

# Receptores estereotipados en pacientes con leucemia linfocítica crónica. Frecuencia y distribución en diferentes países de Latinoamérica.

Stereotyped receptors in chronic lymphocytic leukemia. Frequency and distribution in Latin American countries.

<sup>1</sup>Stanganelli C, <sup>2</sup>Sotelo N, <sup>3</sup>Márquez ME, <sup>1</sup>Cabrera J, <sup>3</sup>Deglesne PA, <sup>4</sup>López JL, <sup>5</sup>Bezares R, <sup>6</sup>Gabús R, <sup>7</sup>Oppezzo P, <sup>8</sup>Slavutsky I, Grupo Latinoamericano de Leucemia Linfocítica Crónica (GLA-LLC)

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

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina.

<sup>3</sup>Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

<sup>4</sup>Banco Municipal de Sangre, Caracas, Venezuela.

<sup>5</sup>Hospital Álvarez, Buenos Aires, Argentina.

<sup>6</sup>Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay.

<sup>7</sup>Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay

<sup>8</sup>Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

cstanganelli@hematologia.anm.edu.ar

TRABAJO PRESENTADO CON MENCIÓN ESPECIAL EN EL MARCO DEL XXIII CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA

Fecha recepción: 15/03/2018

Fecha aprobación: 20/04/2018



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA  
Volumen 22 n° 1: 13-20  
Enero - Abril 2018

**Palabras claves:** leucemia linfocítica crónica, *IGHV*, receptor de células B estereotipado.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia, *IGHV*, stereotyped B-cell receptor.

## Resumen

El estado mutacional de *IGHV* (*immunoglobulin heavy variable region*) ha sido establecido como uno de los factores pronóstico más importantes en LLC, permitiendo dividir a los pacientes en mutados (M), asociados a buena evolución clínica, y no mutados (NM), relacionados a pronóstico adverso. Diferentes estudios han demostrado la presencia

de un repertorio sesgado de genes *IGHV* en LLC, así como la existencia de una fracción de pacientes que presentan BCRs (*B-cell receptors*) de alta homología, denominados estereotipados (BCREs). Los mismos se encuentran agrupados en clústeres definidos en base a la similitud de la secuencia de aminoácidos (aa) de la región VH CDR3 (*variable*

heavy chain complementarity-determining region 3), entre los cuales los clústeres #1, #2, #4 y #8 son los más frecuentes y se hallan relacionados con el curso clínico de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue analizar el estado mutacional, el uso de genes *IGHV* y la expresión de BCREs en pacientes con LLC de diferentes países latinoamericanos en un estudio multicéntrico desarrollado en el contexto del Grupo Latinoamericano de LLC (LAG-CLL). Nuestra cohorte incluyó 431 pacientes con LLC no seleccionados de Argentina (253), Uruguay (99) y Venezuela (79). El análisis de los datos mostró una sobrerrepresentación de casos mutados. Con respecto al uso de la familia *IGHV*, se encontró una distribución VH3>VH4>VH1 en Argentina, mientras que VH3>VH1>VH4 estuvo presente en los demás países. Los genes más frecuentemente utilizados fueron *IGHV1-69*, *IGHV3-23* e *IGHV4-34*. *IGHV3-*

*21* estuvo presente en el 10% de los pacientes venezolanos, pero mostró frecuencias más bajas en la cohorte uruguaya (2%) y un porcentaje intermedio en la serie argentina (6,7%). Los BCREs estuvieron presentes en 15.2% del total de casos. Se detectaron dos nuevos clústeres potenciales. El gen *IGHV3-21* siempre se incluyó en el grupo heterogéneo en la cohorte venezolana. La serie argentina exhibió sobrerrepresentación del clúster #2 (3,13%), mientras que Uruguay mostró la frecuencia más alta de clúster #4 (4,04%). Los pacientes con LLC de Venezuela mostraron porcentajes muy bajos de clústeres mayores (5.1%). Estos resultados constituyen los primeros datos integrados de países latinoamericanos y muestran diferencias interesantes, que reflejan variaciones genéticas y/o diferencias en los factores ambientales que operan en la patogénesis de la LLC en este área geográfica particular.

### Abstract

The *IGHV* (immunoglobulin heavy chain variable region) gene mutational status is considered an important prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia (CLL). We have evaluated the presence of *IGHV* mutational status, gene usage and stereotyped B-cell receptors (BCRSs) in CLL patients from a multicenter study developed in the context of the Latin American Group of CLL (LAG-CLL). Our cohort included 431 unselected CLL patients from Argentina (253), Uruguay (99) and Venezuela (79). Analysis of data showed over-representation of mutated cases. Concerning *IGHV* family usage, VH3>VH4>VH1 distribution was found in Argentina, while VH3>VH1>VH4 was observed in the other countries. The most frequently used *IGHV* genes were *IGHV1-69*, *IGHV3-23* and *IGHV4-34*. *IGHV3-21* was present in 10% of Venezuelan pa-

tients but showed lower frequencies in the Uruguayan (2%) cohort and intermediate frequency in the Argentinean series (6.7%). BCRSs were observed in 15.2% of total cases. Two novel potential subsets were detected. *IGHV3-21* gene was always included in the heterogeneous group in Venezuelan cohorts. Argentinean series exhibit over-representation of cluster #2 (3.13%), while Uruguay showed the highest frequency of cluster #4 (4.04%). Venezuelan CLL patients showed very low percentages of major clusters (5.1%). These results are the first integrated *IGHV* analysis from Latin American countries. They showed interesting differences, reflecting variations in the genetic background and/or differences in environmental factors operating in CLL pathogenesis in this particular geographic area.

### 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>. El curso clínico es muy variable, con tiempos hasta la progresión que van de meses a dé-

cadadas. Si bien los sistemas de estadificación clínica establecidos independientemente por Rai y col<sup>(3)</sup> y Binet y col<sup>(4)</sup> han sido muy útiles en las decisiones de manejo y tratamiento de la enfermedad, resultan necesarios marcadores adicionales para identificar

a los pacientes que presentan mayor riesgo de progresión. El análisis del estado mutacional de *IGHV* (*immunoglobulin heavy chain variable region*)<sup>(5,6)</sup> presenta alto valor pronóstico, habiendo permitido definir dos grupos con curso clínico diferente: pacientes con el gen mutado (M) (<98% de homología con respecto a la línea germinal), asociados a buena evolución clínica, y aquéllos con *IGHV* no mutado (NM) (con homología de 98% o superior), relacionados a progresión de la enfermedad.

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*): región variable (V), región diversidad (D) y región unión J (*Joining*), unidos a los genes de la cadena liviana de la inmunoglobulina (*IGL*) kappa o lambda, proporcionan la base para la estructura del receptor de células B (*B-cell receptor*; BCR)<sup>(7)</sup>. Los fragmentos V se agrupan por homología de secuencia en 7 familias: VH1-VH7 que, al unirse luego a los segmentos D y J, originan un amplio repertorio de rearrreglos *IGHV* posibles. Asimismo, cuando la molécula de inmunoglobulina de la superficie celular reconoce su antígeno específico, se pueden producir mutaciones somáticas en los genes VH. Este proceso, conocido como hipermutación somática (HMS), introduce variabilidad adicional y contribuye a un mejor reconocimiento antigénico por el BCR. Así, el repertorio de células B comprende alrededor de 10<sup>12</sup> especificidades antigénicas diferentes, determinando que la probabilidad de que dos clones de células B independientes puedan llevar exactamente el mismo BCR sólo por azar es prácticamente insignificante.

Por su parte, la LLC muestra un repertorio de genes *IGHV* sesgado, siendo los que pertenecen a las familias VH3, VH4 y VH1 los más utilizados<sup>(6,8-12)</sup>. Igualmente, se observa mayor representación de VH3 y VH4 en el grupo M y predominio de VH1 en el estado NM<sup>(10)</sup>. Además, la HMS no es uniforme entre los genes *IGHV*: el gen *IGHV1-69* presenta pocas o ninguna mutación, mientras que los genes *IGHV3-7*, *IGHV3-23* e *IGHV4-34*, muestran mayor carga de HMS<sup>(10)</sup>. Está asimismo ampliamente documentado que el uso de genes *IGHV* varía en diferentes regiones geográficas<sup>(8,13-15)</sup>.

Paralelamente, una proporción de pacientes con LLC exhibe secuencias de aminoácidos (aa) altamente homólogas en la región VH CDR3 (*variable heavy chain complementarity-determining region 3*)

de la *IGH*<sup>(11,16)</sup>, crítica para la elaboración del sitio de reconocimiento antigénico. Esas secuencias casi idénticas denominadas “estereotipadas” (BCRE; *B-cell receptor estereotipado*), podrían determinar especificidades antigénicas similares. Las mismas se encuentran con mayor frecuencia en los casos con *IGHV*-NM<sup>(11,16)</sup> y se agrupan en clústeres de homología. Existen diferentes criterios para identificar BCREs. El primero, establecido por Messmer y col.<sup>(16)</sup> y Tobin y col.<sup>(17)</sup>, requiere utilizar los mismos genes *IGHV-IGHD-IGHJ*. Poco después se agruparon en clústeres, secuencias con una identidad de aa en VH CDR3 igual o superior al 60%<sup>(13,17)</sup>, aun con genes *IGHV* distintos. Más recientemente se observó que las secuencias VH CDR3 estereotipadas podrían ser compartidas entre pacientes que utilizaban genes de *IGHV* diferentes pero pertenecientes al mismo clan filogenético, estableciendo un nuevo criterio para la identificación de BCREs<sup>(12)</sup>. En algunos casos, la presencia de BCREs asignados a un clúster determinado se correlaciona con el curso clínico de la enfermedad, independientemente del estado mutacional o del gen *IGHV* involucrado<sup>(8,13,18,19)</sup>. Al presente existe escasa información sobre este tema de los países de Latinoamérica. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue analizar el estado mutacional, el patrón de *IGHV* y la expresión de BCREs en pacientes de diferentes países de América del Sur, como parte de un estudio multicéntrico desarrollado en el marco del Grupo Latinoamericano de LLC (LAG-CLL).

## Materiales y métodos

### Pacientes

Nuestra cohorte incluyó 431 casos con LLC no seleccionados (256 varones y 175 mujeres; edad media: 68,4 años, rango: 35-88 años; estadios Rai: 0: 44,4%, I-II: 41% y III-IV: 14,6%); 253 de Argentina, 99 de Uruguay y 79 de Venezuela. La distribución de pacientes de cada país por sexo, edad y estadios clínicos se detalla en la **Tabla 1**. El diagnóstico fue establecido de acuerdo con el International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia Criteria<sup>(20)</sup>. El estudio fue aprobado por los Comités de Ética locales de cada Institución. Todas las personas dieron su consentimiento informado. El protocolo de estudio se efectuó conforme a las normas éticas establecidas en la declaración de Helsinki 1975.

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes con LLC analizados.

Características clínicas	Cohortes		
	Argentina	Uruguay	Venezuela
Nº de pacientes (n)	253	99	79
Sexo F/M	103/150	37/62	35/44
Edad media (años) (rango)	65,3 (35-88)	67,6 (40-87)	68,6 (41-83)
<b>Estadíos clínicos (%)</b>			
Rai 0	31,3	54,0	50,0
Rai I-II	52,7	21,0	42,4
Rai III-IV	16,0	25,0	7,6

F: Femenino; M: Masculino; n: número

### Análisis del estado mutacional de *IGHV*

Se trabajó con cDNA obtenido de células mononucleares de sangre periférica, empleando *primers* sentido específicos para las familias VH1-VH7 y consenso antisentido JH o C $\mu$ , y secuenciación bidireccional, empleando las condiciones y ciclados previamente descriptos<sup>(21)</sup>. El análisis de las secuencias se efectuó utilizando las bases de datos IMG-T/V-QUEST (<http://imgt.cines.fr/>) e IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>).

### Identificación de receptores estereotipados

Para identificar receptores estereotipados se utilizaron los criterios establecidos por Stamatopoulos y col.<sup>(13)</sup> y Bomben y col.<sup>(11)</sup>, así como el nuevo enfoque preconizado por Agathangelidis y col.<sup>(12)</sup> Para el primer análisis se realizó el alineamiento en pares con secuencias estereotipadas conocidas, disponibles en diferentes bases de datos públicas<sup>(11,13)</sup> utilizando el algoritmo Clustal Omega. Se excluyeron pares de secuencias cuya longitud difería en más de 3 aa. Los BCRs se consideraron estereotipados cuando sus secuencias compartían más del 60% de identidad. También se efectuó el alineamiento de secuencias entre nuestros casos para investigar posibles nuevos estereotipos. Para la aplicación del segundo enfoque de búsqueda se requiere que se asignen al mismo clúster sólo las secuencias reordenadas que portan genes *IGHV* del mismo clan filogenético (sea: I, II o III), lo que significa que su línea germinal es cercana y está evolutivamente relacionada.

Las secuencias deben tener además idénticas longitudes de VH CDR3 y posiciones exactas de aa compartidos dentro de esta región, poseer al menos el 50% de identidad de aa y mostrar 70% de aa con propiedades físico-químicas similares<sup>(12)</sup>. Los clústeres que contienen mayor número de secuencias, por ser los más frecuentes, se denominan clústeres

mayores (CM)<sup>(12)</sup>. Para la búsqueda de CM se utilizó la herramienta bioinformática ARResT/AssignSubsets<sup>(22)</sup>.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el programa IBM SPSS Statistics 24. La comparación de la distribución de variables categóricas se realizó empleando la prueba de  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher. Para todas las pruebas, se consideró como estadísticamente significativo un  $p < 0,05$ .

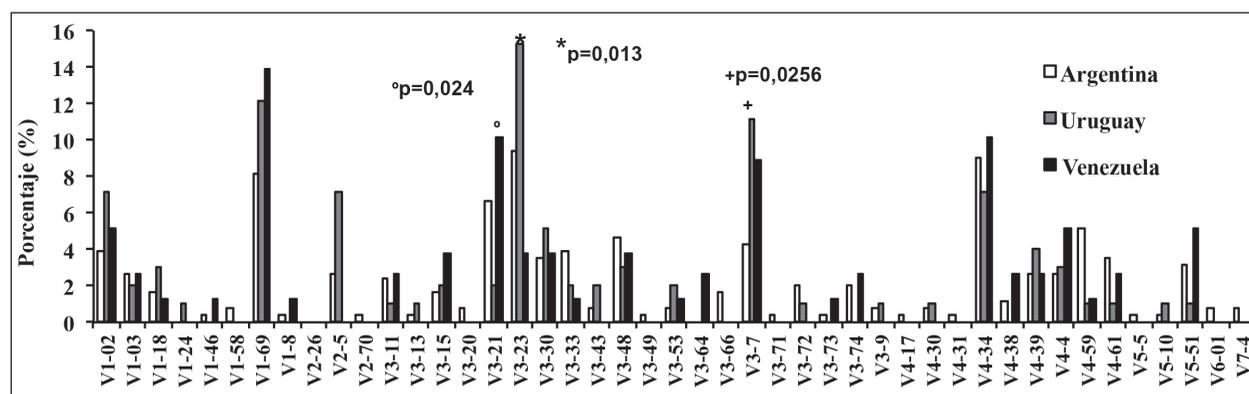
### Resultados

El análisis de las distintas cohortes mostró que más del 50% de los casos de Argentina, Uruguay y Venezuela fueron LLC-M (58%, 51,5% y 53,2%, respectivamente). Los pacientes argentinos presentaron una distribución VH3>VH4>VH1, en tanto que las cohortes restantes fueron VH3>VH1>VH4. Dos pacientes argentinos mostraron rearrreglos dobles. Por su parte, el gen *IGHV3-23* fue el más frecuente en Argentina y Uruguay, *IGHV1-69* en Venezuela, e *IGHV3-7* en Uruguay y Venezuela, observándose diferencias poblacionales para *IGHV3-21*, *IGHV3-23* e *IGHV3-7* ( $p \leq 0,0256$ ) (**Figura 1**).

El alineamiento de secuencias permitió observar la presencia de BCREs en el 13,8% del total de pacientes, asociados a IGHV-NM (71%) (**Tabla 2**). Dos casos argentinos y dos venezolanos presentaron homología en el VH CDR3 entre sí, con secuencias no descriptas previamente, pudiendo constituir nuevos clústeres, que denominamos NAR y NVE, respectivamente. Cuando se analizaron los CM, los pacientes argentinos y uruguayos mostraron frecuencias de 12% y 11%, respectivamente, en tanto que los mismos sólo representaron el 5% de los

casos venezolanos. El porcentaje total de BCREs considerando ambos criterios de detección en forma conjunta fue de 16,2%, 20,2% y 15,2% para Argentina, Uruguay y Venezuela, respectivamente. Por su parte, el porcentaje de CM de toda la cohorte fue de 10,4%, mientras que el porcentaje global de BCREs de la serie, considerando los dos métodos de análisis, fue de 15,2%. Asimismo, el clúster #2, asociado a mal pronóstico, fue el más frecuente en los pacientes argentinos (3,13%), y el clúster #4, de curso indolente, en Venezuela y Uruguay (2,53% y 4,04%, respectivamente). El clúster #1, de pronóstico adverso, se encontró presente en el 1,7% del total de los pacientes. En la cohorte uruguaya se observó

un caso correspondiente al clúster #99, satélite del clúster #1, también de pronóstico adverso. Además, el gen *IGHV1-69* pudo asignarse a distintos clústeres: #3, #5, #6, #7 y #59 todos de mal pronóstico. Se observó una gran diferencia en la frecuencia del rearreglo *IGHV3-21*, presente en el 10% de los pacientes venezolanos (siempre asociado a receptor heterogéneo), y en menores porcentajes en la población uruguaya (2%) y argentina (6,5%), en la que el 47% de los casos correspondió al cluster #2. A su vez, la cohorte uruguaya presentó el mayor número de pacientes con el gen *IGHV4-34* incluidos en el clúster #4 (57%).



**Figura 1.** Uso de genes *IGHV*. Diferencia significativa entre Uruguay y Venezuela para los genes *IGHV3-21* e *IGHV3-23* ( $p=0,024$  y  $*p=0,013$ , respectivamente). Diferencia significativa entre Argentina y Uruguay para el gen *IGHV3-7* ( $+p=0,0256$ ).

**Tabla 2.** Receptores esterotipados en distintos países de Latinoamérica

País	Clústeres Stamatoopoulos/Bomben		Agathangelidis Clústeres mayores		BCREs Total (%)
	NM/Total BCREs	Total BCREs/ Total rearreglos (%)	NM/Total BCREs	Total BCREs/Total rearreglos (%)	
Argentina	18/34	34/255 (13.3%)	13/31	31/255 (12.2%)	16,0
Uruguay	14/14	14/99 (14.1%)	6/11	11/99 (11.1%)	20,2
Venezuela	8/12	12/79 (15.2%)	2/4	4/79 (5.1%)	15,2
Cohorte total	40/60	60/433 (13,8%)	21/46	45/433 (10,4%)	15,2

NM: no mutado, BCREs: B-cell receptors estereotipados

### Discusión

En el presente estudio se efectuó el análisis del uso del gen *IGHV*, el estado mutacional y la presencia de BCREs en una larga serie de pacientes con LLC de Argentina, Uruguay y Venezuela, siendo a nuestro conocimiento, el primer estudio multicéntrico que integra pacientes de varios países de América

del Sur, desarrollado en el contexto de LAG-CLL. El análisis de toda nuestra cohorte mostró una distribución similar de casos con genes *IGHV* M y NM que aquéllos reportados para poblaciones occidentales, con sobrerepresentación del estado M<sup>(8,23,24)</sup>. En cuanto a la distribución familiar de *IGHV*, toda la

serie mostró una mayor representación de la familia IGHV3 seguida de IGHV1 e IGHV4. Esta distribución fue distinta en pacientes de Argentina que mostraron IGHV3>IGHV4>IGHV1.

Respecto al uso de los genes *IGHV*, Argentina mostró una mayor heterogeneidad en comparación con Uruguay y Venezuela. Distintas evidencias han sugerido que la expresión del gen *IGHV3-21* en la LLC puede representar un factor pronóstico adverso, independientemente de la presencia de HMS<sup>(13,25,26)</sup>. Sin embargo, estudios de los países mediterráneos demostraron que la LLC con *IGHV3-21* clúster #2 presenta una mayor agresividad clínica, menor tiempo al primer tratamiento (TTT) o hasta la progresión, en comparación con los casos de LLC que expresan *IGHV3-21* no estereotipado<sup>(8,11)</sup>. Esta observación fue confirmada con un estudio de 8593 casos, donde sólo las LLC con *IGHV3-21* estereotipado correspondientes al clúster #2, presentaban un curso agresivo independientemente de su estado mutacional, en tanto que las *IGHV3-21* heterogéneas (no estereotipadas) mostraban un curso dependiente de su estado mutacional<sup>(18)</sup>. Es interesante señalar las diferencias observadas en la distribución de este gen en los distintos países, con una presencia reducida en la cohorte uruguaya, alta frecuencia en pacientes venezolanos y proporción intermedia en la serie argentina (6,7%), este último resultado no esperado teniendo en cuenta el predominio de ascendencia europea procedente de la región mediterránea en la composición genética de la población de este país<sup>(27)</sup>. Datos de la literatura<sup>(28)</sup> muestran una alta frecuencia de *IGHV3-21* en venezolanos mestizos (22,2%), reflejando la importancia de las características genéticas en la ocurrencia de diferentes reordenamientos en distintos grupos étnicos. En este contexto, resulta de interés remarcar que este gen estuvo siempre asociado a receptores heterogéneos en la cohorte venezolana, en tanto que el 47% de los rearrreglos argentinos correspondieron al clúster #2, de mal pronóstico.

Con respecto a los BCREs, el porcentaje de CM de toda la cohorte fue ligeramente inferior al reportado en países europeos (12%)<sup>(12)</sup>, siendo de destacar la baja frecuencia observada en pacientes venezolanos. Estudios en series más numerosas permitirán comprender las bases biológicas de este hallazgo. Por su parte, el porcentaje global de BCREs de la

serie, considerando ambos métodos de detección, fue similar al reportado en cohortes de tamaño comparable<sup>(13,16,17)</sup>. No obstante, los estudios a gran escala han demostrado que estos receptores representan una fracción de alrededor del 20-30% de los casos<sup>(12,19)</sup>.

Con respecto al clúster #4, fue el más frecuente en la cohorte uruguaya y, al igual que en otras series<sup>(12, 19)</sup>, se asoció a una configuración casi exclusivamente M. Estos pacientes se caracterizan por tener una edad temprana al momento del diagnóstico, un TTT largo, un perfil citogenético favorable y un curso clínico indolente a pesar de su edad temprana de presentación<sup>(13,23)</sup>. Con relación al clúster #8, un *subset* muy agresivo complicado por infecciones severas recurrentes, transformación a Richter o la ocurrencia de un tumor sólido secundario<sup>(29)</sup>, fue observado con más frecuencia en la cohorte uruguaya. Concluyendo, el presente estudio aporta, a nuestro conocimiento, los primeros resultados integrados de *IGHV* de distintos países de América del Sur. Nuestros datos muestran diferencias y similitudes en los pacientes con LLC de los tres países analizados, posiblemente relacionadas a factores genéticos y/o ambientales. Simultáneamente, cabe destacar la importancia del análisis de los BCREs, tendiente a precisar con más certeza el pronóstico de la enfermedad en estadios tempranos de la misma, sobre todo cuando están involucrados los clústeres #1, #2, #4 y #8, por ser los más frecuentes y mejor caracterizados a nivel biológico.

#### Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con fondos de Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (ANPCyT), CONICET e Instituto Nacional del Cáncer de Argentina, la Agencia de Investigación e Innovación, Uruguay y el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

#### Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

#### Bibliografía

1. 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.

2. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2008; 371: 1017-29.
3. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP y col. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975; 46: 219-34.
4. Binet JL, Auquier A, Dighiero G y col. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48: 198-206.
5. 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.
6. 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.
7. Chiorazzi N, Rai K and Ferrarini, M. Mechanisms of disease. *Chronic Lymphocytic Leukemia*. *N Engl J Med*. 2005; 352: 804-15.
8. 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.
9. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C y col. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007; 21: 1-3.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Mauerer 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.
15. Chen L, Zhang Y, Zheng W y col. Distinctive IgVH gene segments usage and mutation status in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2008; 32:1491-8.
16. 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.
17. 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.
18. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzimitiou A y col. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood*. 2015; 125: 856-9.
19. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R y col. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017; 31: 282-91.
20. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D y col. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008; 111: 5446-56.
21. Stanganelli C, Dos Santos P, Panero J y col. Análisis del estado mutacional y rearrreglos del gen IGHV en pacientes con leucemia linfocítica crónica y linfoma de células del manto. *Hematología*, 2016; 20: 54-62.

22. Bystry V, Agathangelidis A, Bikos V y col. ARResT/AssignSubsets: a novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy. *Bioinformatics*. 2015;31:3844-6.
23. Marincevic M, Mansouri M, Kanduri M y col. Distinct gene expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica*. 2010; 95: 2072-9.
24. 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.
25. 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.
26. Thornsélius M, Kröber A, Murray F y col. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in V3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutation status. *Blood*. 2006; 107: 2889-94.
27. Avena S, Via M, Ziv E y col. Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *PLoS ONE*. 2012; 7: e34695.
28. Marquez ME, Deglesne P-A, Lopez JL y col. Unexpectedly high frequency of European parentage in Venezuelan patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph*. 2012; 53:235-41.
29. 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.