. Although in several reports specific reference is made to the phenotypic and even the cytogenetic characteristics of some MBL cases presenting with lymphocytosis (4,11), little information is provided about non-CLL like B-cell clones in subjects who have MBL and normal B-cell counts (6,7,9,12,13). In addition, limited data exists concerning the outcome of subjects with non-CLL-like MBL either detected in population screening studies (9,13) or during investigation for lymphocytosis (2,4,11).

Here, we report on the immunophenotypic features of clonal B-cells from a group of 13 MBL cases identified in a population-based study in the Salamanca area in Western Spain, who showed either a CD5⁺ or CD5⁻, non-CLL-like immunophenotypic and genetic profile. In

addition, we compared our observations to those previously reported in the literature about the phenotypic and genetic features of non-CLL-like CD5⁻ MBL cases.

MATERIALS AND METHODS

Subjects of Study

A total of 639 healthy individuals, 292 men (46%) and 347 women (54%), older than 40 years (median age of 62 ± 13 years; range: 40-97 years), were randomly recruited from the *Primary Health Care* area of Salamanca (Spain) and included in this study. The total leukocyte and lymphocyte counts were of $6.3 \pm 1.6 \times 10^9/L$ and $2.1 \pm 0.7 \times 10^9/L$, respectively, with an absolute PB B-cell number of $0.16 \pm 0.1 \times 10^9/L$. The frequency of MBL clones in the first 608 cases included in this study was previously reported (10). The study was approved by the Ethics Committee of the Cancer Research Center of Salamanca (Salamanca, Spain), and all samples were obtained according to the Declaration of Helsinki, after written informed consent had been given by each subject.

Immunophenotypic Studies

A total amount of around 4 mL/case of EDTA-anticoagulated PB were immunophenotyped using a previously described direct immunofluorescence stain-and-then-lyse technique (14,15), with the following multicolor antibody stainings: (1) CD20-pacific blue (PB)/CD45-pacific orange (PO)/CD8-fluorescein isothiocyanate (FITC)+anti-surface immunoglobulin (sIg) λ -FITC/CD56-phycoerythrin (PE) + anti-sIg κ -PE/CD4-peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 (PerCPCy5.5)/CD19-PE-cyanin 7 (PE-Cy7)/CD3-allophycocyanin (APC)/CD38-AlexaFluor 700 (AF700); (2) CD20-PB/CD45-PO/Cybc12-FITC/CD23-PE/CD19-PerCPCy5.5/ CD10-PE-Cy7/CD5-APC/CD38-AF700; and (3) CD20-PB/anti-sIg λ -FITC/anti-sIg κ -PE/CD19-PerCPCy5.5/CD10-PE-Cy7/CD5-APC. In those cases in which a clonal

(imbalanced $\text{sI}\kappa\text{:sI}\lambda$ ratio of $>3:1$ or $<1:3$) and/or an aberrant B-cell population was detected, the study was extended with the following additional 5- and 6-color stainings (PB/FITC/PE/PerCPCy5.5/PECy7/APC): (1) CD20/CD22/CCR6/-/CD19/CD5; (2) CD20/CD103/CD25/CD5/CD19/CD11c; (3) CD20/CD43/CD79b/CD5/CD19/CD49d; (4) CD20/sIgM/CD27/-/CD19/CD5; (5) CD20/FMC7/CD24/-/CD19/CD5; and (6) CD20/CD3/Cyzap70/-/CD19/CD5. For the staining of Cybc12 and Cyzap70, the Fix & Perm™ reagent kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used, following the recommendations of the manufacturer. All reagents were purchased from Becton/Dickinson Biosciences (BDB; San Jose, CA), except for CD19-PECy7 (Beckman/Coulter, Miami, FL), CD20-PB (e-Biosciences, San Diego, CA), CD38-AF700 (Exbio, Prague, Czech Republic), CD45-PO (Invitrogen, Carlsbad, CA), CD79bPE, CD24PE, and CD43FITC (Immunotech, Marseille, France), and anti-bcl2-FITC, anti-IgM-FITC, anti-sIgλ-FITC, and anti-sIκk-PE (DAKO, Glostrup, Denmark). Data acquisition was performed for $>5 \times 10^6$ leukocytes/tube on a FACSCanto II flow cytometer (BDB) using the FACSDiva software (v6.1; BDB), as described elsewhere (10). Instrument setup and calibration were performed according to well-established protocols (16), and a daily quality control program was followed, using the Cytometer Setup and Tracking (CST)™ Beads and CST Module (BDB). Data analysis was performed using the INFINICYT™ software program (Cytognos SL, Salamanca, Spain). The minimum number of cellular events required to define the presence of a non-CLL-like clonal B-cell cluster was of 50 cells. The definition of a non-CLL-like MBL phenotype was based on the occurrence of a clonal B-cell population with either a CD5⁻ or CD5⁺ phenotype, in the absence of a typical or atypical CLL phenotypic pattern (17).

Analysis of IGH Gene Rearrangements

Assessment of clonality was performed on FACSsorted non-CLL-like B-cell populations (purity: $98\% \pm 0.8\%$) from 11/13 cases through the analysis of IGH gene rearrangements. Genomic DNA preparation, PCR amplification, heteroduplex analysis, sequencing and analysis of IGH_V, IGH_D, and IGH_J genes were performed following well-established protocols, which have been previously described in detail (18,19). Sequences containing $>2\%$ deviation from the germline sequence were considered as somatically mutated rather than genomic polymorphisms (20).

Interphase Fluorescence In Situ Hybridization Studies

The most common genetic abnormalities associated with both CLL and non-CLL B-CLPD were screened by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH), performed on slides containing fixed, FACSsorted (purity: $98\% \pm 0.8\%$) non-CLL-like aberrant B cells ($n = 46$), as described (21). The specific probes used for the cytogenetic characterization of non-CLL-like MBL samples are listed in Table 1. The number of hybridization spots was evaluated using a BX60 fluorescence microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a

Table 1
Interphase Fluorescence In-Situ Hybridization DNA Probes
Used for the Genetic Characterization of Non-CLL-Like
MBL Samples

Genetic alteration	Probe
trisomy 12	CEP12, D12Z3
del(11q22.3)	LSI <i>ATM</i> (11q22.3)
del(11q23)	LSI <i>MLL</i> (11q23.3)
del(17p13.1)	LSI <i>P53</i> (17p13.1)
del(7q)	LSI <i>D7S486/D7Z1</i> (7q31/7p11.1-q11.1)
del(13q14)	LSI <i>13/RB1</i> gene (13q14) and LSI <i>D13S25</i> (13q14.3)
t(14q32)	LSI <i>IgH</i>
t(18q21)	LSI <i>MALT1</i>
t(11;14)(q13;q32)	LSI <i>IgH/CCND1</i>
t(3q27)	LSI <i>BCL6</i>
del(6q21)	6q21 specific / α -satellite 6 Probe Cocktail

All probes but "6q21 specific/ α -satellite 6 Probe Cocktail" were purchased from Vysis Inc (Downers Grove, IL); 6q21 specific/ α -satellite 6 Probe Cocktail was purchased from QBio-gene (Montreal, Quebec, Canada).

100 \times oil objective and scored according to conventional criteria (21).

Statistical Methods

Relative frequencies, as well as median, mean, standard deviation (SD), range and the 25th and 75th percentiles were calculated using the SPSS software program (SPSS 15.0, Chicago, IL), for categorical and continuous variables, respectively. To establish the statistical significance of differences observed between groups, either the Pearson's χ^2 test or the Wilcoxon or Mann-Whitney *U*-tests were used for categorical and continuous variables, respectively. *P*-values ≤ 0.05 were considered to be associated with statistical significance.

RESULTS

Frequency of Healthy Subjects with Non-CLL MBL B-Cell Populations

Circulating monoclonal B cells were detected in 95/639 (14.8%) otherwise healthy subjects aged >40 years, from who 82 (12.8%) showed a CLL-like phenotype and the remaining 13 (2.0%), a non-CLL phenotype. From these latter 13 subjects, nine were males and four were females (frequency of clonal non-CLL-like B cells in men vs. women of 3.0% vs. 1.1%, respectively; $P > 0.05$). These subjects had a mean age of 73 ± 10 years, which was significantly ($P = 0.001$) higher than that of non-MBL healthy donors (61 ± 13 years). The frequency of non-CLL-like MBL according to age was as follows: 0% (0/140) among cases who were between 40 and 49 years old; 0.7% (1/135) of subjects aged 50–59 years; 3% (4/135) of cases in the 60–69 age range; 2.9% (5/174) of those between 70 and 79 years; and 5.4% (3/55) for subjects ≥ 80 years old.

All but three cases (Cases No. 1, No. 4, and No. 12 in Table 2) had absolute lymphocyte counts within the

normal range ($< 3.5 \times 10^9/L$); the three subjects with slightly increased absolute numbers of lymphocytes displayed 3.75×10^9 lymphocytes/L, 3.66×10^9 lymphocytes/L, and 3.83×10^9 lymphocytes/L, respectively. The mean percentage of non-CLL-like B-cells from all PB B cells, lymphocytes and leukocytes was of $34.6\% \pm 34.5\%$; (median: 32%; range: 0.45–96%), $7.7\% \pm 12\%$; (median: 2.9%; range: 0.03–36.9%) and $2.17\% \pm 3.81\%$; (median: 0.7%; range: 0.01–12%), respectively (Table 2). The mean absolute count of clonal non-CLL MBL cells was of 180 ± 345 cells/mm³ (median: 47; range: 0.59–1,132 cells/ μ L); no statistically significant differences were found in the overall PB B-cell counts between individuals with and without circulating clonal non-CLL B-cells ($P > 0.05$).

Immunophenotypic and Genetic Features of Non-CLL MBL B-Cell Populations

In nine of the 13 MBL cases (69%) one single non-CLL-like B-cell clone was detected (six cases expressing surface kappa light chain immunoglobulin (sIgk⁺) and the other three expressing sIgl λ), while in the remaining four cases (31%) two different clonal B-cell populations were identified (Table 2): one B-cell population was sIgk⁺ and the other sIgl λ ⁺ in one case, two distinct sIgk⁺ MBL B-cell subpopulations were found in two cases and two distinct sIgl λ ⁺ MBL B-cell subpopulations were found in the remaining case. Two of these latter four biclonal MBL cases showed one non-CLL-like B-cell population plus one CLL-like B-cell population (cases No. 10 and 12 in Table 2) while in the other two cases (cases No. 11 and 13 in Table 2) both clonal B-cell populations displayed a non-CLL phenotype.

The complete immunophenotypic profile of all clonal B-cell populations identified in the 13 non-CLL-like MBL cases ($n = 17$ B-cell clones) is detailed in Table 2. Nine MBL populations (four from monoclonal cases Nos. 3, 7, 8, and 9, and five from biclonal cases 10, 11, 12, 13, and 13^a) showed an overlapping CD5⁻, CD10⁻, CD20^{+/+}, CD22^{+/+}, CD43⁻, CD38⁻, CD79b^{+/+}, FMC7^{+/+}, sIg⁺ phenotype, with variable expression of CD11c. One of these MBL cases (case No. 7) also showed partial expression of CD25 and CD103, suggestive of HCLv (hairy cell leukemia variant)-like MBL, while the phenotype of B-cell clones from non-CLL-like MBL cases Nos. 3, 10, 12, and 13 were found to be more likely consistent with that of marginal zone-derived non-Hodgkin lymphoma (NHL)-like B-cells, with frequent expression of CD11c and a CD23⁻, CD25⁻, CD27⁻, CD103⁻ immunophenotype. Interphase FISH analysis confirmed the presence of a translocation involving the IGH gene in chromosome 14 [t(14q32)] in only a subset of all clonal B-cells from one of the two MBL B-cell clones of case No. 13 (Table 3). The phenotypic profile of the remaining four CD5⁻ MBL B-cell clones from cases Nos. 8, 9, 11, and 13^a, did not allow their further subclassification based on phenotypic similarities to specific WHO B-CLPD disease categories (unclassifiable non-CLL-like MBL), because of either incomplete phenotypic charac-

terization of small numbers of clonal B-cells or atypical phenotypes. Despite this, case No. 8 was found to carry del(7q) in 80% of all MBL cells, suggesting a marginal-zone-associated origin.

Three cases (MBL cases Nos. 4, 5, and in Table 2) showed a CD5^{-/+d}, CD10⁻, CD11c^{-/+}, CD20⁺, CD22⁺, CD24⁺, CD43⁻, CD38^{-/+d}, CD103⁻, sIg⁺ phenotype, which is consistent also with either marginal zone lymphoma (MZL)- or lymphoplasmacytic (LPL)-like MBL. Among these cases, case no. 5 showed t(14q32) in a significant fraction of the clonal B-cells (Table 3).

The remaining 5 MBL B-cell clones expressed CD5, associated in two biclonal cases with a typical CLL-like phenotype (CD5⁺, CD20^{+d}, CD22^{+d}, CD23⁺, CD43⁺, CD79b⁻, FMC7⁻, sIg^{+d}). Upon excluding these two CLL-like populations corresponding to the second clonal B-cell population detected in Cases Nos. 10^a and 12^a (biclonal MBL cases; Table 2), the other three non-CLL-like MBL populations from Cases Nos. 1, 2, and 11^a showed a CD5^{+/++}, CD10⁻, CD20^{+/++}, CD22^{+/++}, CD23^{-/partially+}, CD24⁺, CD27⁺, CD43⁻, CD38^{-/+d}, CD79⁺, CD103⁻, FMC7⁺, sIg⁺ phenotype. In detail, the phenotypic profile of clonal B-cells was concordant with mantle-cell lymphoma (MCL)-like MBL in all three cases, but only one (Case No. 1) carried t(11;14) by iFISH, while the other two did not (Tables 2 and 3).

IGHV-D-J Gene Repertoire and Mutational Status of Non-CLL MBL B-Cell Populations

Assessment of clonality was performed through the analysis of IGH gene rearrangements in 11/15 FACS-purified non-CLL-like MBL B-cell populations (73% of the cases) showing evidence of (mono)clonality in all of them. In 10 of these 11 MBL B-cell populations, further analysis of the IGH gene sequence was performed (Table 3). The most common IGH_V gene used was IGH_{V1} (3/10; 30%), followed by IGH_{V2}, IGH_{V3}, and IGH_{V4}, each found in 2/10 cases (20%); one case (10%) showed IGH_{V5} gene usage. Of note, IGH_{V2.05} was the only IGH_V gene recurrently expressed ($n = 2$); one case carried the IGH_{V4.34} gene rearrangement.

Half of those non-CLL-like MBL B-cell populations in which analysis of the mutational status of the IGH_V gene was assessed (5/10) were defined as mutated; in contrast, the other 50% (5/10) had unmutated IGH_V genes. In four of these latter five cases, sequences showed a 100% identity to the closest germline IGH_V gene (Table 3).

Clinical Features and Follow-Up of Healthy Individuals with Clonal Non-CLL B-Cell Populations

In all 13 MBL cases the presence of an underlying hematological malignancy was ruled out, and all except three cases had no other associated diseases: Case No. 6 suffered from hypertension, Case No. 8 had hypothyroidism, and Case No. 10 suffered from a chronic ischemic cardiopathy. None of the 13 subjects referred B-symptoms, they had neither organomegalies nor cytopenias (hemoglobin levels of 149 ± 8 g/L, ranging from 141 to 160 g/L; platelet count of $210 \pm 75 \times 10^9/L$,

Table 3
Molecular and Genetic Characteristics of PB Clonal B-Cell Populations (n = 17) From Non-CLL-Like MBL Cases (n = 13)

Case no.	B-cell clonality status	IGH rearrangements						Genetic abnormalities									
		IGHV subgroup genes	IGHD subgroup genes	IGHJ subgroup genes	% of nucleotide identity to germline	t(3q27)	del 6q21	del 7q	del (11q22.3)	del (11q23.3)	Trisomy 12	del (13q14)	del (13q14.3)	t(14q32)	t(11;14)	del (17p13.1)	t(18q21)
<i>Monoclonal cases (n = 9)</i>																	
1	Confirmed	IGHV1-01	IGHD7-27	IGHJ3-01	96	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS (95%)	POS (99%)	NEG	nd
2	nd	nd	nd	nd	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	nd	nd
3	Confirmed	IGHV1-02	IGHD1-21	IGHJ6	100	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
4	Confirmed	IGHV1-02	IGHD3-9	IGHJ5-02	100	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
5	Confirmed	IGHV2-05	IGHD3-9	IGHJ2-01	100	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS (26%)	nd	NEG	NEG
6	Confirmed	IGHV4-59	IGHD6-19	IGHJ5-02	100	NEG	nd	nd	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	nd	nd	nd	NEG
7	Confirmed	IGHV2-05	IGHD3-9	IGHJ2	97.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NEG	NEG	NEG	NEG
8	Confirmed	IGHV3-21	IGHD6-19	IGHJ6c	nd	NEG	POS (80%)	POS (80%)	POS (80%)	POS (80%)	POS (80%)	POS (80%)	POS (80%)	POS (80%)	POS (80%)	POS (80%)	POS (80%)
9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Biclonal cases (n = 4)</i>																	
10	Confirmed	IGHV3-49	IGHD5-24	IGHJ4	92	NEG	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
10 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11	Confirmed	IGHV4-34	IGHD2-15	IGHJ4	94	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12	Confirmed	IGHV1-03	IGHD5-5	IGHJ4-02	98.5	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	Confirmed	IGHV5-51	IGHD3-10	IGHJ4	94	NEG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	POS (10%)	POS (10%)	nd	NEG
13 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NEG

iFISH: interphase fluorescence in situ hybridization. (nd): not determined.

^aThe second MBL cell population in biclonal cases. CLL: Chronic lymphocytic leukemia; MBL: monoclonal B-cell lymphocytes. POS: presence of that genetic abnormality (% positive purified B-cells); NEG: absence of that genetic abnormality.

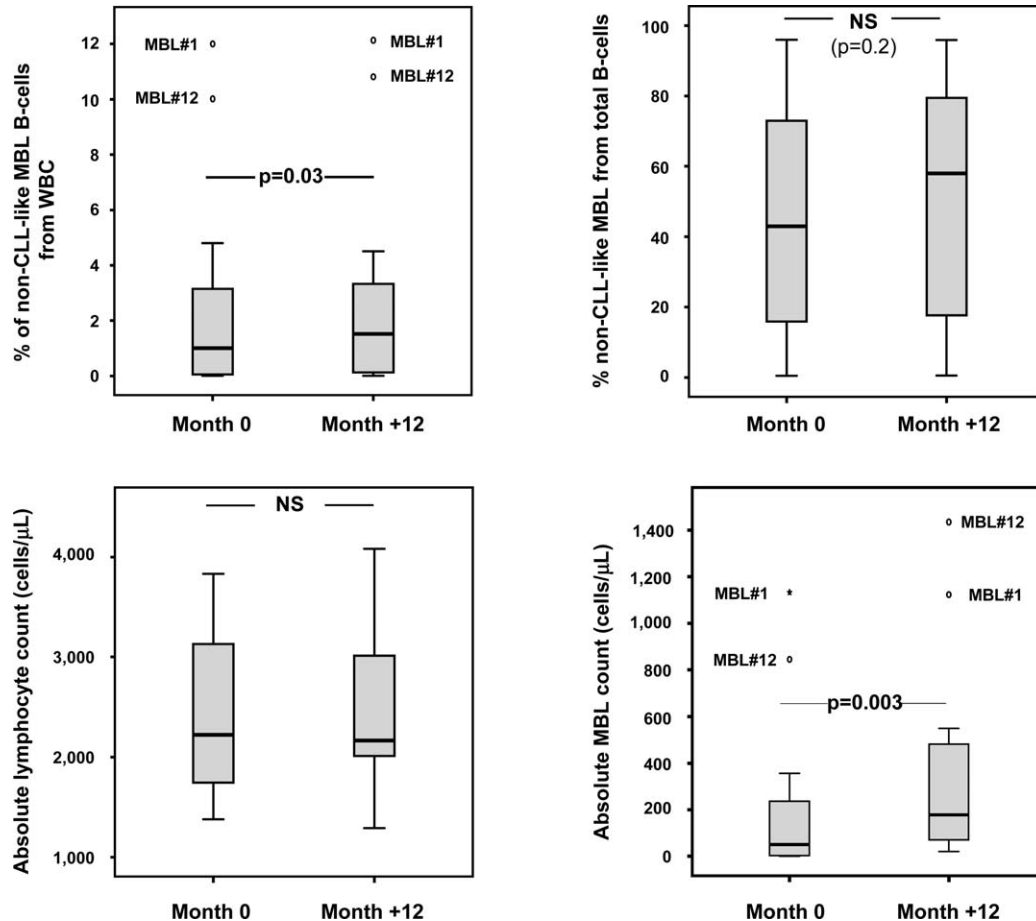


Fig. 1. Short-term (1 year) follow-up of non-CLL-like MBL. Statistically significant differences were found in both the absolute MBL B-cell counts and the percentage of PB MBL B-cells from WBC, between the first (month 0) and the second (month +12) immunophenotypic study. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values and the line in the middle corresponds to median values (50th percentile). Vertical lines represent the highest and lowest values that are not outliers or extreme values. Outliers (values that are between 1.5 and 3 times the interquartile range) are marked with a circle and extreme cases (values that are more than three times the interquartile range) with an asterisk (code numbers for the specific non-CLL-like MBL population are shown). WBC, white blood cells; NS, no statistically significant differences found ($P > 0.05$).

ranging from 126 to $349 \times 10^9/L$; absolute neutrophil count of: $3.4 \pm 0.8 \times 10^9/L$, ranging from 2.0 to $5.0 \times 10^9/L$, and LDH (lactic dehydrogenase) levels were systematically within the normal range (384 ± 61 U/L, range between 316 and 451, normal range: <460 U/L).

Twelve of the 13 non-CLL-like MBL cases were reevaluated 12 months after entering the study. At this time, presence of circulating clonal MBL B-cells was confirmed in all 12 cases, at mean levels which were significantly higher than those initially detected, both in relative ($2.8\% \pm 4.3\%$, median of 1.17%; range: 0.01–12% vs. $2.9\% \pm 4.2\%$, median of 1.52%; range: 0.01–12.1%, clonal B-cells from the whole WBC at month 0 and +12, respectively; $P = 0.03$) and absolute numbers (220 ± 377 , median of 49.7; range: 0.62–1,133 vs. 367 ± 457 , median of 178; range: 21–1,435, clonal MBL B-cells/ μL at month 0 and +12, respectively; $P = 0.003$); despite this increase, no statistical differences were found in the overall absolute PB lymphocyte counts between both time-points (Fig. 1).

DISCUSSION

Information currently available about the immunophenotypic and genetic characteristics of non-CLL-like MBL is relatively limited (Table 4). This is mainly due to the fact that non-CLL-like MBL cases are rather heterogeneous, and their frequency (detected in both population screening and through investigation of a lymphocytosis) is significantly lower than that of MBL associated with more homogeneous and typical CLL-like B-cell clones. In line with this, in this study we report among the general population, up to 2% of adults aged >40 years to carry circulating non-CLL-like B-cell clones in PB. Noteworthy, the frequency of non-CLL-like MBL cases here detected is clearly higher than that previously reported by others, who found CD5⁻ non-CLL-like MBL cases to be present in approximately 1–1.4% of subjects in the general population (6,7). Such a higher frequency could be due to the higher sensitivity of the flow cytometry approach used to investigate the presence of B-cell clones in PB, which has also proven to be associated with an

Table 4
 Clinical Data and Phenotypic Characteristics of the Expanded PB Clonal B-Cells From Atypical-CLL- and Non-CLL-Like MBL Cases Reported in the Literature

Report	Study group	Median age (range) (y)	Overall no. of subjects in the study	Non-CLL-like MBL prevalence (%)	Case no. ^a	Sex	Age (y)	No. of lymphocytes ($\times 10^9/L$)	Abs. MBL count/mm ³	Immunophenotypic profile														
										CD5	CD10	CD20	CD23	CD38	CD79b	CD103	FMC7	Sigk	Sigk	Sigk	SigM			
Rawstron et al. (11)	Non-CLL-like MBL in CLL first-degree relatives	45 (23–79)	59	1.7%	18203	M	81	Normal	54	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Rawstron et al. (7)	CD5 ⁻ non-CLL-like MBL from UK hospital outpatients	NR (>40 years)	910	1%	Not detailed (n = 9)	NR	78 ^b (49–88)	NR	NR	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ghia et al. (6)	Atypical CLL-like MBL from Italy Primary Care	74 (65–98)	500	0.6%	10 11 12	M F F	78 65 68	Normal Normal Normal	NR NR NR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amato et al. (4) ^{d,e}	CD5 ⁻ non-CLL-like MBL from Italy Primary Care	74 (65–98)	500	1.4%	13 14 15 16 17 18 ^c 19 ^c	F F M M M M M	78 78 76 80 81 86 74	Normal Normal Normal Normal Normal Normal Normal	NR NR NR NR NR NR NR	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –	– – – – – – –

Table 4.
Clinical Data and Phenotypic Characteristics of the Expanded PB Clonal B-Cells From Atypical-CLL- and Non-CLL-Like MBL Cases Reported in the Literature (continued)

Report	Study group	Median age (range) (y)	Overall no. of subjects in the study	Non-CLL-like MBL prevalence (%)	Case no. ^a	Sex	Age (y)	No. of lymphocytes ($\times 10^7/L$)	Abs. MBL count/mm ³	Immunophenotypic profile																		
										CD5	CD10	CD20	CD23	CD38	CD79b	CD103	FMC7	Sigk	Sigλ	SigM								
Dagklis et al. (9)	Atypical CLL-like MBL from a population-based study in Italy	55 (18–102)	1725	1.2%	Not detailed (n = 20)	NR	70–79 ^b	Normal	NR	+	✓	✓													✓	✓		
	CD5 [−] non-CLL-like MBL from a population-based study in Italy	55 (18–102)	1725	1.1%	Not detailed (n = 19)	NR	NR	Normal	NR	−																		
Landgren et al. (13)	CD5 [−] non-CLL-like MBL who developed a CLPD ^c	NA	NA	NA	8 ^g	NR	NR	NR	NR	−	−	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
											✓	✓			✓												✓	✓

^aNumbers in this column correspond to the original case numbers (identifier code) provided in the reported series; y: years. ✓: indicates that that marker has been used in the corresponding report (in addition to CD19, to characterize B-cells). M: male; F: female. MZL: Marginal-zone lymphoma. NR: not reported.

^bMedian age/age-range. Antigen expression is referred as: −, absence of expression; +d, dim expression; ++, moderate expression; +, strong expression. Precise (individualized) information about CD11a, CD11c, CD22, CD24, CD25, CD27, and CD43 is not provided in any series, despite some of them have been used for immunophenotypic characterization: CD11a, CD22, CD27 in (11) and (7).

^cBiclinal cases: these two cases showed coexistence of a CLL-like MBL clone (6).

^dNo information provided about the intensity of antigen expression, except for sig (4).

^eThe percentage of non-CLL-like MBL cells from all B-cells ranged between 95% and 99% (no individual data is reported by Amato et al. (4). NA: not applicable. Karyotypic findings (4): Case 1: t(17)(q10); Case 2: del(12)(p11.3p13.1); Case 3: t(2;7)(p11;q22); Case 4: +5,i(17)(q10); Case 7: del(7)(q31q34).

^fThese three cases had also been reported in a previous paper from the same group (12).

^gIn this long-term prospective cohort study, a total of 45 subjects (from 77,469 healthy adults) were diagnosed with CLL, at 6.4 years after collecting their blood samples; 44/45 subjects were found to have an MBL clone in a peripheral blood sample collected prior to diagnosis; in one of them (Case No. 8 from this series) the immunophenotype of MBL cells was compatible with CD5[−] non-CLL-like MBL (13).

increased frequency of CLL-like MBL cases (12% (10) vs. between 3.5 and 7% (7–9)). However, it should be noted that within our non-CLL-like MBL cases, both CD5⁺ and CD5⁻ cases were included; by contrast, in previous reports, only CD5⁻ cases were usually considered, whereas most CD5⁺ cases which did not show a typical CLL-like phenotype were classified as atypical CLL-like B-cell clones, even when only a limited panel of antibodies was used to define their immunophenotype (6,9). In fact, if we only consider CD5⁻ non-CLL-like MBL cases, their frequency in our series is similar to that previously reported by others (1.4% vs. between 1% and 1.4% (6,7,9,12)), even when we used a flow cytometric approach associated with a higher sensitivity as regards detection of CLL like B-cell clones (10). On the basis of these results, our findings would support the hypothesis that the screening approach used could be associated with a lower sensitivity as regards detection of non-CLL versus CLL-like MBL clones in PB samples from healthy subjects who show normal lymphocyte counts. In line with this, Rawstron (22) has also suggested that by definition, normal B-cell levels must be significantly reduced in order to detect CD5⁻ MBL and these cases more likely have more extensive bone marrow (BM) and lymph node involvement than PB. Of note, further work up for NHL performed in our cases did not provide any evidence of an underlying B-CLPD in any of them.

Non-CLL-like MBL has generally been subdivided into two major groups: CD5⁻ and CD5⁺ MBL cases (1,23). Interestingly, the latter has been frequently termed as “atypical” CLL MBL based on higher expression of CD20 and other immunophenotypic features that make them different from typical CLL-like MBL cells. In the present series, six cases showed either a CD5⁺ ($n = 3$ cases) or CD5^{-/+} ($n = 3$) immunophenotype, while most non-CLL-like MBL B-cell clones identified were CD5⁻ ($n = 9$). Noteworthy, all three CD5⁺ non-CLL-like MBL cases showed an immunophenotypic profile consistent with MCL, and one of them displayed t(11;14)(q13;q34). Despite further work up for NHL over 2 years of follow-up, these three CD5⁺ MBL clones remain without any symptoms or signs of disease (data not shown). The other three cases that showed partial and dim CD5 expression, all displayed an immunophenotype consistent with either MZL- and LPL-like B-cell clones, or they could not be classified as similar to neoplastic cells from a specific WHO B-CLPD entity (24). Interestingly, similar immunophenotypic profiles to those of these latter cases were also commonly found among CD5⁻ non-CLL-like MBL; in addition, one CD5⁻ case showed a HCLv-like phenotype. In line with these results, previous reports on MBL cases associated with normal (7–10) and increased (2–6) PB lymphocyte counts, also indicate that in most CD5⁻ non-CLL-MBL cases, clonal B-cells display either an unclassifiable or MZL-like immunophenotype. In addition, we also confirm that among MBL cases detected in the general population, the presence of CD10⁺ B-cell clones is rather infrequent, if at all detected (2–12). In contrast, here we describe for the first time, an MBL

case which shows both phenotypic and genetic features that are highly characteristic of MCL cells.

Altogether, these results suggest that MBL clones detected during screening studies in the general population display immunophenotypic features which significantly overlap with those of B-CLPD for which no primary genetic lesions have been described/identified so far (e.g. CLL, MZL, HCLv, and LPL); conversely, the MBL cell populations phenotypically overlapping with those B-CLPD associated with unique genetic abnormalities present in all neoplastic B-cells—e.g. t(14;18) in follicular lymphoma (FL) and t(11;14) in MCL—are infrequent. On the basis of these observations, it could be hypothesized that in most MBL cases, clonal B-cells could result from the clonal expansion of antigen-driven B-lymphocytes, supporting the pathophysiological mechanisms involved in e.g. MZL/MALT lymphomas (25,26). In line with this hypothesis, previous studies have found a preferential usage of IGH_{V4-34} in the B-cell receptor of MZL neoplastic B-cells (27), although these results could not be confirmed in our as well in another study including MBL cases with a MZL-like phenotype (4). Interestingly however, approximately 20% of non-CLL MBL cases were found to carry two different clonal B-cell populations, which suggest the existence of multiclonality versus monoclonality in a higher proportion of non-CLL like MBL versus B-CLPD WHO diseases. In this regard, we (10) and others (9) have previously reported a high incidence of bi(multi)clonality also among CLL-like MBL cases (19% and 7%, respectively) and, more recently 4/6 CLL-like MBL cases with <150 MBL cells/ μ L from CLL relatives were found to be multiclonal (28). These findings suggest oligoclonal diversification associated to antigen driven expansions, further supporting the potentially reactive nature of both non-CLL-like MBL and CLL-like MBL among individuals with normal lymphocyte counts.

Controversial results have been reported in the literature as regards the age of onset of non-CLL-like MBL. Accordingly, Ghia et al. (6) have suggested that the frequency of non-CLL-like MBL in the general population would not increase significantly with age, whereas, Amato et al. (4) indicated that CD5⁻ MBL associated with increased lymphocyte counts would affect younger subjects than CLL-like MBL cases. In this study, non-CLL-like MBL cases showed a median age higher than subjects who had no-MBL B-cell populations; at the same time, we found a progressively higher frequency of non-CLL like MBL cases in the general population with increasing age ranging from 0.4% among subjects aged 40–59 years to 5.4% among individuals over 80 years. These results suggest a similar behavior for non-CLL and CLL-like MBL in the general population as regards age distribution. In turn, a clear male predominance was also observed. By contrast, the frequency of sIgk⁺ vs sIgl⁺ cases in non-CLL-like cases was similar to that of normal B-lymphocytes, but significantly different from that reported for CLL-like individuals, where a clear predominance of sIgl⁺ cases is observed (29).

IV. Discusión

Varios años después de la descripción formal de la LMB como una categoría diagnóstica establecida por consenso, en la cual se incluyen todos aquellos sujetos portadores de clones de linfocitos B circulantes que no alcanzan los criterios requeridos para ser diagnosticados de LLC-B -o de cualquier otra neoplasia de célula B- (324, 372), continuamos sin conocer de forma precisa las características clínicas, evolutivas y demográficas de esta entidad, así como las características biológicas de los linfocitos B clonales de estos sujetos (373).

En primer lugar, llama la atención la marcada variabilidad en los resultados publicados en la literatura acerca de la prevalencia de la LMB (374, 375) que, incluso entre los trabajos más recientes, oscila desde el 0,12% (población general) (335) hasta el 18% (familiares de pacientes con LLC-B) (329). Esta variabilidad se explica tanto por la diversidad de grupos de población estudiados en los distintos trabajos, como por las diferentes estrategias metodológicas empleadas en el laboratorio para la detección de poblaciones linfoides B clonales. Respecto al primer aspecto, hay que tener en cuenta que el análisis de la prevalencia de LMB se ha realizado principalmente en 3 grupos de sujetos: (i) población general de una determinada comunidad, sin linfocitosis (335, 346, 358); (ii) pacientes generalmente con linfocitosis atendidos en un hospital de forma ambulatoria, sin otra enfermedad hematológica asociada (124, 328, 348); y (iii) familiares de primer grado de consanguinidad de pacientes con LLC-B (329, 330, 351, 376). El segundo factor fundamental que contribuye a explicar la variabilidad encontrada en la frecuencia de presentación de clones LMB es metodológico. Aunque actualmente todos los estudios emplean citometría de flujo multiparamétrica para la identificación de poblaciones de linfocitos B clonales, existen diferencias significativas entre las diversas aproximaciones empleadas, que se traducen en una sensibilidad de detección distinta entre ellas. Los estudios iniciales utilizaban combinaciones de

anticuerpos monoclonales en 2 o 3 fluorescencias distintas y analizaban un número relativamente pequeño de células; con estos métodos, la frecuencia de identificación de clones LMB es en general baja (335, 346). Por el contrario, los trabajos más recientes emplean equipos y técnicas más avanzados que permiten por una parte, realizar estudios multiparamétricos con combinaciones más amplias de anticuerpos y mayor número de fluorescencias (358) y, por otro lado, analizar un número de células mucho más elevado, lo cual facilita la detección de pequeñas poblaciones de células B clonales presentes entre una mayoría de linfocitos B normales. El empleo de estos últimos métodos (p.ej.: la utilización de combinaciones de anticuerpos conjugados con 5 fluorocromos diferentes para el análisis de un mínimo de 500.000 células (358)) permite identificar casos de LMB con una frecuencia significativamente superior (prevalencia de entre 2,3% y 7,2%) a la de los estudios realizados sobre una cantidad menor (alrededor de 200.000) células totales (prevalencia de entre 1,0% y 3,8%) (124, 348).

Esta asociación directa tan clara entre la prevalencia referida de LMB y el número de células analizadas/combinación de fluorescencias empleadas en cada estudio -especialmente evidente en el grupo de sujetos de la población general-, nos llevó a plantear la hipótesis de que si aplicábamos técnicas más sensibles, la frecuencia de detección de clones linfoides B también se incrementaría, y por tanto nos acercaríamos más a la prevalencia real de esta entidad en la población general. Con este propósito planteamos los dos objetivos del presente trabajo doctoral, centrados por una parte en i) establecer la frecuencia de presentación de poblaciones linfoides B clonales en la sangre periférica de adultos mayores de 40 años seleccionados de forma aleatoria de la población general residente en la provincia de Salamanca, empleando técnicas de citometría de flujo multiparamétrica de alta sensibilidad, y por otro lado, en ii) determinar si las poblaciones de células B CD5⁺ con fenotipo tipo LLC-B están

presentes sistemáticamente en la SP de individuos de edad avanzada, reflejo de su posible origen y naturaleza fisiológica vs patológica.

El potencial interés científico y biosanitario de estos hallazgos, derivados por una parte de la demostración de la elevada prevalencia de LMB en la población general, y por otra, de la disponibilidad de una herramienta capaz de detectar estos pequeños clones linfoides B circulantes (la citometría de flujo multiparamétrica de alta sensibilidad), se ha reflejado en la publicación en los últimos años de numerosos estudios centrados en profundizar en el significado biológico y clínico de las LMB. Destacan especialmente aquellos trabajos cuyo propósito ha sido estudiar la relación entre la LMB y la LLC-B, ya que si bien existen datos consistentes que demuestran que la LLC-B clínicamente manifiesta -y otros SLPC-B- estaría precedida prácticamente siempre de un periodo silente de LMB (327, 328), desconocemos los factores involucrados en la progresión/transformación de la enfermedad (326, 373). Un aspecto esencial que nos llevaría a conocer mejor esta relación sería identificar las similitudes y sobre todo las diferencias biológicas, entre las células clonales de ambas entidades (LMB vs. SLPC-B); por ello, el tercer objetivo de este trabajo de tesis doctoral se ha centrado en estudiar las características fenotípicas y genéticas de cada población de linfocitos B (mono)clonales detectada en sujetos aparentemente sanos, y compararlas con las de las células B neoplásicas de pacientes con SLPC-B clínicamente manifiesto. Finalmente, nos planteamos como último objetivo, investigar si en el plazo de al menos un año tras su identificación, se detectan alteraciones numéricas, y/o fenotípicas en el clon linfoide B de las LMB, con la finalidad de conocer su comportamiento evolutivo a corto plazo, desconocido en el momento actual para las LMB sin linfocitosis, derivados de estudios de la población general.

4.1.- Frecuencia de presentación de clones linfoides B en la población general de la provincia de Salamanca.

En conjunto, en el presente trabajo hemos realizado un rastreo inmunofenotípico de la presencia de clones linfoides B en un total de 639 adultos sanos (población general de más de 40 años), reclutados a partir del sistema de Atención Primaria de Salud de la provincia de Salamanca. En 93 de los 639 casos (14,5%) detectamos al menos una pequeña población de linfocitos B clonales (casos LMB). La gran mayoría de estos casos (12%) mostraban un fenotipo tipo LLC-B, y solo en una minoría (2,5%) las células clonales tenían un fenotipo de tipo no-LLC-B.

La frecuencia de identificación de pequeños clones LMB de tipo LLC-B en nuestra cohorte de adultos sanos con recuentos linfocitarios normales es elevada, acercándose a más del doble de la descrita por otros grupos que han estudiado también la prevalencia de LMB en la población general (328, 358, 375). Los estudios en los que la frecuencia de detección de LMB se acerca más a la encontrada en nuestra serie son los llevados a cabo en familiares de primer grado de pacientes con LLC-B (329, 351, 376), y en un estudio concreto realizado en adultos con linfocitosis subclínica (328); así, hasta la fecha ningún trabajo ha referido una prevalencia de LMB tan elevada a la nuestra, en la población general. Este hallazgo lo achacamos fundamentalmente a la mayor sensibilidad de la técnica empleada, ya que en nuestro estudio realizamos un rastreo sistemático de la presencia de clones LMB en $\geq 5 \times 10^6$ leucocitos totales de SP de cada sujeto, y además utilizamos paneles de anticuerpos en combinaciones de entre 6 y 8 fluorescencias para la identificación de las poblaciones B clonales. De ambos factores técnicos, se ha referido que posiblemente el que más influye en la detección de LMB es el número de células totales (y consecuentemente de linfocitos B) recolectado para el análisis (370, 375).

Centrándonos exclusivamente en los estudios llevados a cabo sobre la población general de más de 40 años sin linfocitosis, se evidencia claramente un incremento progresivo en la frecuencia de identificación de casos de LMB de tipo LLC-B, a medida que aumenta el número de células adquiridas en el citómetro de flujo, como hemos mencionado ya anteriormente: i) en el estudio del grupo británico (348) se adquirió información sobre unas 200.000 células totales, identificándose clones LMB de tipo LLC-B en el 3,5% de los casos; ii) en el trabajo del grupo italiano (358) se analizaron unas 500.000 células totales/muestra, y se detectaron clones linfoides B de tipo LLC-B en casi el 7% de los sujetos; iii) en nuestra serie llegamos a detectar un 12% de casos de LMB de tipo LLC-B, tras analizar al menos 10 veces más células nucleadas que en los trabajos previos, y adquirir volúmenes de ~1-4 mL de SP por caso.

El segundo factor de tipo metodológico que puede influir en la estimación de la prevalencia de LMB es la capacidad de identificar clones únicos mediante el empleo de diferentes combinaciones de anticuerpos (375). En general, los estudios que emplean dos fluorescencias diferentes pueden identificar sólo cuatro combinaciones de fenotipos mayoritarios, los métodos que emplean cinco fluorescencias pueden distinguir 32 combinaciones, y con paneles de ocho colores se pueden distinguir 256 combinaciones distintas (375). En definitiva, la identificación de una población de células de fenotipo aberrante entre una mayoría de células B normales es prácticamente inequívoca si empleamos combinaciones de 6-8 colores, como las empleadas en nuestro trabajo.

Otro dato que apoya claramente que la causa de la elevada prevalencia de LMB de tipo-LLC-B encontrada en nuestro estudio es la mayor sensibilidad de la técnica de análisis empleada, es el hecho de que en más de la mitad de los casos (62%), el porcentaje de células B clonales que detectamos se encuentra por debajo del nivel de sensibilidad de otros estudios ($\leq 0,01\%$, es decir, menor o igual a 1 célula aberrante tipo

LLC-B entre 10.000 células normales) (358); así mismo, en la mayoría de nuestros casos con LMB de tipo LLC-B el clon linfoide constituye una fracción muy minoritaria del conjunto de células B totales (mediana de 0,38% del total de células B, con un rango de entre 0,14% y 4,2%), de manera que en ningún caso su presencia se traduce en un aumento del número absoluto de linfocitos totales circulantes.

En contraposición con la elevada frecuencia con la que detectamos LMB tipo LLC-B entre los sujetos de más de 40 años de la población general de Salamanca, encontramos en este mismo grupo de estudio una prevalencia de LMB de tipo no-LLC-B similar a la descrita por otros autores (entre el 1% y 2,5% de los sujetos analizados) (124, 348, 358). Una posible explicación a este hecho, es que el panel de anticuerpos combinados en 8 fluorescencias empleados en nuestra serie está optimizado para detectar el fenotipo característico de la LLC-B, y probablemente no es el más adecuado para identificar otros fenotipos aberrantes; además, en el momento actual carecemos de marcadores específicos para la identificación inequívoca de ciertos subgrupos de SLPC-B (p.ej.: los linfomas derivados de la zona marginal ganglionar o esplénica, o los linfomas de tipo MALT) (148). No obstante, es posible que la prevalencia de las LMB de tipo no-LLC-B sea realmente muy baja en la población general, lo cual sería reflejo de la ontogenia diferente de la LLC-B respecto a otros SLPC-B.

Corroborando los resultados de otros trabajos recientes (348, 358), en nuestro estudio también encontramos diferencias significativas en la prevalencia de LMB de tipo LLC-B en relación con la edad. Así, detectamos clones linfoides B en el 7% de los individuos de entre 40 y 59 años, en más del 20% de los mayores de 60 años y en el 75% de los sujetos con más de 90 años. A este respecto, es interesante destacar que en el único estudio -aparte del nuestro- realizado sobre la población general de más de 90 años, se refiere que la prevalencia de LMB de tipo LLC-B es del 45% dentro de este

tramo de edad (358). Por el contrario, no observamos asociación entre el tamaño del clon linfocito B y la edad. Por tanto, independientemente de la sensibilidad de la técnica empleada en cada estudio, la influencia de la edad parece ser determinante en la presencia *vs.* ausencia de clones LMB, de manera que la frecuencia de identificación de sujetos portadores de clones linfocitos B circulantes aumenta progresivamente con la edad. De hecho, datos de otros grupos confirman que por debajo de los 40 años la prevalencia de LMB sería prácticamente insignificante (358). En lo que respecta a las LMB tipo no-LLC-B, no existe en la actualidad un acuerdo tan unánime acerca de la influencia de la edad; algunos autores (124) sugieren que la presencia de poblaciones clonales B de tipo no-LLC-B en la población general no se incrementa significativamente con la edad, mientras que en nuestro trabajo sí se hizo evidente también para las LMB de tipo no-LLC-B un aumento creciente de la frecuencia conforme aumentaba la edad de los sujetos evaluados.

En nuestra serie, no observamos ninguna asociación significativa entre la prevalencia de LMB tipo LLC-B y otros parámetros epidemiológicos, como el núcleo poblacional de origen -urbano *vs.* semiurbano *vs.* rural- o el sexo (hay que considerar que en la LLC-B está bien documentado el predominio masculino (157, 214)); tampoco encontramos diferencias en el tamaño del clon linfocito B entre hombres y mujeres con LMB. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados de otros grupos que tampoco han encontrado un predominio sexual claro de la LMB tipo LLC-B, aunque a este respecto existe cierta controversia, ya que los rangos publicados en cuanto a la ratio hombre:mujer oscilan entre 1,2 (346) y 1,8 (358) en los estudios realizados sobre la población general y entre 0,7 (328) y 2,1 (348) en los estudios de LMB "clínica". Estas diferencias pueden deberse al hecho de que en ninguno de los trabajos se hace un estudio de la prevalencia específica de sexos por grupos de edad y es posible que las

mujeres incluidas en los distintos estudios fuesen mayores que los hombres. En el grupo de LMB tipo no-LLC-B, la información disponible en la literatura a este respecto es prácticamente nula, dado que las escasas series publicadas por otros grupos son muy pequeñas; en los 13 casos recogidos en nuestro trabajo, comprobamos la existencia de un discreto predominio masculino (9/13 casos), que así mismo ha observado el grupo italiano (124) en su serie de 10 sujetos (6 varones y 4 mujeres), aunque obviamente estos datos deberán ser corroborados en series más amplias.

4.2.- Presencia sistemática de poblaciones de células B CD5⁺ con fenotipo tipo LLC-B en la SP de adultos de edad avanzada.

Como hemos referido en el apartado anterior, con la estrategia de análisis por citometría de flujo empleada, pusimos claramente de manifiesto que al aumentar la sensibilidad de la técnica de detección de clones linfoides B circulantes, se evidencia un incremento significativo del porcentaje de casos de LMB que detectamos en la población general: >14% frente al 3,5-7% descrito por otros grupos, (348, 358). A partir de estos datos, nos planteamos la posibilidad de que al aplicar estrategias de análisis de alta sensibilidad mediante citometría de flujo sobre volúmenes mayores de sangre, fuéramos capaces de detectar clones LMB incluso en todos los sujetos sanos de la población general. Para ello realizamos de nuevo un análisis en el que, a partir de los datos reales obtenidos de cada muestra de sangre analizada (alrededor de 1 ml de sangre periférica de cada sujeto), se construyó un modelo matemático predictivo, con la finalidad de calcular el porcentaje de casos en los que se detectarían clones linfoides B, si se hubieran analizado volúmenes de muestra mayores a los estudiados. El modelo predictivo reveló que si se hiciera un rastreo sobre volúmenes de sangre superiores (≈ 46 mL), se detectarían clones LMB tipo LLC-B en el 32% de la población de entre 40 y 59

años de edad, el 62% en los del tramo de 60 a 69 años y en el 100% de la población general mayor de 70 años. Estos datos apoyan la hipótesis de que la presencia de linfocitos B de fenotipo similar a los de la LLC-B sería un hallazgo prácticamente constante a partir de cierta edad, y que por tanto, todos los sujetos de la población general alcanzarían a tener clones LMB de tipo LLC-B si llegaran a vivir el tiempo suficiente. Para verificar esta hipótesis basada en un modelo matemático predictivo, analizamos muestras de 50 ml de sangre procedentes de 9 sujetos sanos de la población general mayores de 70 años, en los que no se detectaron linfocitos B clonales cuando analizamos 1 ml de SP. Mediante este nuevo análisis, comprobamos que en todos ellos excepto en uno, se detectaban clones LMB circulantes.

Obviamente, si la presencia de clones LMB es constante en la población general adulta, su hallazgo ya no podría ser considerado como una situación patológica, sino que deberíamos considerarla más bien normal o "fisiológica"; el hecho de que ocurra a partir de cierta edad apoya firmemente el que se trate de un fenómeno asociado al envejecimiento y muy probablemente al proceso de inmunosenescencia (377). Como se ha detallado en la *Introducción* de este trabajo doctoral, a medida que avanza la edad se producen cambios en la distribución de las poblaciones linfoides B. Así, se observa un descenso significativo de los linfocitos B de memoria (especialmente evidente entre los linfocitos que han sufrido el cambio isotópico) y de los plasmablastos (29), asociado al hecho de que el repertorio de linfocitos B se va haciendo progresivamente más restringido (119). En estas circunstancias, la vigilancia del sistema inmune frente a estímulos antigénicos crónicos solo sería efectiva si se generan células de vida media larga, de manera que las células B específicas de un antígeno concreto entraran en un estado "inmunosenescente" de supervivencia prolongada. Ello explicaría la aparición de células B progresivamente más restringidas en su repertorio, en respuesta a ciertos

antígenos mantenidos en el organismo en el tiempo. La hipótesis de la estimulación antigénica crónica como circunstancia básica que favorece la aparición y expresión de un clon de células B se apoya en numerosas evidencias que demuestran que determinados agentes infecciosos están relacionados con el desarrollo de varios tipos de leucemias y linfomas de linfocitos B y T maduros (378-380); además, el hecho de que, como hemos señalado en la *Introducción*, las células neoplásicas de pacientes con LLC-B y otros SLPC-B, así como de algunas LMB con linfocitosis, muestren un uso preferencial de algunas versiones de genes V de las cadenas pesadas de las Igs, y la relativa frecuencia con la que se detecta coexistencia de dos o más clones de células B no relacionados en pacientes con SLPC-B leucemizados (322), apoyarían también esta hipótesis. Por tanto, si bien es cierto que hasta la fecha no existen evidencias experimentales que demuestren esta teoría de forma fehaciente, parece bastante probable que las expansiones clonales de linfocitos B de tipo LLC-B presentes en sujetos de edad avanzada sean consecuencia de un epifenómeno de estimulación antigénica crónica, mantenida a lo largo del tiempo, similar a la descrita previamente para las células T y en las que se ven implicadas infecciones virales persistentes que favorecen la aparición de expansiones oligo y monoclonales de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ (381). Una observación adicional que fundamenta esta teoría es la referida muy recientemente por el grupo italiano (382), que ha encontrado que en el 80% de los sujetos de su serie de LMB de la población general, simultáneamente se detectan expansiones oligoclonales de linfocitos T, sobre todo dentro del compartimento CD4⁺/CD8⁺.

Así mismo, disponemos de otros datos derivados de nuestro estudio que apoyan esta hipótesis general de desarrollo de poblaciones linfoides "fisiológicas" en respuesta a estímulos antigénicos crónicos, que inicialmente serían multiclonales u oligoclonales y

que con el tiempo se harían mono o biclonales: la proporción de casos de LMB en los que detectamos más de un clon de células B aberrantes al procesar ≈ 1 ml de SP fue del 21%, llegando incluso a superar la mitad de los casos (5/9) en los que se procesaron ≈ 50 ml de SP, frente al 5% de bi(multi)clonalidad descrito en los SLPC-B clínicamente manifiestos (322). La evidencia de la presencia de bi u oligoclonalidad entre las expansiones de LMB, también ha sido confirmada por otros grupos tanto en la población general de LMB sin linfocitosis (6/89 casos del estudio italianos mostraban una ratio kappa/lambda dentro del rango de la normalidad (358)), como sobre todo en familiares de pacientes con LLC-B (4/6 casos de LMB con menos de 50 células B de tipo LLC-B/ μ l (357)).

En conjunto, todos estos resultados apoyan la hipótesis de que la presencia de células B tipo LLC-B puede ser un fenómeno fisiológico en adultos con recuentos normales de linfocitos, no necesariamente asociado a monoclonalidad, al menos en fases muy tempranas. Con el paso del tiempo, solo un clon (o un número limitado de clones) permanecería estable, presumiblemente como consecuencia de una estimulación antigénica prolongada (383), de naturaleza desconocida hasta la fecha (352). Lo que sí está claro es que estas células necesitarían una o varias "señales" adicionales al estímulo antigénico (que ocurrirían en raras ocasiones) para desarrollar una LLC-B clínicamente manifiesta (383, 384). Esta teoría se ve además apoyada por otros dos hallazgos derivados de nuestro estudio: i) en los 9 casos en los que se realizó un rastreo de poblaciones linfoides B clonales a partir de ≈ 50 ml de SP, el número absoluto de células B de tipo LLC-B era menor en los casos multiclonales respecto al encontrado entre los (mono)clonales (mediana de 0,008 vs. 0,05 células/ml, respectivamente), y; ii) los casos de nuestra serie general de LMB en los que las células clonales no presentaban alteraciones genéticas asociadas a la LLC-B, tenían un número absoluto de células B

clonales significativamente menor que el de los casos con alteraciones genéticas: mediana de 0,56 células B tipo LLC-B/ μ l para los casos sin alteraciones citogenéticas vs. medianas de 11,5 y de 32 células B tipo LLC-B/ μ l en los casos que presentaban del(13q) y trisomía 12, respectivamente.

4.3.- Caracterización fenotípica y genética de cada una de las poblaciones de linfocitos B (mono)clonales detectadas en adultos aparentemente sanos vs. pacientes con SLPC-B clínicamente manifiesto.

En aquellos sujetos mayores de 40 años de la población general de Salamanca en los que detectamos clones linfoides B circulantes (n=93 LMB), procedimos a realizar su caracterización fenotípica detallada, tras el marcaje de las células de SP con un panel más amplio de anticuerpos monoclonales, combinados en ocho fluorescencias. En consonancia con los resultados de otros grupos, los linfocitos B clonales de la gran mayoría de nuestros casos (86%) mostraban un fenotipo de LMB tipo LLC-B. Como hemos mencionado en capítulos anteriores de esta sección, la frecuencia con la que detectamos entre estos casos clones de tipo LLC-B era muy superior (12%) a la descrita en trabajos previos (3,5% - 7%) (348, 353, 358). En los demás casos (13/93: 14% de los sujetos con LMB) el fenotipo de las células B clonales era distinto al de la LLC-B típica, siendo la prevalencia de LMB tipo no-LLC-B en nuestra serie solo ligeramente superior a la descrita por otros grupos (2,5% vs. 1-2%) (124, 348).

Centrándonos en primer lugar en el grupo de las LMB tipo LLC-B, cabe destacar que no observamos diferencias significativas en el patrón fenotípico de las células B clonales respecto al de las células neoplásicas de la LLC-B, para ninguno de los marcadores analizados, de manera que el fenotipo entre ambos tipos de células clonales era indistinguible: CD19⁺, CD5⁺, CD20^{+débil}, CD23⁺, CD79b^{+débil}, FMC7^{-/+débil},

Cybc12^{brillante} y expresión restringida de cadena ligera de smIg^{débil}, en ausencia de CD10. Estos datos confirman los resultados de otros grupos, que tampoco encontraron diferencias en el patrón fenotípico de las LMB tipo LLC-B con la LLC-B al estudiarlas con un panel de 18 anticuerpos diferentes parcialmente coincidentes con los investigados en este trabajo (353).

Por otra parte, merece reseñar la elevada incidencia de biclonalidad entre las LMB tipo LLC-B (17%), respecto a la incidencia de bi- o multiclonalidad descrita en la LLC-B en la que no supera el 5% de los casos (322). Aunque la posible explicación a estas diferencias se ha discutido precisamente en el apartado 4.2 del presente trabajo doctoral, merece destacar que otras causas de tipo metodológico por ejemplo, la distinta sensibilidad de la técnica empleada en nuestro trabajo respecto al de Sánchez *et al* (322) podrían contribuir también a explicar tales diferencias.

Tras la caracterización fenotípica de las LMB tipo LLC-B, se purificaron las células B clonales y sobre los clones de células B purificadas se realizó estudio genético para las cuatro alteraciones típicas de la LLC-B, empleando técnica de hibridación *in situ* fluorescente. Nuestros resultados confirman que en las LMB tipo LLC-B de la población general, en las que ni siquiera las células B totales están expandidas, el clon B tipo LLC-B presenta ya alteraciones genéticas, aunque en una proporción de casos significativamente inferior al observado en la LLC-B (40% de las LMB tipo LLC-B vs. 75% de las LLC-B). Estos hallazgos han sido corroborados muy recientemente por el grupo italiano, que asimismo ha descrito la presencia de alteraciones genéticas en 8 de 16 casos de LMB tipo LLC-B con bajo recuento de linfocitos B clonales (382). En cualquier caso, independientemente de la presencia o no de alteraciones genéticas asociadas, confirmamos la naturaleza clonal de las células B de fenotipo tipo LLC-B mediante biología molecular, en todos los casos en los que pudo realizarse esta técnica

(17/24 casos mostraban reordenamientos clonales del gen *IGH*). Entre los casos en los que detectamos aberraciones cromosómicas por hibridación *in situ*, la delección del brazo largo del cromosoma 13 fue la más frecuente en los dos grupos de sujetos (38% en las LMB tipo LLC-B sin linfocitosis *vs.* 58% en las LLC-B), seguida de la trisomía 12 (7% de las LMB tipo LLC-B y 16% de las LLC-B), ambas consideradas alteraciones de "buen pronóstico" o de "pronóstico intermedio" en la LLC-B. Si bien el porcentaje de células con delección en el cromosoma 13 era similar en los dos grupos de sujetos (67±30 *vs.* 67±31 en las LMB y en las LLC-B, respectivamente), la proporción de células con trisomía 12 era ligeramente inferior en la LMB tipo LLC-B respecto a la LLC-B clínicamente manifiesta (50±13 *vs.* 76±17, respectivamente), sin llegar a alcanzar estas diferencias significación estadística, probablemente debido al número relativamente limitado de casos de LMB que presentaban esta alteración. En ninguna de las LMB tipo LLC-B de nuestra serie, se detectó la presencia de alteraciones genéticas asociadas a mal pronóstico en la LLC-B (delecciones en 11q o en 17p). Hasta la fecha, la descripción de casos de LMB con del(11q) o del(17p) se ha restringido a las LMB con linfocitosis (328, 356), si bien recientemente (diciembre de 2011) se ha descrito la presencia de del(17p) en el 80% y 90% de las células B clonales en dos casos de LMB tipo LLC-B con bajo recuento de células (382); este hallazgo deberá confirmarse y seguirse en el tiempo, para conocer su verdadero significado en la evolución de esta entidad.

El hecho de que ya existan alteraciones genéticas típicas de la LLC-B "de buen pronóstico" en una proporción elevada de LMB tipo LLC-B de la población general con recuentos normales de linfocitos, nos lleva a pensar que estas anomalías ya estarían presentes de forma muy precoz, y podrían estar asociadas a la adquisición del "fenotipo LLC-B", más que a un estado pre-leucémico. Por tanto, la presencia de células LMB,

aún con alteraciones genéticas, sería una condición necesaria pero no suficiente para la transformación a LLC-B, para lo cual se requeriría de otros pasos intermedios que condicionaran la adquisición de alteraciones genéticas adicionales (p.ej.: alteraciones de *NOTCH1*, *MYD88*, etc) asociadas ya a malignidad, de acuerdo con la teoría descrita en el apartado anterior de la *Discusión*. No obstante, aún desconocemos qué significado tiene el que las células clonales de los sujetos con LMB presenten o no alteraciones genéticas, ya que como hemos adelantado en el apartado 4.2 de esta sección, observamos que dentro de nuestra serie de LMB con fenotipo similar a LLC-B, la presencia de alteraciones genéticas se asociaba con un número absoluto de linfocitos B clonales significativamente superior respecto a los casos de LMB sin alteraciones genéticas, y hay que tener en cuenta que hasta la fecha el único factor claramente asociado a la progresión/transformación de una LMB con linfocitosis a una LLC-B es el número absoluto de células B clonales (tienen mayor riesgo de progresión aquellos sujetos con recuentos más elevados (373)). Sería esencial determinar por ejemplo, si los casos LMB tipo LLC-B con alteraciones genéticas tienen un repertorio *IGHV* más parecido al de la LLC-B clínicamente manifiesta, o si por el contrario este se asemeja más al de las células B circulantes de sujetos sanos de edad similar sin LMB.

En lo que respecta a las características biológicas de las LMB tipo no-LLC-B, merece destacar que la información disponible en el momento de iniciar el presente trabajo de tesis doctoral era escasa, refiriéndose la mayoría de las descripciones existentes a casos aislados o a series muy cortas de sujetos. De hecho, nuestra serie basada en 13 casos recogidos en los últimos años constituye la serie más amplia referida en la bibliografía hasta la fecha.

En cuanto al fenotipo, ya se había descrito que las LMB tipo no-LLC-B son más heterogéneas que las de tipo LLC-B, contribuyendo en parte este hecho, junto con el

pequeño número de casos publicados, a que la información disponible acerca de las LMB tipo no-LLC-B sea bastante limitada. En trabajos previos, las LMB tipo no-LLC-B se han clasificado de forma arbitraria en dos grupos, de acuerdo con la presencia o no de la molécula CD5 en las células clonales: casos CD5⁺ y LMB CD5⁻ (124, 348). En la gran mayoría de los casos (n=9/13; 69%) de nuestra serie de LMB tipo no-LLC-B detectamos la presencia de un único clon de células B, mientras que en los 4 casos restantes (31%) identificamos dos clones linfoides B diferentes. Teniendo en cuenta que en 2 de los 4 casos biclonales una de las poblaciones mostraba un fenotipo tipo LLC-B típica, identificamos en los 13 casos un total de 15 poblaciones de linfocitos B clonales de tipo no-LLC-B, que caracterizamos desde el punto de vista fenotípico y genético.

En términos generales, la heterogeneidad fenotípica de las poblaciones de LMB tipo no-LLC-B era considerable. Así, en 6/15 casos las células B clonales expresaban CD5 mientras que las 9 restantes eran CD5⁻. A su vez, identificamos claramente dos grupos dentro de los casos que presentaban expresión de CD5. En 3 poblaciones clonales B que expresaban CD5 este era positivo de forma clara y homogénea, y las tres tenían un perfil fenotípico similar al de las células del linfoma del manto (LCM); además, en una de ellas pudo constatar la presencia de la translocación cromosómica t(11;14) típica de este tipo de linfoma (348, 353, 358). Por el contrario, las otras tres poblaciones B clonales CD5⁺ expresaban CD5 de forma débil y heterogénea y mostraban un fenotipo similar al de las células del LZM/LPL, o bien resultaban "no clasificables" de acuerdo con los criterios fenotípicos de la OMS (348, 353, 358), al no presentar características típicas de ningún otro SLPC-B. En contrapartida, en el grupo de las LMB tipo no-LLC-B CD5⁻ encontramos perfiles fenotípicos parecidos al último grupo de LMB tipo no-LLC-B CD5⁺ (compatible con LZM/LPL o no clasificables), excepto para una de las poblaciones B, que mostró un fenotipo similar a la forma

variante de la tricoleucemia (385). En 10 de estas 15 poblaciones de fenotipo no-LLC-B típica se confirmó clonalidad B mediante el análisis molecular del reordenamiento de los genes *IGH*.

En consonancia con nuestros resultados, las pocas descripciones fenotípicas publicadas indican que la mayoría de los casos de LMB tipo no-LLC-B muestran un inmunofenotipo tipo LZM o tipo "linfoma no clasificable", tanto en sujetos con recuentos linfocitarios normales (348, 358), como con linfocitosis (124, 328, 346, 356, 359). Además, en nuestro estudio describimos por primera vez la existencia de casos de LMB tipo no-LLC-B en los que las células clonales tienen características fenotípicas y genéticas similares a las del LCM, a la vez que ratificamos que la expresión de CD10 es infrecuente en las LMB tipo no-LLC-B de la población en general (124, 328, 340, 346, 348, 351, 356, 358, 359).

En general, estos resultados sugieren que la mayoría de las poblaciones de células B clonales de las LMB tipo no-LLC-B presentan características inmunofenotípicas (y genéticas) superponibles a las de los SLPC-B en los que no existe una alteración genética primaria asociada al desarrollo de la enfermedad; por el contrario, las poblaciones B clonales fenotípicamente similares a los SLPC-B asociados a una única alteración genética presente en todas las células neoplásicas –p.ej. t(14;18) en el LF ó t(11;14) en el LCM– serían infrecuentes (124, 348, 358).

Partiendo de la observación de que los casos más frecuentes de LMB tipo no-LLC-B tienen un fenotipo similar al de los linfomas derivados de la zona marginal, y teniendo en cuenta que en los últimos años se ha propuesto que la estimulación antigénica crónica también podría ser un evento fundamental en la patogenia de los linfomas tipo MALT/LZM (386, 387), cabe pensar que en la mayoría de las LMB tipo no-LLC-B, la expresión de las células B clonales podrían estar relacionadas también

con una respuesta antigénica mantenida, igual que lo sugerido previamente para las LMB tipo LLC-B. De acuerdo con esta hipótesis, estudios previos han descrito que el BCR de las células neoplásicas del LZM muestran un uso preferente de la familia *IGHV4-34* (388); no obstante, estos resultados preliminares no han podido confirmarse, ni en nuestro estudio, ni en el de Amato y cols (359) en cuya serie de LMB tipo no-LLC-B se incluían igualmente casos con fenotipo tipo LZM.

4.4.- Comportamiento clínico evolutivo a corto plazo de la LMB.

En la actualidad, la inmensa mayoría de los estudios de seguimiento de LMB se han realizado sobre LMB tipo LLC-B "clínica" (326, 328, 362, 366), es decir, sobre sujetos que presentan linfocitosis, pero que en el momento de su detección no cumplen los criterios diagnósticos de LLC-B. Como se ha mencionado en capítulos previos de esta memoria, se ha demostrado que prácticamente el 100% de las LLC-B van precedidas de una situación previa de LMB tipo LLC-B, identificada varios años antes de ser diagnosticados de la neoplasia (327). Sin embargo, el riesgo de que un sujeto con LMB tipo LLC-B (con linfocitosis) desarrolle la enfermedad es sumamente bajo. Así se ha comprobado que tras periodos de seguimiento variables (medianas de seguimiento que oscilan entre 2,5 y 7 años), la gran mayoría de estos sujetos mantiene un recuento de linfocitos estable; y de hecho, sólo alrededor del 1-2% de los casos desarrollará anualmente enfermedad progresiva que requiera tratamiento (328, 367), presentando mayor riesgo de progresión aquellos sujetos que parten de una cifra de linfocitos B clonales circulantes más elevada (356, 362, 373). No obstante, estos estudios deben considerarse en general preliminares y se requiere de estudios adicionales a más largo plazo, para conocer de forma más precisa la tasa de progresión de la LMB tipo LLC-B y los posibles factores asociados a la misma. Respecto a las LMB tipo no-LLC-B, nuestro

desconocimiento acerca de su evolución aún es mayor. Únicamente en un trabajo se reseña la persistencia de las poblaciones clonales en 7 casos con linfocitosis, tras un periodo de tiempo de entre 4 y 16 años, sin evidencia de progresión o necesidad de tratamiento en ninguno de los 7 casos (359).

A su vez, la información disponible acerca de la evolución clínica de los individuos con una LMB identificada a partir de estudios realizados en la población general (con recuentos muy bajos de células B clonales en SP) era inexistente en el momento de comenzar este trabajo doctoral, debido principalmente a que consideraciones de tipo ético y sobre todo logístico, han limitado la posibilidad de seguimiento (354). Esta carencia, en nuestro conocimiento se refiere tanto a los casos de LMB tipo LLC-B como a los de tipo no-LLC-B con bajo recuento de linfocitos. En el momento actual, disponemos no sólo de los datos de seguimiento de nuestro estudio, sino también de los resultados publicados muy recientemente por el grupo italiano de estudio de las LMB con bajo recuento de linfocitos (382), que comentaremos más adelante.

En nuestro trabajo, hemos reevaluado al año del primer estudio a un total de 50 de los 93 sujetos con LMB, empleando una estrategia de detección de clones LMB idéntica a la descrita para el estudio basal. De estos 50 casos, 38 eran LMB tipo LLC-B y 12 de tipo no-LLC-B. El primer hallazgo de interés de nuestro estudio radica en que las pequeñas poblaciones de células B clonales persisten en el tiempo, de manera que en la totalidad de estos 50 casos se confirmó la persistencia de LMB en SP en la reevaluación realizada al año del estudio basal. Estos resultados contrastan con los del grupo italiano, que ha descrito una tasa de persistencia de pequeñas poblaciones linfoides B clonales a los 3 años del estudio inicial de únicamente el 90% de los casos de LMB tipo LLC-B ($n=54/60$) y 55% de las LMB tipo no-LLC-B ($n=10/18$). No obstante, merece destacar que en los casos en los que no detectaron persistencia de los

clones B (al menos para los 6 casos de LMB tipo LLC-B, que es el dato que aportan), el número absoluto de células B tipo LLC-B en el primer estudio era muy bajo -mediana de 0,40 células/ μl -, cifra cercana al límite de sensibilidad de su técnica. En este sentido, el motivo de la controversia respecto a nuestros resultados, podría explicarse por la menor sensibilidad de la técnica empleada por el grupo italiano (10^{-5} vs. 10^{-6} , respectivamente). Por el contrario, desconocemos los motivos que pueden explicar la discrepancia observada entre ambos estudios en lo que se refiere a los resultados obtenidos en las LMB tipo no-LLC-B, aunque resulta poco probable que estos pudieran deberse al momento diferente en el que se realizó el estudio de seguimiento en ambos trabajos (1 año en el estudio de Salamanca vs. 3 años en el del grupo italiano), ya que datos preliminares de nuestro grupo han confirmado que se detectan células B clonales circulantes en todos los casos de LMB (n=22, de los cuales 5 son de tipo no-LLC-B) reevaluados a los 3 años del estudio basal. Merece destacar que a lo largo de este tiempo de seguimiento (3 años) no ha habido ningún caso de progresión o transformación en un SLPC-B ni en la serie italiana, ni en nuestros casos (datos no mostrados).

Sin embargo, aunque el seguimiento de nuestros casos es aún muy corto respecto a la evolución presumiblemente tan prolongada de la LMB sin linfocitosis, merece destacar que al año del primer estudio en algunos casos identificamos cambios asociados a un número absoluto de células B clonales significativamente más elevado respecto al detectado en el estudio inicial. Dichos cambios se han traducido en un ligero incremento de la mediana de LMB/ μl de 0,58 células a 0,84 células/ μl . Este ligero incremento en el número absoluto de linfocitos B clonales circulantes se observa no solo en la serie global, sino también al analizar por separado las LMB tipo LLC-B y las LMB tipo no-LLC-B. No obstante, aunque las diferencias sean estadísticamente significativas entre los dos momentos de estudio, el número de células LMB detectable

al año sigue siendo muy pequeño (<1 célula/ μ l en la gran mayoría de los casos), de manera que habría que considerar que clínicamente se mantiene estable.

En general, respecto al comportamiento evolutivo de la LMB sin linfocitosis, nuestros resultados coinciden con los del grupo italiano, que tampoco observó ninguna progresión a SLPC-B clínicamente manifiesto entre su serie de LMB con bajo recuento de células B. Por el contrario, estos autores no observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de linfocitos B clonales circulantes a los 3 años de seguimiento (382), respecto a las detectadas en el estudio inicial.

En resumen, nuestros resultados sugieren que una vez que se identifican células B clonales de tipo LLC-B o de tipo no-LLC-B en la SP de adultos, éstas persisten durante largos periodos de tiempo, (presumiblemente para siempre). No obstante, estos resultados deben corroborarse en estudios con un seguimiento más prolongado, que permita establecer la verdadera tasa de progresión y/o transformación a un SLPC-B clínicamente manifiesto.

V. Conclusiones

- En relación con la frecuencia de presentación de poblaciones de linfocitos B clonales en la circulación sanguínea de sujetos sanos mayores de 40 años sin linfocitosis, residentes en la provincia de Salamanca:

1.- La incidencia de LMB tipo LLC-B en la población general de más de 40 años es significativamente superior a la descrita previamente por otros autores, incrementándose progresivamente a medida que aumenta la edad. El hecho de que en la mayoría de los casos de nuestra serie los niveles de linfocitos B clonales circulantes estén por debajo del límite máximo de sensibilidad de las técnicas empleadas por otros grupos apoya la noción de que la detección de clones linfoides B tipo LLC-B circulantes depende en gran medida de la sensibilidad de la técnica de citometría de flujo empleada.

2.- En contraposición con la LMB tipo LLC-B, la incidencia de LMB tipo no-LLC-B en nuestra serie fue similar a la descrita por otros grupos, lo que podría reflejar una ontogenia diferente de la LLC-B respecto a la mayoría de los demás SLPC-B.

- En relación con la posible presencia sistemática de poblaciones de células B con fenotipo similar a la LLC-B en la SP de adultos de edad avanzada, y su naturaleza fisiológica vs. patológica:

3.- La presencia de células B clonales circulantes con fenotipo similar al de la LLC-B puede ser un hallazgo habitual en la población general adulta (especialmente a partir de los 70 años de edad), lo que sugiere que estas células podrían representar, más que un precursor leucémico la contrapartida normal de la LLC-B.

4.- La detección de células B tipo LLC-B en adultos con recuento normal de linfocitos podría constituir un fenómeno fisiológico, posiblemente relacionado con la inmunosenescencia y no necesariamente asociado a (mono)clonalidad, al menos en las fases más tempranas en las que es factible su identificación.

- En relación con la caracterización fenotípica y genética de las poblaciones de linfocitos B clonales detectadas en adultos sanos y su comparación con las características de las células tumorales de los SLPC-B correspondientes:

5.- No existen diferencias significativas en las características fenotípicas y genéticas de las células B clonales de SP de sujetos con LMB tipo LLC-B y la LLC-B; no obstante, el porcentaje de casos de LMB con alteraciones citogenéticas es ligeramente inferior al observado en la LLC-B y en ellos no se detectaron alteraciones genéticas asociadas a mal pronóstico en la leucemia. Estos hallazgos sugieren que la presencia de alteraciones genéticas como la del(13q) es un evento relativamente precoz, aunque insuficiente para determinar por sí solo la evolución a un estado leucémico.

6.- La mayoría de las poblaciones de células B clonales de las LMB de tipo no-LLC-B presentan características inmunofenotípicas y genéticas superponibles a las de SLPC-B en los que no existe una alteración genética primaria asociada al desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo, el LZM y el LLP; por el contrario, son infrecuentes las poblaciones B clonales fenotípicamente similares a SLPC-B asociados a una única alteración genética común a todas las células neoplásicas del paciente, como la t(14;18) en el LF o la t(11;14) en el LCM. Estos hallazgos apoyan la implicación de distintos

mecanismos y vías de transformación neoplásica y progresión maligna en ambos grupos de SLPC-B.

- En relación con la evolución a corto plazo de las LMB:

7.- En todos los casos en los que se realizó una reevaluación tras al menos 1 año del primer estudio, se seguían detectando células B clonales circulantes, tanto entre las LMB de tipo LLC-B como en las no-LLC-B, lo que apoyaría la noción de que una vez se detecten células B clonales en SP, éstas persistirían y se mantendrían estables a lo largo del tiempo.

8.- Aunque el seguimiento realizado sigue siendo corto, ninguno de los sujetos con LMB mostró signos de progresión o transformación a un SLPC-B clínicamente manifiesto, lo que apoyaría la noción de que en general la LMB con recuento normal de linfocitos B podría tener un comportamiento evolutivo diferente al de las LMB "clínicas", que presentan una tasa de transformación de alrededor del 1% al año.

VI. Referencias

Bibliográficas

1. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008 Sep 1; **112**(5): 1570-1580.
2. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007 Aug; **27**(2): 190-202.
3. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 487-513.
4. Acosta-Rodriguez EV, Merino MC, Montes CL, Motran CC, Gruppi A. Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007 Feb-Apr; **18**(1-2): 73-83.
5. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006 Feb; **6**(2): 107-116.
6. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry* 2004 Jul; **60**(1): 1-13.
7. van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D, Barendregt BH, de Haas EF, Reinders MJ, *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 Nov 1; **175**(9): 5912-5922.
8. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T, *et al.* Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 2006 Oct; **6**(10): 741-750.
9. 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 Jan 3; **191**(1): 5-8.
10. Espeli M, Rossi B, Mancini SJ, Roche P, Gauthier L, Schiff C. Initiation of pre-B cell receptor signaling: common and distinctive features in human and mouse. *Semin Immunol* 2006 Feb; **18**(1): 56-66.
11. Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, *et al.* Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 2007 May 1; **109**(9): 3706-3712.
12. Monteiro JP, Benjamin A, Costa ES, Barcinski MA, Bonomo A. Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *Blood* 2005 Feb 15; **105**(4): 1484-1491.
13. Sapozhnikov A, Pewzner-Jung Y, Kalchenko V, Krauthgamer R, Shachar I, Jung S. Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches. *Nat Immunol* 2008 Apr; **9**(4): 388-395.

14. Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Rycyzyn MA, Mills J, Sarisky RT, *et al.* Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 2004 Dec; **72**(12): 7202-7211.
15. 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 Aug; **15**(2): 323-334.
16. Stoddart A, Ray RJ, Paige CJ. Analysis of murine CD22 during B cell development: CD22 is expressed on B cell progenitors prior to IgM. *Int Immunol* 1997 Oct; **9**(10): 1571-1579.
17. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999 Oct 7; **401**(6753): 556-562.
18. Rolink AG, Nutt SL, Melchers F, Busslinger M. Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 1999 Oct 7; **401**(6753): 603-606.
19. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004 Jun; **20**(6): 707-718.
20. 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 Feb; **18**(1): 2-11.
21. Hillion S, Rochas C, Youinou P, Jamin C. Signaling pathways regulating RAG expression in B lymphocytes. *Autoimmun Rev* 2009 Jun; **8**(7): 599-604.
22. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 595-621.
23. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, *et al.* Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999 Mar; **13**(3): 419-427.
24. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, Macedo A, Martinez A, Gonzalez M, *et al.* Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica* 1998 Dec; **83**(12): 1069-1075.
25. 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 Feb; **4**(2): 133-144.

26. 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 Feb 13; **98**(4): 1745-1750.
27. Abbas AK LA, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology *WB Saunders Company* 2007; **6th ed.**
28. Radic MZ, Zouali M. Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance. *Immunity* 1996 Dec; **5**(6): 505-511.
29. 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**: S47-60.
30. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 117-139.
31. Wasserstrom H, Bussel J, Lim LC, Cunningham-Rundles C. Memory B cells and pneumococcal antibody after splenectomy. *J Immunol* 2008 Sep 1; **181**(5): 3684-3689.
32. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, *et al.* Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 2004 Sep; **5**(9): 943-952.
33. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005 Mar; **5**(3): 230-242.
34. Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 1990 Nov 1; **76**(9): 1739-1747.
35. Lampert IA, Van Noorden S, Wotherspoon AC. Centrocytoid plasma cells of the germinal center. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005 Jun; **13**(2): 124-131.
36. Schebesta M, Heavey B, Busslinger M. Transcriptional control of B-cell development. *Current opinion in immunology* 2002 Apr; **14**(2): 216-223.
37. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, *et al.* Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002 Jul; **17**(1): 51-62.
38. Almeida J, Orfao A, Mateo G, Ocqueteau M, Garcia-Sanz R, Moro MJ, *et al.* Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathologie-biologie* 1999 Feb; **47**(2): 119-127.
39. Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, *et al.* Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993 May 15; **81**(10): 2658-2663.

40. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, *et al.* Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *The American journal of pathology* 1998 Jun; **152**(6): 1655-1665.
41. 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 Nov 2; **188**(9): 1679-1689.
42. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005 Jun 1; **105**(11): 4390-4398.
43. Klein U, Kuppers R, Rajewsky K. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* 1997 Feb 15; **89**(4): 1288-1298.
44. Goodwin RG, Alderson MR, Smith CA, Armitage RJ, VandenBos T, Jerzy R, *et al.* Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell* 1993 May 7; **73**(3): 447-456.
45. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today* 2000 May; **21**(5): 204-206.
46. 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 Nov 2; **188**(9): 1691-1703.
47. Fecteau JF, Cote G, Neron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol* 2006 Sep 15; **177**(6): 3728-3736.
48. Berkowska MA, Driessen GJ, 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 Aug 25; **118**(8): 2150-2158.
49. Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, Christ AP, Urban JF, Jr., Curotto de Lafaille MA, *et al.* Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* 2007 Feb; **26**(2): 191-203.
50. Achatz-Straussberger G, Zaborsky N, Konigsberger S, Feichtner S, Lenz S, Peckl-Schmid D, *et al.* Limited humoral immunoglobulin E memory influences serum immunoglobulin E levels in blood. *Clin Exp Allergy* 2009 Sep; **39**(9): 1307-1313.

51. 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 Mar 12; **113**(11): 2461-2469.
52. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, *et al.* Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 2005 Feb 15; **105**(4): 1614-1621.
53. 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 Jun; **95**(6): 1016-1020.
54. Mohr E, Serre K, Manz RA, Cunningham AF, Khan M, Hardie DL, *et al.* Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. *J Immunol* 2009 Feb 15; **182**(4): 2113-2123.
55. Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunological reviews* 2005 Aug; **206**: 32-63.
56. Cuss AK, Avery DT, Cannons JL, Yu LJ, Nichols KE, Shaw PJ, *et al.* Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J Immunol* 2006 Feb 1; **176**(3): 1506-1516.
57. Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J Immunol* 2009 Apr 1; **182**(7): 4116-4126.
58. Suryani S, Fulcher DA, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Shaw PJ, *et al.* Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood* 2010 Jan 21; **115**(3): 519-529.
59. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, *et al.* Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *The Journal of pediatrics* 1997 Mar; **130**(3): 388-393.
60. Tsao PN, Chiang BL, Yang YH, Tsai MJ, Lu FL, Chou HC, *et al.* Longitudinal follow-up of lymphocyte subsets during the first year of life. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand* 2002 Sep; **20**(3): 147-153.
61. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, *et al.* Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte

- reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2008 Apr; **127**(1): 14-25.
62. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, *et al.* CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010 Jan 29; **32**(1): 129-140.
 63. Engelke M, Engels N, Dittmann K, Stork B, Wienands J. Ca(2+) signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev* 2007 Aug; **218**: 235-246.
 64. Batista FD, Arana E, Barral P, Carrasco YR, Depoil D, Eckl-Dorna J, *et al.* The role of integrins and coreceptors in refining thresholds for B-cell responses. *Immunol Rev* 2007 Aug; **218**: 197-213.
 65. Dalloul A. CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmun Rev* 2009 Feb; **8**(4): 349-353.
 66. 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 Oct; **29**(10): 3319-3328.
 67. Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, Foerster C, Hoenig M, Driessen G, *et al.* Circulating CD21^{low} B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Aug 11; **106**(32): 13451-13456.
 68. Amu S, Tarkowski A, Dorner T, Bokarewa M, Brisslert M. The human immunomodulatory CD25⁺ B cell population belongs to the memory B cell pool. *Scandinavian journal of immunology* 2007 Jul; **66**(1): 77-86.
 69. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000 Oct 12; **407**(6805): 789-795.
 70. Tokoyoda K, Zehentmeier S, Chang HD, Radbruch A. Organization and maintenance of immunological memory by stroma niches. *Eur J Immunol* 2009 Aug; **39**(8): 2095-2099.
 71. Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 2003 Oct; **3**(10): 822-829.
 72. Henneken M, Dorner T, Burmester GR, Berek C. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2005; **7**(5): R1001-1013.
 73. Sundstrom P, Lundin SB, Nilsson LA, 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 Dec; **38**(12): 3327-3338.
74. Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005 Jun; **17**(3): 230-236.
75. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003 Jun 1; **101**(11): 4500-4504.
76. Oefner C, Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Dale GE. Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004 Feb; **60**(Pt 2): 392-396.
77. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, *et al.* Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 2008 Jul; **88**(3): 841-886.
78. Liu Y, Chen GY, Zheng P. CD24-Siglec G/10 discriminates danger- from pathogen-associated molecular patterns. *Trends Immunol* 2009 Dec; **30**(12): 557-561.
79. Yunta M, Lazo PA. Apoptosis protection and survival signal by the CD53 tetraspanin antigen. *Oncogene* 2003 Feb 27; **22**(8): 1219-1224.
80. Barclay NA BM, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, van, PA. dM. The Leucocyte Antigen. *FactsBook* 1997; **Elsevir Inc.**
81. Barrena S, Almeida J, Yunta M, Lopez A, Fernandez-Mosteirin N, Giralt M, *et al.* Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. *Leukemia* 2005 Aug; **19**(8): 1376-1383.
82. Perez-Andres M, Santiago M, Almeida J, Mateo G, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, *et al.* Immunophenotypic approach to the identification and characterization of clonal plasma cells from patients with monoclonal gammopathies. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004 Jul-Dec; **18**(3-4): 392-398.
83. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, *et al.* Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008 Mar; **93**(3): 431-438.
84. Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat AF, Bossen C, *et al.* APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* 2008 Mar 1; **111**(5): 2755-2764.

85. Ademokun A, Wu YC, Dunn-Walters D. The ageing B cell population: composition and function. *Biogerontology* 2010 Apr; **11**(2): 125-137.
86. Albright JF AJ. Aging, immunity, and infection. *Humana press* 2003; **New Jersey**.
87. Mariotti S, Sansoni P, Barbesino G, Caturegli P, Monti D, Cossarizza A, *et al*. Thyroid and other organ-specific autoantibodies in healthy centenarians. *Lancet* 1992 Jun 20; **339**(8808): 1506-1508.
88. Miller JP, Allman D. The decline in B lymphopoiesis in aged mice reflects loss of very early B-lineage precursors. *J Immunol* 2003 Sep 1; **171**(5): 2326-2330.
89. Kline GH, Hayden TA, Klinman NR. B cell maintenance in aged mice reflects both increased B cell longevity and decreased B cell generation. *J Immunol* 1999 Mar 15; **162**(6): 3342-3349.
90. Makinodan T. Studies on the influence of age on immune response to understand the biology of immunosenescence. *Exp Gerontol* 1998 Jan-Mar; **33**(1-2): 27-38.
91. Viveros MP, Fernandez B, Guayerbas N, De la Fuente M. Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol* 2001 Mar 1; **114**(1-2): 80-88.
92. Boldizar F, Mikecz K, Glant TT. Immunosenescence and its potential modulation: lessons from mouse models. *Expert Rev Clin Immunol* 2010 May; **6**(3): 353-357.
93. Johnson KM, Owen K, Witte PL. Aging and developmental transitions in the B cell lineage. *International immunology* 2002 Nov; **14**(11): 1313-1323.
94. Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Effects of aging on the common lymphoid progenitor to pro-B cell transition. *J Immunol* 2006 Jan 15; **176**(2): 1007-1012.
95. Guerrettaz LM, Johnson SA, Cambier JC. Acquired hematopoietic stem cell defects determine B-cell repertoire changes associated with aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Aug 19; **105**(33): 11898-11902.
96. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, *et al*. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Jun 28; **102**(26): 9194-9199.
97. Stephan RP, Reilly CR, Witte PL. Impaired ability of bone marrow stromal cells to support B-lymphopoiesis with age. *Blood* 1998 Jan 1; **91**(1): 75-88.
98. Stephan RP, Lill-Elghanian DA, Witte PL. Development of B cells in aged mice: decline in the ability of pro-B cells to respond to IL-7 but not to other growth factors. *J Immunol* 1997 Feb 15; **158**(4): 1598-1609.

99. Labrie JE, 3rd, Sah AP, Allman DM, Cancro MP, Gerstein RM. Bone marrow microenvironmental changes underlie reduced RAG-mediated recombination and B cell generation in aged mice. *J Exp Med* 2004 Aug 16; **200**(4): 411-423.
100. Breitbart E, Wang X, Leka LS, Dallal GE, Meydani SN, Stollar BD. Altered memory B-cell homeostasis in human aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002 Aug; **57**(8): B304-311.
101. Frasca D, Landin AM, Lechner SC, Ryan JG, Schwartz R, Riley RL, *et al.* Aging down-regulates the transcription factor E2A, activation-induced cytidine deaminase, and Ig class switch in human B cells. *J Immunol* 2008 Apr 15; **180**(8): 5283-5290.
102. Chong Y, Ikematsu H, Yamaji K, Nishimura M, Nabeshima S, Kashiwagi S, *et al.* CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *Int Immunol* 2005 Apr; **17**(4): 383-390.
103. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol* 2004 Mar; **72**(3): 203-212.
104. Jentsch-Ullrich K, Koenigsmann M, Mohren M, Franke A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. *Clin Immunol* 2005 Aug; **116**(2): 192-197.
105. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL, *et al.* Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol* 2009 Oct; **133**(1): 95-107.
106. Veneri D, Ortolani R, Franchini M, Tridente G, Pizzolo G, Vella A. Expression of CD27 and CD23 on peripheral blood B lymphocytes in humans of different ages. *Blood Transfus* 2009 Jan; **7**(1): 29-34.
107. Colonna-Romano G, Bulati M, Aquino A, Scialabba G, Candore G, Lio D, *et al.* B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mech Ageing Dev* 2003 Apr; **124**(4): 389-393.
108. Shi Y, Yamazaki T, Okubo Y, Uehara Y, Sugane K, Agematsu K. Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell. *J Immunol* 2005 Sep 1; **175**(5): 3262-3267.
109. Tangye SG, Good KL. Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells? *J Immunol* 2007 Jul 1; **179**(1): 13-19.
110. Frasca D, Riley RL, Blomberg BB. Effect of age on the immunoglobulin class switch. *Crit Rev Immunol* 2004; **24**(5): 297-320.

111. Landin AM, Frasca D, Harrison P, Scallan M, Riley RL, Blomberg BB. E47 retroviral rescue of intrinsic B-cell defects in senescent mice. *Aging Cell* 2011 Apr; **10**(2): 327-337.
112. Frasca D, Landin AM, Alvarez JP, Blackshear PJ, Riley RL, Blomberg BB. Tristetraprolin, a negative regulator of mRNA stability, is increased in old B cells and is involved in the degradation of E47 mRNA. *J Immunol* 2007 Jul 15; **179**(2): 918-927.
113. Whisler RL, Williams JW, Jr., Newhouse YG. Human B cell proliferative responses during aging. Reduced RNA synthesis and DNA replication after signal transduction by surface immunoglobulins compared to B cell antigenic determinants CD20 and CD40. *Mech Ageing Dev* 1991 Dec 2; **61**(2): 209-222.
114. Song H, Price PW, Cerny J. Age-related changes in antibody repertoire: contribution from T cells. *Immunol Rev* 1997 Dec; **160**: 55-62.
115. Blaeser A, McGlauchlen K, Vogel LA. Aged B lymphocytes retain their ability to express surface markers but are dysfunctional in their proliferative capability during early activation events. *Immun Ageing* 2008; **5**: 15.
116. Bergler W, Adam S, Gross HJ, Hormann K, Schwartz-Albiez R. Age-dependent altered proportions in subpopulations of tonsillar lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1999 Apr; **116**(1): 9-18.
117. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev* 2011 Aug 20.
118. Anspach J, Poulsen G, Kaattari I, Pollock R, Zwollo P. Reduction in DNA binding activity of the transcription factor Pax-5a in B lymphocytes of aged mice. *J Immunol* 2001 Feb 15; **166**(4): 2617-2626.
119. Dunn-Walters DK, Ademokun AA. B cell repertoire and ageing. *Curr Opin Immunol* 2010 Aug; **22**(4): 514-520.
120. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, *et al.* Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006 Mar 30; **354**(13): 1362-1369.
121. Radl J. Age-related monoclonal gammopathies: clinical lessons from the aging C57BL mouse. *Immunology today* 1990 Jul; **11**(7): 234-236.
122. Kyle RA, Rajkumar SV. Epidemiology of the plasma-cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007 Dec; **20**(4): 637-664.
123. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009 May 28; **113**(22): 5418-5422.

124. 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 Mar 15; **103**(6): 2337-2342.
125. Frasca D, Riley RL, Blomberg BB. Aging murine B cells have decreased class switch induced by anti-CD40 or BAFF. *Exp Gerontol* 2007 Mar; **42**(3): 192-203.
126. Paganelli R, Quinti I, Fagiolo U, Cossarizza A, Ortolani C, Guerra E, *et al.* Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. *Clin Exp Immunol* 1992 Nov; **90**(2): 351-354.
127. Andersen-Ranberg K, M HO-M, Wiik A, Jeune B, Hegedus L. High prevalence of autoantibodies among Danish centenarians. *Clin Exp Immunol* 2004 Oct; **138**(1): 158-163.
128. Huang YP, Gauthey L, Michel M, Loreto M, Paccaud M, Pechere JC, *et al.* The relationship between influenza vaccine-induced specific antibody responses and vaccine-induced nonspecific autoantibody responses in healthy older women. *J Gerontol* 1992 Mar; **47**(2): M50-55.
129. Schenkein JG, Park S, Nahm MH. Pneumococcal vaccination in older adults induces antibodies with low opsonic capacity and reduced antibody potency. *Vaccine* 2008 Oct 9; **26**(43): 5521-5526.
130. Montserrat E. Chronic lymphoproliferative disorders. *Curr Opin Oncol* 1997 Jan; **9**(1): 34-41.
131. Orfao A AJ, Sánchez M L, San Miguel J. Immunophenotypic diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders other than chronic lymphocytic leukemia. *GB Faget, Eds: Chronic lymphocytic leukemia: Molecular Genetics, Biology, Diagnosis and Management* 2003; **Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.:** 173-199.
132. Matutes E WI, Sainati L, De Oliveira MP, Cayovsky D. Advances in the lymphoproliferative disorders. Review of our experience in the study of over 1000 cases. *Biol Clin Hematol* 1989; **11**: 53-62.
133. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994 Sep 1; **84**(5): 1361-1392.
134. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, 4th edn. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2008, 439 p.pp.
135. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, *et al.* The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee

- meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999 Dec; **10**(12): 1419-1432.
136. Brito-Babapulle V, Pittman S, Melo JV, Pomfret M, Catovsky D. Cytogenetic studies on prolymphocytic leukemia. 1. B-cell prolymphocytic leukemia. *Hematol Pathol* 1987; **1**(1): 27-33.
137. Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J, Gorham J, Nowell PC, Croce CM. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* 1985 May 23-29; **315**(6017): 340-343.
138. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997 Oct 15; **90**(8): 2863-2892.
139. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood* 1984 Jun; **63**(6): 1424-1433.
140. Trentin L, Zambello R, Sancetta R, Facco M, Cerutti A, Perin A, *et al.* B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules. *Cancer Res* 1997 Nov 1; **57**(21): 4940-4947.
141. Cariappa A, Pillai S. Antigen-dependent B-cell development. *Curr Opin Immunol* 2002 Apr; **14**(2): 241-249.
142. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999 Nov 11; **341**(20): 1520-1529.
143. Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 2001 Apr; **38**(2): 111-123.
144. Menendez P, Vargas A, Bueno C, Barrena S, Almeida J, De Santiago M, *et al.* Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia* 2004 Mar; **18**(3): 491-498.
145. Stevenson FK, Sahota SS, Ottensmeier CH, Zhu D, Forconi F, Hamblin TJ. The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Adv Cancer Res* 2001; **83**: 81-116.
146. Alizadeh AA, Staudt LM. Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells. *Curr Opin Immunol* 2000 Apr; **12**(2): 219-225.
147. Alizadeh A, Eisen M, Davis RE, Ma C, Sabet H, Tran T, *et al.* The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999; **64**: 71-78.

148. Dogan A, Isaacson PG. Splenic marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 2003 May; **20**(2): 121-127.
149. 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.
150. Deneys V, Mazzon AM, Marques JL, Benoit H, De Bruyere M. Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. *J Immunol Methods* 2001 Jul 1; **253**(1-2): 23-36.
151. Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, Moro MJ, *et al.* Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 2002 Aug; **16**(8): 1460-1469.
152. Chan LC, Lam CK, Yeung TC, Chu RW, Ng M, Chow EY, *et al.* The spectrum of chronic lymphoproliferative disorders in Hong Kong. A prospective study. *Leukemia* 1997 Nov; **11**(11): 1964-1972.
153. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005 Apr; **5**(4): 251-262.
154. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999 Jan; **17**(1): 399-408.
155. Linet M. Chronic lymphocytic leukemia. *The epidemiology of chronic lymphocytic leukemia* 1988; **In: Polliack A, Catovsky D, editors.**(Chur: Harwood Academic Publishers): p. 11–32.
156. Sgambati M. LM, Devesa S. Chronic lymphoid leukemias. *Chronic lymphoid leukemias* 2003; **2nd ed.**(New York: M. Dekker): p. 33–62.
157. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, *et al.* Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999 Jul 15; **94**(2): 448-454.
158. Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood* 2004 Sep 15; **104**(6): 1850-1854.
159. Sellick GS, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006 Apr; **33**(2): 195-201.

160. Jonsson V, Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR, Hilden J, Olsen JH, *et al.* CLL family 'Pedigree 14' revisited: 1947-2004. *Leukemia* 2005 Jun; **19**(6): 1025-1028.
161. Brown JR. Inherited predisposition to chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Hematol* 2008 Oct 1; **1**(1): 51-61.
162. Capalbo S, Trerotoli P, Ciancio A, Battista C, Serio G, Liso V. Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur J Haematol* 2000 Aug; **65**(2): 114-117.
163. Yuille MR, Houlston RS, Catovsky D. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 1998 Nov; **12**(11): 1696-1698.
164. Montserrat E, Moreno C. Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: clinical implications. *Curr Opin Oncol* 2009 Nov; **21**(6): 609-614.
165. Crowther-Swanepoel D, Houlston RS. The molecular basis of familial chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009 May; **94**(5): 606-609.
166. 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 Jul 1; **48**(1): 198-206.
167. Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev* 2009 Jan; **23**(1): 25-47.
168. Quijano S, Lopez A, Rasillo A, Sayagues JM, Barrena S, Sanchez 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. *Cytometry B Clin Cytom* 2008 May; **74**(3): 139-149.
169. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000 Mar; **4**(1): 22-47.
170. Wolowiec D, Ciszak L, Kosmaczewska A, Bocko D, Teodorowska R, Frydecka I, *et al.* Cell cycle regulatory proteins and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2001 Dec; **86**(12): 1296-1304.
171. 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 Oct; **8**(10): 1640-1645.
172. 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 Feb; **16**(2): 178-185.

173. Criel A, Michaux L, De Wolf-Peeters C. The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1999 Mar; **33**(1-2): 33-45.
174. Zucchetto A, Bomben R, Dal Bo M, Bulian P, Benedetti D, Nanni P, *et al.* CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia* 2006 Mar; **20**(3): 523-525; author reply 528-529.
175. 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 Jan 10; **363**(9403): 105-111.
176. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Benedetti D, Marconi D, Zucchetto A, *et al.* Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood* 2007 Apr 1; **109**(7): 2989-2998.
177. 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 Sep 15; **94**(6): 1840-1847.
178. 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 Jun 15; **101**(12): 4944-4951.
179. 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 Jan 15; **111**(2): 865-873.
180. 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 Aug; **45**(8): 1595-1603.
181. 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 Jul 1; **160**(1): 27-34.
182. Stilgenbauer S, Lichter P, Dohner H. Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2000 Mar; **4**(1): 48-72.
183. 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 Dec 28; **343**(26): 1910-1916.

184. Dierlamm J, Michaux L, Criel A, Wlodarska I, Van den Berghe H, Hossfeld DK. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1997 Mar; **94**(1): 27-35.
185. Tabertero MD, San Miguel JF, Garcia JL, Garcia-Isidoro M, Wiegant J, Ciudad J, *et al.* Clinical, biological, and immunophenotypical characteristics of B-cell chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12 by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 1995 Sep 15; **22**(3): 217-222.
186. Juliusson G, Gahrton G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1990 Apr; **45**(2): 143-160.
187. Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, *et al.* p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998 Jun 1; **91**(11): 4342-4349.
188. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Dohner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Jul 15; **94**(2): 748-753.
189. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, *et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 2005 Oct 27; **353**(17): 1793-1801.
190. Newman RA, Peterson B, Davey FR, Brabyn C, Collins H, Brunetto VL, *et al.* Phenotypic markers and BCL-1 gene rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 1993 Aug 15; **82**(4): 1239-1246.
191. Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, *et al.* PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994 Oct 15; **84**(8): 2726-2732.
192. Ohno H, Doi S, Yabumoto K, Fukuhara S, McKeithan TW. Molecular characterization of the t(14;19)(q32;q13) translocation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1993 Dec; **7**(12): 2057-2063.
193. Besmer E, Gourzi P, Papavasiliou FN. The regulation of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 2004 Apr; **16**(2): 241-245.
194. Jacquot S, Kobata T, Iwata S, Schlossman SF, Morimoto C. CD27/CD70 interaction contributes to the activation and the function of human autoreactive CD27+ regulatory T cells. *Cell Immunol* 1997 Jul 10; **179**(1): 48-54.
195. Agematsu K. Memory B cells and CD27. *Histology and histopathology* 2000 Apr; **15**(2): 573-576.

196. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005 Feb 24; **352**(8): 804-815.
197. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, *et al.* B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002 Jun 1; **99**(11): 4087-4093.
198. 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 Dec 3; **194**(11): 1625-1638.
199. 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 Feb 1; **111**(3): 1524-1533.
200. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, Hultdin M, *et al.* Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Mar 15; **99**(6): 2262-2264.
201. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, *et al.* Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005 Feb 15; **105**(4): 1678-1685.
202. Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, *et al.* Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *The Journal of clinical investigation* 2005 Jun; **115**(6): 1636-1643.
203. Broker BM, Klajman A, Youinou P, Jouquan J, Worman CP, Murphy J, *et al.* Chronic lymphocytic leukemic (CLL) cells secrete multispecific autoantibodies. *Journal of autoimmunity* 1988 Oct; **1**(5): 469-481.
204. 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 Jan 1; **109**(1): 259-270.
205. Thorselius M, Krober A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Buhler A, *et al.* Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood* 2006 Apr 1; **107**(7): 2889-2894.
206. Potter KN, Mockridge CI, Neville L, Wheatley I, Schenk M, Orchard J, *et al.* Structural and functional features of the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2006 Mar 15; **12**(6): 1672-1679.

207. Puente XS, Quesada V, Osorio FG, Cabanillas R, Cadinanos J, Fraile JM, *et al.* Exome sequencing and functional analysis identifies BANF1 mutation as the cause of a hereditary progeroid syndrome. *Am J Hum Genet* 2011 May 13; **88**(5): 650-656.
208. 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* 2012 Jan; **44**(1): 47-52.
209. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975 Aug; **46**(2): 219-234.
210. Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, *et al.* A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer* 1977 Aug; **40**(2): 855-864.
211. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004 Feb 15; **103**(4): 1202-1210.
212. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987 Mar; **69**(3): 929-936.
213. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol* 1989 Jun; **72**(2): 141-149.
214. Montserrat E, Gomis F, Vallespi T, Rios A, Romero A, Soler J, *et al.* Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. *Blood* 1991 Sep 15; **78**(6): 1545-1551.
215. Jaksic B, Vitale B, Hauptmann E, Planinc-Peraica A, Ostojic S, Kusec R. The roles of age and sex in the prognosis of chronic leukaemias. A study of 373 cases. *Br J Cancer* 1991 Aug; **64**(2): 345-348.
216. Molica S, Brugiattelli M, Callea V, Morabito F, Levato D, Nobile F, *et al.* Comparison of younger versus older B-cell chronic lymphocytic leukemia patients for clinical presentation and prognosis. A retrospective study of 53 cases. *Eur J Haematol* 1994 Apr; **52**(4): 216-221.
217. Dominis M, Jaksic B. Clinical relevance of peripheral blood lymphocyte morphology and lymph node histology in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* 1987; **12**(2): 297-313.
218. Schwarz J, Mikulenkova D, Cermakova M, Polanska V, Michalova K, Marinov I, *et al.* Prognostic relevance of the FAB morphological criteria in chronic

- lymphocytic leukemia: correlations with IgVH gene mutational status and other prognostic markers. *Neoplasma* 2006; **53**(3): 219-225.
219. Han T, Barcos M, Emrich L, Ozer H, Gajera R, Gomez GA, *et al.* Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data. *J Clin Oncol* 1984 Jun; **2**(6): 562-570.
220. Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2008 Jul; **22**(4): 211-219.
221. Morilla A, Gonzalez de Castro D, Del Giudice I, Osuji N, Else M, Morilla R, *et al.* Combinations of ZAP-70, CD38 and IGHV mutational status as predictors of time to first treatment in CLL. *Leuk Lymphoma* 2008 Nov; **49**(11): 2108-2115.
222. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, *et al.* Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008 Sep 1; **112**(5): 1923-1930.
223. Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Saussoy P, Van Den Neste E, Michaux L, *et al.* microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood* 2009 May 21; **113**(21): 5237-5245.
224. Gunn SR, Mohammed MS, Gorre ME, Cotter PD, Kim J, Bahler DW, *et al.* Whole-genome scanning by array comparative genomic hybridization as a clinical tool for risk assessment in chronic lymphocytic leukemia. *J Mol Diagn* 2008 Sep; **10**(5): 442-451.
225. Agrawal SG, Liu FT, Wiseman C, Shirali S, Liu H, Lillington D, *et al.* Increased proteasomal degradation of Bax is a common feature of poor prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008 Mar 1; **111**(5): 2790-2796.
226. Bench AJ, Erber WN, Follows GA, Scott MA. Molecular genetic analysis of haematological malignancies II: Mature lymphoid neoplasms. *Int J Lab Hematol* 2007 Aug; **29**(4): 229-260.
227. Matutes E, Catovsky D. The value of scoring systems for the diagnosis of biphenotypic leukemia and mature B-cell disorders. *Leuk Lymphoma* 1994; **13** **Suppl 1**: 11-14.
228. Catovsky D. Chronic lymphoproliferative disorders. *Curr Opin Oncol* 1995 Jan; **7**(1): 3-11.
229. Melo JV, Catovsky D, Galton DA. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization of an intermediate group. *Br J Haematol* 1986 Jun; **63**(2): 377-387.

230. Polliack A. Hairy cell leukemia and allied chronic lymphoid leukemias: current knowledge and new therapeutic options. *Leuk Lymphoma* 1997 Dec; **26 Suppl 1**: 41-51.
231. Bouroncle BA. Thirty-five years in the progress of hairy cell leukemia. *Leukemia & lymphoma* 1994; **14 Suppl 1**: 1-12.
232. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, *et al.* Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1989 Jun; **42(6)**: 567-584.
233. Del Giudice I, Davis Z, Matutes E, Osuji N, Parry-Jones N, Morilla A, *et al.* IgVH genes mutation and usage, ZAP-70 and CD38 expression provide new insights on B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL). *Leukemia* 2006 Jul; **20(7)**: 1231-1237.
234. Ruchlemer R, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, Attolico I, Wotherspoon AC, Matutes E, *et al.* B-prolymphocytic leukaemia with t(11;14) revisited: a splenomegalic form of mantle cell lymphoma evolving with leukaemia. *Br J Haematol* 2004 May; **125(3)**: 330-336.
235. Hernandez JM, Mecucci C, Criel A, Meeus P, Michaux I, Van Hoof A, *et al.* Cytogenetic analysis of B cell chronic lymphoid leukemias classified according to morphologic and immunophenotypic (FAB) criteria. *Leukemia* 1995 Dec; **9(12)**: 2140-2146.
236. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008 Jan; **8(1)**: 22-33.
237. Davi F, Maloum K, Michel A, Pritsch O, Magnac C, Macintyre E, *et al.* High frequency of somatic mutations in the VH genes expressed in prolymphocytic leukemia. *Blood* 1996 Nov 15; **88(10)**: 3953-3961.
238. Catovsky D. Current approach to the biology and treatment of chronic lymphoid malignancies other than CLL. *Hematol Cell Ther* 1996 Dec; **38 Suppl 2**: S63-66.
239. Forconi F, Sahota SS, Raspadori D, Ippoliti M, Babbage G, Lauria F, *et al.* Hairy cell leukemia: at the crossroad of somatic mutation and isotype switch. *Blood* 2004 Nov 15; **104(10)**: 3312-3317.
240. Gudgin EJ, Erber WN. Immunophenotyping of lymphoproliferative disorders: state of the art. *Pathology* 2005 Dec; **37(6)**: 457-478.
241. Frassoldati A, Lamparelli T, Federico M, Annino L, Capnist G, Pagnucco G, *et al.* Hairy cell leukemia: a clinical review based on 725 cases of the Italian Cooperative Group (ICGHCL). Italian Cooperative Group for Hairy Cell Leukemia. *Leukemia & lymphoma* 1994 Apr; **13(3-4)**: 307-316.

242. Ahmad E, Garcia D, Davis BH. Clinical utility of CD23 and FMC7 antigen coexistent expression in B-cell lymphoproliferative disorder subclassification. *Cytometry* 2002 Feb 15; **50**(1): 1-7.
243. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003 Feb 15; **101**(4): 1220-1235.
244. Ocio EM, Mateo G, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Garcia-Sanz R, Hernandez JM, *et al.* Cell cycle analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma* 2005 Mar; **5**(4): 250-252.
245. Troussard X, Maloisel F, Flandrin G. Hairy cell leukemia. What is new forty years after the first description? *Hematol Cell Ther* 1998 Aug; **40**(4): 139-148.
246. Matutes E. Immunophenotype of the chronic lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 1998; **83**: 193-198.
247. Haglund U, Juliusson G, Stellan B, Gahrton G. Hairy cell leukemia is characterized by clonal chromosome abnormalities clustered to specific regions. *Blood* 1994 May 1; **83**(9): 2637-2645.
248. Miranda RN, Briggs RC, Kinney MC, Veno PA, Hammer RD, Cousar JB. Immunohistochemical detection of cyclin D1 using optimized conditions is highly specific for mantle cell lymphoma and hairy cell leukemia. *Mod Pathol* 2000 Dec; **13**(12): 1308-1314.
249. Bosch F, Campo E, Jares P, Pittaluga S, Munoz J, Nayach I, *et al.* Increased expression of the PRAD-1/CCND1 gene in hairy cell leukaemia. *Br J Haematol* 1995 Dec; **91**(4): 1025-1030.
250. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, *et al.* BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 2011 Jun 16; **364**(24): 2305-2315.
251. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, Ambrosetti A, *et al.* Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood* 2012 Jan 5; **119**(1): 192-195.
252. Weisenburger DD, Armitage JO. Mantle cell lymphoma-- an entity comes of age. *Blood* 1996 Jun 1; **87**(11): 4483-4494.
253. Jaffe ES, Bookman MA, Longo DL. Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation--mantle zone lymphoma: a distinct subtype of B-cell lymphoma. *Hum Pathol* 1987 Sep; **18**(9): 877-880.
254. Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, *et al.* A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 2003 Jun 15; **101**(12): 4975-4981.

255. Walsh SH, Thorselius M, Johnson A, Soderberg O, Jerkeman M, Bjorck E, *et al.* Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* 2003 May 15; **101**(10): 4047-4054.
256. Kraus TS, Sillings CN, Saxe DF, Li S, Jaye DL. The role of CD11c expression in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *American journal of clinical pathology* 2010 Aug; **134**(2): 271-277.
257. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001 Feb 15; **46**(1): 23-27.
258. Catovsky D, Matutes E. Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes/splenic marginal-zone lymphoma. *Semin Hematol* 1999 Apr; **36**(2): 148-154.
259. Goy A, Remache YK, Gu J, Stewart J, Hayes KJ, Gold D, *et al.* Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line M-1. *Leuk Lymphoma* 2004 Jun; **45**(6): 1255-1260.
260. Rimokh R, Berger F, Bastard C, Klein B, French M, Archimbaud E, *et al.* Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood* 1994 Jun 15; **83**(12): 3689-3696.
261. Kienle D, Katzenberger T, Ott G, Saupe D, Benner A, Kohlhammer H, *et al.* Quantitative gene expression deregulation in mantle-cell lymphoma: correlation with clinical and biologic factors. *J Clin Oncol* 2007 Jul 1; **25**(19): 2770-2777.
262. Fernandez V, Salamero O, Espinet B, Sole F, Royo C, Navarro A, *et al.* Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010 Feb 15; **70**(4): 1408-1418.
263. Schraders M, Jares P, Bea S, Schoenmakers EF, van Krieken JH, Campo E, *et al.* Integrated genomic and expression profiling in mantle cell lymphoma: identification of gene-dosage regulated candidate genes. *Br J Haematol* 2008 Oct; **143**(2): 210-221.
264. Bain BJ, Catovsky D. The leukaemic phase of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 1995 Mar; **48**(3): 189-193.
265. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P, Smith T, Hagemester F, Rodriguez MA, *et al.* Molecular response assessed by PCR is the most important factor predicting failure-free survival in indolent follicular lymphoma: update of the MDACC series. *Ann Oncol* 2000; **11 Suppl 1**: 137-140.
266. Bennett JM, JG, Mecucci C. Morphologic, immunologic and cytogenetic classification of the chronic (mature) B and T lymphoid leukemias: fourth meeting of the MIC Cooperative Study Group. *Cancer Res* 1990; (50): 2212.

267. Becker H. [Non-Hodgkin lymphomas. Clinical and pathological correlation]. *Fortschr Med* 1981 Jan 15; **99**(1-2): 3-8.
268. Sun Y, Han X. [Detection of BCL2 translocation in an interphase nucleus using fluorescence in situ hybridization strategy]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2001 Dec; **18**(6): 472-475.
269. Willis TG, Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 2000 Aug 1; **96**(3): 808-822.
270. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985 Jun 21; **228**(4706): 1440-1443.
271. Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, Ruby EI, Anderson JR, Vose JM, *et al.* Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma. *Blood* 1995 Jun 15; **85**(12): 3671-3678.
272. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, *et al.* The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002 Jun 20; **346**(25): 1937-1947.
273. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, Ichinohasama R, Nakamura N, Yoshino T, *et al.* De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood* 2002 Feb 1; **99**(3): 815-821.
274. Czader M, Porwit A, Tani E, Ost A, Mazur J, Auer G. DNA image cytometry and the expression of proliferative markers (proliferating cell nuclear antigen and Ki67) in non-Hodgkin's lymphomas. *Mod Pathol* 1995 Jan; **8**(1): 51-58.
275. Winter JN, Andersen J, Variakojis D, Gordon LI, Fisher RI, Oken MM, *et al.* Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in the diffuse, aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1996 Nov 15; **88**(10): 3919-3925.
276. Piris M, Brown DC, Gatter KC, Mason DY. CD30 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1990 Sep; **17**(3): 211-218.
277. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, *et al.* Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 1993 Oct 29; **262**(5134): 747-750.
278. Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, *et al.* Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1994 Apr 1; **83**(7): 1757-1759.
279. Vega F, Orduz R, Medeiros LJ. Chromosomal translocations and their role in the pathogenesis of non-Hodgkin's lymphomas. *Pathology* 2002 Oct; **34**(5): 397-409.
280. Niitsu N, Okamoto M, Nakamura N, Nakamine H, Aoki S, Hirano M, *et al.* Prognostic impact of chromosomal alteration of 3q27 on nodal B-cell

- lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 329 consecutive patients. *Leukemia research* 2007 Sep; **31**(9): 1191-1197.
281. Ohno H. Pathogenetic and clinical implications of non-immunoglobulin ; BCL6 translocations in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 2006 Nov; **46**(2): 43-53.
282. Chen YW, Hu XT, Liang AC, Au WY, So CC, Wong ML, *et al.* High BCL6 expression predicts better prognosis, independent of BCL6 translocation status, translocation partner, or BCL6-deregulating mutations, in gastric lymphoma. *Blood* 2006 Oct 1; **108**(7): 2373-2383.
283. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, *et al.* Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998 Nov 1; **92**(9): 3152-3162.
284. Skinnider BF, Horsman DE, Dupuis B, Gascoyne RD. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Hum Pathol* 1999 Jul; **30**(7): 803-808.
285. Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Owen RG, Morgan GJ, Jack AS. The detection of t(14;18) in archival lymph nodes: development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2003 Aug; **5**(3): 168-175.
286. Akasaka T, Akasaka H, Ueda C, Yonetani N, Maesako Y, Shimizu A, *et al.* Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/immunoglobulin heavy-chain fusion gene. *J Clin Oncol* 2000 Feb; **18**(3): 510-518.
287. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 2004 Nov 15; **104**(10): 3009-3020.
288. Davi F, Delecluse HJ, Guiet P, Gabarre J, Fayon A, Gentilhomme O, *et al.* Burkitt-like lymphomas in AIDS patients: characterization within a series of 103 human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphomas. Burkitt's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 1998 Dec; **16**(12): 3788-3795.
289. Hutchison RE, Murphy SB, Fairclough DL, Shuster JJ, Sullivan MP, Link MP, *et al.* Diffuse small noncleaved cell lymphoma in children, Burkitt's versus non-Burkitt's types. Results from the Pediatric Oncology Group and St. Jude Children's Research Hospital. *Cancer* 1989 Jul 1; **64**(1): 23-28.
290. Haralambieva E, Boerma EJ, van Imhoff GW, Rosati S, Schuurin E, Muller-Hermelink HK, *et al.* Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2005 Aug; **29**(8): 1086-1094.

291. Ogden CA, Pound JD, Batth BK, Owens S, Johannessen I, Wood K, *et al.* Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma. *J Immunol* 2005 Mar 1; **174**(5): 3015-3023.
292. Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001 Sep 10; **20**(40): 5595-5610.
293. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 1994 Mar 15; **83**(6): 1558-1562.
294. Hernandez JM, Garcia JL, Gutierrez NC, Mollejo M, Martinez-Climent JA, Flores T, *et al.* Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol* 2001 May; **158**(5): 1843-1850.
295. Walsh SH, Rosenquist R. Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2005; **22**(4): 327-341.
296. Tierens A, Delabie J, Malecka A, Wang J, Gruszka-Westwood A, Catovsky D, *et al.* Splenic marginal zone lymphoma with villous lymphocytes shows ongoing immunoglobulin gene mutations. *Am J Pathol* 2003 Feb; **162**(2): 681-689.
297. Liu K, Stern RC, Rogers RT, Dodd LG, Mann KP. Diagnosis of hematopoietic processes by fine-needle aspiration in conjunction with flow cytometry: A review of 127 cases. *Diagnostic cytopathology* 2001 Jan; **24**(1): 1-10.
298. Zander DS, Iturraspe JA, Everett ET, Massey JK, Braylan RC. Flow cytometry. In vitro assessment of its potential application for diagnosis and classification of lymphoid processes in cytologic preparations from fine-needle aspirates. *American journal of clinical pathology* 1994 May; **101**(5): 577-586.
299. Rottnek M, Strauchen J, Moore F, Morgello S. Primary dural mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphoma: case report and review of the literature. *J Neurooncol* 2004 May; **68**(1): 19-23.
300. Attygalle AD, Liu H, Shirali S, Diss TC, Loddenkemper C, Stein H, *et al.* Atypical marginal zone hyperplasia of mucosa-associated lymphoid tissue: a reactive condition of childhood showing immunoglobulin lambda light-chain restriction. *Blood* 2004 Nov 15; **104**(10): 3343-3348.
301. Baseggio L, Traverse-Glehen A, Petinataud F, Callet-Bauchu E, Berger F, Ffrench M, *et al.* CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* 2010 Apr; **95**(4): 604-612.

302. Wenzel C, Dieckmann K, Fiebiger W, Mannhalter C, Chott A, Raderer M. CD5 expression in a lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type as a marker for early dissemination and aggressive clinical behaviour. *Leuk Lymphoma* 2001 Aug; **42**(4): 823-829.
303. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, *et al.* Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 2000 Oct; **6**(4): 961-967.
304. Ye H, Gong L, Liu H, Hamoudi RA, Shirali S, Ho L, *et al.* MALT lymphoma with t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 is characterized by strong cytoplasmic MALT1 and BCL10 expression. *J Pathol* 2005 Feb; **205**(3): 293-301.
305. Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raderer M, Chott A. T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia* 2005 Apr; **19**(4): 652-658.
306. Farinha P, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Oncol* 2005 Sep 10; **23**(26): 6370-6378.
307. Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, *et al.* Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 1999 Jan 8; **96**(1): 35-45.
308. Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G, Blanckaert N. Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clin Chem* 1998 May; **44**(5): 944-949.
309. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, Mateo G, Sanchez-Guijo F, Sanchez ML, *et al.* Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003 Apr; **30**(2): 187-195.
310. Walsh SH, Laurell A, Sundstrom G, Roos G, Sundstrom C, Rosenquist R. Lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom's macroglobulinemia derives from an extensively hypermutated B cell that lacks ongoing somatic hypermutation. *Leukemia research* 2005 Jul; **29**(7): 729-734.
311. Iida S, Rao PH, Nallasivam P, Hibshoosh H, Butler M, Louie DC, *et al.* The t(9;14)(p13;q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene. *Blood* 1996 Dec 1; **88**(11): 4110-4117.
312. Offit K, Parsa NZ, Filippa D, Jhanwar SC, Chaganti RS. t(9;14)(p13;q32) denotes a subset of low-grade non-Hodgkin's lymphoma with plasmacytoid differentiation. *Blood* 1992 Nov 15; **80**(10): 2594-2599.
313. Schop RF, Kuehl WM, Van Wier SA, Ahmann GJ, Price-Troska T, Bailey RJ, *et al.* Waldenstrom macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin

- heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions. *Blood* 2002 Oct 15; **100**(8): 2996-3001.
314. Gertz MA, Kyle RA. Hyperviscosity syndrome. *J Intensive Care Med* 1995 May-Jun; **10**(3): 128-141.
315. Neurath MF, Max EE, Strober W. Pax5 (BSAP) regulates the murine immunoglobulin 3' alpha enhancer by suppressing binding of NF-alpha P, a protein that controls heavy chain transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Jun 6; **92**(12): 5336-5340.
316. Fialkow P. Clonal and stem cell origin of blood cell neoplasms. *Contemporary Hematology/Oncology* 1980; **Plenum Publishing; New York, NY**(In: Lobue J, Gordon AS, Silber R, Muggia FM, eds.): 1-46.
317. Woda BA, Knowles DM, 2nd. Nodular lymphocytic lymphoma eventuating into diffuse histiocytic lymphoma: immunoperoxidase demonstration of monoclonality. *Cancer* 1979 Jan; **43**(1): 303-307.
318. Siegelman MH, Cleary ML, Warnke R, Sklar J. Frequent biclonality and Ig gene alterations among B cell lymphomas that show multiple histologic forms. *J Exp Med* 1985 Apr 1; **161**(4): 850-863.
319. Bhagavathi S, Micale MA, Douglas-Nikitin V, Ballouz S, Neumann K, Blenc AM. Composite Biclinal Marginal Zone Lymphoma of Lung and Chronic Lymphocytic Leukemia in a Patient: Pathologic, Phenotypic, Cytogenetic, and Molecular Study. *Int J Surg Pathol* 2009 Apr 15.
320. 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 biclinal disease. *Ann Hematol* 1997 May; **74**(5): 243-246.
321. Fend F, Quintanilla-Martinez L, Kumar S, Beaty MW, Blum L, Sorbara L, *et al.* Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biclinal lymphomas. A molecular analysis using laser capture microdissection. *Am J Pathol* 1999 Jun; **154**(6): 1857-1866.
322. Sanchez ML, Almeida J, Gonzalez D, Gonzalez M, Garcia-Marcos MA, Balanzategui A, *et al.* Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003 Oct 15; **102**(8): 2994-3002.
323. Sanchez ML, Almeida J, Lopez A, Sayagues JM, Rasillo A, Sarasquete EA, *et al.* Heterogeneity of neoplastic cells in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: biclonality versus intraclonal evolution of a single tumor cell clone. *Haematologica* 2006 Mar; **91**(3): 331-339.

324. 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 Aug; **130**(3): 325-332.
325. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008 Jun 15; **111**(12): 5446-5456.
326. 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 Jun; **48**(6): 1087-1091.
327. 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 Feb 12; **360**(7): 659-667.
328. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008 Aug 7; **359**(6): 575-583.
329. 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 Mar; **52**(1): 1-12.
330. 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 Nov; **147**(3): 339-346.
331. de Tute R, Yuille M, Catovsky D, Houlston RS, Hillmen P, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) in CLL families: substantial increase in relative risk for young adults. *Leukemia* 2006 Apr; **20**(4): 728-729.
332. Han T, Ozer H, Gavigan M, Gajera R, Minowada J, Bloom ML, *et al.* Benign monoclonal B cell lymphocytosis--a benign variant of CLL: clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic studies in 20 patients. *Blood* 1984 Jul; **64**(1): 244-252.
333. Bassan R, Buzzetti M, Marini B, Rambaldi A, Allavena P, Barbui T. Investigation of chronic lymphocytosis in adults. *American journal of clinical pathology* 1988 Jun; **89**(6): 783-787.
334. Aguilar-Santelises M, Loftenius A, Ljungh C, Svenson SB, Andersson B, Mellstedt H, *et al.* Serum levels of helper factors (IL-1 alpha, IL-1 beta and IL-6), T-cell products (sCD4 and sCD8), sIL-2R and beta 2-microglobulin in patients with B-CLL and benign B lymphocytosis. *Leukemia research* 1992 Jun-Jul; **16**(6-7): 607-613.

335. Rachel JM, Zucker ML, Fox CM, Plapp FV, Menitove JE, Abbasi F, *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis in blood donors. *Br J Haematol* 2007 Dec; **139**(5): 832-836.
336. Garcia C, Rosen A, Kimby E, Aguilar-Santelises M, Jondal M, Bjorkhilm M, *et al.* Higher T-cell imbalance and growth factor receptor expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) as compared to monoclonal B-cell lymphocytosis of undetermined significance (B-MLUS). *Leukemia research* 1989; **13**(1): 31-37.
337. Mandelli F, De Rossi G, Mancini P, Alberti A, Cajozzo A, Grignani F, *et al.* Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentric study from the GIMEMA group. *J Clin Oncol* 1987 Mar; **5**(3): 398-406.
338. Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, Rozman C. Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and progression and prognosis of early clinical stages. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; **30**(5-6): 359-361.
339. Wang C, Amato D, Rabah R, Zheng J, Fernandes B. Differentiation of monoclonal B lymphocytosis of undetermined significance (MLUS) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) with weak CD5 expression from CD5(-) CLL. *Leukemia research* 2002 Dec; **26**(12): 1125-1129.
340. Wang C, Amato D, Fernandes B. CD5-negative phenotype of monoclonal B-lymphocytosis of undetermined significance (MLUS). *Am J Hematol* 2002 Feb; **69**(2): 147-149.
341. Garcia Vela J, Delgado I, Benito L, Monteserin M, Garcia Alonso L, Somolinos N, *et al.* CD79b expression in B cell chronic lymphocytic leukemia: its implication for minimal residual disease detection. *Leukemia* 1999 Oct; **13**(10): 1501-1505.
342. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, Davies FE, Richards SJ, Haynes AP, *et al.* Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 2001 Jul 1; **98**(1): 29-35.
343. Vogt RF, Meredith, M.N.K., Powell, J., Ethridge, S.F., Whitfield, W., Henderson, L.O. & Hannon, W.H. Results in eleven individuals with B-cell-like phenotypes in environmental health studies. *In: Proceedings of a USPHS Workshop on Laboratory Approaches to Determining the Role of Environmental Exposures as Risk Factors for B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-cell Lymphoproliferative Disorders* 1997; (ed. by G.E. Marti, R.F. Vogt & V.E. Zenger): 19-35. USPHS, Atlanta, GA.
344. Sarasua SM, Vogt, R.F., Middleton, D.C., Slade, B.A., McGeehin, M.a. & Lybarger, J.A. 'CLL-like' B-cell phenotypes detected in superfund studies: epidemiologic methods and findings. *In: Proceedings of a USPHS Workshop on Laboratory Approaches to Determining the Role of Environmental Exposures as*

- Risk Factors for B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-cell Lymphoproliferative Disorders* 1997; (ed. by G.E. Marti, R.F. Vogt & V.E. Zenger): 7-19. USPHS, Atlanta, G.A.
345. Marti GE, Muller, J., Stetler-Stevenson, M. & Caporaso, N. B-cell monoclonal lymphocytosis in three individuals living near a hazardous waste site. *In: Proceedings of a USPHS Workshop on Laboratory Approaches to Determining the Role of Environmental Exposures as Risk Factors for B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-cell Lymphoproliferative Disorders* 1997; (ed. by G.E. Marti, R.F. Vogt & V.E. Zenger): 37-50. USPHS, Atlanta, GA.
346. Shim YK, Vogt RF, Middleton D, Abbasi F, Slade B, Lee KY, *et al.* Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytometry B Clin Cytom* 2007 Sep; **72**(5): 344-353.
347. Rachel JM, Zucker, M.L., Plapp, F.V., Fox, C.M., Marti, G.E., Abbasi, F., & Menitove, J.E. B cell monoclonal lymphocytosis in blood donors *Blood* 2002; **100**(590a).
348. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JA, Evans PA, *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 Jul 15; **100**(2): 635-639.
349. Goldin LR, Bjorkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009 May; **94**(5): 647-653.
350. Marti GE, Faguet GB, Stewart C, Branham P, Carter PH, Washington GC, *et al.* Evolution of leukemic heterogeneity of human B-CLL lymphocytes between and within patients. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; **182**: 303-311.
351. 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 Oct 1; **100**(7): 2289-2290.
352. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia* 2010 Mar; **24**(3): 512-520.
353. 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 Dec; **139**(5): 724-729.
354. Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 430-439.

355. Lanasa MC, Allgood SD, Slager SL. Family-associated monoclonal B lymphocytosis is commonly oligoclonal and expresses markers associated with adverse risk in CLL [Abstract]. *Blood* 2008; **112**: 3144.
356. Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Maddocks K, *et al.* Brief report: natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009 Aug 20; **27**(24): 3959-3963.
357. 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 Jan; **24**(1): 133-140.
358. 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 Jul 2; **114**(1): 26-32.
359. 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. *American journal of clinical pathology* 2007 Aug; **128**(2): 333-338.
360. Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dorner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *The Journal of clinical investigation* 1997 May 15; **99**(10): 2488-2501.
361. 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 Sep 15; **94**(6): 1848-1854.
362. 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 Apr 30; **113**(18): 4188-4196.
363. Gribben JG, Zahrieh D, Stephans K, Bartlett-Pandite L, Alyea EP, Fisher DC, *et al.* Autologous and allogeneic stem cell transplantations for poor-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005 Dec 15; **106**(13): 4389-4396.
364. Rawstron AC, Hillmen P. Clinical and diagnostic implications of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010 Mar; **23**(1): 61-69.
365. Vogt RF, Shim YK, Middleton DC, Buffler PA, Campolucci SS, Lybarger JA, *et al.* Monoclonal B-cell lymphocytosis as a biomarker in environmental health studies. *Br J Haematol* 2007 Dec; **139**(5): 690-700.

366. Mulligan CS, Thomas ME, Mulligan SP. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008 Nov 6; **359**(19): 2065-2066; author reply 2066.
367. 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 Jun; **146**(1): 64-75.
368. Vogt RF, Jr., Kyle RA. The secret lives of monoclonal B cells. *N Engl J Med* 2009 Feb 12; **360**(7): 722-723.
369. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, *et al.* Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007 Jun 21; **356**(25): 2582-2590.
370. Scarfo L, Dagklis A, Scielzo C, Fazi C, Ghia P. CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis: are we all bound to have it? *Seminars in cancer biology* 2010 Dec; **20**(6): 384-390.
371. Martin P, Chadburn A, Christos P, Weil K, Furman RR, Ruan J, *et al.* Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009 Mar 10; **27**(8): 1209-1213.
372. Marti G, Abbasi F, Raveche E, Rawstron AC, Ghia P, Aurrant T, *et al.* Overview of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2007 Dec; **139**(5): 701-708.
373. Mowery YM, Lanasa MC. Clinical aspects of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Cancer Control* 2012 Jan; **19**(1): 8-17.
374. Caporaso NE, Marti GE, Vogt RF, Jr., Shim YK, Middleton D, Landgren O. Evolution of a precursor. *Cytometry B Clin Cytom* 2010 Jan; **78**(1): 1-3.
375. 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; **78 Suppl 1**: S10-18.
376. 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 Aug 25.
377. Tamas Fulop CF, Katsuiku Hirokawa, Graham Pawelec. *Handbook on Immunosenescence*, Springer edn, vol. 1 and 2, 2009.
378. Rosenquist R. Introduction: The role of inflammation, autoimmune disease and infectious agents in development of leukaemia and lymphoma. *Journal of internal medicine* 2008 Dec; **264**(6): 512-513.

379. Hjalgrim H, Engels EA. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *Journal of internal medicine* 2008 Dec; **264**(6): 537-548.
380. Suarez F, Lortholary O, Hermine O, Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* 2006 Apr 15; **107**(8): 3034-3044.
381. 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. *British journal of haematology* 2007 Dec; **139**(5): 780-790.
382. Fazi C, Scarfo 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 Dec 15; **118**(25): 6618-6625.
383. Ghia P, Granziero L, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Chronic B cell malignancies and bone marrow microenvironment. *Seminars in cancer biology* 2002 Apr; **12**(2): 149-155.
384. Caligaris-Cappio F, Ghia P. The normal counterpart to the chronic lymphocytic leukemia B cell. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007 Sep; **20**(3): 385-397.
385. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, *et al.* EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Submitted to Leukemia* 2012.
386. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991 Nov 9; **338**(8776): 1175-1176.
387. Roulland S, Suarez F, Hermine O, Nadel B. Pathophysiological aspects of memory B-cell development. *Trends Immunol* 2008 Jan; **29**(1): 25-33.
388. Arcaini L, Zibellini S, Passamonti F, Rattotti S, Lucioni M, Invernizzi R, *et al.* Splenic marginal zone lymphoma: Clinical clustering of immunoglobulin heavy chain repertoires. *Blood Cells Mol Dis* 2009 May-Jun; **42**(3): 286-291.