

# Análisis del estatus mutacional y rearrreglos del gen IGHV en pacientes con leucemia linfocítica crónica y linfoma de células del manto

IGHV gene rearrangements and mutational status in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma patients

Stanganelli C<sup>1</sup>, Dos Santos P<sup>2</sup>, Panero J<sup>2</sup>, Santana BA<sup>3</sup>, Calado R<sup>3</sup>, Slavutsky I<sup>2</sup>

<sup>1</sup>División Patología Molecular, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Laboratorio de Genética, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET - Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Divisão de Hematologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brazil.

islavutsky@hematologia.anm.edu.ar

Fecha de recepción: 20/05/2016

Fecha de aprobación: 5/10/2016



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA

Volumen 20 n° 3: 274 - 283

Septiembre - Diciembre 2016

**Palabras clave:** Leucemia linfocítica crónica, Linfoma de células del manto, IGHV, Hipermutación somática, Receptores B-estereotipados.

**Keywords:** Chronic lymphocytic leukemia, Mantle cell lymphoma, IGHV, Somatic hypermutation, Stereotyped B-cell receptors.

## Resumen

El estatus mutacional del gen *IGHV* (*immunoglobulin heavy chain variable region*) es considerado un factor pronóstico importante en leucemia linfocítica crónica (LLC), en tanto que en linfoma de células del manto (LCM) su utilidad desde el punto de vista clínico requiere una evaluación más extensa. El análisis de la literatura muestra un repertorio sesgado en ambas patologías, con mayor participación de las familias VH3, VH4 y VH1, así como una expresión diferencial de genes *IGHV*. En este estudio se efectuó el análisis comparativo del estatus mutacional, los rearrreglos de *IGHV* y la presencia de receptores estereotipados de una cohorte argentina de 174 pacientes con LLC y de 31 casos con LCM de Brasil. En LLC se observó mayor diversidad de genes, siendo los más frecuentes *IGHV1-69*, *IGHV3-23*,

*IGHV4-34*, *IGHV3-21* e *IGHV3-48* (34,1% del total), en tanto que en LCM se encontró un repertorio muy reducido que incluye: *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV3-23* e *IGHV4-39* (66,7% del total), y una menor carga mutacional respecto de LLC. En LCM sólo 3,2% de los casos presentaron receptores estereotipados, mientras que en LLC el 14,2% de los rearrreglos fueron estereotipados, siendo los *clusters* más representados #2, #7 y #9. Nuestros datos y los previamente reportados en la literatura sustentan la presencia de estímulos antigénicos en el desarrollo y la patogénesis de ambas entidades, con características específicas en cada una de ellas. En LLC, la incorporación del análisis de los receptores estereotipados podría refinar el pronóstico del estatus mutacional de *IGHV*.

## Abstract

The mutational status of *IGHV* (immunoglobulin heavy chain variable region) gene is considered an important prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia (CLL), nevertheless its clinical usefulness in mantle cell lymphoma (MCL) requires a more extensive evaluation. In both pathologies, the analysis of the literature showed bias repertoire, with higher representation of VH3, VH4 and VH1 families, as well as a differential usage of *IGHV* genes. In this study, we have performed the analysis of *IGHV* mutational status and gene rearrangements as well as the evaluation of the presence of stereotyped receptors, in an Argentinean cohort of 174 CLL patients and 31 cases of Brazilian patients with MCL. In CLL, a greater diversity of genes was observed, being the most frequent: *IGHV1-69*,

*IGHV3-23*, *IGHV4-34*, *IGHV3-21* and *IGHV3-48* (34.1% of the total), while in MCL a very small repertoire including: *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV3-23* and *IGHV4-39* (66.7% of total), was found. In addition, MCL had a lower mutational load compared to CLL. In MCL only 3.2% of the cases presented stereotyped receptors, whereas in CLL this value reached 14.2%, being the most represented clusters #2, #7 and #9. Our data and previous reports in the literature support the presence of antigenic stimuli in the development and pathogenesis of both entities with specific characteristics in each of them. In CLL, the analysis of stereotypic receptors could refine the clinical outcome on beyond immunoglobulin mutational status.

## Introducción

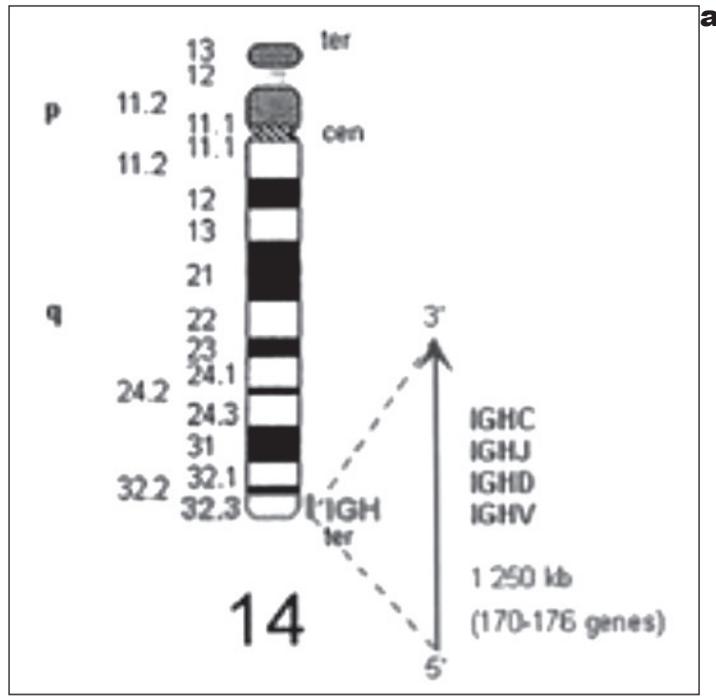
La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la forma más común de leucemia en adultos en el mundo occidental, representando casi el 30% de todas las leucemias<sup>(1,2)</sup>. Un aspecto característico de esta entidad es la variabilidad en la evolución clínica de los pacientes, con casos que presentan larga sobrevida con poco requerimiento terapéutico y otros que muestran rápida progresión de la enfermedad a pesar de los tratamientos específicos<sup>(3)</sup>, no siendo suficientes los sistemas de estadificación y los parámetros biológicos disponibles para predecir este comportamiento diferente. Esto hace necesario profundizar el estudio de nuevos marcadores que permitan definir en forma más precisa el curso clínico de los pacientes y su respuesta al tratamiento en estadios iniciales de la enfermedad. En el año 1999 dos grupos de trabajo<sup>(4,5)</sup> demostraron independientemente que el nivel de mutaciones presentes en los genes *IGHV* (*immunoglobulin heavy chain variable region*), permite dividir a la LLC en dos grandes grupos acorde al porcentaje de homología respecto de la línea germinal (LG). Aquellos casos con  $\geq 98\%$  de homología son considerados no mutados (NM), se asocian con peor evolución clínica, estadios avanzados, morfología atípica, rearrreglos genómicos de mal pronóstico y resistencia al tratamiento, mientras que los casos con homología  $< 98\%$  son considerados mutados (M) y presentan, en términos generales, mejor pro-

nóstico. Estos datos iniciales fueron posteriormente confirmados por numerosos investigadores, demostrando que el estatus mutacional de *IGHV* es uno de los factores pronóstico más fuertes en LLC<sup>(6-9)</sup>.

En cuanto al linfoma de células del manto (LCM), es una neoplasia agresiva de células B maduras con una sobrevida media de 5-7 años, que corresponde a alrededor del 6% del total de los linfomas no-Hodgkin. Esta patología se caracteriza clínicamente por una linfadenopatía generalizada, enfermedad diseminada al momento del diagnóstico y mala evolución clínica<sup>(10)</sup>. A nivel molecular presenta la t(11;14)(q13;q32), considerada el evento oncogénico primario, que determina el rearrreglo *CCND1/IGH@*, que origina la sobreexpresión de *CCND1* (*ciclina D1*), gen de importancia en la regulación del ciclo celular, particularmente durante la transición de G<sub>1</sub> a S. Paralelamente, existe un 5% de casos *ciclina D1* negativos, con sobreexpresión de las *ciclinas D2* o *D3*, que actuarían como sustitutos funcionales de la *ciclina D1* en el desarrollo del LCM<sup>(11)</sup>. No obstante, en los últimos años se han identificado pacientes que presentan enfermedad indolente con larga sobrevida y requerimiento terapéutico bajo o nulo<sup>(12,13)</sup>. A diferencia de la LLC, una carga mutacional baja puede ser funcionalmente relevante en este linfoma, por tal motivo el punto de corte de 2% ampliamente utilizado en LLC no es apropiado en LCM, ya que puede

enmascarar la heterogeneidad biológica y clínica de esta entidad. Esta situación determinó que estudios recientes hayan agrupado los casos de LCM en verdadero NM (VNM) (100% de homología), mínima-

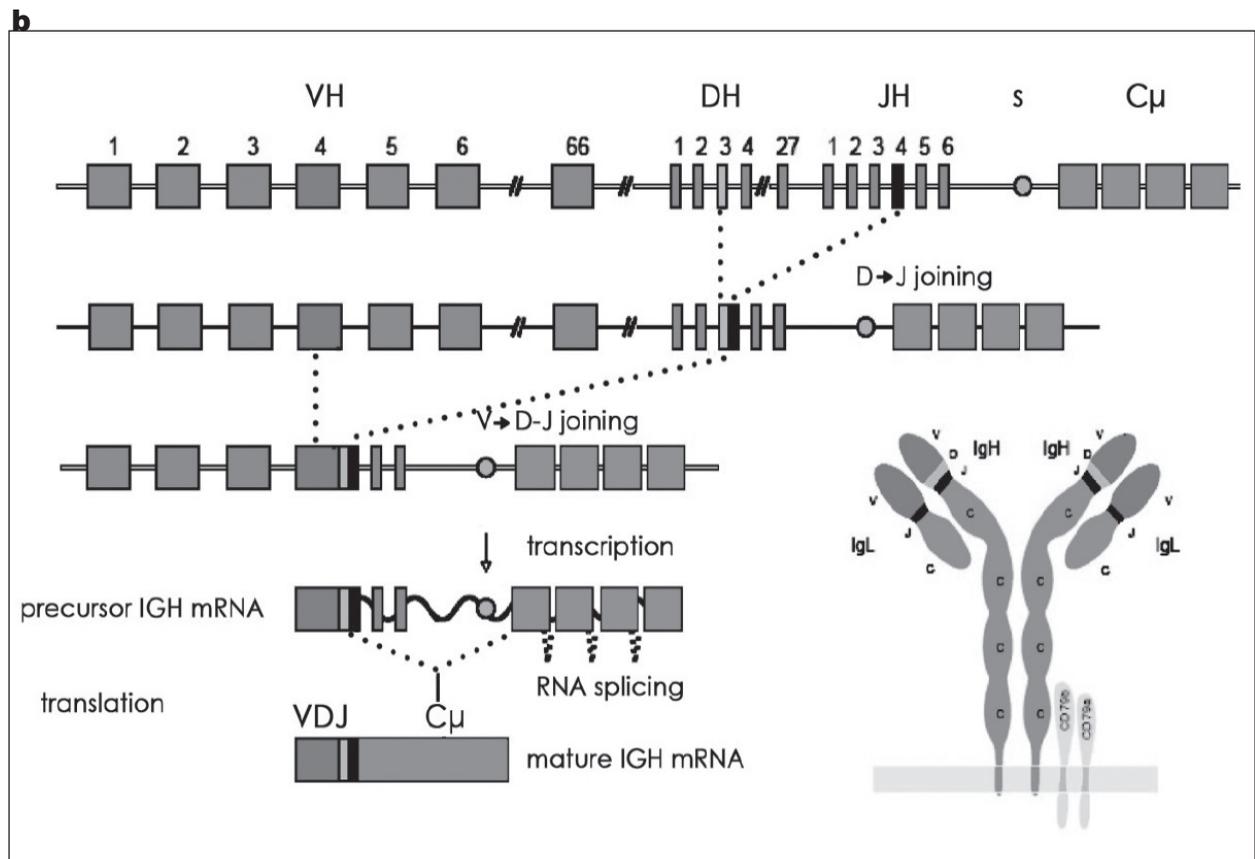
mente M (MM) (99,9%-97%) y altamente mutado (AM) (<97%)<sup>(14,15)</sup>, criterio que podría ser de utilidad clínica.



**Figura 1.**

**a)** El locus IGH@ humano, localizado en el brazo largo del cromosoma 14 (14q32.33), contiene los diferentes segmentos VH, DH, JH y segmentos constantes (C); con un total de 170-176 genes en un área aproximada de 1250 Kb. El repertorio funcional es de aproximadamente 76-84 genes por genoma haploide<sup>(17)</sup>.

**b)** Recombinación V-D-J de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.



### Recombinación de los genes de la cadena pesada de la inmunoglobulina

Durante la maduración de las células B normales en los órganos linfoides primarios, el reordenamiento de los genes de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGH): regiones V (*variable*), D (*diversity*) y J (*joining*), unidos a los genes de la cadena liviana (IGL), kappa o lambda, proporcionan la base para la estructura del receptor de células B (*B-cell receptor*; BCR), responsable del reconocimiento antigénico<sup>(16)</sup> (Figuras 1A y B).

Al generarse este reconocimiento antígeno-específico, la célula B ingresa al centro germinal de los folículos linfoides, donde tiene lugar el proceso conocido como hipermutación somática (HMS), mecanismo por el cual se introduce un alto número de mutaciones en los segmentos V de las cadenas pesada (VH) y liviana (VL) de las inmunoglobulinas (Igs), sitio de unión al antígeno (Ag). De esta forma, el repertorio de células B puede reconocer alrededor de  $10^{12}$  especificidades antigénicas diferentes. En este contexto, la probabilidad teórica de que dos clones de células B independientes puedan llevar exactamente el mismo BCR sólo por azar es prácticamente insignificante<sup>(17)</sup>. Por su parte, los fragmentos V se agrupan por homología de secuencia en siete familias: VH1-VH7, que al unirse luego a los segmentos D y J originan un amplio repertorio de rearreglos *IGHV* posibles.

Sin embargo, tanto la LLC como el LCM muestran un repertorio de genes *IGHV* sesgado, siendo los que pertenecen a las familias VH3, VH4 y VH1, los más utilizados en ambas entidades<sup>(5,14,15,18-20)</sup>. Asimismo, en LLC las mutaciones somáticas no están distribuidas uniformemente entre las familias VH, se observa sobrerepresentación de VH3 y VH4 en el grupo M y sobreexpresión de la familia VH1 en el estatus NM<sup>(18,21,22)</sup>. También hay expresión diferencial de algunos genes *IGHV* en ambas patologías en comparación con las células B normales<sup>(5,14,15,18)</sup>. Además, la HMS no es uniforme entre los genes *IGHV*: por ejemplo en LLC, el gen *IGHV1-69* presenta pocas o ninguna mutación, en tanto que los genes *IGHV3-7*, *IGHV3-23* e *IGHV4-34*, muestran una carga significativa de HMS<sup>(18)</sup>. Simultáneamente, en LCM el gen *IGHV3-21* se encuentra sobreexpresado en el grupo VNM, y el gen *IGHV3-23* predomina entre los AM<sup>(14)</sup>.

Asimismo, el uso de genes *IGHV* en LLC varía en di-

ferentes regiones geográficas. Los genes *IGHV* más frecuentemente utilizados en los países occidentales son *IGHV1-69*, *IGHV3-7*, *IGHV4-34* e *IGHV3-23*<sup>(19,20,23-25)</sup>, en tanto que en la población asiática se encuentra una expresión muy baja de *IGHV1-69*<sup>(26,27)</sup>. También, el gen *IGHV3-21* se observó sobrerepresentado en los países del norte de Europa en comparación con la región mediterránea<sup>(19,28)</sup>. Por su parte, el LCM muestra una fuerte restricción en el uso de genes *IGHV*, con sólo cuatro rearreglos: *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV1-8* e *IGHV3-23*, representando casi el 50% del total de casos<sup>(14,15)</sup>. Hasta el presente no se han reportado variaciones en el uso de genes *IGHV* en distintas regiones geográficas para esta última patología.

Del mismo modo, una proporción de pacientes con LLC no relacionados exhibe secuencias de aminoácidos (aa) altamente homólogas en la región HCDR3 (*heavy-chain complementary determining region 3*) de la Ig producto de la unión V-D-J<sup>(20,29,30)</sup>. Dichas secuencias casi idénticas, denominadas “estereotipadas”, se encuentran con mayor frecuencia en las LLC-NM<sup>(23,29)</sup>, e integran grupos o *clústeres* de homología. Las mismas deben cumplir determinadas características para ser incluidas en un *clúster* determinado: uso de los mismos genes V-D-J y porcentaje de identidad de aminoácidos en HCDR3  $\geq 60\%$ <sup>(23,29)</sup>. Stamatopoulos y col<sup>(23)</sup> describieron inicialmente 48 subconjuntos diferentes de secuencias con HCDR3 homóloga en pacientes con LLC de origen mediterráneo. En la actualidad, se han descrito más de 200 *clústeres* diferentes entre los cuales se definieron 19 *clústeres* mayores que contienen al menos 20 secuencias cada uno, y constituyen los de mayor frecuencia<sup>(25)</sup>. El porcentaje de pacientes con LLC con receptores estereotipados varía de 9,5 a 32% en las cohortes publicadas<sup>(23,31,32)</sup>.

En algunos casos, la presencia de BCRs estereotipados asignados a un *clúster* determinado se correlaciona con el curso clínico de la enfermedad, independientemente del estatus mutacional o del gen *IGHV* involucrado<sup>(19,23,33,34)</sup>. En LCM se han reconocido también regiones HCDR3 estrechamente homólogas (estereotipadas), aunque con características moleculares claramente distintas de las descritas en LLC<sup>(14,15)</sup>, requiriéndose aún la inclusión de más casos para la adecuada descripción de sus *clústeres*.

### Implicancias clínicas de los genes *IGHV* y la presencia de receptores estereotipados

En las últimas décadas, el estudio molecular de los genes de la *IGHV* expresados por el BCR ha permitido identificar subgrupos de pacientes con diferentes características biológicas, presentación clínica y evolución de la enfermedad, indicando que la reactividad funcional del Ag del BCR está implicada críticamente en el comportamiento de los clones malignos<sup>(15,23,30,32)</sup>. Las primeras evidencias mostraron que el uso del gen *IGHV3-21* en la LLC representaba un factor pronóstico adverso, independientemente del estatus mutacional de *IGHV*<sup>(20,23,35)</sup>. Posteriormente, Ghia y col<sup>(19)</sup> observaron que, en población medite-

rránea, solamente tenían pronóstico adverso los pacientes con *IGHV3-21* y receptor estereotipado perteneciente al subconjunto #2. Esta observación fue confirmada recientemente<sup>(34)</sup> en un amplio estudio que abarca 8593 casos de LLC, en el que se sostiene que aquellos pacientes con *IGHV3-21* no estereotipados presentarían un curso clínico dependiente de su estatus mutacional. Otro ejemplo lo constituye el gen *IGHV3-23* que representa un factor pronóstico negativo independiente entre las LLC-M<sup>(6,36)</sup>.

En la **Tabla 1** se presentan datos de la literatura que describen los genes *IGHV* de uso frecuente en LLC, la presencia de BCRs estereotipados y su significado clínico.

**Tabla 1.** Características moleculares de los genes *IGHV* con relevancia clínica.

Gen <i>IGHV</i>	Estado mutacional	BCR estereotipado	Clústeres	Comportamiento clínico	Referencias
<i>IGHV1-69</i>	NM (Predominio 100% H)	Sí	#3, #5, #7 y #9	Corto TPT	22, 37
<i>IGHV3-23</i>	M	No	-	Corto TPT (en el contexto de LLC-M)	36
<i>IGHV3-21</i>	Predominio M	-	-	Corta SV	35
	Predominio M	Sí	#2	Corto TPT, Corto TP	19
	Predominio M	Sí	#2	Corta SV, Corto TPT	28*
	Predominio M	Sí	#2	Corto TPT	34**
<i>IGHV3-72</i>	M	Sí		Enfermedad estable e indolente	38, 39
<i>IGHV4-34</i>	M	Sí	#4, #16	# 4: menor edad al diagnóstico y enfermedad indolente	23, 40
<i>IGHV4-39</i>	Predominio NM	Sí	#8	Transformación a Richter	23, 41

*IGHV*: Immunoglobulin heavy chain variable region; NM: no mutado; M: mutado; H: Homología; TPT: tiempo previo al tratamiento; TP: tiempo hasta la progresión; SV: supervivencia global. BCR: B-cell receptor.

\*El mal pronóstico para pacientes con *IGHV3-21* es independiente del estatus mutacional y la presencia de receptores estereotipados no tiene impacto en la SV o TPT.

\*\*El mal pronóstico para pacientes con *IGHV3-21* depende de la presencia de receptores estereotipados de cluster #2, el pronóstico de los pacientes con *IGHV3-21* no estereotipado depende de su estatus mutacional.

Por el contrario, las implicancias clínicas del análisis inmunogenético en LCM son controvertidas<sup>(42-45)</sup>. La mayoría de los estudios no han encontrado relación entre el estatus mutacional de los genes *IGHV* y la evolución de la enfermedad<sup>(45,46)</sup>. Esta situación podría deberse en parte a la aplicación de un valor de corte de 2% (98% de homología con la LG) para la asignación de casos al subgrupo M o NM, ya que

la mayoría de los pacientes eran NM o tenían HMS limitada, lo que impedía un correcto análisis<sup>(42,45)</sup>. En un estudio posterior, Navarro y col<sup>(47)</sup> utilizando un punto de corte de 3%, encuentran que los pacientes con LCM-NM presentaban peor evolución clínica y supervivencia más corta que aquellos con *IGHV* M, con diferencias altamente significativas, siendo necesarios más estudios para confirmar estos datos.

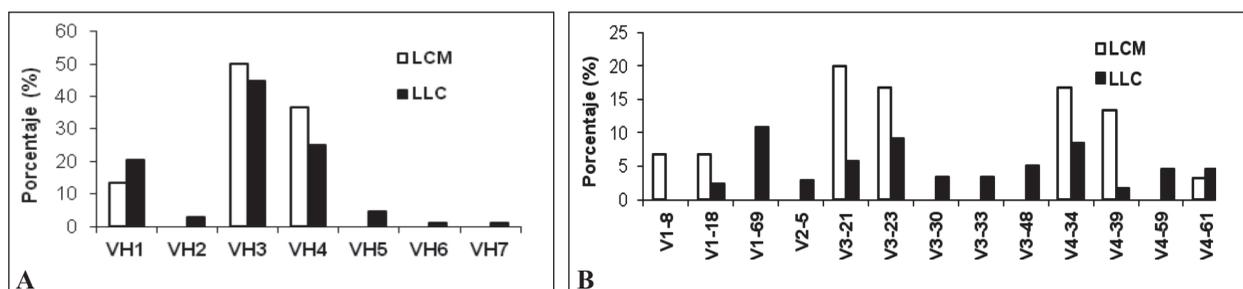
**Análisis de una cohorte de Argentina y Brasil.**

En nuestro laboratorio efectuamos el análisis comparativo del estatus mutacional y del repertorio de genes *IGHV* en una cohorte argentina de 174 pacientes con LLC (113 varones; edad media: 65 años; 82,4% en estadios iniciales) y de 31 casos con LCM (23 varones; edad media 63 años) provenientes de la Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil.

En LLC, el análisis acorde al estatus mutacional mostró que el 44,3% de los rearreglos fueron NM

y el 55,7% M. Por su parte en LCM, la distribución fue: 26,7% VNM, 53,3% MM y 20% AM. El 52,3% de los casos con LLC presentaron <97% de homología respecto de la LG, mostrando una mayor carga mutacional respecto de LCM (20%) ( $p=0,0008$ ). En ambas entidades detectamos mayor uso de la familia VH3 seguida de VH4 y VH1. Las familias VH5, VH6 y VH7 estuvieron ausentes en LCM y sus porcentajes fueron muy pequeños en LLC.

La distribución de familias VH en ambas patologías se encuentra detallada en la **Figura 2A**.



**Figura 2.** A) Distribución de familias VH en LLC y LCM; B) Distribución de genes IGHV en LLC y LCM.

En cuanto a los genes utilizados, en LLC se observó mayor diversidad, siendo más frecuentes *IGHV1-69*, *IGHV3-23*, *IGHV4-34*, *IGHV3-21* e *IGHV3-48* (34,1% del total), con diferencias respecto de otras regiones geográficas<sup>(48)</sup>. Por el contrario, en LCM se encontró un repertorio muy reducido de genes VH: *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV3-23* e *IGHV4-39* (66,7% del total)<sup>(49)</sup>, datos que coinciden ampliamente con la literatura<sup>(14,15)</sup>. El gen *IGHV1-69* no se encontró representado en LCM, siendo el de mayor frecuencia en LLC. En la **Figura 2B** se grafica el uso de genes *IGHV* en LLC y LCM. En ambas patologías los genes J y D predominantes fueron J6, J4 y D3, D2 y D6, respectivamente. En LCM se observó un uso sesgado de *IGHV3-21* con D3-3 y J6 y de *IGHV4-34* con D2-2 y J4, detectándose un solo caso con receptores estereotipados (3,2%) correspondiente al cluster #8. Por el contrario, en LLC se detectaron 25 casos estereotipados (14,2%), siendo los *clústeres* más representados: #2, #7 y #9 (**Tabla 2**). Con referencia al gen *IGHV3-21*, nuestra cohorte de pacientes con LLC mostró un 5,7% de los casos con este rearreglo<sup>(48)</sup>, el 40% de los cuales (4/10) fueron estereotipados correspondientes al *clúster* #2. Diferentes análisis demostraron una alta frecuencia de *IGHV3-21* en Escandinavia (6,5%-11%)<sup>(28,51)</sup> y las frecuencias más bajas en estudios de Estados Unidos

y la región mediterránea<sup>(19,20,22,52)</sup>, con porcentajes que van del 0% al 5%. Esta distribución geográfica diferente estaría relacionada con la heterogeneidad en la exposición a Ags responsables de la aparición y comportamiento clínico de la LLC<sup>(19,20,35,53)</sup>.

Es de remarcar que en nuestra cohorte de LCM el porcentaje de *IGHV3-21* fue 20%, mucho mayor al observado en LLC, pero coincidente con lo previamente reportado para esa entidad<sup>(14,15)</sup>.

Concluyendo, nuestros datos y los anteriormente publicados en la literatura sustentan la presencia de estímulos antigénicos en el desarrollo y la patogénesis de la LLC y el LCM, con características específicas para cada una de ellas. Esto se fundamenta en diferencias en el estatus mutacional de *IGHV*, así como el uso sesgado de genes específicos y la presencia de receptores estereotipados en ambas patologías. En LCM, tanto en la literatura como en la cohorte aquí analizada, se detectó un repertorio propio y restringido de genes *IGHV* y una menor carga mutacional respecto de LLC. En esta última patología, la incorporación del análisis de los receptores estereotipados podría brindar información adicional a la clasificación de grupos de riesgo genético, así como refinar el pronóstico del estatus mutacional de *IGHV*, con potencial implicancia en la toma de decisiones terapéuticas.

Tabla 2. Receptores estereotipados.

Pa- ciente	Rearreglo			Estado mutacio- nal	Secuencia de aminoácidos de HCDR3	Bomben y col <sup>(20)</sup> Clúster (MAS)	Messmer y col <sup>(50)</sup> Clúster (MAS)	Hadzidimitriou y col <sup>(15)</sup>
	IGHV	IGHD	IGHJ					
<b>Leucemia linfocítica crónica</b>								
14	V1-3*01	D6-19	J4*02	NM	AREQWLVLASFYD	1 (64)	-	1
15	V3-30*03	D1-20	J3*02	M	AKNNWNDFQDASDI	N6 (70)	26 (58)	-
16	V1-3*03	D1-26	J6*02	NM	ARMYSGSYYYYYYGMVDV	-	27 (73)	28A
18	V1-69*01	D3-3	J6*02	NM	ARPKDSYDFWSGYHVLYYYYGMVDV	7 (62)	9 (68)	7H
26	V3-30*03	D3-3	J6*02	NM	ARADLNADDFWSGYHYYYYYGMVDV	7 (62)	4 (64)	-
41	V4-34*01	D2-15	J6*02	M	ASRFYCSGANCESPSFYYYYYGMVDV	-	-	16
58	V1-2*01	D6-19	J4*02	NM	ARQQWLVLLENFDY	-	-	1
59	V1-69*13	D3-3	J6*02	NM	ARDPTGDFWSGYYPNYYYYYGMVDV	7 (71)	-	-
66	V3-21*01	D1-26	J6*02	M	TRDANGMDV	-	2 (89)	2
82	V3-21*01	D3-22	J6*02	NM	AGDRNAMDV	2 (75)	2 (67)	2
83	V4-34*01	D2-15	J6*02	M	AGRFYCSGATCLSSQYYYYSGLDV	-	-	16
84	V4-34*01	D5-18	J6*02	M	ARGYPDTPVERRYYYYGLDIW	4 (64)	-	4
85	V3-21*01	D5-24	J6*02	NM	AGDRNAMDV	2 (75)	2 (67)	2
95	V4-4*02	D6-19	J4*02	M	ARGPNSDGWNAFDY	-	-	77
96	V4-34*01	D2-21	J4*02	M	VRGGYWAFDY	-	-	14
108	V3-48*02	D3-3	J6*02	NM	ARGGRYDFWSVWDYYYYGMD	-	20 (62)	-
115	V4-34*01	D4-17	J6*02	M	ARGYGATATRRYYYYFGLDV	-	-	4
146	V1-69*01	D3-3	J6*03	NM	ARAPHKNYDFWSGYSPAMYYYYGMVDV	-	9 (71)	-
149	V4-59*01	D6-19	J1*01	M	ARGPHTSGWNAHQH	-	-	77
154	V3-21*01	D5-12	J6*02	NM	ATDRNAMDV	-	2 (67)	2
<b>Linfoma del manto</b>								
8	V4-34*01	D2-2	J6*02	MM	ARGIPGAIGGYYYYYGMVDV	-	-	8

Subsets #1, #2 y #7 identificados por Stamatopoulos et al<sup>(23)</sup> y Murray et al<sup>(30)</sup>; N6 propuesto por Bomben et al<sup>(20)</sup> y subsets #2, #9, #26, #27 y #64, identificados por Messmer et al<sup>(50)</sup>. MAS: Multiple Alignment Score: Valor medio de todos los pares de alineamiento entre la secuencia en estudio y las secuencias del clúster; para que la secuencia en estudio sea incluida en el clúster el MAS debe ser  $\geq 60$ .

**Agradecimientos:**

El presente trabajo fue realizado con fondos de Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (ANPCyT), CONICET, Laboratorio GlaxoSmithKlein, Argentina, y FAPESP Grant N°12/50947-1, Brasil. Parte de los pacientes incluidos en este estudio integran el Registro de Leucemia Linfocítica Crónica de la Sociedad Argentina de Hematología.

**Declaración de conflictos de interés:**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

**Bibliografía**

1. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE y col. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol.* 2007;139:809-19.
2. Smith A, Howell D, Patmore R y col. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the haematological malignancy research network. *Br J Cancer.* 2011;105:1684-92.
3. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2008;371:1017-29.
4. Damle RN, Wasil T, Fais F y col. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94:1840-7.
5. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A y col. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94:1848-54.
6. Kröber A, Seiler T, Benner A y col. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;100:1410-6.
7. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ y col. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGHV gene mutational status, and loss of mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood.* 2002;100:1177-84.
8. Tobin G, Thunberg U, Laurell A y col. Patients with chronic lymphocytic leukemia with mutated VH genes presenting with Binet stage B or C form a subgroup with a poor outcome. *Haematologica.* 2005;90:465-9.
9. Langerak AW, Davi F, Ghia y col. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia.* 2011;25: 979-84.
10. Swerdlow S, Campo E, Harris N y col. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon, 2008.
11. Sander B, Quintanilla-Martinez L, Ott G y col. Mantle cell lymphoma: a spectrum from indolent to aggressive disease. *Virchows Arch.* 2016;468:245-57.
12. Fernández V, Salamero O, Espinet B y col. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010;70:1408-18.
13. Ondrejka S, Lai R, Smith S, Hsi E. Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction and good prognosis. *Haematologica.* 2011;96:1121-7.
14. Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, Rosenquitt R, Stamatopoulos K. Unlocking the secrets of immunoglobulin receptors in mantle cell lymphoma: Implications for the origin and selection of malignant cells. *Sem Cancer Biol.* 2011;21:299-307.
15. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N y col. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood.* 2011;118:3088-95.
16. Chiorazzi N, Rai K, Ferrarini, M. Mechanisms of disease. *Chronic Lymphocytic Leukemia.* *N Engl J Med.* 2005;352:804-15.
17. Lefranc, MP, Lefranc, G. *The Immunoglobulin FactsBook.* Academic Press, London, UK, 2001, 458 pp.

18. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S y col. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest.* 1998;102:1515-25.
19. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C y col. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood.* 2005;105:1678-85.
20. Bomben R, Dal Bo M, Capello D y col. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptor: results from Italian multicentre study. *Br J Haematol.* 2009;144:492-506.
21. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A y col. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1910-6.
22. Maurer K, Zahrieh D, Gorgun G y col. Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2005;129:499-510.
23. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C y col. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood.* 2007;109:259-70.
24. Donisi PM, Di Lorenzo N, Riccardi M y col. Pattern and distribution of immunoglobulin VH gene usage in a cohort of B-CLL patients from a northeastern region of Italy. *Diagn Mol Pathol.* 2006;15:206-15.
25. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A y col. Stereotyped B-cell receptors in one third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapeutic interventions. *Blood.* 2012;119:4467-75.
26. Hojjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Razavi SM y col. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage and mutational status of the leukemic B cells in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci.* 2009;100:2346-53.
27. Irons RD, Le A, Bao L y col. Characterization of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) in Shanghai, China: molecular and cytogenetic characteristics, IgV gene restriction and hypermutation patterns. *Leuk Res.* 2009;33:1599-603.
28. Cahill N, Sutton L-A, Jansson M y col. IGHV3-21 gene frequency in Swedish cohort of patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012;12:201-6.
29. Messmer BT, Albesiano E, Messmer D y col. The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood* 2004;103:3490-5.
30. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A y col. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood.* 2008;111:1524-33.
31. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F y col. A differential ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptor: molecular and computational evidence. *Leukemia.* 2010;24:125-32.
32. Maura F, Cutrona G, Fabris S y col. Relevance of stereotyped B-cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE.* 2011;6:e24313.
33. Darzentas N, Stamatopoulos K. The significance of stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia, *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27:237-50.
34. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzimitiou A y col. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal prognostic considerations. *Blood.* 2015;125:856-9.
35. Tobin G, Thunberg U, Johnson A y col. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:2262-4.

36. Bomben R, Dal-Bo M, Benedetti D y col. Expression of mutated *IGHV3-23* genes in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features. *Clin Cancer Res.* 2010;16:620-6.
37. Weinberg JB, Volkheimer AD, Chen Y y col. Clinical and molecular predictors of disease severity and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 2007;82:1063-70.
38. Guarini A, Gaidano G, Romana F y col. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood.* 2003;102:1035-41.
39. Capello D, Zucchetto A, Degan M y col. Immunophenotypic characterization of IgVH3-72 B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Res.* 2006;30:1197-9.
40. Marincevich M, Mansouri M, Kanduri M y col. Distinct gene expression profile in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped *IGHV4-34* B-cell receptors. *Haematologica.* 2010;95:2072-9.
41. Rossi D, Spina V, Cerr M y col. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4415-22.
42. Orchard J, Garand R, Davis Z y col. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, non nodal disease. *Blood.* 2003;101:4975-81.
43. Camacho FI, Algara P, Rodriguez A y col. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood.* 2003;101:4042-6.
44. Kienle D, Krober A, Katzenberger T y col. VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood.* 2003;102:3003-9.
45. Schraders M, Oeschger S, Kluin PM y col. Hypermutation in mantle cell lymphoma does not indicate a clinical or biological subentity. *Mod Pathol.* 2009;22:416-25.
46. Cogliatti SB, Bertoni F, Zimmermann DR y col. IgV H mutations in blastoid mantle cell lymphoma characterize a subgroup with a tendency to more favourable clinical outcome. *J Pathol.* 2005;206:320-7.
47. Navarro A, Clot G, Royo C y col. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the *IGHV* mutational status and *SOX11* expression have distinct biological and clinical features. *Cancer Res.* 2012;72:5307-16.
48. Stanganelli C, Travella A, Bezares R y col. Immunoglobulin gene rearrangement and mutational status in Argentinian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013;13:447-57.
49. Panero J, Alves-Paiva RM, Roisman A y col. Acquired TERT promoter mutations stimulate TERT transcription in mantle cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2016;91:481-5.
50. Messmer BT, Raphael BJ, Aerni SJ y col. Computational identification of CDR3 sequence archetypes among immunoglobulin sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2009;33:368-76.
51. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K y col. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2004;104:2879-85.
52. Rossi D, Spina V, Bomben R y col. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013;121:4902-5.
53. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med.* 2008;264:549-62.