

Tesis Doctoral

Impacto de las variantes genéticas de susceptibilidad a leucemia linfocítica crónica y de la vía de la autofagia sobre la supervivencia y la progresión de la enfermedad

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular (B16.56.1)

Línea Bioquímica y Biología Molecular en Ciencias de la Vida



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Antonio José Cabrera Serrano

Noviembre 2024, Granada

Directores de tesis:

Juan Sainz Pérez

Manuel Jurado Chacón



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA



HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

Tesis Doctoral

Impacto de las variantes genéticas de susceptibilidad a Leucemia Linfocítica Crónica y de la vía de la autofagia sobre la supervivencia y la progresión de la enfermedad

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular (B16.56.1)

Línea Bioquímica y Biología Molecular en Ciencias de la Vida



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Antonio José Cabrera Serrano

Lugar de realización: Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO)

Fecha de inicio: 06/03/2021
Fecha de finalización: 16/11/2024



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Antonio José Cabrera Serrano
ISBN: 978-84-1195-743-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/103182>

DERECHOS DE AUTOR

El doctorando D. Antonio José Cabrera Serrano y los directores de tesis D. Juan Sainz Pérez y D. Manuel Jurado Chacón.

Garantizan al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de sus directores de tesis y hasta donde su conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 10 de noviembre de 2024

Doctorando

Antonio José Cabrera Serrano

Director

Director

Fdo: Juan Sainz Pérez

Fdo: Manuel Jurado Chacón

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Antecedentes. Leucemias.....	5
1.2. Leucemia linfocítica crónica.....	10
1.2.1. Leucemia linfocítica de células pequeñas	11
1.2.2. Linfocitosis monoclonal de células B	11
1.2.3. Epidemiología de la LLC	12
1.2.4. Localización y progresión	14
1.2.5. Manifestaciones clínicas	15
1.2.6. Diagnóstico clínico.....	17
1.2.7. Estratificación clínica de pacientes	19
1.2.8. Tratamiento	25
1.3. Genética en la LLC	32
1.3.1. Riesgo genético familiar.....	32
1.3.2. Alteraciones cromosómicas/citogenéticas.....	34
1.3.3. Estudios de secuenciación	38
1.3.4. Estudios de epigenoma.....	45
1.3.5. Estudios de asociación del genoma completo	49
1.4. Vías implicadas en la patogénesis de la LLC. Autofagia	53
1.4.1. Autofagia.....	54
1.4.2. Mecanismo de la autofagia.....	55
1.4.3. Autofagia en la hematopoyesis	59
1.4.4. Autofagia en la LLC.....	62
1.4.5. Variación genética germinal asociada con la autofagia	64
2. JUSTIFICACIÓN.....	66

3. OBJETIVOS	68
4. METODOLOGÍA.....	69
4.1. Diseño del estudio.....	69
4.2. Población de estudio	69
4.3. Selección de polimorfismos de un solo nucleótido	76
4.4. Recogida de muestras biológicas y base de datos.....	79
4.5. Conservación, extracción y cuantificación del material biológico	79
4.6. Genotipado y control de calidad	80
4.7. Equilibrio de Hardy-Weinberg	82
4.8. Estudio de asociación.....	83
4.9. Meta-análisis.....	83
4.10. Análisis de supervivencia global y tiempo hasta el primer tratamiento en la cohorte CRuCIAL.....	84
4.11. Creación de modelos predictivos de supervivencia y progresión.....	85
4.12. Impacto de las variantes genéticas relacionadas con la autofagia en el flujo de autofagia.....	86
4.13. Efecto funcional de las SNPs identificados en las respuestas inmunitarias.....	87
4.14. Correlación de los SNPs identificados con los recuentos de células sanguíneas y los perfiles proteómicos séricos/plasmáticos	88
4.15. Correlación entre los SNPs identificados y las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroideas.....	89
4.17. Análisis funcionales <i>in silico</i>	90
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
Primera fase del estudio.....	91
5.1. Impacto de las variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para la LLC sobre la supervivencia general del paciente	91
5.2. Impacto de las variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para la LLC sobre la progresión de la enfermedad	96

5.3. Análisis funcionales de las variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para la LLC sobre la supervivencia y progresión de la enfermedad.....	104
Segunda fase del estudio.....	109
5.4. Impacto de las variantes genéticas asociadas con la autofagia en el riesgo a desarrollar la LLC.....	109
5.4.1. Análisis estratificado por genero de las variantes genéticas asociadas con la autofagia en el riesgo a desarrollar la LLC en la cohorte CRuCIAL.....	114
5.5. Análisis de asociación de las variantes relacionadas con la autofagia en la supervivencia global y la progresión de los pacientes de LLC en la cohorte CRuCIAL	116
5.6. Impacto de las variantes relacionadas con la autofagia en el flujo de autofagia	118
5.7. Análisis funcionales de las variantes relacionadas con la autofagia.....	120
6. CONCLUSIONES.....	129
6. CONCLUSIONS	130
7, BIBLIOGRAFIA	132
8. ANEXO I.....	198
9, ANEXO II	217
9.1. Tabla suplementaria 1	217
9.2. Tabla suplementaria 2.....	222
9.3. Tabla suplementaria 3	224
9.4. Tabla suplementaria 4.....	227
10. ANEXO III	236
10.1. Lista de publicaciones incluidas en esta Tesis.....	236
10.2. Lista de publicaciones no incluidas en esta Tesis.....	236
10.3. Presentaciones en eventos científicos	238
10.4. Otros méritos.....	240

ABREVIATURAS

ABL1: *Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1*

ACAT: Acetyl-CoA Acetyltransferase

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALC (*Absolute Lymphocyte Count*): Recuento absoluto de linfocitos

AMBRA1 (*Activating Molecule in Beclin-1 Regulated Autophagy*): Molécula Activadora en la Autofagia Regulada por Beclin-1

AMPK (*AMP-activated protein Kinase*): Proteína quinasa activada por AMP

APC (*Antigen-Presenting Cell*): Células presentadoras de antígenos

ARID1A (*AT-Rich interactive Domain-containing protein 1A*): Proteína que contiene un dominio interactivo rico en A/T 1A

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATG: *Autophagy-related*

ATG101: *Autophagy-related 101*

ATG12: *Autophagy-related 12*

ATG13: *Autophagy-related 13*

ATG14L: *Autophagy-related 14 like*

ATG16L: *Autophagy-related 6 like*

ATG2B: *Autophagy-related 2B*

ATG5: *Autophagy-related 5*

ATG6: *Autophagy-related 6*

ATG8: *Autophagy-related 8*

ATG9: *Autophagy-related 9*

ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*

AUROC (*Area Under the Receiver Operating Characteristic*): Área Bajo la Curva de Característica Operativa del Receptor

BAFF (*B-cell Activating Factor*): Factor activador de células B

BCL2: *B-cell lymphoma 2*

BclXL: *B-cell lymphoma-extra large*

BCR: *Breakpoint Cluster Region*

BIRC3: *Baculoviral IAP Repeat Containing 3*

Bnip3: *BCL2 Interacting Protein 3*

BR: Bendamustina y Rituximab

Breg: Células B reguladoras

BTK (Bruton Tyrosine Kinase): Tirosina quinasa de Bruton

caQTL (*Chromatin accessibility quantitative trait locus*): Locus de Rasgo Cuantitativo de Accesibilidad de la Cromatina

CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cell*): Células T con Receptor de Antígeno Quimérico

CBX7: *Chromobox 7*

CD10 (*cluster of differentiation 10*): Grupo de diferenciación 10

CD11 (*cluster of differentiation 11*): Grupo de diferenciación 11

CD19 (*cluster of differentiation 19*): Grupo de diferenciación 19

CD20 (*cluster of differentiation 20*): Grupo de diferenciación 20

CD22 (*cluster of differentiation 22*): Grupo de diferenciación 22

CD23 (*cluster of differentiation 23*): Grupo de diferenciación 23

CD43 (*cluster of differentiation 43*): Grupo de diferenciación 43

CD5 (*cluster of differentiation 5*): Grupo de diferenciación 5

CD79a (*cluster of differentiation 79a*): Grupo de diferenciación 79a

CD79b (*cluster of differentiation 79b*): Grupo de diferenciación 79b

CD81 (*cluster of differentiation 81*): Grupo de diferenciación 81

CDCA7L: *Cell Division Cycle Associated 7 Like*

CHD2: *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 2*

ChIP-Seq (*Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*): Secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina

CIBERESP: Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública

CIT (*Cytotherapeutic Immunotherapy*): Células Inmunitarias Terapéuticas

CLL-IPi (*Chronic Lymphocytic Leukemia International Prognostic Index*): Índice de Pronóstico Internacional para la Leucemia Linfocítica Crónica

CNV (*Copy Number Variation*): Variación en el número de copias

CpG (*Cytosine-phosphate-Guanine*): Citosina-fosfato-Guanina

cQTL (*cell type-specific Quantitative Trait Locus*): Locus de rasgo cuantitativo específico de tipo celular

CRuCIAL: *Consortium for Research in Chronic lymphocytic Leukemia*

TC: Tomografía computarizada

CUL5: *Cullin 5*

CXXC1: *CXXC Finger Protein 1*

DLBCL (*Diffuse Large B-cell Lymphoma*): Linfoma difuso de células B grandes

DLEU1: *Deleted in Lymphocytic Leukemia 1*

DLEU2: *Deleted in Lymphocytic Leukemia 2*

DNMT3A: *DNA methyltransferase 3 alpha*

DUX4: *Double Homeobox 4*

EBV (*Epstein-Barr Virus*): Virus asociados al Epstein-Barr

ECOG PS (*Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*): Estado funcional del Grupo Cooperativo Oncológico del Este

EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*): Ácido etilendiaminotetraacético

EE.UU.: Estados Unidos de América

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas

EMR: Enfermedad mínima residual

eQTL (*Expression quantitative trait locus*): Loci de expresión cuantitativa

EXPH2: *Exophilin 2*

EZH2: *Enhancer of Zeste Homolog 2*

FBXW7: *F-box and WD repeat domain containing 7*

FCR: Fludarabina, Ciclofosfamida y Rituximab

FGFR1: *Fibroblast Growth Factor Receptor 1*

FIP200: *Focal Adhesion Kinase Family Interacting Protein of 200 kDa*

FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*): Hibridación in situ fluorescente

FMC7 (*Fetal-Maternal Cell 7*): Marcador Célula Feto-Materna 7

FOX: *Forkhead Box*

FRDX1: *Ferredoxin 1*

GABARAP: *Gamma-Aminobutyric Acid Receptor-Associated Protein*

GATA: Factores de transcripción GATA

GEC (*Genetic Epidemiology of CLL Consortium*): Consorcio de Epidemiología Genética de LLC

GSKIP: *GSK3 β -interacting protein*

GWAS: (*Genome-Wide Association Studies*): Estudios de asociación del genoma completo

H2AX: *Histone H2A.X*

H3K27ac (*Acetylation of lysine 27 on histone H3*): Acetilación de la lisina 27 en la histona H3

H3K27me3 (*Methylation of lysine 27 on histone H3*): Metilación del residuo de lisina 27 en la histona H3

H3K4me3: (*Methylation of lysine 4 on histone H3*): Metilación del residuo de lisina 27 en la histona H3

Hb: Hemoglobina

HDAC: (*Histone Deacetylase*): Desacetilasa de histonas

HFGP (*Human Functional Genomic Project*): Proyecto Genómico Funcional Humano

HIF1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha*): Factor Inducible por Hipoxia 1 alfa

HOPS (*Homing and Protein Transport System*): Sistema de Transporte y Aterrizaje de Proteínas

HOX: *Homeobox*

hQTL (*Histone modification quantitative trait locus*): Locus de rasgos cuantitativos de modificación de histonas

HR (*Hazard Ratio*): Cociente de riesgo

HSC (*Hematopoietic Stem Cell*): Célula madre hematopoyética

HWE (*Hardy-Weinberg Equilibrium*): Equilibrio de Hardy-Weinberg

IBD (*Identity by Descent*): Identidad por descendencia

IC: Intervalo de confianza

ICD (*International Classification of Diseases*): Clasificación Internacional de Enfermedades

IFN: Interferón

IFN γ : Interferón gamma

IgD: Inmunoglobulina D

IGHV (*Immunoglobulin Heavy Chain Variable*): Cadena pesada de inmunoglobulina variable

IgM: Inmunoglobulina M

IKZF3: *IKAROS Family Zinc Finger 3*

IL10: Interleucina 10

IL17: Interleucina 17

IL18R1: Interleucina 18 receptor 1

IL1Ra: Antagonista del receptor de interleucina 1

IL1 β : Interleucina 1 beta

IL22: Interleucina 22

IL6: Interleucina 6

IL8: Interleucina 8

INE: Instituto Nacional de Estadística

InterLymph (*International Lymphoma Epidemiology Consortium*): Consorcio Internacional de Epidemiología del Linfoma

IPSE-CLL (*International Prognostic Score for Early-stage CLL*): Puntuación Pronóstica Internacional para CLL en etapa temprana

IRF2BP2: *Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2*

IRF4: *Interferon Regulatory Factor 4*

IRF8: *Interferon Regulatory Factor 8*

ITGB2: *Integrin Beta 2*

iwCLL (*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*): Taller Internacional sobre Leucemia Linfocítica Crónica

KDEL2: *KDEL Containing 2*

KLF2: *Kruppel-like factor 2*

KLHL6: *Kelch-like protein 6*

LAMP1/2 (*Lysosome-associated membrane proteins 1 and 2*): Proteínas de membrana asociadas a lisosomas 1 y 2

LC3-II (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*): Proteína 1A/1B asociada a microtúbulos - cadena ligera 3

LD: (Lymphocyte Depletion): Depleción de linfocitos

LDT (*Lymphocyte Doubling Time*): Tiempo de duplicación de linfocitos

LH: Linfoma de Hodgkings

LLA: Leucemia linfocítica aguda

LLC: Leucemia linfocítica crónica

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crónica

lncRNA: ARN largo no codificante

LNH: Linfoma no Hodgkin

LPS: Lipopolisacáridos

MAF (*Minor allele frequency*): Frecuencia del alelo menor

MBL (*Monoclonal B-cell lymphocytosis*): Linfocitosis monoclonal de células B

Mcl-1: *Myeloid Cell Leukemia 1*

MDM: Monocitos derivados de macrófagos

MDM2: *Murine Double Minute 2*

MEF2A: *Myocyte Enhancer Factor 2A*

MGCD0103: Mocetinostat

MGCD013: Sabutoclax

miRNA (*microRNA*): microARN

MRE11: *Meiotic Recombination 11*

mTOR: *Mechanistic Target of Rapamycin*

mTORC1: *Mechanistic Target of Rapamycin 1*

mTORC2: *Mechanistic Target of Rapamycin 2*

MYD88: *Myeloid Differentiation Primary Response 88*

NCI (*National Cancer Institute*): Instituto Nacional del Cáncer

ncRNA (*non-coding RNA*): ARN no codificante

NFATC4: *Nuclear Factor of Activated T-Cells, Cytoplasmic 4*

NGS (*Next-Generation Sequencing*): Secuenciación de nueva generación

NK- κ B: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NMD: Neoplasias mielodisplásicas

NMP: Neoplasias mieloproliferativas

NOS: *Not otherwise specified*

NOTCH1: *Notch Homolog 1*

NPAT: *Nuclear Protein, Ataxia-Telangiectasia Mutated*

NPM1: *Nucleophosmin 1*

OCT2: *Octamer-Binding Transcription Factor 2*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR (*Odds Ratios*): Razón de riesgo

ORF (*Open Reading Frame*): Marco de lectura abierto

PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*): Células mononucleares de sangre periférica

PCMI: *Pericentriolar Material 1*

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa

PDGFRA: *Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*

PDGFRB: *Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta*

PE: Fosfatidiletanolamina

PEST: dominio PEST (posiblemente relacionado con la señalización)

PFS (*Progression-Free Survival*): Supervivencia libre de progresión

PHA (*Phytohemagglutinin*): Fitohemaglutinina

PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa

PIP3: Fosfatidilinositol-3-fosfato

POT1: *Protection of Telomeres 1*

POU2F2: *POU Class 2 Homeobox 2*

PRS (*Polygenic Risk Score*): Puntuaje de Riesgo Poligénico

PTPN11: *Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11*

PU1: *PU Box Transcription Factor 1*

RAB39: *Ras-related protein Rab-39*

RAPTOR: *Regulatory Associated Protein of mTOR*

RDX: *Radixin*

RE: Retículo endoplasmático

REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer

Rheb: *Ras homolog enriched in brain*

RNA-seq (*RNA sequencing*): Secuenciación de ARN

RNAi: ARN de transferencia

ROR1: *Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor 1*

ROS (*Reactive Oxygen Species*): Especies reactivas de oxígeno

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RPS15: *Ribosomal Protein S15*

RT: Transformación de Richter

SDS: *Software for Data Science*

SEER: *Surveillance, Epidemiology, and End Results*

SETD1: *SET Domain Containing 1*

SETD2: *SET Domain Containing 2*

SF3B1: *Splicing Factor 3b Subunit 1*

SG: Supervivencia general

SLAMF1: *Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 1*

SLL (*Small Lymphocytic Lymphoma*): Linfoma linfocítico de células pequeñas

SMCHD1: *Structural Maintenance of Chromosomes Flexible Hinge Domain 1*

SNAREs: *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Proteins*

sncRNA (*small non-coding RNA*): ARN no codificante pequeño

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*): Polimorfismo de un solo nucleótido

SQSTM1: *Sequestosome 1*

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TBS (*Tris-buffered saline*): Solución salina tamponada con tris

TBS-T (*Tris-buffered saline with Tween*): Solución salina tamponada con tris y Tween)

TCR (T-cell receptor): Receptor de células T

THPT: Tiempo hasta el primer tratamiento

TLRs (*Toll-like receptors*): Receptores tipo Toll

TNF α (*Tumor Necrosis Factor alpha*): Factor de Necrosis Tumoral alfa

TP53: *Tumor Protein p53*

ULK1: *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*

UVRAG: *UV Radiation Resistance Associated Gene*

VPS15: *Vacuolar Protein Sorting 15*

VPS34: *Vacuolar Protein Sorting 34*

WAC: *WW Domain Containing Adaptor with Coiled-Coil*

WES (*Whole Exome Sequencing*): Secuenciación del exoma completo

WGBS (*Whole Genome Bisulfite Sequencing*): Secuenciación de bisulfito de genoma completo

WIPI: *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein*

XPO1: *Exportin 1*

ZMYM3: *Zinc Finger MYM-Type 3*

ZNF292: *Zinc Finger Protein 292*

ZNF384: *Zinc Finger Protein 384*

β 2M: beta-2-microglobulina

RESUMEN

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la forma más común de leucemia en adultos en los países occidentales. Aunque esta enfermedad puede seguir un curso indolente, en otros casos progresa rápidamente, se vuelve resistente al tratamiento y puede transformarse en un linfoma de células B más agresivo. Aunque los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) han identificado parte del componente genético de la línea germinal que subyace a la susceptibilidad a la LLC, el uso potencial de estas variantes para predecir la progresión de la enfermedad y la supervivencia del paciente sigue siendo una incógnita. Así mismo, aún desconocemos la importancia que las variantes genéticas en la ruta de la autofagia tienen sobre la etiología de la enfermedad, su progresión y supervivencia de los pacientes. En esta tesis, nuestro objetivo fue dilucidar los determinantes genéticos asociados con la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes, y profundizar en el papel que la autofagia tiene en el desarrollo de la LLC. Por último, trabajamos en la caracterización funcional de las variantes genéticas consideradas de interés.

En el primer estudio, incluido en esta tesis, se evaluó si la presencia de 41 variantes genéticas de susceptibilidad para la LLC identificadas previamente en estudios de GWAS nos podían ayudar a predecir la supervivencia global (SG) y el tiempo hasta el primer tratamiento (THPT) en 1.039 pacientes con LLC. Nuestros resultados mostraron que, a pesar de que algunos polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNPs) asociaban débilmente con la SG y el THPT de los pacientes, estas asociaciones no eran significativas tras la correcciones por comparaciones múltiples. Además, los puntajes de riesgo poligénico (PRSs) generados con estos SNPs mostraron una baja capacidad para predecir la SG de los pacientes y el THPT, con áreas bajo la curva ROC (AUROC, por sus siglas en inglés) de 0,57 y 0,62 respectivamente. Este ha sido el mayor estudio realizado hasta la fecha para evaluar el efecto que las variantes genéticas de susceptibilidad para la LLC tienen sobre la SG de los pacientes y el THPT y nos ha permitido comprobar de forma inequívoca que las variantes genéticas de susceptibilidad para la LLC no afectan sustancialmente a la SG de los pacientes con LLC y confirmar resultados previos que sugerían un efecto nulo de estas variantes genéticas en la determinación del THPT.

En el segundo estudio, que forma parte de esta tesis, se analizaron más de 55.000 SNPs relacionados con la autofagia en cuatro poblaciones independientes, incluyendo un total

de 5.472 casos de LLC y 726.465 controles. Esta investigación identificó asociaciones significativas con los genes *CDKN2A* y *BCL2*, que se correlacionaron con un mayor riesgo de desarrollar LLC. La variante más significativa fue la asociada a *CDKN2A* ($p = 1.57 \times 10^{-12}$). También se validaron asociaciones previamente conocidas para los genes *FAS*, *BCL2* y *BAK1*, que están implicados en la regulación de la autofagia y la apoptosis celular. A nivel molecular, los SNPs en los genes *CDKN2A* y *FAS* se correlacionaron con niveles elevados de expresión de *CDKN2A* y *ACTA2* en sangre y linfocitos, lo que sugiere que estas variantes pueden afectar la respuesta inmune y los procesos celulares clave. No obstante, el estudio no encontró una asociación significativa entre estas variantes y el flujo de autofagia, ni con la progresión de la enfermedad o la supervivencia de los pacientes, lo que indica que estas variantes podrían ser más relevantes para la iniciación de la LLC que para su evolución posterior.

Palabras clave: Leucemia linfocítica crónica, variantes genéticas, autofagia, susceptibilidad, supervivencia global, tiempo hasta el primer tratamiento, puntuación de riesgo poligénico.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common form of adult leukemia in Western countries. Although this disease may follow an indolent course, in some cases it progresses rapidly, becomes resistant to treatment and/or transforms into a more aggressive B-cell lymphoma. Although genome-wide association studies (GWAS) have uncovered part of the germline genetic component underlying CLL susceptibility, the potential use of these variants to predict disease progression and patient survival remains unknown, as does the role of the autophagy-related genetic variants in disease etiology, progression and survival. In this thesis, we aimed to elucidate the genomic determinants associated with disease progression and survival, further investigate the role of autophagy in CLL, and functionally characterize the most promising genetic variants.

In the first study, 41 variants previously identified in GWAS studies were evaluated to determine whether they could predict overall survival (OS) and time to first treatment in 1,039 patients with CLL. Although some SNPs showed weak associations with OS and THPT, these were not significant after applying corrections for multiple testing. Furthermore, the polygenic risk scores (PRSs) generated with these SNPs show a low ability to predict survival and disease progression, with areas under the ROC curve (AUROC) of 0.57 for OS and 0.62 for THPT. Although this is the largest study evaluating the effect of GWAS-identified susceptibility variants for CLL on OS, the results suggest that CLL susceptibility variants do not substantially affect overall survival in CLL patients and confirm previous results suggesting no effect of these variants on THPT.

In the second study, more than 55,000 autophagy-related SNPs were analyzed in four independent populations, including a total of 5,472 CLL cases and 726,465 controls. This research identified significant associations with the genes *CDKN2A* and *BCL2*, which were correlated with an increased risk of developing CLL. The most significant variant was the one associated with *CDKN2A* ($p=1.57\times 10^{-12}$). Previously known associations were also validated for the genes *FAS*, *BCL2*, and *BAK1*, which are involved in the regulation of autophagy and cell apoptosis. At the molecular level, SNPs in the *CDKN2A* and *FAS* genes were correlated with elevated expression levels of *CDKN2A* and *ACTA2* in blood and lymphocytes, suggesting that these variants may affect immune response and key cellular processes. However, the study found no significant association between

these variants and autophagic flux, disease progression or survival, indicating that these variants might be more relevant to the initiation of CLL than to its subsequent evolution.

Key words: Chronic lymphocytic leukemia, genetic variants, autophagy, susceptibility, overall survival, time to first treatment, polygenic risk score.

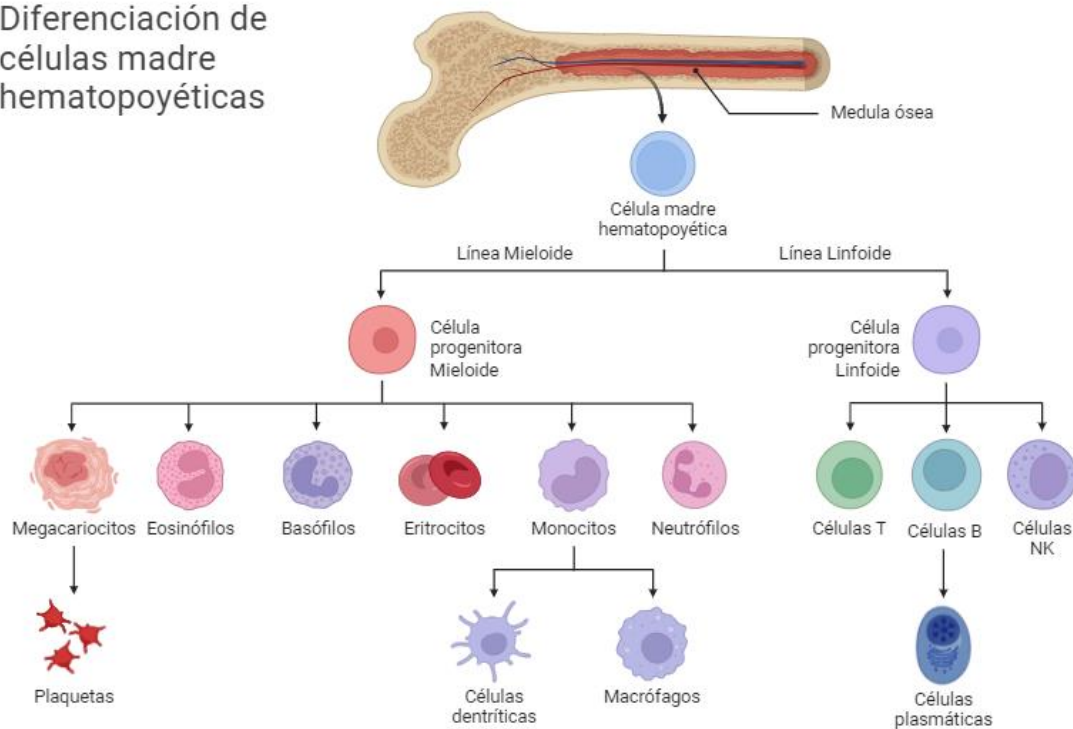
1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes. Leucemias

Las leucemias constituyen un grupo de hemopatías cuyo origen es la diferenciación y proliferación clonal de las células leucémicas hematopoyéticas provocando una desregulación de la hematopoyesis en el individuo (Taylor et al., 2017a). La hematopoyesis es un proceso crucial en la generación y renovación de las distintas subpoblaciones de células sanguíneas a partir de células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) en la médula ósea (Figura 1). Como resultado del proceso de hematopoyesis, se originan dos líneas celulares distintas. La primera es la línea mieloide, que da lugar a los eritrocitos (o glóbulos rojos), las plaquetas, los granulocitos (incluyendo basófilos, neutrófilos y eosinófilos) y los monocitos. La segunda es la línea linfoide, que genera las células T (o linfocitos T), las células B (o linfocitos B), y las células NK (Djavaheri-Mergny et al., 2019a; Lai & Kondo, 2008; Ruiz et al., 2022).

Figura 1. Modelo clásico de hematopoyesis.

Diferenciación de células madre hematopoyéticas



En las últimas décadas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado diferentes ediciones de la guía de clasificación de los tumores de tejidos hematopoyéticos

y linfoides en las que ha descrito como se deben clasificar, identificar y tratar las distintas leucemias y el resto de neoplasias hematológicas (Swerdlow S.H. et al., 2008, 2017). Esta clasificación se ha basado principalmente en el tipo celular afectado, el estado de maduración celular y la velocidad de proliferación, identificando más de 30 subtipos. La OMS ha descrito que, en su mayoría, las células leucémicas son capaces de migrar al torrente sanguíneo, los ganglios linfáticos, el cerebro, la médula espinal y otras partes del cuerpo produciendo numerosos daños en los órganos del paciente y agravando la enfermedad, pero además en muchos casos produciendo una disfunción del sistema inmune que desemboca en una inmunodeficiencia frente a las infecciones. Sin embargo, en la quinta y última edición, se han introducido numerosos cambios significativos en la categorización de estas neoplasias hematológicas, con un mayor enfoque en las características genéticas y moleculares de las células leucémicas (Alaggio et al., 2022; Khoury et al., 2022). La aplicación de todo este conocimiento en la clínica en los últimos años refleja un avance continuo en la comprensión de las neoplasias hematológicas, y subraya la creciente relevancia de la medicina personalizada para el diagnóstico, el pronóstico, y el desarrollo y tratamiento de estas enfermedades. Este enfoque no solo ha permitido una caracterización más precisa de las patologías hematológicas a nivel molecular, sino que también ha facilitado la implementación de estrategias terapéuticas más eficaces, adaptadas a las particularidades genéticas de cada paciente.

A continuación, vamos a describir las principales categorías identificadas en la última edición de la guía de la OMS para los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides (Alaggio et al., 2022; Khoury et al., 2022).

- **Leucemia mieloide aguda**

La leucemia mieloide aguda (LMA), también conocida como leucemia mielógena aguda se origina cuando se produce una proliferación incontrolada de glóbulos blancos inmaduros de tipo mieloblastos en médula ósea y sangre. Esta leucemia es la segunda más común en niños (15-20% de todos los casos de leucemia infantil) (Arber et al., 2022), pero también se da comúnmente en adultos mayores. Además, la LMA se puede dividir principalmente en dos grandes grupos.

- LMA con anormalidades genéticas definidas: Son aquellas que presentan mutaciones genéticas específicas o translocaciones cromosómicas, como por ejemplo las mutaciones en *NPM1* y la translocación t(8;21) En función

de la presencia de estas alteraciones genéticas se produce una clasificación más precisa capaz de influir directamente en las decisiones terapéuticas.

- LMA, no clasificada (NOS, por sus siglas en inglés): Son todas aquellas LMAs que no presentan anomalías genéticas específicas, de modo que este grupo se analiza y caracteriza por criterios morfológicos y citoquímicos, de uso habitual en la práctica clínica.

- **Leucemia Linfoblástica Aguda**

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se produce cuando se da una proliferación rápida y descontrolada de linfoblastos inmaduros en médula ósea. Esta leucemia es la más común en niños representando el 75-80% de todos los casos de leucemia infantil (Arber et al., 2022), aunque también puede presentarse en adultos. Esta es la leucemia que más cambios ha sufrido en las sucesivas ediciones de la guía de la OMS de los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides debido a la importancia de la genética en la clasificación de los subtipos. Estos avances en la genética han sido posibles gracias a las nuevas técnicas de secuenciación del transcriptoma, que ha permitido identificar nuevos subtipos:

- LLA de células B: En este subgrupo las células afectadas son las células B (o linfocitos B) y tiene una fuerte implicación la genética en la clasificación de los subtipos, ya que están definidos por la presencia de alteraciones genéticas específicas, como las mutaciones en *DUX4*, *ZNF384*, entre otros genes. El análisis de estas mutaciones facilita un diagnóstico más detallado y unas opciones terapéuticas más efectivas.
- LLA de células T: En este caso las células afectadas son las células T (o linfocitos T) y al contrario que el grupo anteriormente comentado, este tipo de LLA no se basa en características genéticas y actualmente está en revisión, por lo que la OMS podría incorporar cambios en las próximas ediciones en función de los nuevos descubrimientos.

- **Leucemia linfocítica crónica**

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es el tipo de leucemia es la más común en adultos en los países occidentales y se puede englobar dentro del grupo de neoplasias linfoides. Se caracteriza por la proliferación y acumulación incontrolada de linfocitos B maduros

en médula ósea y sangre, aunque también suele afectar a los ganglios linfáticos. A pesar de que esta leucemia no tiene subtipos específicos, la genética juega un papel fundamental en el diagnóstico, su clasificación para la selección de las terapias de tratamiento y el pronóstico.

- **Neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia**

Este tipo de leucemias se caracterizan por la proliferación de células mieloides o linfoides asociadas con un aumento significativo de eosinófilos en sangre. En las anteriores ediciones este grupo se definía principalmente por la morfología y características clínicas, pero en la nueva edición de 2022, gracias de nuevo al avance en la genética, se distinguen varios subtipos en función de la presencia de translocaciones específicas que afectan a genes como *PDGFRA*, *PDGFRB* y *FGFR1*.

- **Neoplasias mielodisplásicas y Neoplasias mieloproliferativas**

Aunque las neoplasias mielodisplásicas (NMD) y las neoplasias mieloproliferativas (NMP) no se definen estrictamente como leucemias, están muy estrechamente relacionadas con ellas, ya que ambas neoplasias se deben a trastornos clonales de las HSCs, que dan lugar a las distintas células sanguíneas en la médula ósea. De hecho, dentro de las NMD podemos encontrar la leucemia mieloide crónica (LMC) que se caracteriza principalmente por la fusión del gen *BCR-ABL1*, dando lugar al cromosoma Filadelfia. En el resto de los subgrupos de estas neoplasias es muy común que se acabe desarrollando una LMA.

- **Linfomas**

Por último, los linfomas son un grupo de patologías que no se definen estrictamente como leucemias ya que, aunque las células afectadas son las mismas, el origen son los ganglios linfáticos o el tejido linfático. Al igual que en muchas de las leucemias anteriormente descritas, este grupo de neoplasias se ha visto favorecido por los avances genéticos que han permitido una mayor integración de las características genéticas en su clasificación y estratificación. Los dos grupos más característicos son:

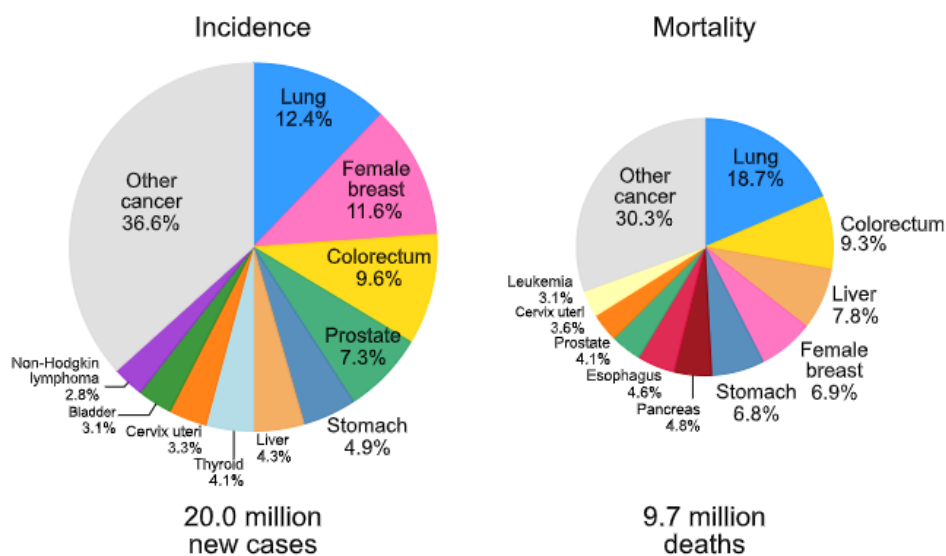
- Linfoma de Hodgkin (LH): Caracterizado por la presencia de células grandes y anormales derivadas de linfocitos B, llamadas “Reed-

Sternberg”. Podemos encontrar una subdivisión de este grupo en dos: LH clásico y LH nodular con predominio linfocítico.

- Linfomas no Hodgkin (LNH): En este grupo podemos encontrar un número muy heterogéneo de enfermedades relacionadas con los linfomas como los linfomas de células B (linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt y otros), los linfomas de células T (Linfoma anaplásico de células grandes y linfoma angioinmunoblástico) y los linfomas relacionados con inmunodeficiencia (asociados a virus como el Epstein-Barr (EBV)).

El impacto de este tipo de hemopatías ha aumentado en los últimos años, constituyendo, solo las leucemias estrictas, aproximadamente el 2,4% (486.777 casos diagnosticados) de todos los tumores diagnosticados en ambos sexos en el mundo. En el año 2020, tuvieron un índice de fallecimientos en torno al 3,1% (305.405 casos fallecidos) (Figura 2) (Bray et al., 2024). Cuando estratificamos los resultados por género podemos apreciar como la incidencia y gravedad de la enfermedad es mayor en hombres que en mujeres. Mientras que la incidencia en hombres es del 6,2% (27.824 casos) y la tasa de mortalidad es del 3,7% (173.063 casos), en mujeres el porcentaje de incidencia es del 4,4% (208.953 casos) y la tasa de mortalidad es del 2.5% (131.970 casos).

Figura 2. Gráficos circulares que presentan la distribución de casos y muertes de los tipos de cáncer más comunes en 2022 para ambos sexos (Bray et al., 2024).



En España, según la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), la estimación de nuevos diagnósticos en 2024 es de 5.861 en ambos sexos, de los cuales se estima 3.385 sean en hombres y 2.476 en mujeres, lo cual está en línea con las estimaciones mundiales previamente descritas. Asimismo, los porcentajes de mortalidad actualizados para el año 2022 por el Instituto Nacional de Estadística (INE), muestran un porcentaje de mortalidad para las leucemias en ambos sexos de 2,91% (3.344 casos fallecidos), A diferencia de las estimaciones mundiales previamente descritas, la tasa de mortalidad en hombres es ligeramente menor, 2,81% (1.914 casos fallecidos), mientras que la de mujeres es ligeramente superior, 3,04% (1.430 casos fallecidos) (Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), 2022).

1.2. Leucemia linfocítica crónica

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una enfermedad que pertenece al grupo de las neoplasias linfoides y fue descrita por primera vez como una entidad leucémica independiente por Virchow en 1845 (Virchow, 1845). Sin embargo, no fue hasta la primera década de 1900 que se reconoció a la LLC como una leucemia independiente (Osler, 1909; Turk, 1903).

Es considerada la leucemia más común en adultos en los países occidentales y actualmente, es una enfermedad incurable cuyos tratamientos se centran en paliar los síntomas y en mejorar y alargar la calidad de vida de los pacientes. Se caracteriza principalmente por la proliferación y acumulación clonal descontrolada de células B maduras en la médula ósea y sangre periférica. Estas células suelen tener un inmunofenotipo IgM/IgD⁺, CD20⁺, CD5⁺, CD22⁺, CD79a⁺, CD43⁺, CD19⁺, CD23⁺ y CD11 (débil) y migran a otras zonas del cuerpo, incluidos los ganglios linfáticos, el hígado y el bazo. (Alaggio et al., 2022; Hallek & Al-Sawaf, 2021). Existe además una variable de esta enfermedad, donde las células B afectadas poseen una morfología diferente y un inmunofenotipo poco característico, con la falta de expresión de uno o más de los antígenos de superficie previamente descritos, generalmente CD5 y CD23. Cuando esto ocurre y no se cumplen los criterios para el diagnóstico de ningún otro linfoma de células B, se diagnostica una variante de esta enfermedad llamada LLC atípica (Robak et al., 2023).

La acumulación de las células B monoclonales en los pacientes suele provocar leucocitosis, insuficiencia de la médula ósea, infecciones recurrentes y, a veces, enfermedades autoinmunes como la anemia hemolítica. Generalmente, el desarrollo de la enfermedad es lento, produciéndose una alteración tanto en el proceso de formación como en el funcionamiento de las propias células B, motivo por el cual los pacientes no suelen mostrar síntomas hasta que la enfermedad está avanzada (Alaggio et al., 2022; Hallek & Al-Sawaf, 2021).

1.2.1. Leucemia linfocítica de células pequeñas

Basándose en sus características morfológicas e inmunofenotípicas similares, la leucemia linfocítica de células pequeñas (SLL, por sus siglas en inglés) y la LLC se consideran dos manifestaciones diferentes de la misma enfermedad (Jaffe, 2009; Swerdlow S.H. et al., 2008). El término SLL se utiliza para casos no leucémicos donde los pacientes presentan solo linfadenopatía, organomegalia y un recuento inferior a 5×10^9 células leucémicas/litro (sin linfocitosis en sangre periférica), pero con una morfología tisular y el inmunofenotipo similar al de la LLC. Su diagnóstico debe ser confirmado mediante una evaluación histopatológica de una biopsia de los ganglios linfáticos (siempre que sea posible). La principal diferencia de la SLL respecto a la LLC es que la acumulación de células B se produce principalmente en los ganglios linfáticos. Aproximadamente un 20% de los casos de SLL evolucionan a LLC (Morrison et al., 1989; Santos & O'Brien, 2012).

1.2.2. Linfocitosis monoclonal de células B

La linfocitosis monoclonal de células B (MBL, por sus siglas en inglés) es una hematopatía que se produce cuando el paciente sufre una acumulación clonal de células B inferior a 5000 linfocitos B por microlitro de sangre, sin citopenia, linfadenopatías, organomegalias u otros síntomas de LLC, a pesar de que inmunofenotípicamente las células B sean compatibles con un diagnóstico de LLC. A diferencia de la SLL, la MBL no se considera una manifestación clínica de la LLC, sino una enfermedad hematológica independiente con características clínicas propias (Hallek et al., 2018). Aunque con el tiempo se han definido como entidades clínicas independientes, la MBL sigue siendo considerada por muchos especialistas como una enfermedad precursora de la LLC, debido

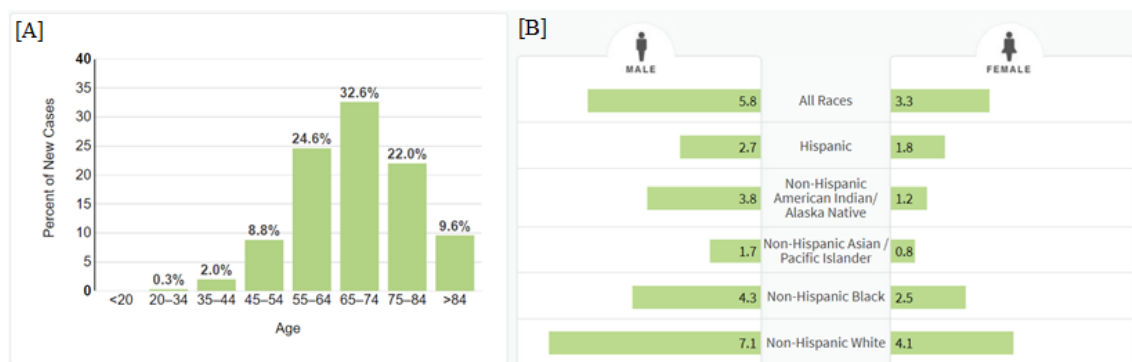
a su tasa de progresión estimada en torno al 1-2% anual (Rawstron et al., 2008) . Además, la MBL se asocia con un mayor riesgo de infecciones recurrentes, el desarrollo de neoplasias secundarias y la eventual transformación a LLC (Rawstron et al., 2008; Shanafelt et al., 2021). Este hecho demuestra la importancia de un seguimiento clínico cuidadoso de los pacientes para detectar complicaciones tempranas. Esta enfermedad está presente en aproximadamente un 5-10% de la población general, pero este porcentaje aumenta hasta el 22% en los familiares de pacientes con LLC (Slager et al., 2021).

1.2.3. Epidemiología de la LLC

Como ya hemos comentado anteriormente, la LLC es la leucemia más común en adultos en los países occidentales (EE. UU. y Europa) y representa el 1% de todos los nuevos cánceres diagnosticados (20.700 nuevos casos) en EE.UU. según las proyecciones hechas por la *American Cancer Society* (ACS; <https://www.cancer.org/>) (American Cancer Society, 2024). Según la *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER; <https://seer.cancer.gov/>), la incidencia anual general de esta enfermedad es de 4,5 por cada 100.000 hombres y mujeres. Sin embargo, esta incidencia desciende drásticamente a menos de 1 por cada 100.000 en los países orientales, como la republica de Corea o China (Alaggio et al., 2022; Robak et al., 2023; Yoon et al., 2010). La incidencia, además, puede verse incrementada por diversos factores intrínsecos del paciente:

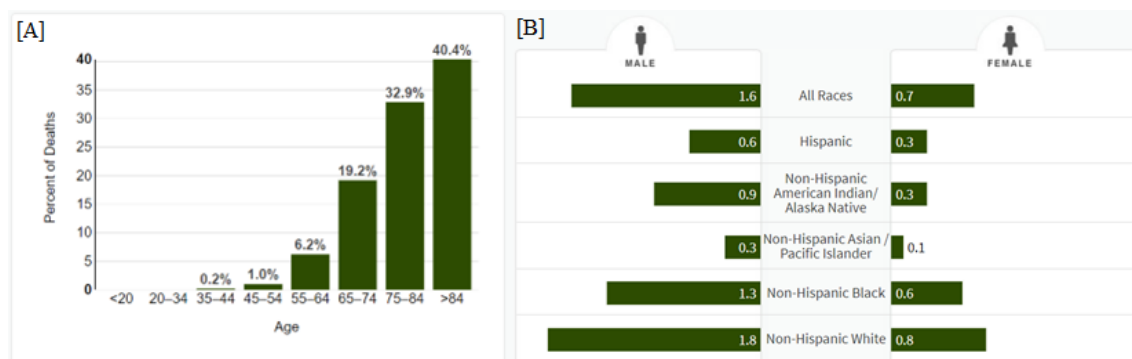
- Edad: A medida que aumenta la edad, la incidencia se incrementa a 20 casos por cada 100.000 individuos en mayores de 60 años (Figura 3A) (Swerdlow S.H. et al., 2008).
- Género: Esta enfermedad es aproximadamente el doble de común en hombres, con un cociente de 1,5-2:1 en comparación con las mujeres (Figura 3B) (Noone, 2018).
- Etnia: El origen étnico del paciente también influye en la incidencia de la enfermedad, siendo más común en los individuos caucásicos y menos común en los individuos asiáticos (Figura 3B) (Noone, 2018).

Figura 3: [A] Diagrama de porcentaje de casos nuevos diagnosticados de LLC/SLL por grupo de edad. [B] Incidencia de nuevos casos de LLC/SLL por cada 100.000 personas por raza/etnia y sexo. Datos ajustados por edad. SEER 22 2017–2021.



La edad media de diagnóstico de la LLC/SLL es de 70 años (American Cancer Society, 2024), pero puede presentarse y ser diagnosticada en personas más jóvenes (con una edad inferior a 55 años) (Parikh et al., 2014; Spier et al., 1985). Cabe destacar que, en esta enfermedad crónica, la edad de diagnóstico tiene un papel esencial para el pronóstico de los pacientes, ya que se han observado mayores tasas de mortalidad en aquellos pacientes con edades superiores a la media de diagnóstico. La supervivencia relativa global a 5 años para los pacientes de LLC, excluyendo otras causas de fallecimiento, es aproximadamente del 88,1%. Sin embargo, esta tasa, se ve afectada por factores intrínsecos del paciente que pueden aumentar o disminuir la supervivencia, como la edad (Figura 4A), el sexo y la etnia (Figura 4B).

Figura 4: [A] Diagrama de porcentaje de fallecimientos de LLC/SLL por grupo de edad. [B] Ratio de fallecimientos de LLC/SLL por cada 100.000 personas por raza/etnia y sexo. Datos ajustados por edad. SEER 22 2017–2021.



La combinación de estos factores intrínsecos del paciente sugiere de manera clara un papel significativo de la predisposición genética en la manifestación, progresión y

supervivencia de la enfermedad, modulada por las características individuales del paciente.

1.2.4. Localización y progresión

La LLC se mantiene, en la mayoría de los casos, estable durante largos periodos de tiempo en las fases iniciales, sin necesidad de tratamiento. No obstante, a pesar de ello se suelen producir daños que afectan principalmente a la sangre periférica, la médula ósea, el bazo, los ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides secundarios. Generalmente, tras un periodo estable indefinido, la LLC progresa hacia unas fases más avanzadas, donde estos daños se agravan debido al aumento y acumulación de células B, lo que desemboca en una mayor infiltración en la médula ósea y en daños extraganglionares más severos que, en los peores casos afectan al sistema nervioso central (Alaggio et al., 2022; Ratterman et al., 2014).

En algunos casos cuando la LLC progresa severamente agravando los síntomas agudos de la enfermedad, como el rápido crecimiento de los ganglios linfáticos, la fiebre y/o la pérdida injustificada de peso entre otros. Eso puede provocar la transformación de Richter (RT), que da lugar a un linfoma agresivo de mal pronóstico. Afortunadamente, esta transformación solo ocurre en aproximadamente el 2-10% de los casos (Fan et al., 2012; Parikh et al., 2013; Rossi et al., 2008, 2009). La primera vez que se detectó esta patología clínica asociada a la progresión de la LLC fue en 1964 por Lortholary *et al.* denominándolo Síndrome de Richter (Lortholary, 1964), pero no fue hasta el 2007 cuando se demostró la asociación clonal entre ambas neoplasias (Mao et al., 2007), siendo finalmente aceptada la RT en la última edición de la OMS de los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides (Alaggio et al., 2022). Con el paso de los años esta definición se ha ido categorizando y definiendo, observándose que en el 80-90% de los casos, la RT da lugar a linfomas difusos de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés) (Imataki & Uemura, 2018; Rossi et al., 2018). En el 10-20% de los casos se produce un LH (Rossi et al., 2018) y, por raramente (~1%), linfomas de Burkitt (Chatzidimitriou & Vassilakopoulos, 2021) y otros, como el linfoma de células T (Imataki & Uemura, 2018; A. Lee et al., 1995; Strickler et al., 1992).

1.2.5. Manifestaciones clínicas

La LLC es una de las neoplasias hematológicas con un curso clínico más heterogéneo y variable, de modo que algunos pacientes presentan una enfermedad indolente sin síntomas que nunca requieren de tratamiento. Sin embargo, otros pacientes presentan toda la sintomatología característica y una progresión agresiva de la enfermedad que les obliga a tener tratamiento desde el primer momento (Hallek et al., 2018; Hallek & Al-Sawaf, 2021).

Por ello, la detección temprana de las manifestaciones clínicas es fundamental para el diagnóstico temprano de los pacientes, lo cual influye significativamente en la identificación del grado de desarrollo de la enfermedad y el pronóstico esperado. Esto nos permite adaptar el tratamiento, incrementar su eficacia y mejorar las expectativas de supervivencia y calidad de vida del paciente. Las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con LLC son las siguientes:

- **Organomegalia**

Una de las manifestaciones clínicas de la LLC es el crecimiento anormal de determinados órganos del paciente, especialmente la esplenomegalia, la hepatomegalia y la linfadenopatía, debido a la afectación y acumulación clonal de células B leucémicas, lo que provoca molestias abdominales y viscerales en el paciente. Se suelen identificar mediante exámenes médicos físicos y/o mediante radiografías por tomografía computarizada (CT), en estadios más avanzados de la enfermedad (Jain et al., 2024; Scarfò et al., 2016; Swerdlow S.H. et al., 2017).

- **Síntomas B/Síntomas constitucionales**

Estas manifestaciones clínicas son un grupo de síntomas comunes en los pacientes. De hecho, suelen ser los primeros que detecta el paciente y, frecuentemente, lo motivan a consultar al médico para una evaluación clínica inicial. Son sensación de fatiga severa, fiebres altas ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), pérdida involuntaria de peso ($\geq 10\%$ en 6 meses) y sudoraciones nocturnas, todo ello sin evidencia de infecciones (Jain et al., 2024; Swerdlow S.H. et al., 2017).

- **Manifestaciones autoinmunes hematológicas**

Estas manifestaciones suelen ser menos frecuentes. Entre ellas, la anemia hemolítica autoinmune se considera la más común (10-15%) en los pacientes. La siguiente más común es la trombocitopenia inmune que solo afecta al 1-5% de los pacientes y, por último, la aplasia pura de glóbulos rojos y la neutropenia autoinmune que son dos trastornos autoinmunes que solo se presentan en menos del 1% de los pacientes (Hodgson et al., 2011; Porpaczy & Jäger, 2022). Además, cabe destacar que en el momento del diagnóstico un 30% de los pacientes presentan hipogammaglobulinemia que, con el paso del tiempo y la evolución de la enfermedad, puede incrementar aproximadamente al 60% de los pacientes (Swerdlow S.H. et al., 2017).

- **Manifestaciones autoinmunes no hematológicas**

En algunos casos, los pacientes pueden presentar patologías autoinmunes no hematológicas raras, como son el pénfigo paraneoplásico, el angioedema adquirido y la enfermedad de aglutinina fría (Dearden, 2008; Porpaczy & Jäger, 2022).

- **Infecciones recurrentes**

Desafortunadamente, los pacientes tienen una alta probabilidad de sufrir infecciones recurrentes y oportunistas, generalmente son debido a una respuesta inmune defectuosa y/o por las enfermedades autoinmunes asociadas. Las infecciones más comunes son las bacterianas (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*) que afectan a las vías respiratorias superiores e inferiores, pero también a las vías urinarias. Recientemente, también se ha descrito un aumento del riesgo a padecer infecciones virales (Virus del Herpes Simple, Citomegalovirus, Virus de Epstein-Barr, Virus de la Varicela-Zóster) y agentes oportunistas (*P. jirovecii*). Además, cuando la LLC progresa y se agrava, suele producirse simultáneamente un empeoramiento de las infecciones, como resultado de los tratamientos y los defectos en la respuesta inmune (Eichhorst et al., 2021; Scarfò et al., 2016; Swerdlow S.H. et al., 2017).

- **Afectaciones extramedulares**

En algunos de los casos más severos, cuando se produce una infiltración medular severa y una migración amplia de las células B afectadas, se pueden producir trastornos en la

piel, en los riñones, en el tracto gastrointestinal y en el sistema nervioso central (Akintola-Ogunremi et al., 2002; Jasim et al., 2006; Ratterman et al., 2014; Swerdlow S.H. et al., 2017).

- **Presencia de proteína monoclonal**

Finalmente, aproximadamente el 10% de los pacientes de LLC presentan una acumulación de una proteína monoclonal, generalmente de tipo IgM, en suero sanguíneo y/u orina (G. X. , F. S. M. , S. D. L. , & R. K. R. Qian, 1984; Rizzo et al., 2015; Swerdlow S.H. et al., 2017).

1.2.6. Diagnóstico clínico

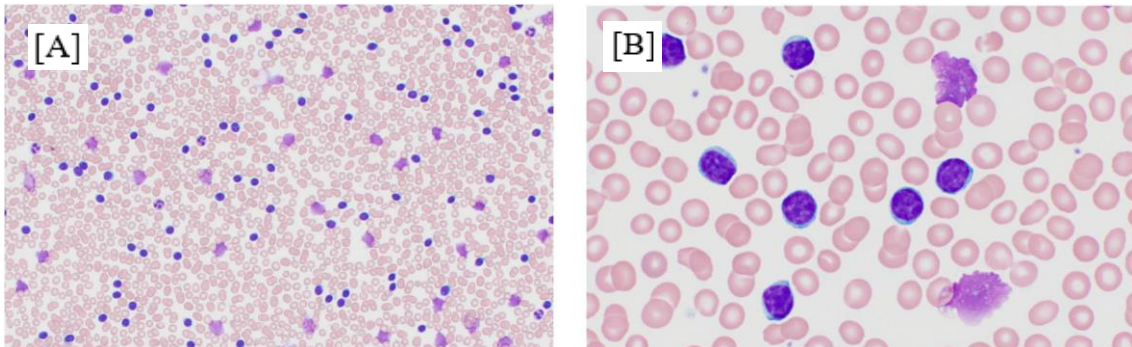
En 1988 un grupo de clínicos, investigadores y expertos de referencia en hematología se reunieron para unificar todos los conocimientos, basándose en las evidencias hasta la fecha en la LLC. Publicaron por primera vez una guía común para protocolos clínicos de LLC (Cheson et al., 1988). A lo largo de los años, los avances en la investigación hematológica, el desarrollo de las nuevas técnicas de diagnóstico, la comprensión de la importancia del panorama genómico y genético, la implementación de pruebas de detección de enfermedad mínima residual (EMR) y el desarrollo de nuevas terapias, han ido transformando el enfoque del manejo clínico de la LLC, impulsando la creación de nuevas ediciones revisadas y actualizadas (Cheson et al., 1988; Hallek et al., 2008, 2018; Mulligan et al., 2009). Una de las principales razones de creación de estas guías es unificar y confirmar el diagnóstico de los pacientes, ya que es muy importante no confundirlo con otras neoplasias linfoproliferativas (leucemia de células pilosas, linfoma de células del manto, linfoma la zona marginal, linfoma folicular, etc.) para el correcto abordaje clínico y terapéutico de los pacientes. Para ello, en la mayoría de los casos es necesario realizar hemogramas, recuentos diferenciales, frotis de sangre, caracterización inmunofenotípica y, por último, un estudio de las características genéticas de las células B afectadas.

Según la última edición de la guía *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* (iwCLL) para el diagnóstico, tratamiento, tratamiento y manejo de la LLC

(Hallek et al., 2018), el diagnóstico de esta enfermedad se realiza de manera estandarizada a nivel mundial, basándose en los siguientes criterios:

El diagnóstico de LLC requiere la presencia de ≥ 5000 células B/ μl en la sangre periférica durante al menos 3 meses, con una clonalidad celular que debe confirmarse mediante citometría de flujo. Estas células B se caracterizan por su pequeño tamaño, un borde estrecho de citoplasma, un núcleo denso sin nucléolos visibles y por presentar una cromatina ligeramente agregada. Además, entre el análisis de muestras de sangre se suelen encontrar grandes cantidades de células grandes escindidas o prolinfocitos (hasta el 55%) (Melo et al., 1986), que junto con la presencia de sombras nucleares de Gümprecht y restos celulares, son una característica morfológica presente en la LLC que se utiliza para el diagnóstico de los pacientes (Hallek et al., 2008, 2018; Hallek & Al-Sawaf, 2021) (Figura 5).

Figura 5. Tinción con Wright-Giemsa de sangre periférica de paciente con LLC. Se observan células B maduras afectadas pequeñas con la cromatina condensada y sombras de Gümprecht. [A] Aumento 200X; [B] Aumento 1000X; (Kay et al., 2022).



Otro criterio de diagnóstico importante es la confirmación del inmunofenotipo de las células B afectadas mediante citometría de flujo (Hallek et al., 2018; Hallek & Al-Sawaf, 2021). La primera vez que se describió el perfil inmunofenotípico de las células B afectadas de LLC fue en 1994 por Matutes *et al.* Este estudio solo incluía la coexpresión de los marcadores CD5^+ , CD3^+ , FMC7^+ , y una baja expresión CD22^+ y de inmunoglobulinas de superficie. A este perfil inmunofenotípico se han ido añadiendo nuevos marcadores específicos, de modo que actualmente el perfil inmunofenotípico de las células B afectadas se caracteriza por la coexpresión de CD5 (antígeno de células T), CD19 , CD20 y CD23 (antígenos de superficie de células B). Además, las células B afectadas deben presentar una considerable baja expresión de inmunoglobulinas de

superficie (κ o λ), CD20 y CD79b en comparación con los niveles presentes en las células B sanas (Ginaldi et al., 1998a; Matutes et al., 1994; Moreau et al., 1997). Desafortunadamente estos marcadores de superficie no son únicos de las células B afectadas de LLC, sino que pueden aparecer en otras neoplasias malignas linfoides. La expresión de CD5, por ejemplo, también es característico del linfoma de células del manto (Morice et al., 2008). Es por ello, que se ha creado un panel unificado de expresión diferencial de marcadores (Tabla 1) donde además de los mencionados se incluyen otros marcadores como CD43, CD79b, CD81, CD200, CD10 o ROR1 que permiten refinar y confirmar el diagnóstico (Rawstron et al., 2018).

Tabla 1. Tabla de diagnóstico diferencial de LLC mediante el inmunofenotipado para determinar la expresión de marcadores de superficie en células linfoides (Rawstron et al., 2018).

	Igs	CD5	CD23	CD79b	FMC7	CD20	CD22	CD103	CD200	CD25	CD11c	CD10	CD43	ROR1
Linfocitos B normales	Alto	No	No	Alto	Alto	Alto	Alto	No	No	Bajo	Bajo	No	No	No
Leucemia linfocítica crónica	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	No	Muy alto	Bajo	Bajo	No	Muy alto	Alto
Linfoma de células del manto	Alto	Alto	No	Alto	Muy alto	Muy alto	Alto	No	Bajo	No	No	No	Muy alto	Alto
Linfoma linfoplasmocítico	Muy alto	Bajo	Bajo	Alto	Bajo	Alto	Alto	No	No	Bajo	Bajo	No	Bajo	No
Linfoma folicular	Muy alto	No	No	Alto	Bajo	Alto	Bajo	No	No	No	No	Bajo	No	Bajo
Leucemia de células pilosas	Muy alto	No	No	Bajo	Alto	Alto	Muy alto	Alto	No	Muy alto	Muy alto	No	No	Alto
Linfoma de zona marginal	Alto	No	No	Alto	Alto	Alto	Alto	No	No	Alto	Alto	No	Bajo	Bajo

Abreviaturas: Igs, Inmunoglobulinas de superficie.

1.2.7. Estratificación clínica de pacientes

Al igual que en otras neoplasias hematológicas y no hematológicas, la LLC requiere de una correcta estadificación de los pacientes para determinar el desarrollo y evolución de la enfermedad, que permita un abordaje clínico integrado, con un pronóstico y tratamiento adecuado. En la LLC, la estadificación tiene una mayor importancia debido a la gran heterogeneidad clínica de la enfermedad, que se produce como resultado de la diseminación de las células B afectadas desde la médula ósea a diferentes órganos.

Tradicionalmente, existen dos sistemas de estadificación clínica ampliamente aceptados, el sistema Binet (Binet et al., 1981) y el sistema Rai (Rai et al., 1975). Este último fue

actualizado para reducir el número de grupos pronósticos de cinco a tres (Rai, 1987). Ambos sistemas definen 3 grupos pronóstico principales mediante resultados clínicos sencillos, económicos y pruebas de laboratorio y físicas estándar. A pesar de que ambos sistemas están estandarizados y aceptados mundialmente, su uso no es uniforme a en todos los centros médicos, siendo más común el uso de estadiaje clínico de Rai en los Estados Unidos y el sistema Binet en Europa.

El sistema de Rai (Rai, 1987; Rai et al., 1975) se caracteriza por que todos los pacientes deben presentar linfocitosis, y, dependiendo de las complicaciones patológicas adicionales que presenten los pacientes (linfadenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia, trombocitopenia y anemia), éstos se clasificarán en un estadio u otro. Este sistema divide a los pacientes en 5 estadios bien diferenciados con un índice de riesgo y una tasa de supervivencia específicos (Tabla 2):

- **Estadio 0:** Los pacientes presentan linfocitosis (≥ 5000 células B/ μ l en sangre periférica), sin adenopatías palpables y con unos recuentos de glóbulos rojos y plaquetas dentro de los parámetros normales. En este estadio se clasifican los pacientes con un riesgo bajo y una supervivencia global (SG) media de aproximadamente 10 años.
- **Estadio I:** Los pacientes presentan linfocitosis, adenomegalia y recuentos normales de plaquetas y glóbulos rojos. En este estadio se clasifican los pacientes con riesgo intermedio, cuya SG media se ve disminuida en hasta aproximadamente hasta los 7 años.
- **Estadio II:** Los pacientes presentan linfocitosis, esplenomegalia y/o hepatomegalia, recuentos de glóbulos rojos y plaquetas casi normales y en algunos casos, linfadenopatías palpables. En este estadio, al igual que el anterior, se clasifican los pacientes de riesgo intermedio y con una SG media de aproximadamente 7 años.
- **Estadio III:** Los pacientes presentan linfocitosis, anemia no inmune (niveles de hemoglobina inferiores de 110g/l), un recuento de plaquetas aproximadamente normal, y en algunos casos, adenopatías. En este estadio se clasifican los pacientes con un riesgo alto, cuya SG media esta entre 1,5 y 4 años.
- **Estadio IV:** Los pacientes presentan linfocitosis y trombocitopenias (niveles de plaquetas inferiores a $100.000 \times 10^9/l$), pero, en algunos casos, pueden además

presentar adenopatías y anemia no inmune. Este estadio también se considera de riesgo alto para sus pacientes, donde la SG media es generalmente inferior a 4 años.

Tabla 2. Sistema de estadificación clínica de Rai.

Estadio	Clínica	Riesgo	Supervivencia media (Años)
0	Linfocitosis Células afectadas en sangre y/o médula (células linfoides > 30%)	Bajo	10-14
I	Linfocitosis Adenopatías	Intermedio	7
II	Linfocitosis Esplenomegalia y/o hepatomegalia Posible linfadenopatía	Intermedio	7
III	Linfocitosis Anemia, no inmune (Hemoglobina < 110g/l) Posible hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatía	Alto	1,5-4
IV	Linfocitosis Trombocitopenia (recuento plaquetario < 100×10 ⁹ /l) Posible hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía o anemia	Alto	1,5-4

El sistema de Binet (Binet et al., 1981) se basa en el número de áreas afectadas y en la presencia o ausencia de anemia y/o trombocitopenia en los pacientes. La afectación de las áreas viene definida por la presencia de ganglios linfáticos agrandados con más de 1 centímetro u organomegalia. Las áreas de afectación consideradas son: en primer lugar, cabeza y cuello, incluyendo el anillo de Waldeyer (considerándose todo como un área, incluso si hay varios ganglios afectados); en segundo lugar, axilas (considerándose la afectación de ambas como una sola área); en tercer lugar, las ingles (considerándose la afectación de ambas como una sola área); en cuarto lugar, una afectación palpable del bazo; y, en quinto lugar, una afectación palpable del hígado. Este sistema divide a los pacientes en 3 estadios bien diferenciados con un índice de riesgo y una tasa de SG específicos (Tabla 3):

- **Estadio A:** Los pacientes presentan menos de 3 áreas de tejido linfático afectadas sin trombocitopenia ni anemia. Este estadio es similar al estadio 0 del sistema de Rai, y ambos corresponden a pacientes con un riesgo bajo y una SG media superior a los 10 años.

- **Estadío B:** Los pacientes presentan 3 o más áreas de tejido linfático afectadas, pero sin trombocitopenia ni anemia. En este caso se clasifica este estadio como de riesgo intermedio y los pacientes tienen una SG aproximada de 7 años.
- **Estadío C:** Los pacientes presentan anemia y/o trombocitopenia, independientemente del número de áreas de tejido linfático afectadas. Este último estadio se clasifica de riesgo alto ya que sus pacientes tienen una SG media inferior a 4 años.

Tabla 3. Sistema de estadificación clínica de Rai.

Estadío	Clínica	Riesgo	Supervivencia media (Años)
A	Hemoglobina \geq 100 g/l y plaquetas \geq $100 \times 10^9/l$ Áreas afectadas \leq 2	Bajo	10-14
B	Hemoglobina \geq 100 g/l y plaquetas \geq $100 \times 10^9/l$ Áreas afectadas \geq 3	Intermedio	7
C	Hemoglobina $<$ 100 g/l y/o un recuento de plaquetas $<$ $100 \times 10^9/L$	Alto	2-4

El problema con estos sistemas de estadificación de pacientes radica en que se sustentan en factores de pronóstico como la anemia o la trombocitopenia, que suelen presentarse cuando la enfermedad está muy avanzada. Por esta razón, estos indicios se han vuelto insuficientes para discernir entre algunos subgrupos de pronóstico específicos (Pflug et al., 2014). Esto, sumado a los recientes avances en la terapia y la identificación de nuevos marcadores pronóstico independientes de las manifestaciones clínicas, como mutaciones genéticas recurrentes y alteraciones cromosómicas (Cramer & Hallek, 2011), ha llevado a que en los últimos años los estudios se han centrado en la identificación de marcadores pronóstico con relevancia clínica e importancia en el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, se ha abordado en paralelo la construcción de sistemas de puntuación que combinen estos marcadores con los tradicionales y la información clínica, biológica y genética disponible (Cortese et al., 2014; International CLL IPI working group., 2016; Pflug et al., 2014; Shanafelt et al., 2009; Wierda et al., 2007).

Así pues, el sistema de puntuación que ha demostrado una mayor relevancia en los últimos años, es el Índice Pronóstico Internacional de LLC (CLL-IPI, por sus siglas en inglés) (International CLL IPI working group., 2016). Este sistema de estadificación y pronóstico de los pacientes se desarrolló originalmente utilizando conjuntos de datos de más de 4.500 pacientes tratados dentro y fuera de ensayos clínicos, dividiéndolos en 4

subgrupos pronósticos diferentes. Este sistema se ha validado con éxito a nivel mundial en numerosas cohortes independientes (Da Cunha-Bang et al., 2016; Delgado et al., 2017; Gentile et al., 2016, 2018; Molica et al., 2017, 2018; Rigolin et al., 2017). La base de este sistema es la clasificación de los pacientes en 4 grupos pronósticos mediante la aplicación de un puntaje ponderado de cinco factores pronóstico independientes (Tablas 4 y 5) (International CLL IPI working group., 2016):

- **Edad:** Como hemos podido ver, en el apartado previo de epidemiología, la edad del paciente es un otro factor pronóstico significativo, ya que los pacientes mayores de 65 años tienden a tener un peor pronóstico (Noone, 2018).
- **Estadío clínico:** El estado clínico de los pacientes y el curso clínico de la enfermedad es un factor pronóstico claro. Tradicionalmente el estadio se ha establecido según los sistemas de Rai y Binet, de modo que los estadios más avanzados tienen peor pronóstico que los de bajo riesgo.
- **Beta-2 microglobulina (β 2M):** La β 2M es un marcador de actividad tumoral en suero, el cual muchos estudios han asociado como un marcador independiente de pronóstico para la LLC, cuando se encuentra en niveles elevados en el suero del paciente (Pflug et al., 2014; Wierda et al., 2007).
- **Estado mutacional del gen de la variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IGHV*):** Este factor pronóstico es uno de los más importantes, ya que las células leucémicas dependen de este gen para su proliferación (Fais et al., 1998). Además, numerosos estudios han demostrado que los pacientes con un estado no mutado del gen *IGHV* se asocia con un peor pronóstico que aquellos con un estado mutado del gen (Damle et al., 1999; Delgado et al., 2017; Hamblin et al., 1999; Naylor & Capra, 1999).
- **Delección del(17p) y/o mutación de *TP53*:** Los pacientes que tienen estas alteraciones genéticas presentan una mayor resistencia al tratamiento, y, por tanto, suelen presentar un peor pronóstico. Así pues, la presencia de estas alteraciones genéticas constituye un factor pronóstico donde los pacientes que las sufren suelen tener una enfermedad más agresiva y son más resistentes a la quimioterapia convencional (Pospisilova et al., 2012; Shanafelt et al., 2006; Zenz, Eichhorst, et al., 2010).

Tabla 4. Factores pronóstico independientes y puntaje del Índice Pronóstico Internacional de LLC (CLL-IPI).

Factor pronóstico	Condición	Puntos
Deleción del(17p) y/o mutación de <i>TP53</i>	Deleción y/o mutado	4
<i>IGHV</i>	No mutado	2
Beta-2 microglobulina (mg/l)	> 3,5	2
Edad	> 65 años	1
Estadío clínico	Sistemas Rai y Binet	1

Tabla 5. Diferentes categorías del Índice Pronóstico Internacional de LLC (CLL-IPI).

Puntaje	Categoría CLL-IPI de riesgo	Ratio de supervivencia a 5 años	Posible consecuencia clínica
0-1	Riesgo bajo	93.20%	Sin tratamiento
2-3	Riesgo intermedio	79.30%	No tratar, excepto si la enfermedad es realmente sintomática
4-6	Riesgo alto	63.30%	Tratamiento indicado, excepto si la enfermedad es asintomática
7-10	Riesgo muy alto	23.30%	Si necesita tratamiento, no utilizar quimioterapia sino agentes dirigidos o tratamientos en ensayos clínicos

Por último, cabe destacar que recientemente se están desarrollando y validando nuevos sistemas clínicos centrados en la importancia de la detección y tratamiento de la LLC en las primeras etapas (Ahn et al., 2021; Condoluci et al., 2020; Hoehstetter et al., 2020). El Grupo de trabajo internacional sobre IPI de LLC ha desarrollado recientemente un nuevo sistema con el objetivo de predecir el tiempo hasta tratamiento en los pacientes con LLC asintomática o temprana, llamado *International Prognostic Score for Early-stage CLL* (IPSE-CLL, por sus siglas en inglés) (Condoluci et al., 2020). En este nuevo sistema se combinan tan solo tres factores pronósticos, el estado mutacional de *IGHV* no mutado, el recuento absoluto de linfocitos $< 15 \times 10^9/l$ en sangre periférica, y la presencia de los ganglios linfáticos palpables. Con estos tres factores se predijo el riesgo acumulado a cinco años para el inicio del tratamiento de 8,4%, 28,4% y 61,2% para pacientes de riesgo bajo, riesgo intermedio y riesgo alto, respectivamente (Condoluci et al., 2020). Este sistema puede ser muy valioso para asesorar a todos los pacientes diagnosticados con LLC en etapas tempranas en relación a cuando deben iniciar su tratamiento, mejorando así sus condiciones de vida. En este contexto, resulta esencial seguir identificando nuevos

factores pronóstico y construyendo nuevos sistemas clínicos que nos permitan adelantar el diagnóstico de la LLC y tratar a los pacientes en las primeras etapas de la enfermedad, lo que, sin duda, nos ayudaría a mejorar la SG y la calidad de vida de los pacientes.

1.2.8. Tratamiento

En la mayoría de los casos, los pacientes diagnosticados de LLC no requieren tratamiento en el momento del diagnóstico y se les coloca en un estado de observación activa (observación y espera) para detectar la progresión de la enfermedad. Esta observación activa se basa en un seguimiento estrecho seriado, donde el médico solicita los antecedentes e historial clínico, realiza un examen físico y analiza hemogramas completos con una determinada frecuencia. La frecuencia concreta del seguimiento se puede adaptar en función de la puntuación de riesgo de LLC-IPI (International CLL IPI working group., 2016), donde los pacientes con riesgo alto y muy alto de progresión de la enfermedad son vistos con mayor frecuencia, generalmente cada 3 a 6 meses, mientras que en aquellos con riesgo bajo e intermedio (considerados asintomáticos con enfermedad en estadio temprano, con Rai 0, Binet A) son seguimientos con menor frecuencia, entre 6 y 12 meses. Con el paso del tiempo generalmente la LLC progresa y los pacientes acaban requiriendo tratamiento. Los criterios para determinar el inicio del tratamiento fueron defendidos y consensuados en la última reunión del Taller Internacional sobre LLC (Hallek et al., 2018). Estos criterios son:

1. Evidencia de insuficiencia medular progresiva, manifestada por el desarrollo o empeoramiento de anemia y/o trombocitopenia. Los niveles de umbrales de hemoglobina, $Hb < 10 \text{ g/dl}$ o los recuentos de plaquetas $< 100.000/\mu\text{l}$ generalmente se consideran una indicación para el tratamiento. Sin embargo, debe señalarse que en algunos pacientes los recuentos de plaquetas $< 100.000/\mu\text{l}$ pueden permanecer estables durante un largo período de tiempo; esta situación no requiere automáticamente una intervención terapéutica.
2. Esplenomegalia masiva ($\geq 6 \text{ cm}$ por debajo del margen costal izquierdo) o progresiva o sintomática.
3. Nódulos masivos (es decir, $\geq 10 \text{ cm}$ en el diámetro más largo) o linfadenopatía progresiva o sintomática.

4. Linfocitosis progresiva con un aumento de $\geq 50\%$ durante un período de 2 meses, o un tiempo de duplicación de linfocitos (LDT, por sus siglas en inglés) de menos de 6 meses. El LDT se puede obtener por extrapolación de regresión lineal de recuentos absolutos de linfocitos (ALC, por sus siglas en inglés) obtenidos a intervalos de 2 semanas durante un período de observación de 2 a 3 meses; Los pacientes con recuentos iniciales de linfocitos en sangre de $<30.000/\mu\text{l}$ pueden requerir un período de observación más largo para determinar el LDT. Deben excluirse los factores que contribuyen a la linfocitosis distintos de la LLC, como infecciones o administración de esteroides.
5. Complicaciones autoinmunes que incluyen anemia o trombocitopenia y que responden mal a los corticosteroides.
6. Afectación extranodal sintomática o funcional (piel, riñón, pulmón o columna vertebral).
7. Síntomas relacionados con la enfermedad definidos por cualquiera de los siguientes:
 - Pérdida de peso involuntaria $\geq 10\%$ en los 6 meses anteriores.
 - Fatiga significativa con una puntuación de 2 o peor de la Escala de Desempeño del *Eastern Cooperative Oncology Groupes Performance Status* (ECOG-PS); no puede trabajar o no puede realizar actividades habituales.
 - Fiebre $\geq 100,5$ °F o $38,0^{\circ}\text{C}$ durante 2 o más semanas sin evidencia de infección.
 - Sudoraciones nocturnas durante ≥ 1 mes sin evidencia de infección.

En aquellos casos en los que el paciente no cumple con los criterios para el inicio de la terapia en la LLC, es fundamental ofrecer orientación sobre el mayor riesgo de desarrollar infecciones, subrayando la importancia de una vacunación adecuada y la necesidad de realizar cribados regulares para la detección precoz de otros tipos de cáncer, incluidos los cánceres cutáneos. En línea con todo lo comentado, hasta el momento, los estudios sobre LLC en estadios tempranos no han demostrado un beneficio clínico significativo asociado a las intervenciones terapéuticas tempranas (Dighiero et al., 1998; Herling et al., 2020; Hoehstetter et al., 2017; Langerbeins et al., 2022).

Una vez establecidos los criterios para el inicio del tratamiento, resulta crucial considerar las diversas opciones terapéuticas disponibles, que han evolucionado significativamente en los últimos años. Estas estrategias varían en función de múltiples factores, incluidos la

edad del paciente, las comorbilidades existentes (miocardiopatías, arritmia, insuficiencia renal, etc.) y las características genéticas de la enfermedad, así como la presencia de deleciones cromosómicas y mutaciones recurrentes. En este contexto, el manejo de la LLC se ha diversificado, integrando enfoques que van desde la quimioterapia clásica y las terapias inmunomoduladoras hasta tratamientos más recientes y dirigidos, como los inhibidores de la tirosina quinasa y las terapias con anticuerpos monoclonales. Hasta 2014, el tratamiento de primera línea para los pacientes de LLC dependía de la edad y las comorbilidades del paciente, y consistía principalmente en hemoimmunoterapia (CIT, por sus siglas en inglés) y quimioterapia, con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR) en pacientes jóvenes (< 65 años). Para los pacientes de entre 65 y 75 años el tratamiento estaba basado en bendamustina y rituximab (BR) y clorambucilo como agente único con o sin tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD20 para pacientes mayores de 75 años o con comorbilidades significativas. La introducción de nuevos agentes orales y descubrimientos ha revolucionado por completo el enfoque del tratamiento para la LLC.

Actualmente la elección de la terapia de primera línea en la LLC está entre dos enfoques principales: los inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton (BTK, por sus iniciales en inglés) de administración continua y la combinación de dos inhibidores de la proteína BCL2, venetoclax con obinutuzumab, que tiene una duración de tratamiento limitada. Ambos enfoques presentan ventajas y desventajas, y la decisión terapéutica se personaliza en base a las características del paciente y sus comorbilidades.

Los inhibidores de BTK, como ibrutinib, acalabrutinib y zanubrutinib, permiten un inicio sencillo de la terapia, sin necesidad de infusión intravenosa y presentan un bajo riesgo de síndrome de lisis tumoral, lo que es una ventaja significativa en comparación con otros regímenes. Sin embargo, requieren una administración continua hasta que la enfermedad progrese, lo que se asocia con el riesgo padecer ciertos eventos adversos relacionados con su uso prolongado, como arritmias, hipertensión y complicaciones hemorrágicas (Cherng & Jain, 2021). Por tanto, en pacientes con enfermedad coronaria, fibrilación auricular no controlada o necesidad de anticoagulación a largo plazo, se debe tener precaución con este tipo de terapia, aunque no están contraindicados.

Por otro lado, la terapia basada en inhibidores de la proteína BCL2 (venetoclax, combinada con obinutuzumab) ofrece un enfoque de tratamiento con duración limitada, pero requiere de un monitoreo estricto debido al mayor riesgo de síndrome de lisis

tumoral, especialmente en aquellos pacientes que presentan adenopatías voluminosas o disfunción renal. Además, se ha demostrado que la neutropenia de grado 3-4 se presenta en aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con venetoclax, lo que nuevamente destaca la importancia del monitoreo estricto de los pacientes, cuando se escoge este tipo de terapia (Cherng & Jain, 2021).

Además, en pacientes con aberraciones genéticas específicas, como la alteración del *TP53*, la elección de la terapia es crucial. En los pacientes con esta alteración genética, el tratamiento con venetoclax y obinutuzumab presenta una respuesta subóptima a largo plazo, por lo que los inhibidores de BTK de segunda generación, como acalabrutinib o zanubrutinib, son actualmente una mejor opción en comparación con el ibrutinib.

Dado el éxito de estos nuevos agentes en el manejo de primera línea de la LLC, se están llevando a cabo varios ensayos para investigar su eficacia en combinación. Estudios preclínicos han sugerido una acción complementaria entre los inhibidores de BTK y venetoclax, especialmente con ibrutinib, ya que este incrementa la dependencia de las células de LLC de la proteína antiapoptótica BCL2, que es inhibida por el venetoclax (Cervantes-Gomez et al., 2015). Curiosamente, estos agentes terapéuticos muestran perfiles de toxicidad no superpuestos y parecen dirigirse a diferentes nichos de la enfermedad. Mientras que los inhibidores de BTK son más efectivos para eliminar la enfermedad ganglionar, el tratamiento con venetoclax es más efectivo en la eliminación de células tumorales en la médula ósea y la sangre periférica.

Varios estudios clínicos de fase 2 en pacientes con LLC sin tratamiento previo que recibieron una combinación de ibrutinib y venetoclax durante una duración fija de 2 años (Jain et al., 2019, 2020) o 4 años (Jain et al., 2022) han demostrado que la terapia de duración fija con ibrutinib y venetoclax puede conducir a respuestas profundas, permitiendo la interrupción del tratamiento, lo que representa un objetivo clave en el manejo de la LLC en primera línea. Además, esta combinación ha demostrado altas tasas de remisión completa y de EMR no detectable en varios estudios multicéntricos (Jain et al., 2020; Tam et al., 2022), incluyendo comparaciones con otras combinaciones terapéuticas como el clorambucilo-obinutuzumab (Niemann et al., 2023).

En los casos en los que el paciente recae tras estos tratamientos, se pasa a una segunda línea de tratamiento. Las opciones terapéuticas para una segunda línea y sucesivas suelen ser las mismas que con el primer tratamiento (medicamentos dirigidos, inmunoterapia y

posiblemente quimioterapia), aunque su elección depende de cuál fue el primer tratamiento y la respuesta al mismo, así como los factores personales del paciente. En aquellos casos en los que la respuesta al tratamiento inicial ha sido buena y duradera (por lo general, al menos varios años), se podría usar el mismo tratamiento nuevamente. Por el contrario, si la respuesta inicial no fue buena, está menos indicado usar el mismo tratamiento.

Las distintas opciones terapéuticas para la primera (Tabla 6), segunda y tercera (Tabla 7) líneas han sido recientemente descritas en la última versión de la guía clínica del *National Comprehensive Cancer Network* para el tratamiento de la LLC (National Comprehensive Cancer Network, 2024)

Tabla 6. Tratamientos de primera línea en la LLC (National Comprehensive Cancer Network, 2024).

	LLC sin del(17p) o mutación de <i>TP53</i>	LLC con del(17p) o mutación de <i>TP53</i>
Inhibidores de BTK		
Acalabrutinib con o sin obinutuzumab	●	●
Zanubrutinib	●	●
Ibrutinib	●	●
Ibrutinib and obinutuzumab	●	
Ibrutinib and rituximab	●	
Inhibidores de BCL-2		
Venetoclax con obinutuzumab	●	●
Inhibidores BTK y BCL-2		
Ibrutinib and venetoclax	●	●
Quimioinmunoterapia o inmunoterapia		
Fludarabine, cyclophosphamide y rituximab	●	
Bendamustina y rituximab u obinutuzumab Obinutuzumab con clorambucilo	●	
Obinutuzumab	●	●
Metilprednisolona a dosis altas con rituximab u obinutuzumab	●	●

● Régimen preferido porque funciona mejor, es más seguro o cuesta menos que otras opciones o hay mejor investigación que respalda su uso.

Tabla 7. Tratamientos de segunda y tercera línea para la LLC (National Comprehensive Cancer Network, 2024).

	LLC sin del(17p) o mutación de <i>TP53</i>	LLC con del(17p) o mutación de <i>TP53</i>
Inhibidores de BTK		
Acalabrutinib	●	●
Zanubrutinib	●	●
Ibrutinib	●	●
Pirtobrutinib después de inhibidores de BTK	●	●
Inhibidores de BCL-2		
Venetoclax con rituximab	●	●
Venetoclax	●	●
Venetoclax con o sin rituximab u obinutuzumab (preferido), si recae después de un tratamiento previo con venetoclax	●	●
Inhibidores BTK y BCL-2		
Ibrutinib and venetoclax	●	●

● Régimen preferido porque funciona mejor, es más seguro o cuesta menos que otras opciones o hay mejor investigación que respalda su uso.

A pesar del notable progreso terapéutico comentado anteriormente con los agentes dirigidos para el tratamiento de la LLC, esta enfermedad sigue siendo incurable con los tratamientos actuales. El trasplante alogénico de HSCs con acondicionamiento de intensidad reducida ha demostrado remisiones duraderas en pacientes de alto riesgo, con una tasa de supervivencia libre de progresión (PFS, por sus siglas en inglés) a 10 años del 34% (Dreger, Ghia, et al., 2018; Krämer et al., 2017). Estos resultados demostraron la importancia de las terapias celulares en el tratamiento de pacientes de alto riesgo, particularmente en aquellos que agotan rápidamente los tratamientos disponibles, así como en pacientes más jóvenes que tienen una mayor duración de la enfermedad por enfrentar. Para este tipo de terapias la edad, el estado físico y las comorbilidades son factores clave al considerar el trasplante alogénico de células madre (Dreger, Ghia, et al., 2018).

En la aplicación de la terapia de trasplante alogénico de HSCs en pacientes con LLC, los resultados son variados y, en ocasiones, contradictorios. Esto se debe, en gran parte, a la influencia de la terapia de primera línea y la respuesta individual de los pacientes. Un ensayo clínico multicéntrico que incluyó a pacientes tratados con al menos un agente novedoso no mostró diferencias estadísticamente significativas en términos de

supervivencia libre de progresión (PFS, por sus siglas en inglés) o SG (Roeker et al., 2020). En contraste, otro estudio demostró una mejora en la supervivencia cuando los pacientes habían sido tratados previamente con quimioinmunoterapia (H. T. Kim et al., 2020). Sin embargo, un análisis basado en el registro europeo de trasplantes evidenció que los pacientes tratados previamente con ibrutinib presentaron peores resultados tras el HSCT (Dreger, Michallet, et al., 2018). Es por ello que, el papel del trasplante alogénico de células madre ha disminuido para los pacientes con LLC en la era de la terapia dirigida (Tournilhac et al., 2023). Estos hallazgos resaltan la necesidad de considerar cuidadosamente el historial terapéutico al evaluar la idoneidad del trasplante de HSCs en el manejo de la LLC, por lo que actualmente este tipo de terapia solo se recomienda a pacientes jóvenes que no respondieron, recayeron después de la respuesta inicial o son intolerantes tanto a un inhibidor de BTK como a venetoclax (el llamado grupo doblemente refractario o doblemente expuesto), especialmente si tienen LLC con mutación en *TP53* (Jain et al., 2024).

Actualmente la terapia celular más estudiada para el tratamiento de la LLC y otras neoplasias es la terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T, por sus siglas en inglés). Concretamente, la terapia CAR-T dirigida a CD19 se ha estudiado en varios ensayos clínicos de pacientes con enfermedad recidiva o refractaria. El ensayo multicéntrico más grande hasta la fecha es el TRANSCEND CLL 004, en él los pacientes recibieron la terapia CAR-T *lisocabtagene maraleucel* después de sufrir una linfodepleción con fludarabina y ciclofosfamida. La tasa de remisión completa o remisión completa con recuperación incompleta del recuento entre los pacientes evaluables por eficacia fue del 18% con una tasa de respuesta general del 47%. Se informó de remisión de ultrasensibilidad en la EMR (sensibilidad 0,01 %) en sangre periférica y médula ósea en el 64 % y el 59 % de los 87 pacientes evaluables por eficacia, respectivamente (Siddiqi et al., 2023). Otros estudios a menor escala han conseguido resultados similares (Frey et al., 2020; Siddiqi et al., 2020; Turtle et al., 2017), incluso combinando esta terapia con otros agentes dirigidos como el ibrutinib (Wierda et al., 2020). Esta última estrategia se ha planteado con el objetivo de superar los defectos de las células T relacionados con la enfermedad que obstaculizan la eficacia de CAR-T en pacientes con LLC (Fraietta et al., 2016).

En conclusión, las últimas investigaciones en terapias celulares para la LLC se centran en prevenir el agotamiento de las células CAR-T, sus patologías asociadas y la resistencia a

la enfermedad. Estrategias combinadas y el desarrollo de terapias de próxima generación son actualmente áreas activas de estudio, con el objetivo de mejorar la eficacia y la duración de la respuesta al tratamiento, abordando los desafíos de la heterogeneidad de la enfermedad y la resistencia terapéutica.

1.3. Genética en la LLC

Como hemos visto, la LLC tiene un fuerte componente genético asociado, no solo al diagnóstico, sino también con el desarrollo de la enfermedad, su tratamiento y la respuesta al mismo. Por ello, en los últimos años, los estudios se han centrado en investigar el componente genético de la LLC. Gracias en parte a los avances en las técnicas de genética molecular, como la hibridación in situ fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés), las nuevas técnicas de secuenciación (NGS, por sus siglas en inglés), ha sido posible estudiar el genoma de los pacientes. Además, técnicas como los *microarrays* de expresión génica o epigenómica, la secuenciación completa del genoma por bisulfito (WGBS, por sus siglas en inglés) y las técnicas de genotipado masivo para estudios del genoma completo, han facilitado la investigación en este campo. Actualmente, todos los esfuerzos en este ámbito están orientados a la identificación de nuevos marcadores de susceptibilidad y pronóstico, en áreas como la prevención, la respuesta a tratamiento, la EMR, la supervivencia y el tiempo hasta el primer tratamiento (THPT). El objetivo último consiste en mejorar las estrategias de prevención de la enfermedad, así como su diagnóstico, abordaje clínico y el tratamiento de los pacientes.

1.3.1. Riesgo genético familiar

A lo largo de la historia, se han investigado más de 100 familias donde la incidencia de LLC era muy alta, lo que sugería una predisposición genética heredable clara, pero además la existencia de un componente genético de tipo familiar. En algunos de estos estudios familiares se ha visto que, además de LLC, los familiares suelen presentar otros trastornos linfoproliferativos de células B, como el LH (Goldin et al., 2004; Gunz et al., 1975; Jønsson et al., 2005; Kerber & O'Brien, 2005; Linet et al., 1989).

Más recientemente, algunos estudios de genética epidemiológica de casos y controles en familias que sufrían una LLC de tipo familiar, han sido capaces de determinar que el riesgo relativo de sufrir LLC entre los familiares de primer grado de consanguineidad u otro trastorno linfoproliferativo de células B, es aproximadamente entre 2 y 8 veces mayor que en la población general (Cerhan & Slager, 2015; Crowther-Swanepoel & Houlston, 2009; Kerber & O'Brien, 2005; Kipps et al., 2017; Law, Berndt, et al., 2017; Speedy et al., 2014a). en algunos casos, el riesgo puede llegar a ser 8,5 veces mayor para los familiares de primer grado de consanguinidad (Goldin et al., 2009). Además, algunos estudios han demostrado que el riesgo a padecer la enfermedad incrementa hasta 27 veces cuando se tienen dos familiares de primer grado afectados (Goldin et al., 2004; Sud et al., 2019). Aunque, otros estudios han intentado identificar factores genéticos comunes entre diferentes familias, desafortunadamente, la ausencia de suficiente potencia estadística ha imposibilitado la localización de genes de riesgo (Sellick et al., 2005, 2007). Por otro lado, los estudios de secuenciación del exoma completo en familias han sido capaces de identificar mutaciones en la línea germinal de los genes del complejo shelterina, predominantemente en el gen *POT1*, con el alelo *POT1* Gln376Arg asociado a un riesgo 3,6 veces mayor en un estudio de casos y controles independiente (Speedy et al., 2016). La variante *ITGB2* E630K y una variante en el gen *NFATC4* también se han encontrado asociadas con el riesgo de LLC en numerosas familias (Goldin et al., 2016; Itchaki, 2017). Sin embargo, la primera de estas mutaciones no se ha podido validar en un estudio de casos y controles (Tiao et al., 2017), mientras que la segunda sí se pudo asociar con un aumento del riesgo a desarrollar la enfermedad de hasta 20 veces mayor en un estudio de casos y controles (Itchaki, 2017). Sin embargo, ninguna de estas variantes se encuentra con la incidencia necesaria en otros pacientes con LLC o familias completas.

Por último, cabe destacar que, en estos estudios de tipo familiar, resulta notable que, a diferencia de lo observado en la mayoría de los cánceres, la incidencia de la enfermedad es mayor en mujeres, hallazgo que contrasta con las tasas de incidencia generales de cáncer, donde típicamente se observa una mayor prevalencia en hombres (Bray et al., 2024; Crowther-Swanepoel & Houlston, 2009; Noone, 2018; Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), 2022; Siegel et al., 2023).

1.3.2. Alteraciones cromosómicas/citogenéticas

En 1990 se describió por primera vez la presencia de mutaciones citogenéticas en pacientes de LLC y su relación con el pronóstico de la enfermedad (Dierlamm et al., 1997; Juliusson et al., 1990; Juliusson & Gahrton, 1990). Más recientemente, estudios genéticos han descrito la posibilidad de que el inicio de la leucemia pueda ser el resultado de la pérdida o ganancia de material cromosómico, seguido de unas mutaciones más específicas que serían las causantes de determinar el grado de agresividad de la leucemia (Juliusson et al., 1990). Así pues, la citogenética proporciona una mejor comprensión de la patogenia de la enfermedad y podría ayudar con el pronóstico de un paciente. La técnica de análisis citogenético más usado en el caso de la LLC es la FISH que se utiliza para detectar secuencias de ADN específicas en los cromosomas de células en división (metafase) y en no división (interfase) de modo que se puedan identificar las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (pérdida y/o ganancia de material cromosómico). La técnica FISH en interfase se ha convertido en la técnica estándar en la LLC debido sobre todo al hecho de que la mayoría de las células de LLC se detienen en la fase G0/G1 temprana del ciclo celular y rara vez se dividen *in vitro*.

Las alteraciones cromosómicas más comunes presentes en los pacientes de LLC son (Alhourani et al., 2014; Döhner et al., 2000; Eid et al., 2021; Zenz, Mertens, et al., 2010):

- **Deleción en el cromosoma 13**

Las deleciones en el brazo largo del cromosoma 13 están descritas en aproximadamente el 55% de los pacientes de LLC, siendo la mutación citogenética más común en la enfermedad. Podemos destacar la deleción del(13q14) que afecta a una región donde se encuentran dos genes de ARN largo no codificante (*DLEU2* y *DLEU1*), implicados en la linfoproliferación clonal y que desempeñan un papel crucial tanto en la iniciación como en la progresión de la LLC (Wan Mohamad Zamri et al., 2023). Además, en esta región se encuentran también ciertos microARNs (miRNA, por sus siglas en inglés), como el miRNA15A y el miRNA16A, cuya eliminación por la del(13q14) es determinante, ya que desempeñan un papel crucial en el control de la producción de proteínas esenciales para la apoptosis celular y la progresión normal del ciclo celular (Calin et al., 2002). Así pues, su eliminación provoca que las células no puedan responder a las señales de estrés lo que impide la

activación de la apoptosis y favorece el desarrollo de la enfermedad (Montague & Pathak, 2023). Además, produce una regulación positiva del gen *BCL2* en las células $CD5^+$, lo que activa la vía de señalización aberrante del protooncogén *BCL2* y ayuda al desarrollo de la enfermedad (Hockenbery et al., 1990). Por todo esto, la del(13q14) aislada está relacionada con un curso clínico más benigno de la enfermedad, un tiempo prolongado hasta el tratamiento y una mejor SG comparada con pacientes con otras alteraciones cromosómicas (Calin et al., 2002; Khalid et al., 2021; Klein et al., 2010).

- **Deleción en el cromosoma 11**

Las deleciones en el brazo largo del cromosoma 11 son la segunda alteración cromosómica más común en los pacientes de LLC. Se encuentra en aproximadamente el 25% de los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad sin quimioterapia previa y en el 10% de los pacientes con enfermedad en estadio temprano (Gaidano & Rossi, 2017; Quesada et al., 2011; Zenz, Mertens, et al., 2010). En este caso destaca la del(11q23) que afecta a una región en la que se encuentra el gen *ATM* que codifica la proteína quinasa ATM. Esta proteína se encarga de regular el mecanismo de reparación del daño del ADN mediante la señalización proximal ATM (Eclache et al., 2004; Seiffert et al., 2012). Sin embargo, solo en un 8–30% de los casos se ha asociado la del(11q23) con mutaciones en el gen *ATM* (Ouillette et al., 2012), lo que sugiere la implicación de otros genes en la región como *RDX*, *FRDX1*, *RAB39*, *CUL5*, *ACAT*, *NPAT*, *KDELC2*, *EXPH2*, *MRE11*, *H2AX* y *BIRC3* (Nadeu et al., 2016). Precisamente este último, *BIRC3*, se encuentra en una región vecina al gen *ATM* (11q22) y sus mutaciones y deleciones se han detectado en aproximadamente el 4% de los pacientes en el momento del diagnóstico y en el 24% de los pacientes con una LLC refractaria a quimioterapia con fludarabina. Este hecho sugiere que quizás las alteraciones genéticas en *BIRC3* puedan estar relacionadas con un fenotipo específico de LLC refractario a quimioterapia (Diop et al., 2020; Rossi, Fangazio, Rasi, et al., 2012). Además, las deleciones del cromosoma 11 se han asociado con un aumento rápido de la progresión de la enfermedad, factores de mal pronóstico y una menor SG de los pacientes (Döhner et al., 1997; Rawstron et al., 2008). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que el uso de quimioterapia en estos casos puede reducir significativamente estos factores de mal pronóstico (Puente et al., 2011).

- **Delección en el cromosoma 17**

Las deleciones en el brazo pequeño del cromosoma 17 son menos frecuentes, ya que están presentes en el 5-8% de los pacientes de LLC. Aproximadamente el 80% de las alteraciones en este cromosoma corresponden a la delección del(17p13). En esta región se encuentra el gen supresor de tumores *TP53*, uno de los genes más importantes y más estudiados en los últimos por su estrecha asociación con múltiples tipos de cáncer. (Seiffert et al., 2012; Zenz, Vollmer, et al., 2010). Tradicionalmente se ha demostrado que los pacientes que presentan la del(17p13) muestran una marcada resistencia a los protocolos de quimioterapia genotóxica (Hallek et al., 2010). Por otro lado, las mutaciones del gen *TP53* se encuentran entre el 4 y el 37% de los pacientes y se asocian con un mal pronóstico (Zenz, Vollmer, et al., 2010). En la mayoría de los casos (más del 80%) los pacientes que poseen la delección del(17p13) también presentan mutaciones en *TP53*, mientras que en los casos que no tienen la delección las mutaciones de *TP53* son mucho menos frecuentes, aunque tienen idénticas consecuencias desfavorables sobre la respuesta a la quimioterapia y la supervivencia de los pacientes (Bosch & Dalla-Favera, 2019; Seiffert et al., 2012).

- **Trisomía del cromosoma 12**

La trisomía del cromosoma 12 se observa aproximadamente en el 10-20% de los pacientes, y suele presentarse asociada a otras alteraciones cromosómicas como la trisomía del cromosoma 18 y el 19 o deleciones recurrentes (14q, 13q, 11q, o 17p) y traslocaciones de *IGHV* (Puiggros et al., 2014). Aunque aún no está claro su relación con la patogénesis de la enfermedad y que genes están implicados, recientemente se ha asociado la presencia de esta trisomía con una morfología atípica de los linfocitos y con un pronóstico intermedio (Döhner et al., 2000; Seiffert et al., 2012). Sin embargo, en los casos en los que esta trisomía se presenta junto con mutaciones del gen *NOTCH1* el pronóstico pasa a ser desfavorable con periodos de supervivencia más cortos (Balatti et al., 2012).

Tabla 8. Las alteraciones cromosómicas frecuentes mediante FISH (Wan Mohamad Zamri et al., 2023).

Alteraciones cromosómicas	Prevalencia al diagnóstico	Gen implicado	Contexto	Pronóstico
Delección 13q14	50–60%	<i>DLEU2</i> y <i>DLEU1</i>	Linfoproliferación clonal, recapitulando los diferentes pasos de la iniciación y progresión de la LLC	Bueno
Delección bialélica en 13q	~30%			Incierto (Efecto difuminado debido a la magnitud de las deleciones o el silenciamiento del alelo restante a través de otros procesos)
Trisomía del 12	10–20%		Asociada a morfología atípica de los linfocitos	Intermedio
Delección 11q22-23	5–20%	<i>ATM</i>	Asociada con LLC quimio-refractaria	Bajo
Delección 17p13	1–3% en el diagnóstico inicial; y > 20% en enfermedad refractaria	<i>TP53</i>	La inactivación de <i>TP53</i> provoca inestabilidad genómica y está relacionada con la resistencia a la radioterapia y/o quimioterapia	Bajo

Además, se ha demostrado que en torno al 80% de los pacientes de LLC poseen al menos una de estas cuatro alteraciones cromosómicas más frecuentes, la delección del(13q), la del(11q), la del(17p) o la trisomía del cromosoma 12 (Döhner et al., 2000).

Otras alteraciones cromosómicas menos frecuentes que se encuentran en los pacientes, son las deleciones en 6q (Cuneo et al., 2004), 9p21 y 10q23, o la trisomía parcial o total de los cromosomas 3, 8, 18 y/o 19 y las duplicaciones de 2p24 (Alhourani et al., 2014; Bosch & Dalla-Favera, 2019; Döhner et al., 2000; Rodríguez-Vicente et al., 2013). Algunas de estas cuales no se han podido identificar mediante FISH, si no que han requerido el análisis mediante otras plataformas (Tabla 9) (Wan Mohamad Zamri et al., 2023). De todas ellas, la más destacada es la del(6q) que está presente en aproximadamente el 7% de los pacientes. Esta alteración cromosómica se ha asociado con una alta incidencia de células B con una morfología atípica, CD38⁺ y una incidencia intermedia de mutaciones somáticas de *IGHV*, lo que confiere un riesgo y un pronóstico intermedio (Cuneo et al., 2004).

Tabla 9. Las alteraciones cromosómicas menos comunes en pacientes con LLC descubiertas por varias plataformas (Wan Mohamad Zamri et al., 2023).

Alteraciones cromosómicas	Prevalencia al diagnóstico	Plataforma usada	Referencias
Traslocación cromosómica	32–42%	Técnica de bandeado G	(Baliakas et al., 2014; Mayr et al., 2006; Van Den Neste et al., 2007)
Cariotipos complejos	16%	Técnica de bandeado G	(Baliakas et al., 2014; Haferlach et al., 2007)
Deleción de 6q	3–6%	Arrays genómicos	(Cuneo et al., 2004; Stilgenbauer et al., 1999)
Alteraciones en el cromosoma 8 (8p pérdida o ganancia)	2–5%	Arrays genómicos	(Puiggros et al., 2014)
Deleción de 22q11	15%	Arrays genómicos	(Gunn et al., 2009)
Ganancia de 20q13.12	19%	Arrays genómicos	(A. E. Rodríguez et al., 2012)

Cariotipo complejo, presencia de 3 o más anomalías cromosómicas.

Sin embargo, las alteraciones cromosómicas no parecen ser responsables de toda la heterogeneidad clínica de la LLC. Como hemos visto, las mutaciones recurrentes en ciertos genes, como el *TP53* y *BIRC3*, pueden ser responsables por si solos de un mal pronóstico. Por lo tanto, resulta crucial caracterizar con exactitud el perfil de anomalías genéticas, no solo cromosómicas, que expliquen de la heterogeneidad clínica e identificar las bases moleculares que subyacen a esta grave enfermedad para así poder favorecer la llegada de nuevas estrategias terapéuticas.

1.3.3. Estudios de secuenciación

El desarrollo de las nuevas técnicas de NGS y el análisis del número de copias, han permitido por primera vez, una imagen completa del genoma humano, gracias a su capacidad para leer millones de fragmentos de ADN en un mismo análisis (Metzker, 2010). Estas nuevas tecnologías han posibilitado la realización de análisis comparativos entre el genoma de las células tumorales y el de las células sanas, identificando nuevas mutaciones somáticas y germinales antes desconocidas, que son cruciales para el desarrollo del cáncer. Estas nuevas tecnologías nos han proporcionado una perspectiva detallada y completa a nivel genómico, sobre cómo se desarrollan los cánceres (Stratton et al., 2009).

Entre las principales tecnologías de NGS podemos encontrar los análisis de genoma y exoma completo, los análisis de secuenciación de ARN (RNA-seq, por sus siglas en inglés) y ChIP-Seq y los métodos basados en bisulfito. Estas tecnologías nos permiten, dependiendo del material biológico y el procesamiento previo de las muestras, detectar mutaciones somáticas y germinales puntuales, pequeñas inserciones/deleciones cromosómicas, reordenamientos cromosómicos y variaciones en los mecanismos de *splicing* (Harris et al., 2010; Meyerson et al., 2010).

Cuando se han aplicado estas tecnologías en la investigación de la LLC se han identificado numerosos genes, algunos de ellos asociados a las alteraciones cromosómicas comentadas previamente. Además, han proporcionado una imagen completa del panorama genómico de la enfermedad. En particular, la secuenciación del exoma completo (WES) demostró la gran variabilidad genética presente en esta patología, y también reveló la existencia de nuevas mutaciones genéticas frecuentes, potencialmente involucradas en determinar el origen y el desarrollo de la enfermedad (Puente et al., 2011; Quesada et al., 2011; Rossi, Fangazio, & Gaidano, 2012; Wang et al., 2011).

La primera vez que se secuenció el genoma completo de pacientes con LLC fue en 2011, donde se secuenciaron dos pacientes con *IGHV* mutado y otros dos pacientes con *IGHV* no mutado (Puente et al., 2011). En este estudio se descubrieron más de 1.000 variantes somáticas en cada paciente, con 45 genes afectados que alteran sus proteínas codificantes. De todos estos genes, únicamente se encontró que cuatro de ellos (*NOTCH1*, *MYD88*, *XPO1* y *KLHL6*) se expresaban y mutaban de forma recurrente en un conjunto de validación de 169 muestras, sugiriendo que estos genes estaban implicados en el desarrollo de la enfermedad. Sorprendentemente, solo el gen *NOTCH1* había sido identificado previamente en LLC, (Sportoletti et al., 2010) y estudios funcionales demostraron que la mutación era una delección recurrente de dos bases codificantes que producían una forma truncada de *NOTCH1* que se acumulaba en las células. Estos resultados junto con estudios posteriores, mostraron que la mutación somática de *NOTCH1* se podía considerar un factor pronóstico independiente para las formas más agresivas de LLC (Fabbri et al., 2011; Nadeu et al., 2016; Rossi, Rasi, et al., 2012; Villamor et al., 2013). La importancia de estos hallazgos, se ve reflejada en el estudio de este gen como un potencial objetivo terapéutico para pacientes con LLC (Rosati et al., 2013) y para la construcción de modelos de pronóstico (Cortese et al., 2014).

En este primer análisis de secuenciación genómica de LLC (Puentes et al., 2011) se aprovechó además para identificar mutaciones puntuales somáticas recurrentes y describir el perfil mutacional característico de los casos de *IGHV* mutado. Los resultados sugirieron una activación de la polimerasa- η que es propensa a errores y podría explicar las mutaciones recurrentes, mediante el proceso normal de hipermutación somática. A través de la asociación de este perfil mutacional con sus diferentes consecuencias clínicas, se ha logrado diferenciar a los pacientes de LLC con *IGHV* mutado de aquellos con *IGHV* no mutado.

Ese mismo año se llevaron a cabo dos estudios de exoma completo en dos grandes cohortes de pacientes de LLC (Quesada et al., 2011; Wang et al., 2011). Estos estudios no solo confirmaron la delección recurrente en *NOTCH1*, sino también descubrieron nuevas mutaciones somáticas que alteran proteínas y afectan de forma recurrente a varios genes con frecuencias variables. Por último, estos estudios favorecieron la descripción completa del perfil mutacional de pacientes con LLC *IGHV* mutado y no mutado (Figura 6).

Figura 6. Mutaciones recurrentes en la LLC.



El tamaño de cada símbolo genético es proporcional al logaritmo de la frecuencia mutacional del gen correspondiente, como se describe en Quesada et al. (2011) y Wang et al. (2011) (Quesada et al., 2011; Wang et al., 2011). Las frecuencias se han corregido en función del tamaño del gen y la composición de los codones, como se informa en Quesada et al. Los genes en rojo están mutados preferentemente en casos sin mutación de *IGHV*, los genes en azul están mutados en casos con mutación de *IGHV* y los genes en violeta están mutados en ambos (Quesada et al., 2013).

Las mutaciones somáticas identificadas más comunes son las que están implicadas en las siguientes vías celulares (Nadeu et al., 2016): Reparación del daño celular y control del ciclo celular (*TP53*, *ATM* y *BIRC3*) (Rossi, Fangazio, & Gaidano, 2012), procesamiento de ARN mensajero (ARNm) (*SF3B1*) (Diop et al., 2020; Rossi, Fangazio, Rasi, et al.,

2012), señalización de *NOTCH* (*NOTCH*) (Rossi, Fangazio, & Gaidano, 2012; Villamor et al., 2013) y ciertas vías inflamatorias (*MYD88*) (Gruber & Wu, 2014; Villamor et al., 2013). Además, se ha demostrado que algunas de estas mutaciones son excluyentes entre sí, mientras que otras se segregan de forma conjunta, sugiriendo, en primer lugar, que provienen de líneas evolutivas distintas y, en segundo lugar, que tienen efectos sinérgicos (Baliakas et al., 2015). Como se observa en la Figura 6, entre los genes mutados más recurrentes encontramos a *NOTCH1*, *MYD88*, *TP53*, *ATM*, *SF3B1*, *FBXW7*, *POT1*, *CHD2*, *RPS15*, *IKZF3*, *ZNF292*, *ZMYM3*, *ARID1A* y *PTPN11*. Sin embargo, solo unos pocos de estos genes han demostrado tener un papel pronóstico en los estudios de cohortes más grandes y han sido propuestos para su incorporación en nomogramas de pronóstico. Estos genes son:

- ***NOTCH1***

Este gen presenta mutaciones recurrentes en el 10-15% de los pacientes. El gen codifica una proteína transmembrana de clase I que actúa como un factor de transcripción activado por ligandos. Esta proteína desempeña un papel clave en la regulación de procesos celulares fundamentales como la diferenciación, la proliferación celular y la apoptosis. En general, más del 90% de las mutaciones de *NOTCH1* se encuentran localizadas en el exón 34, causando la interrupción del dominio PEST. Estas mutaciones se asocian frecuentemente, como hemos visto, con la trisomía del cromosoma 12, la ausencia de mutación en el gen *IGHV*, un curso clínico agresivo, y un mayor riesgo de transformación en linfoma difuso de células B grandes (Cortese et al., 2014; Del Poeta et al., 2013; Mansouri et al., 2013; Nadeu et al., 2016; Rossi, Fangazio, & Gaidano, 2012; Rossi, Rasi, et al., 2012).

- ***SF3B1***

Este gen presenta mutaciones recurrentes en aproximadamente el 10% de los casos, pero su frecuencia se incrementa hasta un 20% en los casos de LLC en progresión y en recaída (Mansouri et al., 2013; Nadeu et al., 2016; Quesada et al., 2011, 2013; Rossi, Fangazio, & Gaidano, 2012; Wang et al., 2011). El gen *SF3B1* codifica una subunidad de un complejo involucrado en el procesamiento del ARNm, específicamente en el *splicing* del ARN, proceso mediante el cual se eliminan los intrones y se unen los exones en los precursores de ARNm. Concretamente, *SF3B1* es un componente del complejo U2 del

spliceosoma, encargado de reconocer los sitios de *splicing* y facilitar el ensamblaje, motivo por el cual ha sido objeto de estudio para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales (Corrionero et al., 2011; Kaida et al., 2007), ya que podría participar en el desencadenamiento de las mutaciones en los pacientes. Además, investigaciones genómicas han descubierto mutaciones en este gen en otras enfermedades, como la mielodisplasia (Papaemmanuil et al., 2011; Yoshida et al., 2011) y otras neoplasias malignas (Makishima et al., 2012), incluyendo los tumores sólidos (Biankin et al., 2012; Ellis et al., 2012; Harbour et al., 2013). En casi todos estos estudios, se ha identificado que las mutaciones afectan al dominio de repetición HEAT C-Terminal de *SF3B1* agrupándose en una región espacial de su estructura, sugiriendo que provocan la interrupción de la unión de la proteína a algún cofactor, disminuyendo la fidelidad del *splicing* de los genes específicos implicados (Quesada et al., 2011). Consecuentemente, con estos resultados y considerando la función esencial del proceso de *splicing* en la biología eucariota, los datos obtenidos a través de RNA-Seq muestran que las mutaciones en este gen no conducen a cambios generalizados en los patrones de *splicing* de las células tumorales (Harbour et al., 2013; Quesada et al., 2011; A. J. Ramsay et al., 2013; Visconte et al., 2012).

Por otro lado, el gen *SF3B1* también está implicado en la represión mediada por *polycomb* de los genes *Hox* y, por tanto, su papel en el desarrollo del tumor podría ser independiente del *splicing* de ARN (Isono et al., 2005). Además, las mutaciones de *SF3B1* se asocian con un curso clínico desfavorable y con la refractariedad a fludarabina (Rossi et al., 2011). En este contexto, resulta evidente que se requieren más estudios que ayuden a determinar el mecanismo que conecta la mutación de *SF3B1* con el desarrollo de la enfermedad.

- ***BIRC3***

Este gen está localizado cerca del gen *ATM* en la región 11q22. El gen *BIRC3* está implicado en la inhibición de la apoptosis y la regulación del factor molecular B (NFB, por sus siglas en inglés). Las mutaciones en este gen provocan codones de terminación que eliminan el dominio de anillo C-Terminal. Las mutaciones y deleciones se han identificado en un 4% de los pacientes y en un 24% de aquellos pacientes con enfermedad refractaria a la fludarabina (Diop et al., 2020; Rossi, Fangazio, Rasi, et al., 2012). Estos datos sugieren que las mutaciones del gen *BIRC3* se asocian con un fenotipo de LLC refractario a la quimioterapia.

- ***TP53***

Las mutaciones en *TP53* se asocian con la delección del(17p) ya que están presentes en el 80-90% de los casos confirmados con dicha delección (Seiffert et al., 2012; Zenz, Vollmer, et al., 2010). Además, estas mutaciones se asocian más frecuentemente, con pacientes de LLC que tienen el *IGHV* no mutado y en pacientes que han recibido quimioterapia. Por todo ello, las mutaciones en el gen *TP53* se han asociado con una mayor progresión de la enfermedad, un mal pronóstico y la quimiorrefractoriedad (Gonzalez et al., 2011; Pospisilova et al., 2012; Rossi, Fangazio, Rasi, et al., 2012; Zenz, Eichhorst, et al., 2010; Zenz, Vollmer, et al., 2010). Estudios más recientes han demostrado que los subclones con diminutas mutaciones en *TP53* (solo detectables mediante secuenciación ultra profunda de NGS), son importantes desencadenantes de la evolución de la LLC, asociándose a una evolución clínica más agresiva, pero además, son mucho más frecuentes en el momento de la recaída, por lo que se usan como predictores de la quimiorrefractoriedad (Rossi et al., 2014).

Generalmente, las mutaciones en este gen provocan la inactivación funcional completa vía p53, que resulta esencial para responder al daño del ADN e inducir la apoptosis celular. Otro mecanismo afectado por las mutaciones de *TP53* es la sobreexpresión de MDM2, ubiquitina ligasa específica de p53, que media en la degradación de p53. Se ha demostrado que está sobreexpresada en el 50-70% de los pacientes con la enfermedad (Koníková & Kusenda, 2003; Watanabe et al., 1996). Esta sobreexpresión de MDM2 implica la represión de un gran número de genes y miRNAs dependientes de p53, como el miRNA34a, un efector descendente de p53, que se encuentra en niveles muy bajos en los pacientes de LLC. Este miRNA está implicado en la regulación de la senescencia, la apoptosis y la detención del ciclo celular, por lo que se podría correlacionar su baja expresión con un curso más agresivo de la enfermedad (Asslaber et al., 2010).

Tabla 10. Mutaciones recurrentes que influyen en el pronóstico de la LLC.

Gen mutado	Región	Implicación	Pronóstico
<i>TP53</i>	17p13.1	La inactivación de <i>TP53</i> provoca inestabilidad genómica y está relacionada con la resistencia a la radioterapia y/o quimioterapia	Bajo
<i>NOTCH1</i>	9q34.3	Actúa como protooncogén que regulación de procesos celulares fundamentales y aumenta el riesgo a desarrollar el RT	Bajo
<i>BIRC3</i>	11q22.2	La mutación de <i>BIRC3</i> conduce a la activación independiente del ligando de la vía constitutiva NFκB, lo que induce la proliferación y supervivencia celular	Bajo
<i>SF3B1</i>	2q33.1	La mutación de <i>SF3B1</i> provoca un empalme defectuoso del ARNm y una desregulación del ciclo celular, lo que conduce a una rápida progresión de la enfermedad	Bajo

Los sucesivos estudios genómicos han revelado también una amplia heterogeneidad intraclonal entre las diferentes subpoblaciones de LLC a lo largo de la evolución de la enfermedad (Knight et al., 2012; Landau et al., 2013; Landau & Wu, 2013; Schuh et al., 2012). Según estos estudios, el número de alteraciones genómicas tiende a aumentar conforme la enfermedad evoluciona y se ve muy influenciado por los tratamientos que condicionan la evolución clonal de los subclones afectados. Estos subclones mutados son muy importantes ya que se vuelven prevalentes en las poblaciones leucémicas justo en el momento de la recaída, condicionando la enfermedad hacia un curso más agresivo (Gruber & Wu, 2014; Rossi et al., 2014).

Por otro lado, estudios más recientes del genoma de pacientes de LLC, centrado en el análisis de *microarrays* de *copy number variations* (CNVs, por sus siglas en inglés), han identificado 74 regiones del genoma afectadas. Entre ellas podemos encontrar 14 regiones bien conocidas y descritas previamente como, por ejemplo, las del(13q14.2), del(11q22.3), y del(17p13.1). De las 60 regiones identificadas, 27 correspondieron a regiones completamente nuevas, que no habían sido previamente asociadas con la patología, mientras que las 33 regiones restantes se correspondieron con alteraciones del número de copias que deben ser investigadas con mayor profundidad ya que es necesario determinar su posible superposición. Este estudio también permitió la identificación de la región del *TP53* y la del(17p13.1), que es posiblemente la región más relevante debido a su conocida asociación con un pronóstico desfavorable. Además, se identificaron genes diana en siete de las regiones nuevas, entre las que destacaron *PCMI*/del(8p), *IRF2BP2*/del(1q42.2-q42.3) y *SMCHD1*/del(18p11.32-p11.31) (Robbe et al., 2022).

Finalmente, los análisis de secuenciación de RNA-seq han demostrado que las alteraciones en microARNs no codificantes son también importantes para el desarrollo de la patología. A parte de los ya comentados (miRNA15A y miRNA16A) (Calin et al., 2002), estos estudios han descrito otras alteraciones específicas de estos microARN asociados con la LLC. Entre ellos podemos destacar miRNA 29a/b, miRNA 29c, miRNA 34b, miRNA 181b, miRNA 3676 o miRNA 155. Generalmente, las alteraciones en microARNs provocan su desregulación a la baja provocando inhibición de las vías implicadas que, en la mayoría de los casos, afectan a la apoptosis, favoreciendo así una proliferación descontrolada de las células leucémicas afectadas (Balatti et al., 2015; Cui et al., 2014; Davari et al., 2021; Golovina et al., 2024; P. Liu et al., 2024).

1.3.4. Estudios de epigenoma

Como hemos descrito anteriormente, la LLC ha sido tradicionalmente estudiada a través del análisis genómico, pero en los últimos años, los estudios del epigenoma han emergido como una herramienta crucial para comprender mejor su patogénesis, su evolución y, sobre todo, la diversidad de la enfermedad. Estos estudios se basan en el análisis de las modificaciones reversibles del genoma, como la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, la remodelación de la cromatina y la regulación mediada por ARNs no codificantes (ncRNA, por sus siglas en inglés).

En el año 2012 se realizó uno de los primeros estudios del epigenoma de la LLC, donde combinaron la secuenciación de bisulfito del genoma completo y *microarrays* de alta densidad para caracterizar los metilomas de 139 pacientes y varias subpoblaciones específicas de células B. Los resultados de este estudio demostraron la aparición de modificaciones epigenéticas generalizadas en todos los pacientes y durante la evolución de la enfermedad. El principal resultado de este estudio fue la identificación de la hipometilación en determinados genes como una firma epigenética clave en la LLC. Esto ha ayudado a redefinir la clasificación de los pacientes en tres grupos clínicos: aquellos con *IGHV* mutado, *IGHV* no mutado y un tercer grupo intermedio con características fenotípicas mixtas. Además, la comparación de los patrones de metilación entre poblaciones de células B, mostró que las células B malignas con *IGHV* no mutado parecen derivar de células B del centro pregerminal, mientras que las células con *IGHV* mutado parecen tener su origen en células B del centro germinal. Finalmente, el análisis de la

interacción entre las alteraciones genómicas y epigenéticas de las muestras de LLC, mostró que las muestras con mutaciones en *NOTCH1* y *SF3B1* muestran un patrón de metilación de ADN distinto, lo que sugiere una interacción entre los eventos genómicos más frecuentes y la reprogramación epigenética asociada con esta neoplasia (Kulis et al., 2012).

Los resultados obtenidos subrayan claramente el potencial de la epigenética en la LLC, ofreciendo nuevas perspectivas sobre la progresión de la enfermedad y abriendo la posibilidad a estrategias terapéuticas más personalizadas. En línea con estos hallazgos, los nuevos estudios se han centrado en analizar estas modificaciones epigenéticas, especialmente aquellas que modifican las histonas, es decir, que influyen sobre elementos promotores, potenciadores activos y regiones del genoma transcripcionalmente activas, así como, la metilación del ADN y los ARN no codificantes. El objetivo es entender mejor su impacto en la biología tumoral, explorar su potencial como dianas terapéuticas y como moduladores de procesos esenciales como la expresión génica y la estabilidad genómica.

- **Metilación del ADN**

La metilación del ADN es un proceso epigenético que regula la expresión génica al impedir la unión entre los factores de transcripción y los promotores. Particularmente, en la LLC, los estudios de metilación del genoma completo han permitido identificar tres subgrupos distintos de LLC, lo que ha redefinido los subgrupos previamente encontrados en estudios anteriores (Kulis et al., 2012). Estos grupos son: LLC de tipo célula B naïve, LLC intermedia y LLC de tipo célula B de memoria. Estos grupos muestran diferencias en los niveles de mutación de *IGHV* y en las características clínicas (como el tiempo hasta el primer tratamiento o la supervivencia) (Queirós et al., 2015). Otros estudios mostraron que los casos de LLC con *IGHV* mutado y no mutado son diferentes a nivel epigenético, ya que se identificaron diferentes firmas de metilación en miles de sitios CpG (Kulis et al., 2012). La importancia clínica de estos subgrupos epigenéticos también se ha validado cuando se analizan los datos clínicos, ya que la LLC con *IGHV* mutado muestra una respuesta favorable al régimen de fludarabina-ciclofosfamida-rituximab (Wojdacz et al., 2019).

Además, se ha demostrado que las alteraciones epigenéticas, aunque están asociadas con la LLC, emergen antes del inicio de la enfermedad y persisten a lo largo de sus distintas etapas de la misma (Wojdacz et al., 2019). También se observó que los

cambios de metilación del ADN en las células de LLC son limitados (Wojdacz et al., 2019). No obstante, en pacientes específicos se observa una evolución epigenética significativamente diferente como, por ejemplo, en aquellos que han recaído (Kretzmer et al., 2021). Las células de LLC se caracterizan en estos estudios por una gran hipometilación en comparación con las células B de memoria (Kulis et al., 2012; Tsagiopoulou et al., 2019). Estas alteraciones de hipometilación se agrupan principalmente en los genes y las regiones de heterocromatina, mientras que en las células sanas la hipometilación se produce principalmente en los promotores y las regiones relacionadas con *Polycomb* (Tsagiopoulou et al., 2019). Estas alteraciones pueden preceder al tratamiento o surgir tras una recaída, afectando a regiones enriquecidas con sitios de unión de factores de transcripción como GATA, STAT, HOX y FOX (Tsagiopoulou et al., 2019).

- **Modificaciones de histonas**

Al igual que la metilación del ADN, la modificación de histonas es un proceso epigenético que regula la expresión génica mediante el empaquetamiento del ADN, tanto cuando se encuentra transcripcionalmente activo (eucromatina) o inactivo (heterocromatina). Las modificaciones de histonas, como la metilación o acetilación de las colas de histonas, que afectan el acceso de los factores de transcripción al ADN, son reversibles y afectan la accesibilidad de los factores de transcripción al ADN (Bannister & Kouzarides, 2011). Los estudios han demostrado que los cambios en los patrones de las modificaciones de histonas se han asociado a numerosas neoplasias, entre las que se incluyen la LLC (Ernst et al., 2010; Pastore et al., 2019; Van Haaften et al., 2009; Yao et al., 2024). Un estudio reciente que investigaba la acetilación de H3K27 (H3K27ac) demostró que 297 superpotenciadores (*super-enhancers*) estaban regulados de forma diferencial en la LLC en comparación con las células B normales (Pastore et al., 2019). Este tipo de acetilación se incrementa en genes clave para la proliferación y diferenciación linfocitaria, como *BCL2*, *LEF1* y *CTLA4* (Kosmaczewska et al., 2005; Robertson et al., 1996a; Wang et al., 2014). Pero esta no es la única modificación de histonas que se ha asociado a la LLC. La trimetilación de la H3K27 (H3K27me3) y la H3K4 (H3K4me3) también se han asociado con la patología. Mientras que un nivel alto de H3K4me3 y unos niveles bajos de H3K4me3 y H3K27ac se han asociado con un silenciamiento genético uniforme en las células B

no afectadas (Pastore et al., 2019). Se requieren numerosas proteínas para conseguir la transferencia de los grupos metilo o acilo a las colas de las histonas y producir su modificación. Algunas de estas proteínas se han asociado de manera significativa con neoplasias entre las que se incluye la LLC. Podemos destacar EZH2 que es una subunidad del complejo represor *Polycomb 2*, un complejo con actividad de metiltransferasa de histonas, principalmente responsable de H3K27me3 (Yoo & Hennighausen, 2012). Esta subunidad se demostró que estaba sobreexpresada en pacientes de LLC con *IGHV* no mutado, lo que se asoció a niveles altos de H3K27me3. Este aumento en la expresión de EZH2 también se asoció con una mayor viabilidad celular de LLC, mientras que, por el contrario, una expresión baja de EZH2 resultó en un aumento de la apoptosis. Así pues, inhibidores de EZH2 han demostrado reducir los niveles de H3K27me3 e inducir apoptosis, lo que ha convertido a EZH2 en un potencial objetivo terapéutico para los subtipos más agresivos de la enfermedad (Papakonstantinou et al., 2016). Por último, también se han encontrado otros genes relacionados con la remodelación de la cromatina implicados en la LLC, como *ARID1A*, *CHD2* y *SETD2*. No obstante, se han descrito en tan solo aproximadamente el 2%, el 5% y el 4% de los casos de LLC, respectivamente (Parker et al., 2016; Puente et al., 2015; D. Rodríguez et al., 2015).

- **ARN no codificante**

Los ncRNA tienen un papel importante en la regulación de procesos biológicos, como la señalización, desarrollo y la diferenciación celular. De ellos, algunos pueden tener funciones en la traducción, como es el ARN transferente (RNAt, por sus siglas en inglés), pero otros son parte de los mecanismos de regulación epigenética. Entre estos últimos podemos clasificar los ARNs en cortos (sncRNAs, por sus siglas en inglés) y largos (lncRNAs, por sus siglas en inglés), en función de si sus transcritos son o no mayores de 200 nucleótidos. Los miRNAs son un tipo específico de sncRNA, cuya función principal es la de silenciar la expresión génica a nivel postranscripcional (Zhang et al., 2019). Como hemos comentado anteriormente, entre ellos podemos destacar, en primer lugar, el miRNA-155, ya comentado previamente, que desempeña un papel en la regulación de la expresión génica en las células B (Vigorito et al., 2007) y que está sobreexpresado en LLC (Elton et al., 2013) y, en segundo lugar, miRNA-15a y miRNA-16-1, que se encuentran en una región frecuentemente eliminada

(13q14), y se encargan de regular negativamente a *BCL2* (Pekarsky et al., 2018). Por último, es necesario mencionar el miRNA-34 que presenta unos niveles muy bajos de expresión en LLC (Ferracin et al., 2010) y que también influye en la expresión de *BCL2* (X. Lin et al., 2014) y, por tanto, en regulación de la apoptosis celular (Shanesazzade et al., 2018).

Por otro lado, los lncRNAs están implicados en la regulación transcripcional y postranscripcional, por lo que se han propuesto como una herramienta de diagnóstico para ciertos tipos de cáncer (Y. Qian et al., 2020). Se ha demostrado que algunos de estos lncRNAs pueden actuar como supresores de tumores (Marín-Béjar et al., 2017). En pacientes de LLC se ha demostrado que cuando *P53* es funcional es capaz de inducir a los lncRNAs NEAT1 y lincRNA-p21 que correlacionan con los niveles de la apoptosis inducida por el daño al ADN (Blume et al., 2015). Además, la delección de 13q14 en la LLC resulta en la pérdida de *DLEU1* y *DLEU2*, dos lncRNAs asociados con la regulación de la supresión tumoral a través de interacciones con NF- κ B (Dal Bo et al., 2011; Garding et al., 2013).

Considerando los estudios mencionados, resulta evidente que los estudios epigenómicos han mejorado nuestra comprensión de los mecanismos subyacentes al desarrollo y progresión de la LLC. Como hemos visto, se han identificado tres mecanismos principales en la regulación de la expresión génica y la evolución tumoral. Estos avances no solo han ampliado el conocimiento de la biología de la LLC, sino que además han generado nuevas oportunidades para desarrollar terapias específicas dirigidas en base a las alteraciones epigenéticas, lo que puede mejorar los resultados clínicos de la patología.

1.3.5. Estudios de asociación del genoma completo

Como hemos mencionado con anterioridad, la LLC se caracteriza por una notable heterogeneidad genética, lo que complica tanto su diagnóstico como su tratamiento. Esta heterogeneidad es reflejo de la existencia de un amplio abanico de mutaciones somáticas, alteraciones epigenéticas y patrones de expresión génica, que sugieren que la LLC es un espectro de subtipos moleculares. En este contexto, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) han emergido como una herramienta esencial para identificar variaciones genéticas germinales asociadas tanto con la susceptibilidad a

desarrollar la enfermedad como con la respuesta terapéutica y la progresión. Estos estudios han permitido desentrañar la complejidad genética de la LLC, revelando nuevos genes de riesgo y aportando información valiosa sobre los mecanismos biológicos subyacentes. Al abordar la heterogeneidad genética, los GWAS no solo contribuyen a una mejor comprensión de la patogénesis de la LLC, sino que también abren la puerta a enfoques más personalizados en su tratamiento y manejo clínico.

Este tipo de estudios tratan de identificar qué genes y mutaciones están implicados en el desarrollo de una determinada enfermedad, a través de la caracterización masiva de marcadores genéticos y el análisis de asociación en grandes cohortes de casos y controles sanos, representando la población general. Al contrario que en los estudios de genes candidato, los GWASs no se basan en una hipótesis previa, si no que se limitan a analizar masivamente las variaciones germinales presentes en todo el genoma. Aunque los GWASs han aportado una información muy valiosa, también han demostrado claramente que las variantes genéticas identificadas no son siempre variantes causales directas, lo que dificulta notablemente el poder conocer los mecanismos biológicos en los que están implicadas las variantes identificadas (Bush & Moore, 2012; McCarthy et al., 2008; Visscher et al., 2012).

El primer GWAS realizado con éxito se publicó en 2005 (Haines et al., 2005). Desde entonces, esta herramienta se ha utilizado para identificar variantes genéticas asociadas con múltiples enfermedades incluyendo tumores sólidos, enfermedades autoinmunes y hematológicas, entre otras muchas (Berndt et al., 2013a; Gentiluomo et al., 2022; D. H. Kim et al., 2011; Phipps et al., 2016). Además de utilizarse para la identificación de genes de susceptibilidad, los GWASs han sido utilizados para el estudio de marcadores asociados con la supervivencia de los pacientes, la respuesta a fármacos o la presencia de ciertas características clínicas, debiéndose analizar en estos últimos casos cohortes específicas de pacientes. El verdadero potencial de los GWASs radica en su capacidad para caracterizar el riesgo genético individual, lo que abre la puerta a la llegada en el futuro de posibles tratamientos más personalizados y adaptados al perfil genético de cada paciente.

La metodología de estos estudios se basa en el reclutamiento de una cohorte de casos y controles y el genotipado con *arrays* de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) distribuidos a lo largo de todo el genoma (entre 500.000 y 1 millón

de marcadores). Una vez genotipados los marcadores genéticos incluidos en los *arrays*, se puede realizar un análisis de imputación basado en los valores conocidos de desequilibrio de ligamiento (LD, por sus siglas en inglés) de los SNPs y que permiten extraer información de las variantes genéticas distribuidas por todo el genoma. El LD considera la asociación no aleatoria de unos determinados alelos en dos o más *loci* y puede verse influenciado por la tasa de recombinación, la tasa de mutación, la deriva genética y/o la selección, de manera que cada señal de asociación identificada en un GWAS puede afectar a cientos de SNPs distribuidos en uno o más genes (Slatkin, 2008). Una vez realizada la imputación, se procede a realizar el análisis de asociación donde se comparan las frecuencias alélicas de los SNPs del genoma entre casos y controles. Este análisis permite identificar aquellos marcadores genéticos enriquecidos en casos frente a controles. Debido a la gran cantidad de marcadores genéticos analizados (~7.000.000), se ha establecido un umbral estándar de significación típico para GWAS de $p = 5 \times 10^{-8}$, que se ha definido tras considerar el número asociaciones realizadas.

Por último, debemos comentar que este tipo de estudios tiene ciertas limitaciones, aunque la mayoría pueden corregirse mediante un correcto diseño en el reclutamiento de la población de estudio, la inclusión de controles de calidad y la realización de los ajustes estadísticos pertinentes (Pavan et al., 2020; Turner et al., 2011). Las principales limitaciones de los GWASs son: el tamaño muestral, el poder estadístico, los falsos positivos, la estratificación poblacional y la identificación de la variante causal (Visscher et al., 2017). De todas ellas, la más limitante suele ser el tamaño de la población ya que, si no tenemos un número mínimo de individuos, no podríamos establecer las asociaciones estadísticas necesarias entre las variantes genéticas y la enfermedad y, si lo hiciéramos, los resultados podrían no ser fiables (falsos positivos) y extrapolables a la enfermedad en términos generales. Es por ello que muchas de las variantes genéticas identificadas hasta la fecha en estudios de GWAS no se han podido replicar o validar en estudios posteriores. Por tanto, la validación de las asociaciones identificadas en estudios de GWAS en grandes cohortes independientes, resulta ser un paso fundamental para poder extraer conclusiones sólidas de este tipo de estudios.

El papel de estas mutaciones germinales en el riesgo de la LLC ha sido ampliamente estudiado mediante estudios de GWAS, con un total de doce investigaciones directas (Backman et al., 2021; Berndt et al., 2013a, 2016, 2022; Brandes et al., 2021; Di Bernardo et al., 2008; Jiang et al., 2021; Law, Berndt, et al., 2017; Law, Sud, et al., 2017; Slager et

al., 2011, 2012; Speedy et al., 2013). Adicionalmente, un estudio ha identificado asociaciones mediante superposición genética entre la LLC y enfermedades autoinmunes (Din et al., 2019) y, más recientemente, se han descubierto marcadores genéticos asociados con el tiempo hasta el primer tratamiento en pacientes con LLC (W. Y. Lin et al., 2021). En definitiva, este tipo de estudios ha sido capaz de identificar un total de 102 SNPs asociados con la LLC en distintas poblaciones, de los cuales solo 50 son asociaciones consideradas completamente independientes. Aunque el riesgo de LLC conferido por cada uno de estos *loci* individuales es modesto, su alta frecuencia en la población general hace que su contribución a la enfermedad sea significativa, con un riesgo general aumentado basado en el número de variantes afectadas en cada paciente (Kleinstern & Slager, 2023; Sud et al., 2017). La mayoría de los SNPs identificados son intrónicos y, a menudo, se ubican cerca de genes relevantes en la LLC que afectan, por ejemplo, a mecanismos tan importantes como la apoptosis, la función de los telómeros, la diferenciación celular y la señalización de las células B, entre otros procesos (Kleinstern & Slager, 2023; Yan et al., 2020). Además, se ha observado que algunas de las variantes genéticas identificadas se encuentran enriquecidas en regiones de cromatina activa (Ott et al., 2018; Speedy et al., 2019), lo que sugiere una función reguladora de los genes. Un ejemplo representativo es la identificación de un SNP que afecta a la región no traducida 3' UTR del factor regulador del interferón 4 (*IRF4*, por sus siglas en inglés). Este gen está profundamente involucrado en distintas etapas de la diferenciación y desarrollo de las células B (N. S. De Silva et al., 2012; Shaffer et al., 2009) y su regulación negativa se ha asociado con el desarrollo de LLC (Di Bernardo et al., 2008). Posteriores estudios, utilizando modelos murinos *knock-out* para *IRF4*, demostraron la correlación funcional entre los bajos niveles de *IRF4* y el desarrollo de la LLC (Shukla et al., 2013; Simonetti et al., 2013). Además, también se demostró que dos mutaciones sin sentido recurrentes, *IRF4*-S114R e *IRF4*-L116R, tienen una importancia funcional clara, en el dominio de unión al ADN de la proteína (Puente et al., 2015).

En conclusión, los estudios de GWAS desarrollados en las últimas décadas nos han permitido analizar de forma masiva los SNPs a lo largo de todo el genoma e identificar los principales genes de susceptibilidad a la enfermedad. Además, también se han podido identificar los marcadores genéticos que modulan la respuesta terapéutica, la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes.

Al integrar el conocimiento generado por todos los diferentes estudios genómicos y epigenómicos recientes, se ha proporcionado una visión integral completa de las alteraciones que pueden impulsar el desarrollo y la progresión de la LLC. Se han descubierto una gran cantidad de nuevos genes mutados agrupados en vías funcionales y se han identificado diferentes subtipos genéticos y epigenéticos de la LLC que pueden superponerse parcialmente con los subtipos definidos clínicamente (Hallek et al., 2018; Hallek & Al-Sawaf, 2021). Uno de los principales desafíos que ha surgido de los estudios recientes es el descubrimiento de la tremenda heterogeneidad molecular de la enfermedad, que en parte subyace a la diversidad clínica observada en los pacientes. La mayoría de los estudios se han realizado en el momento del diagnóstico o en pacientes pretratados y no se entiende bien cómo la enfermedad modula el genoma y el epigenoma a lo largo de la evolución de la enfermedad. Además, aún se desconocen las implicaciones clínicas y funcionales de una gran cantidad de nuevos genes mutados y regiones reguladoras moduladas. Toda esta información es esencial para comprender las interacciones entre las modificaciones genómicas y epigenómicas y la comunicación cruzada entre las células tumorales y el microambiente que influyen en la evolución de la enfermedad. Para trasladar estas nuevas perspectivas a la práctica clínica será necesario un esfuerzo integrado para comprender mejor estos mecanismos básicos en el contexto de la compleja evolución de la enfermedad.

1.4. Vías implicadas en la patogénesis de la LLC. Autofagia

En los últimos años, todos estos avances en el conocimiento de la comprensión biológica de la LLC han demostrado que es una enfermedad heterogénea y multifactorial que no se puede atribuir a una única alteración genética ni a un conjunto de factores clínicos específicos. Esto la convierte en un rompecabezas biológico complejo que aún está lejos de ser completamente descifrado. Para desentrañar los mecanismos que subyacen a la enfermedad, resulta esencial profundizar en las vías celulares de señalización implicadas en su desarrollo y progresión.

Entre las principales vías afectadas en la LLC se encuentran la estabilidad genómica y la respuesta al daño del ADN, la señalización de *NOTCH1*, la maquinaria de *splicing*, el metabolismo del ARN, la señalización NFκB y la señalización del receptor de células B

y los *Toll-like receptors* (TLRs). Estas vías no solo juegan un papel en la supervivencia y proliferación de las células tumorales, sino también en la resistencia a los tratamientos, lo que subraya su importancia clínica.

Un aspecto clave en la progresión de la LLC es la alteración en los mecanismos de muerte celular, en particular en la apoptosis, que es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular (Huang et al., 2015). La disfunción en este proceso permite la acumulación y proliferación de células malignas. Además, otras formas de muerte celular, como la autofagia y la necroptosis, también han cobrado relevancia en los últimos años.

En este contexto, la autofagia, un proceso celular de reciclaje y degradación de componentes intracelulares, ha emergido como un mecanismo de interés en la LLC y el resto de neoplasias hematológicas (García Ruiz et al., 2022). A continuación, profundizaremos en la importancia de la autofagia y su papel en la biología de esta enfermedad.

1.4.1. Autofagia

Entre los diversos procesos biológicos, la autofagia ha atraído cada vez más atención en los últimos años, ya que es un proceso catabólico que se encarga de mantener la homeostasis celular (Chun & Kim, 2018). Se trata de un proceso adaptativo de supervivencia celular, por el cual la célula, en condiciones de estrés, como la privación de nutrientes o factores de crecimiento, condiciones hipóxicas, presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), agregados proteicos, daños en el ADN o en los orgánulos e incluso el contacto con patógenos intracelulares (Kroemer et al., 2010), activa una vía degradativa esencial en la que los lisosomas juegan un papel clave para mantener la homeostasis celular (Glick et al., 2010; Yu et al., 2018).

El proceso de autofagia puede dividirse en dos principales mecanismos: la microautofagia y la macroautofagia. La microautofagia es un proceso no selectivo en el que las sustancias o moléculas a degradar son engullidas mediante la invaginación directa de la membrana, ya sea del lisosoma o de la vacuola. Por otro lado, la macroautofagia, comúnmente conocida simplemente como autofagia, implica el reciclaje de orgánulos dañados o disfuncionales mediante el autofagosoma, que posteriormente se fusiona con el lisosoma

para la degradación del material contenido (Chun & Kim, 2018; Galluzzi et al., 2017; Glick et al., 2010).

Además, la autofagia también puede clasificarse en selectiva y no selectiva. La autofagia no selectiva ocurre de manera inespecífica, sin un reconocimiento previo del material a degradar y suele estar implicada en el mantenimiento de las funciones celulares básicas. Por el contrario, la autofagia selectiva implica el reconocimiento específico del material a degradar, generalmente mediado por chaperonas, dirigiendo de forma precisa estos componentes al lisosoma. Los materiales degradados en la autofagia selectiva suelen ser productos nocivos para la célula, como proteínas dañadas, agregados tóxicos, toxinas o bacterias invasoras (Chun & Kim, 2018; Galluzzi et al., 2017; Kroemer et al., 2010).

En resumen, la autofagia es un proceso esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que permite la degradación y reciclaje de componentes celulares tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Dependiendo de las condiciones desencadenantes y de las necesidades celulares, puede ocurrir un tipo u otro de autofagia. Esto refleja la complejidad y especificidad con las que este mecanismo puede adaptarse a diferentes necesidades celulares. Además de su papel en la eliminación de componentes dañados, la autofagia también puede desempeñar funciones clave en otros procesos como la regulación del metabolismo, la respuesta al estrés y la defensa celular, lo que destaca su importancia en la modulación de la supervivencia y la salud celular (Glick et al., 2010). En el contexto de las células madre pluripotentes, la autofagia además adquiere una relevancia mayor, ya que su homeostasis es esencial para mantener propiedades clave como la autorrenovación y la capacidad de diferenciarse en diversos linajes celulares (Chang, 2020; Guan et al., 2013).

1.4.2. Mecanismo de la autofagia

La autofagia actúa en coordinación con otros procesos clave en el control celular, como son la apoptosis o la maquinaria del proteasoma (Yu et al., 2018). La autofagia es un proceso altamente regulado que se produce en la célula en una serie de pasos, todos ellos mediados por un gran número de genes y proteínas, donde los más conocidos son los genes *ATG*, pero también el complejo mTORC1 y PI3K entre otros (Levine & Kroemer, 2019; V. R. Silva et al., 2020; Urbańska & Orzechowski, 2021). Estos pasos son: la

iniciación, la nucleación y la elongación, la fusión de lisosomas y la degradación del autofagosoma.

- **Iniciación**

El proceso de autofagia se inicia con la formación del autofagosoma, un paso clave que requiere la generación de una membrana de aislamiento específica. Este proceso comienza con la formación de una estructura conocida como "el omegasoma", que se forma a partir de la membrana del retículo endoplasmático (RE). Posteriormente, se desarrolla el "fagóforo", una estructura en forma de copa compuesta por una membrana simple. Aunque el RE es la principal fuente de esta membrana, pueden contribuir otros orgánulos y estructuras celulares, como el aparato de Golgi, los endosomas, las mitocondrias y la membrana plasmática. Este ensamblaje de membranas es fundamental para la formación y elongación del autofagosoma, que culmina en la captura y degradación de los componentes intracelulares destinados a ser reciclados.

En este paso una de las vías más importantes en la regulación involucra al complejo mTOR, una serina/treonina quinasa que forma dos complejos funcionalmente distintos: mTORC1, dependiente de rapamicina y regulador del tamaño celular, y mTORC2, independiente de rapamicina, que modula la organización del citoesqueleto de actina y, por tanto, la forma celular (Costas & Rubio, 2017). mTORC1 juega un papel fundamental en la respuesta a la privación de nutrientes, particularmente en la ausencia de aminoácidos y factores de crecimiento. En condiciones de abundancia de nutrientes, mTORC1 se localiza en el lisosoma, activado por su subunidad Rheb, lo que inhibe la autofagia. Sin embargo, la rapamicina, un inhibidor específico de mTORC1, actúa como un potente inductor de la autofagia, incluso bajo condiciones de abundancia de nutrientes (Mizushima, 2007; Ravanan et al., 2017). mTORC1 interactúa con el complejo ULK1, compuesto por las subunidades ULK1, ATG13, ATG101 y FIP200, todas ellas cruciales para el inicio de la autofagia. En condiciones normales, mTORC1 fosforila ULK1 y ATG13, inactivando el complejo y, por lo tanto, inhibiendo el proceso autofágico. Sin embargo, en situaciones de privación de nutrientes, mTORC1 es inhibido y se disocia del complejo ULK1, lo que conduce a la activación de ULK1. Esta disociación se ve facilitada por la acción de la quinasa AMPK, que inhibe a mTORC1 mediante la fosforilación de las subunidades Rheb y RAPTOR. A continuación, AMPK fosforila y activa ULK1, que, a su vez, fosforila ATG13 y FIP200, activándolos también. La

activación completa del complejo ULK1 desencadena la formación del fagóforo, dando inicio al aislamiento de la membrana y la progresión del proceso autofágico. Además, ULK1 fosforila Beclin-1 dentro del complejo PI3K, lo que facilita el inicio de la vía autofágica (Z. Dong et al., 2016; Hansen et al., 2018; Noda, 2017; Ravanan et al., 2017).

- **Nucleación y elongación**

La nucleación del autofagosoma se desencadena por la formación de un complejo de clase III PI3K, compuesto por VPS34, Beclin-1 (ATG6), ATG14L y p150 (VPS15). La formación de este complejo está regulada principalmente por Beclin-1, localizada en la membrana del retículo endoplásmico, que puede unirse a UVRAG o a diferentes miembros de la familia de *BCL2* y *BCLXL*, activando o inhibiendo la autofagia, respectivamente. La actividad del complejo PI3K es modulada por ULK1, que fosforila tanto a Beclin-1 como a AMBRA1, una proteína que se une a Beclin-1 durante el proceso. ULK1, al ser activado, fosforila y activa el complejo PI3K, promoviendo así su reclutamiento hacia el RE, donde se inicia la formación de los omegasomas, que a su vez dan lugar al fagóforo en formación (Devereaux et al., 2013; Z. Dong et al., 2016; Müller & Proikas-Cezanne, 2015).

En el RE, el complejo PI3K activado se encarga de producir PIP3 (fosfatidilinositol-3-fosfato) en la membrana de los omegasomas, lo que recluta proteínas de la familia WIPI. Estas proteínas WIPI son responsables de atraer otras proteínas ATG necesarias para el desencadenamiento de la autofagia. Entre estas proteínas, ATG9 es la única proteína transmembrana y desempeña un papel esencial en el transporte de lípidos hacia el fagóforo, contribuyendo a su expansión. Generalmente ATG9 se localiza en la membrana del aparato de Golgi y en los endosomas (Devereaux et al., 2013; Müller & Proikas-Cezanne, 2015).

El reclutamiento de proteínas en el sitio de formación del fagóforo produce su expansión, un proceso mediado por dos sistemas de conjugación de proteínas similares a la ubiquitina: el sistema ATG12-ATG5-ATG16L y LC3-II (ATG8). En primer lugar, el sistema ATG12-ATG5-ATG16L se asocia a la membrana del fagóforo, facilitando la incorporación de lípidos. Posteriormente, LC3 se conjuga con fosfatidiletanolamina y el LC3 conjugado (LC3-II) se inserta en la membrana en expansión del fagóforo por medio del sistema ATG12-ATG5-ATG16L. LC3-II, actúa como un marcador de autofagosomas y permite la interacción con los receptores de carga autofágica durante el proceso de

autofagia selectiva (Costas & Rubio, 2017; Djavaheiri-Mergny et al., 2019b; Z. Dong et al., 2016; Glick et al., 2010).

A pesar de que la autofagia se considera un proceso de degradación generalmente no selectivo, existe evidencia de que este mecanismo puede exhibir selectividad de sustrato. LC3-II interactúa con la molécula adaptadora SQSTM1/p62, que contiene dominios de unión a ubiquitina, atrapando proteínas ubiquitinadas y uniéndolas a LC3-II. Este tipo de autofagia selectiva es denominado fagocitosis asociada a LC3, aunque también existen otros mecanismos selectivos, como los mediados por chaperonas (Cuervo & Wong, 2014). La participación de p62/SQSTM1 en el reconocimiento de la carga autofágica es crucial, ya que estas proteínas marcan la carga con patrones específicos de ubiquitinación, permitiendo su reclutamiento hacia los autofagosomas a través de LC3-II (Djavaheiri-Mergny et al., 2019b; Hansen et al., 2018; Riffelmacher & Simon, 2017).

- **Fusión con lisosomas y degradación**

Una vez formado el autofagosoma, este se une al endosoma mediante el complejo HOPS que, a su vez, se fusiona con los lisosomas para formar finalmente el autofagolisosoma. En este proceso la proteína GTPasa Rab 7 presente en la membrana de los endosomas es activada por UVRAG para regular esta unión a través de LC3/GABARAP (McEwan et al., 2015). Además, las proteínas SNAREs median la fusión de membranas vesiculares entre el autofagosoma y el lisosoma, dando la conformación en hélice que promueve la fusión. Para la maduración de este proceso además se deben activar las proteínas LAMP1/2 que dan estabilidad a la fusión y facilitan el transporte de materiales. Finalmente, una vez se ha formado el autofagolisosoma, el contenido se degrada mediante las hidrolasas lisosomales y se excreta al citosol por las permeasas (Z. Dong et al., 2016; Nencioni et al., 2013; Ravanan et al., 2017).

Figura 7. El proceso de la autofagia. Esquema representativo del proceso y la maquinaria reguladora principal de la autofagia.

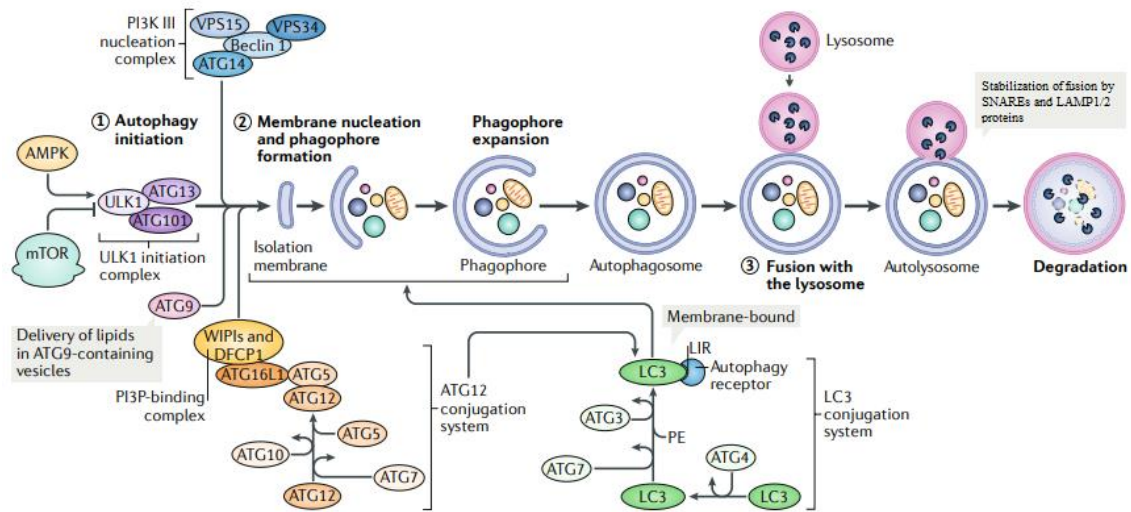


Imagen adaptada de (Hansen et al., 2018).

1.4.3. Autofagia en la hematopoyesis

Recientemente, se ha demostrado que la autofagia también regula otros procesos celulares importantes, como la diferenciación celular, la muerte celular y el ciclo celular (Bialik et al., 2018; Hansen et al., 2018; Levine et al., 2008; Maiuri et al., 2010; Pattingre et al., 2005). Este hecho hace que juegue un papel fundamental en la tumorigénesis y la quimiorresistencia en todo tipo de enfermedades, incluidas las neoplasias hematológicas (Djavaheri-Mergny et al., 2019b; Nencioni et al., 2013; Onorati et al., 2018; Riffelmacher & Simon, 2017). En las neoplasias hematológicas se ha descrito que la autofagia puede tener un papel promoviendo el desarrollo tumoral, pero también reduciendo el daño celular causado por fármacos, lo que hace que las células cancerosas sean resistentes a los protocolos de quimioterapia estándar y puedan crecer y adoptar un fenotipo proliferativo descontrolado que afecta a las células implicadas en la hematopoyesis (Z. Dong et al., 2016; Shahrabi et al., 2019). Además, una vez formado el tumor, la desregulación de la autofagia puede ser usado como un mecanismo adaptativo para estabilizar las proteínas oncogénicas, que deberían ser degradadas en condiciones normales. En las neoplasias hematológicas, el papel de la autofagia parece depender del contexto, variando no solo según el tipo de tumor sino también en base al tipo de progenitor y a la fase específica en la que actúa (iniciación vs. progresión), pudiendo tener

papeles opuestos (Nazio et al., 2019). Todo ello convierte a la autofagia en una diana terapéutica muy interesante en las neoplasias hematológicas (Auberger & Puissant, 2017; Z. Dong et al., 2016; Onorati et al., 2018).

Múltiples estudios han demostrado que la autofagia juega un papel importante en el proceso hematopoyético, ya que está implicada en la remodelación celular durante la diferenciación, el mantenimiento a largo plazo de los tipos celulares y la regulación del equilibrio entre la autorrenovación y la quiescencia en las HSCs (Phadwal et al., 2013; Sotthibundhu et al., 2018; Vijayakumar & Cho, 2019). Esto logra mediante el control de los orgánulos dañados, la reducción de las ROS, la presentación de antígenos por las células dendríticas y la modulación de la inflamación, evitando así la citotoxicidad y el daño al ADN (Y. Li et al., 2012; Riffelmacher & Simon, 2017; Shahrabi et al., 2019).

A nivel genético, Cheung *et al.* demostraron mediante *microarrays* de expresión génica que determinadas HSC quiescentes tenían una firma genética con una regulación positiva de genes claramente implicados en la autofagia como *ULK2*, *PINK1*, el homólogo de *ATG8 Gabarap11* y *FOXO3A* (Cheung & Rando, 2013). Precisamente, este último gen *FOXO3A* codifica para un factor de transcripción cuya función es mantener la quiescencia de las HSC, protegiendo las HSCs de la estimulación proapoptótica (Warr et al., 2013) a través de la inducción de la expresión de genes de autofagia, como *ATG4*, *LC3B*, *ULK2*, *VPS34*, *Beclin1*, *Map11c3b* y *Bnip3* (van der Vos et al., 2012; Warr et al., 2013). Por otro lado, estudios han demostrado que la presencia y acumulación de ROS provoca la activación de los factores FOXO, aumentando los niveles de sestrina, que producen la inhibición de mTORC1 a través de la vía quinasa AMPK, lo que activa la autofagia (C. Chen et al., 2010; J. H. Lee et al., 2010) y, a su vez, contribuye a la quiescencia celular al suprimir la actividad mitocondrial y promover la glucólisis (C. Chen et al., 2008).

La autofagia es también un proceso esencial para el mantenimiento del equilibrio de autorrenovación/diferenciación de las HSCs, como se ha demostrado en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha demostrado que la delección del gen *ATG7* produce un daño severo en la capacidad de autorrenovación de las HSCs, lo que produce una acumulación de mitocondrias aberrantes en estas células aumentando así los niveles de ROS y un mayor daño del ADN (Mortensen et al., 2011; Warr et al., 2013). Un estudio más reciente corroboró estos resultados mediante la investigación de un fenotipo similar a la delección de *ATG7* en las HSCs, la delección de *FIP200*. Esta delección induce la proliferación que,

además, se asocia a una mayor masa mitocondrial y a niveles más elevados de ROS (Cao et al., 2015; F. Liu et al., 2010). Esto resulta esencial para la preservación de las propiedades de las HSCs, debido a que, durante la diferenciación, se produce una transición metabólica de la glucólisis anaeróbica a la fosforilación oxidativa mitocondrial. La alteración prematura de esta transición puede afectar al balance entre la autorrenovación y el destino de diferenciación de las HSCs (Folmes & Terzic, 2016).

Considerando lo mencionado anteriormente, se puede afirmar que el mantenimiento de los niveles basales de autofagia resulta ser crucial para las HSCs, permitiéndoles eliminar mitocondrias dañadas y evitar la acumulación de ROS a través de la mitofagia. Este proceso previene que un exceso de ROS induzca la hiperproliferación de las HSCs y su posterior destrucción a través de la apoptosis. De hecho, las HSCs sanas presentan un número significativamente menor de mitocondrias en comparación con las células más diferenciadas, lo que se debe, posiblemente, al ambiente hipóxico en el que se desarrollan. Este microambiente favorece el metabolismo glucolítico sobre la fosforilación oxidativa, que es característica de las células diferenciadas (Joshi & Kundu, 2013; Vannini et al., 2016). Así pues, se ha propuesto que el nicho hipóxico de las HSCs podría inducir la autofagia mediante la expresión de *Bnip3*, un proceso dependiente del factor HIF1 α (Bellot et al., 2009). Esto es esencial para preservar las propiedades de las HSCs, ya que, durante la diferenciación, se produce una transición metabólica de la glucólisis anaeróbica a la fosforilación oxidativa mitocondrial. La alteración prematura de esta transición puede afectar el balance entre la autorrenovación y el destino de diferenciación de las HSCs (Jang et al., 2015).

En general, los defectos en la autofagia comprometen la función de las HSCs, primero a través de un aumento del estrés oxidativo, que después conduce a alteraciones en el ADN y genera inestabilidad genómica, facilitando el desarrollo de tumores hematológicos. Por tanto, es fundamental explorar nuevas estrategias para identificar las alteraciones en la autofagia y restaurar su función normal en las HSCs dañadas. De conseguirlo se podrían abrir nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento de las neoplasias hematológicas.

1.4.4. Autofagia en la LLC

En la LLC la autofagia ha emergido como un proceso crucial que puede influir tanto en la muerte como en la supervivencia celular, complementando a los mecanismos tradicionales de apoptosis y necrosis celular. Estudios recientes han indicado que la autofagia no solo actúa como un mecanismo de control de calidad celular en la LLC, sino que además puede estar implicada en la respuesta de las células tumorales frente al tratamiento, convirtiéndose así en una diana terapéutica potencialmente relevante (Z. Dong et al., 2016; Shenhe et al., 2018). Dado que las principales vías de muerte celular están interconectadas, es esencial comprender los mecanismos moleculares que median estas interacciones para diseñar combinaciones de fármacos más efectivas y personalizadas que nos ayuden en el manejo de los pacientes con LLC.

La autofagia no solo es esencial en la homeostasis de las HSCs, sino que también es esencial en el mantenimiento de los linfocitos B y T. La primera evidencia de que la autofagia desempeñaba un papel en el desarrollo y la supervivencia de las células T surgió de la delección de *ATG5* en modelos murinos. Esta estrategia demostró que los timocitos de los ratones *wild-type* para *ATG5* experimentaban una diferenciación normal, mientras que el número total de timocitos y células T y B periféricas se reducía significativamente en los ratones con la delección de *ATG5*. Además, los timocitos circulantes de los ratones con la delección mostraban un aumento de la muerte celular y una proliferación alterada tras la activación del TCR (Pua et al., 2007). Estos hallazgos sugerían de manera inequívoca que la autofagia desempeña un papel relevante en la supervivencia y proliferación de los linfocitos T, aunque parece ser prescindible en el proceso de diferenciación. Los estudios que compararon la expresión génica en timocitos normales y deficientes en *ATG5* han revelado además un enriquecimiento de genes asociados a la función mitocondrial, lo que indica una relación entre la autofagia y la eliminación mitocondrial. Este mecanismo es similar al observado durante la diferenciación eritroide, destacando la importancia de la autofagia en el control de la calidad mitocondrial (Stephenson et al., 2009).

La autofagia desempeña un papel dual en la LLC, actuando tanto como mecanismo de supervivencia como de muerte celular.

Por un lado, algunos estudios han demostrado el papel de la autofagia en la promoción de la citotoxicidad (K. Sharma et al., 2014) y la apoptosis de las células tumorales (Levine

et al., 2008; Rosati et al., 2013). En un estudio se demostró que el bloqueo del flujo de la autofagia se asociaba con linfocitosis y un mayor porcentaje de células de LLC (Romero-Macías et al., 2019), lo que estaba en consonancia con previos estudios que mostraron que habían mostrado que la inhibición de la autofagia, mediante el uso de inhibidores como MGCD0103, promovía la muerte celular de las células tumorales (El-Khoury et al., 2014). Además, como hemos visto, la familia de proteínas BCL2 inhibe la autofagia, a través de la unión de Mcl-1 a Beclin-1 inhibiendo así la apoptosis favoreciendo la resistencia a fármacos como la fludarabina (Faria et al., 2006). Sin embargo, la aplicación de obatoclax promovió la disociación de Beclin-1 y Mcl-1, activando la autofagia y produciendo alta citotoxicidad, lo que sugiere que la autofagia dependiente de Beclin-1 es un mecanismo eficaz para superar la resistencia a fludarabina (Faria et al., 2006; A. Sharma et al., 2013). Otros fármacos como venetoclax o flavopiridol favorecen la muerte celular en LLC a través de la activación de la autofagia (Avsec et al., 2021), pero aumentan el síndrome de lisis tumoral en un porcentaje significativo de los pacientes (40%) (Maddocks et al., 2015). Los estudios posteriores que intentaron reducir la toxicidad combinando la ciclofosfamida con flavopiridol y rituximab, obtuvieron resultados favorables (Stephens et al., 2013). En línea con estos resultados, se ha descrito además que la proteína SLAMF1 activa la autofagia al estabilizar indirectamente el complejo Beclin-1–VPS34 (Bologna et al., 2016) y que se encontraron niveles más altos de ARNm de Beclin-1 y ATG5 en pacientes con LLC en comparación con individuos sanos (Kong et al., 2018). Por otra parte, Arroyo *et al.* observaron que una mayor expresión concomitante de las proteínas LC3B, CD38 y ZAP70 se correlacionaba con una progresión más rápida de la enfermedad (Arroyo et al., 2020).

La autofagia puede además proteger a las células leucémicas a través de la eliminación de orgánulos dañados y reducir el estrés oxidativo, promoviendo la resistencia a los tratamientos. Así pues, se puede definir también la autofagia como un proceso de citoprotección y supervivencia para las células tumorales, lo que les proporciona capacidad para la resistencia a los tratamientos farmacológicos.

En línea con esta hipótesis, numerosos estudios han demostrado que al tratar a los pacientes de LLC con dasatinib, que es un inhibidor de la tirosina quinasa, el fármaco desencadena estrés en el RE y reduce la expresión de *Mcl-1* y *BCL-xL*, aumentando la autofagia citoprotectora y provocando resistencia (Pitini, 2011; Tasdemir et al., 2008). Este mecanismo citoprotector se ha descrito también en estudios de resistencia a

vorinostat, un inhibidor de la histona deacetilasas (HDAC, por sus siglas en inglés), en pacientes de LLC que tras una línea de tratamiento con los inhibidores de la autofagia 3-MA y cloroquina pueden recuperar la sensibilidad de las células al vorinostat (Ding et al., 2018). Además, otros fármacos como MGCD013 actúan también disminuyendo el flujo autofágico directamente en las células de LLC, mejorando así la muerte celular inducida por inhibidores de HDAC y quinasas dependientes de ciclina (CDK, por sus siglas en inglés) (El-Khoury et al., 2014).

Todos estos antecedentes sugieren que el papel de la autofagia en la LLC puede variar significativamente debido a la gran heterogeneidad de la enfermedad, lo que resalta la necesidad de un análisis contextualizado. Este papel dual posiciona a la autofagia como una potencial diana terapéutica, subrayando la importancia de comprender los mecanismos moleculares que la regulan en la LLC para el desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas.

1.4.5. Variación genética germinal asociada con la autofagia

Como se ha mencionado previamente, la expresión aberrante de genes relacionados con la autofagia está significativamente asociada con el desarrollo del cáncer (Fraiberg & Elazar, 2020; Maiuri et al., 2009; Tsuchihara et al., 2009). Además, múltiples activadores de la autofagia o genes específicos relacionados con este proceso se encuentran frecuentemente en regiones genómicas implicadas tanto en cánceres sólidos (Bekri et al., 1997; Lebovitz et al., 2015; Liang & Jung, 2010) como en cánceres hematológicos (Riffelmacher & Simon, 2017; Rothe et al., 2019; Taylor et al., 2017b). Asimismo, se ha descrito que su regulación no solo afecta el riesgo de desarrollar neoplasias, sino también la respuesta a tratamientos convencionales, la progresión de la enfermedad y la supervivencia del paciente (Jaganathan et al., 2014).

Diversos estudios han explorado el papel de variantes raras asociadas a neoplasias de células B, como el mieloma múltiple (MM, por sus siglas en inglés), en la modulación de la autofagia. Para ello, se han llevado a cabo numerosos estudios de GWAS, que han sido fundamentales para comprender el papel de la autofagia en el MM (Mitchell et al., 2016; Went et al., 2018). En el MM, estos estudios sugieren un modelo de susceptibilidad basado en la desregulación transcripcional de células B, en el que la autofagia desempeña

un papel crucial. La presencia de mutaciones funcionales en genes relacionados con la vía mTOR (*ULK4*, *ATG5* y *WAC*) y con la vía IRF4-MYC (*CDCA7L*, *DNMT3A*, *CBX7* y *KLF2*) se asocian con un mayor riesgo de desarrollar MM (Went et al., 2018). Además, la variación germinal en la región *ATG2B/GSKIP*, que incluye la duplicación 14q32, predispone a la hematopoyesis clonal temprana, lo que aumenta el riesgo de neoplasias mieloides (Pegliasco et al., 2022; Saliba et al., 2015).

Sin embargo, a pesar de todos estos hallazgos, aún se conoce poco acerca del impacto de la variación en la línea germinal sobre la regulación de este proceso esencial en la LLC. Aunque como hemos visto, los estudios han identificado mutaciones somáticas que alteran la autofagia y contribuyen a la progresión de la enfermedad, la influencia de las variantes germinales sigue siendo un área poco explorada. Dado que la autofagia desempeña un papel dual en la supervivencia y muerte de las células tumorales, comprender cómo estas variantes heredadas modulan su regulación en la LLC podría proporcionar información crucial para el desarrollo de terapias más específicas. El estudio de la variación germinal en genes clave de la autofagia podría revelar nuevos biomarcadores de susceptibilidad y progresión, así como nuevas estrategias para superar la resistencia al tratamiento en estos pacientes.

2. JUSTIFICACIÓN

La LLC es una enfermedad altamente heterogénea. Mientras algunos pacientes tienen largos períodos de estabilidad de la enfermedad y una supervivencia relativamente alta en los 5 primeros años tras diagnóstico, otros pacientes presentan una enfermedad agresiva que eventualmente requiere tratamiento y reduce de forma significativa las tasas de supervivencia. Estas enormes diferencias han llamado la atención de la comunidad científica que ha tratado de descifrar el porqué de estas diferencias.

El notable interés de la comunidad científica en la LLC queda evidenciado por el elevado número de publicaciones científicas que abordan esta patología. En una búsqueda reciente en la base de datos PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando como criterio de búsqueda el término “chronic lymphocytic leukemia”, se obtuvieron 29.971 publicaciones, de los 1.166 fueron publicados el último año. Entre los factores que hacen de la LLC una enfermedad tan interesante y destacada para la investigación, tanto básica como clínica, los más obvios son la facilidad de obtener muestras de sangre y médula ósea de manera repetida con poca incomodidad o riesgo para los pacientes, y la posibilidad de realizar estudios de seguimiento a largo plazo debido a la prolongada supervivencia de los pacientes. Además, se suelen considerar otros factores como el elevado número de afectados, el envejecimiento constante de la población, la limitada eficacia de los tratamientos actuales y el hecho de que continúe siendo una enfermedad incurable con un curso clínico extremadamente heterogéneo.

En los últimos años, nuestro conocimiento sobre la base biológica de la LLC ha mejorado sustancialmente y se ha descrito además como una enfermedad multifactorial que no puede explicarse completamente ni por las alteraciones genéticas ni por un conjunto de factores clínicos específicos. Por el contrario, parece que la biología está mostrando un complejo rompecabezas aún por descifrar en el que parecen estar implicadas diferentes vías de señalización con clara implicaciones genéticas.

En este contexto, la traslación a la práctica clínica de todo el conocimiento molecular y genético adquirido en los últimos años resulta un enorme reto. Existe una creciente necesidad de identificar tanto nuevos marcadores genéticos asociados a la LLC como realizar estudios de validación para confirmar los ya existentes. Además, resulta

igualmente esencial identificar qué factores genéticos modulan la respuesta terapéutica, la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes.

Teniendo en cuenta los antecedentes arriba mencionados, nuestro grupo de investigación ha creado el consorcio internacional CRuCIAL (*Consortium for Research in Chronic lymphocytic Leukemia*) donde se propuso validar la asociación de marcadores genéticos identificados hasta la fecha en estudios de GWAS (García-Martín et al., 2022) y analizar su impacto sobre la SG de los pacientes y el THPT. El consorcio CRuCIAL además pretende caracterizar las variantes genéticas conocidas para arrojar algo de luz sobre los mecanismos funcionales subyacentes a la LLC.

Debido a los hallazgos recientes, que han demostrado que la autofagia es un mecanismo celular autónomo que participa en el proceso de la tumorigénesis y en la resistencia a agentes quimioterapéuticos, mediante la modulación de una amplia gama de procesos biológicos, nuestro consorcio se ha planteado en el análisis del impacto de la variación genética en esta ruta sobre el riesgo a desarrollar LLC. Previamente, nuestro grupo de investigación en el contexto de otro consorcio internacional, ya ha demostrado con éxito la influencia de este tipo de variación genética sobre el riesgo de padecer MM (Clavero et al., 2023), otra neoplasia de células B.

En base a esta hipótesis el consorcio CRuCIAL esta, además, trabajando en el análisis del impacto de la variación genética en la ruta de la autofagia sobre la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes. Si bien los estudios previos en este campo han contado con poblaciones relativamente pequeñas y, en general, han abordado solo unos pocos marcadores genéticos mediante estudios de genes candidato, nuestro consorcio pretende superar estas limitaciones a través del trabajo en un contexto internacional y utilizando una gran cohorte de pacientes de LLC bien caracterizados clínicamente. Para la caracterización funcional de los marcadores considerados de interés, el consorcio CRuCIAL además ha estado trabajando en el análisis del impacto de las variantes genéticas de autofagia sobre el flujo de la autofagia y sobre la respuesta inmune mediante ensayos funcionales *in vitro* e *in silico*.

3. OBJETIVOS

- Analizar el impacto de los polimorfismos de susceptibilidad a LLC sobre la supervivencia y la progresión de la enfermedad.

- Evaluar la influencia de las distintas variantes genéticas en genes de la autofagia como marcadores de susceptibilidad a desarrollar LLC.

- Analizar el impacto de los polimorfismos en los genes de la vía de la autofagia sobre la supervivencia global de los pacientes y la progresión de la enfermedad.

- Caracterizar funcionalmente los marcadores genéticos de interés mediante el uso de herramientas *in silico* y ensayos de estimulación *in vitro* y la correlación de los marcadores genéticos de interés con las concentraciones serológicas circulantes de 103 proteínas inmunológicas, 7 hormonas esteroideas y el número en valores absolutos de 91 subpoblaciones celulares de sangre periférica.

4. METODOLOGÍA

4.1. Diseño del estudio

Este estudio se estructuró en dos fases:

1. En la primera fase se realizó un análisis de supervivencia mediante regresión de Cox para evaluar si las variantes genéticas identificadas previamente en estudios de GWAS influían sobre la SG de los pacientes y la progresión de la enfermedad definida como TPHT. Además, se construyeron modelos predictivos de puntuaje de riesgo poligénico (PRS) para examinar la capacidad predictiva de las variantes genéticas identificadas.
2. En segunda fase, se llevó a cabo un análisis caso-control y meta-análisis en cuatro poblaciones independientes, para identificar las variables de riesgo asociadas a la autofagia en el contexto de LLC, seguido de un análisis de SG, TPHT y un análisis del flujo de autofagia utilizando los marcadores identificados en los análisis previos. En ambas etapas las variables clave identificadas en estos análisis se caracterizaron funcionalmente mediante estudios *in vitro* en la cohorte del *Human Functional Genomic Project* (HFGP) y mediante análisis *in silico* con distintas herramientas informáticas.

4.2. Población de estudio

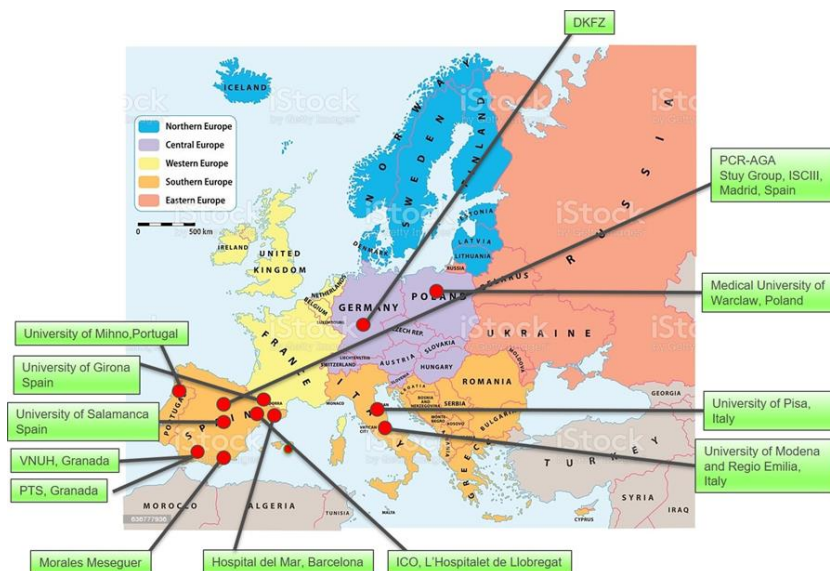
Todos los pacientes incluidos en el consorcio CRuCIAL fueron diagnosticados según los criterios internacionales actualizados (Hallek & Al-Sawaf, 2021). El reclutamiento de los casos se ha realizado siempre bajo la supervisión de médicos clínicos expertos en cada uno de los centros participantes. El consorcio actualmente se mantiene en activo y sigue reclutando tanto pacientes con LLC como controles sanos. Hasta el momento, el consorcio ha reclutado alrededor de 1.200 casos de LLC y 2.000 controles sanos, cifras que aumentan con el paso del tiempo gracias al reclutamiento de todos los grupos participantes y la incorporación de nuevos centros europeos. Las instituciones que actualmente participan en CRuCIAL se muestran en la Figura 8. Todas estas instituciones han contribuido significativamente en el reclutamiento de pacientes y la recogida de muestras biológicas y datos clínicos y participan en el diseño de los estudios que se llevan

a cabo en el consorcio. Todos los participantes del estudio eran de ascendencia europea, para su homogeneidad genética y dieron su consentimiento informado por escrito para participar en las dos fases del estudio desarrollados en el consorcio. Los estudios propuestos en el consorcio han seguido la Declaración de Helsinki y han sido aprobados por los comités de supervisión ética de todas las instituciones participantes que se detallan a continuación:

- Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, España, 0760-N-18);
- Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, España, PI90/07/2018);
- Hospital del Mar (Barcelona, España);
- Instituto Catalán de Oncología (Barcelona, España);
- Hospital Universitario Morales Meseguer (Murcia, España);
- Grupo del Consorcio para la Investigación Biomédica en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP) (España);
- Universidad de Módena y Reggio Emilia, AOU Policlínico (Módena, Italia);
- Universidad de Pisa (Pisa, Italia).

Las poblaciones analizadas en las dos fases de este estudio fueron ligeramente diferentes por el periodo temporal acontecido entre ellas.

Figura 8. Mapa geográfico con los centros participantes en el consorcio CRuCIAL.



En la primera fase, la población analizada estuvo compuesta por 1.039 pacientes con LLC reclutados a través del consorcio europeo CRuCIAL. Las principales características clínicas y demográficas de los pacientes se incluyen en la Tabla 11.

Tabla 11. Características clínicas y demográficas de los pacientes de la cohorte CRuCIAL utilizadas para los análisis de SG y de THPT.

Supervivencia general (SG) Cohorte CRuCIAL (1.039 casos de LLC)		Tiempo hasta el primer tratamiento (THPT) Cohorte CRuCIAL (354 casos de LLC)	
Edad (años)	65,87 ± 11,05	Edad (años)	65,03 ± 10,94
Ratio del género (hombres/mujeres)	1,57 (636/403)	Ratio del género (hombres/mujeres)	1,62 (219/135)
País de origen (vivos/fallecidos)		País de origen (vivos/fallecidos)	
España	754 (536/218)	España	227 (174/73)
Italia	285 (216/69)	Italia	127 (86/41)
Tiempo medio de seguimiento (meses)	76,77 (50-123)	Media de THPT (días)	759,49 (31-1148,74)
Vivos	76 (52,1-123)	Vivos	830.81 (44,13- 1308,93)
Fallecidos	77 (44-123)	Fallecidos	564.83 (13,10-800)
Estado de seguimiento		Estado de seguimiento	
Vivos	752 (72,38)	Vivos	239 (68,29)
Fallecidos	287 (27,62)	Fallecidos	111 (31,71)
Estadio de Binet		Estadio de Binet	
A	647 (81,48)	A	201 (64,84)
B	99 (12,46)	B	68 (21,94)
C	48 (6,04)	C	41 (13,23)
Estadio de Rai		Estadio de Rai	
0	597 (65,67)	0	124 (37,35)
I	152 (16,72)	I	105 (31,63)
II	114 (12,57)	II	63 (18,98)
III	12 (1,31)	III	16 (4,82)
IV	34 (3,73)	IV	24 (7,23)

Los datos se describen como media ± desviación estándar, n (%) o percentiles (percentiles 25 a 75).

En la segunda fase del estudio las poblaciones analizadas se dividieron a su vez en poblaciones de descubrimiento y de replicación:

- **Poblaciones de descubrimiento**

Las poblaciones de descubrimiento consistieron en 4.272 pacientes con LLC y 724.567 controles sanos del consorcio International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph) (3.099 pacientes con LLC y 7.666 controles), el proyecto de investigación del genoma FinnGen (668 pacientes con LLC y 314.189 controles) y el proyecto UK

Biobank (505 pacientes con LLC y 402.712 controles). En todas estas cohortes de descubrimiento, los casos de LLC se diagnosticaron siguiendo los criterios internacionales actualizados (Hallek & Al-Sawaf, 2021) y los controles fueron donantes de sangre o sujetos sanos seleccionados al azar de la población general. La cohorte InterLymph consistió en cuatro iniciativas previas de estudios GWAS: *National Cancer Institute GWAS* (NCI GWAS) (Berndt et al., 2013a), *Utah Chronic Lymphocytic Leukemia GWAS* (Utah), *Genetic Epidemiology Consortium of CLL GWAS* (GEC) (Slager et al., 2011) y *Molecular Epidemiology of Non-Hodgkin Lymphoma GWAS* (Conde et al., 2010). Los pacientes con LLC de todos estos estudios fueron reclutados de clínicas u hospitales, registros de cáncer o mediante un informe del paciente verificado por médicos y patólogos. El Centro de Coordinación de Datos InterLymph revisó los códigos *International Classification of Diseases* (ICD) y otra información patológica/médica disponible y clasificó los casos de acuerdo con la clasificación jerárquica del *InterLymph Pathology Working Group* basada en la última edición de la guía de la OMS para la clasificación de los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides (Swerdlow S.H. et al., 2017). Los casos y controles de LLC del GWAS de InterLymph fueron genotipados en *Illumina OmniExpress*[®] en el *Cancer Genomics Research Laboratory* (CGR) del NCI. Los genotipos se identificaron mediante el software *Illumina GenomeStudio*[®] y los duplicados incluidos en el control de calidad mostraron una concordancia > 99%. Se aplicaron métricas de control de calidad exhaustivas a los datos. Se excluyeron los SNPs monomórficos, las variantes genéticas y muestras con una tasa de identificación < 93%, las muestras con heterocigosidad media < 0,25 o > 0,33 según los SNPs autosómicos o discordancia sexual (> 5% de heterocigosidad en el cromosoma X para hombres y < 20% de heterocigosidad en el cromosoma X para mujeres). Se eliminaron los duplicados inesperados (> 99,9% de concordancia) y los parientes de primer grado basados en la identidad por descendencia (IBD, por sus siglas en inglés) que tenían un $\text{Pi-hat} > 0,40$. La ascendencia se evaluó utilizando el módulo *GLU struct.admix* basado en el método propuesto por Pritchard *et al.* (Pritchard et al., 2000) y se excluyeron los participantes con menos del 80% de ascendencia europea. Los datos de GWAS de los proyectos UK Biobank y FinnGen se descargaron de sus respectivos repositorios (<https://pheweb.sph.umich.edu> y <https://r10.finnngen.fi/>, freeze R10) y las definiciones de los fenotipos se generaron a partir de registros médicos electrónicos y códigos de facturación derivados del UK Biobank, así como de registros nacionales (FinnGen,

<https://risteys.finregistry.fi/>). Se ha descrito previamente en más detalles la metodología usada en estos GWAS (Gagliano Taliun et al., 2020; Kurki et al., 2023).

- **Población de replicación**

La población de replicación estuvo compuesta por 1.200 pacientes con LLC y 1.898 controles sanos reclutados a través del consorcio europeo CRuCIAL. Todos los participantes del estudio eran de ascendencia europea, para su homogeneidad genética y dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. Este estudio en CRuCIAL se llevó a cabo de acuerdo con las pautas de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por los Comités de Revisión Institucional de todas las instituciones participantes (anteriormente citadas e incluidas en la Figura 8). En la tabla 12 se incluye una descripción detallada de la cohorte del estudio y las principales características de los pacientes y los controles. En la tabla 13 se muestran las características clínicas y demográficas de esta cohorte para los individuos incluidos en los análisis de supervivencia y progresión.

Tabla 12. Características clínicas y demográficas de los pacientes de la cohorte de replicación de CRuCIAL.

Cohorte de replicación de CRuCIAL (N = 3.098)		
	Casos de LLC (N = 1.200)	Controles sanos (N = 1.898)
Edad (años)	65,59 ± 11,15	55,24 ± 9,87
Ratio de género (hombres/mujeres)	1,54 (727/473)	0,84 (868/1030)
País de origen		
España	934	1468
VNUH (Granada)	45	1123
PTS (Granada)	206	-
ICO/IDIBELL (Barcelona)	182	163
HDM (Barcelona)	158	-
UHS (Salamanca)	155	9
MMUH (Murcia)	188	173
Italia	266	430
UMRE (Modena)	266	430
Estadio de Binet (%)		
A	744 (81,31)	-
B	115 (12,57)	-
C	56 (6,12)	-
Estadio de Rai (%)		
0	663 (65,00)	-
I	181 (17,75)	-
II	72 (7,06)	-
III	74 (7,25)	-
IV	30 (2,94)	-

Los datos se describen como la media ± desviación estándar y/o (%). Abreviaturas: VNUH, Hospital Universitario Virgen de las Nieves; ICO, Instituto Catalán de Oncología; HDM, Hospital del Mar; UHS, Hospital Universitario de Salamanca; UMRE, Universidad de Modena y Reggio Emilia.

Tabla 13. Características clínicas y demográficas de los pacientes de la cohorte CRuCIAL de replicación utilizadas para los análisis de SG y de TPHT.

Supervivencia general (SG) Cohorte CRuCIAL (1.170 casos de LLC)		Tiempo hasta el primer tratamiento (THPT) Cohorte CRuCIAL (522 casos de LLC)	
Edad (años)	68,18 ± 10,55	Edad (años)	64,95 ± 11,04
Ratio del género (hombres/mujeres)	1,56 (713/457)	Ratio del género (hombres/mujeres)	1,56 (318/204)
País de origen (vivos/fallecidos)		País de origen (vivos/fallecidos)	
España	911 (687/224)	España	405 (316/89)
Italia	259 (194/65)	Italia	117 (80/37)
Tiempo medio de seguimiento (meses)	89,53 ± 58,44 (47-122)	Media de THPT (días)	1286,01 ± 2017,96 (68-1841)
Vivos	89,73 ± 58,08 (48-121)	Vivos	1347,44 ± 1502,09 (136-2039,5)
Fallecidos	88,95 ± 59,63 (44-123)	Fallecidos	1092,96 ± 3129,45 (27-1135)
Estado de seguimiento		Estado de seguimiento	
Vivos	881	Vivos	396
Fallecidos	289	Fallecidos	126
Estadio de Binet		Estadio de Binet	
A	729 (81,54)	A	295 (69,58)
B	111 (12,42)	B	82 (19,34)
C	54 (6,04)	C	47 (11,08)
Estadio de Rai		Estadio de Rai	
0	656 (65,60)	0	
I	175 (17,50)	I	195 (44,62)
II	70 (7,00)	II	110 (25,17)
III	71 (7,10)	III	57 (13,04)
IV	28 (2,80)	IV	51 (11,67)

Los datos se presentan como la media ± desviación estándar, n (%) o percentiles (percentiles 25 a 75).

4.3. Selección de polimorfismos de un solo nucleótido

La selección de los marcadores genéticos se realizó para cada uno de los estudios teniendo en cuenta las hipótesis de partida y los objetivos a cumplir.

Para la primera fase del estudio se seleccionaron los SNPs a través de una extensa búsqueda bibliográfica de GWAS y meta-análisis relevantes publicados hasta 2022 utilizando bases de datos en línea disponibles públicamente como GWAS Catalog - EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) y PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Backman et al., 2021; Berndt et al., 2013a, 2016, 2022; Brandes et al., 2021; Di Bernardo et al., 2008; Jiang et al., 2021; Law, Berndt, et al., 2017; Law, Sud, et al., 2017; Slager et al., 2011, 2012; Speedy et al., 2013). Además, para la selección de marcadores genéticos se tuvieron en cuenta criterios adicionales como los datos obtenidos de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), la potencial funcionalidad y el desequilibrio de ligamiento entre los SNPs. Finalmente se seleccionaron un total de 41 SNPs en 39 genes (Tabla 14).

Tabla 14. Lista seleccionada de variantes identificadas mediante GWAS para la LLC.

SNP	Chr	Genes	Alelo Ref	Alelo Riesgo	Contexto	Referencia (Pubmed ID)
rs4368253	18	<i>AC107990.1 NFE2L3P1</i>	T	C	Intergenic	26956414
rs58055674	2	<i>ACOXL</i>	T	C	Intronic	26956414
rs1439287	2	<i>ACOXL</i>	C	T	Intronic	26956414
rs7944004	11	<i>ASCL2 C11orf21</i>	G	T	Intergenic	26956414
rs4987855	18	<i>BCL2</i>	A	G	3' UTR	26956414
rs2651823	11	<i>C11orf21 TSPAN32</i>	G	A	Intronic	28165464
rs1476569	4	<i>CAMK2D</i>	A	G	Intergenic	28165464
rs3769825	2	<i>CASP8</i>	C	T	Intronic	26956414
rs7558911	2	<i>CFLAR</i>	G	A	Intronic	28165464
rs1036935	18	<i>CXXC1</i>	G	A	Intergenic	28165464
rs1359742	9	<i>DMRTA1</i>	C	G	Intergenic	26956414
rs6546149	2	<i>DTNB</i>	C	G	Intronic	28165464
rs9880772	3	<i>EOMES LINC01980</i>	C	T	Intergenic	26956414
rs13015798	2	<i>FAM126B</i>	G	A	Intronic	26956414
rs6586163	10	<i>FAS</i>	C	A	Intronic	28165464
rs2267708	7	<i>GPR37</i>	C	T	Intronic	28165464
rs35923643	11	<i>GRAMD1B</i>	A	G	Intronic	26956414
rs2953196	11	<i>GRAMD1B</i>	A	G	Intronic	26956414

rs3800461	6	<i>ILRUN</i>	G	C	Intronic	28165464
rs9392504	6	<i>IRF4</i>	G	A	Intergenic	28165464
rs391855	16	<i>IRF8</i>	T	A	Intergenic	26956414
rs898518	4	<i>LEF1</i>	C	A	Intronic	26956414
rs34676223	1	<i>MDS2</i>	A	C	Intergenic	28165464
rs57214277	4	<i>MYL12BP2 LINC02363</i>	C	T	Intergenic	28165464
rs10936599	3	<i>MYNN</i>	T	C	Missense	24292274
rs11715604	3	<i>NCK1</i>	A	T	Intronic	28165464
rs6489882	12	<i>OAS3</i>	A	G	Intronic	28165464
rs140522	22	<i>ODF3B</i>	C	T	Upstream	28165464
rs2236256	6	<i>OPRM1 IPCEF1</i>	A	C	Intronic/3'UTR	24292274
rs11637565	15	<i>PCAT29 LOC107984788</i>	A	G	Intergenic	28165464
rs17246404	7	<i>POT1</i>	T	C	Non Coding Transcript Variant	24292274
rs2511714	8	<i>POU5F1P2 ODF1</i>	T	G	Intergenic	26956414
rs11083846	19	<i>PRKD2</i>	G	A	Intronic	18758461
rs888096	2	<i>QPCT RNU6-1116P</i>	G	A	Intergenic	28165464
rs41271473	1	<i>RHOU</i>	A	G	Non Coding Transcript Variant	28165464
rs73718779	6	<i>SERPINB6</i>	G	A	Intronic	26956414
rs12638862	3	<i>TERC</i>	G	A	Intergenic	28165464
rs7705526	5	<i>TERT</i>	C	A	Intronic	28165464
rs61904987	11	<i>TMPRSS5 DRD2</i>	C	T	Intergenic	28165464
rs926070	6	<i>TSBP1-AS1</i>	G	A	Intronic	24292274
rs7254272	19	<i>ZBTB7A MAP2K2</i>	G	A	Intergenic	28165464

Abreviaturas: SNP, Polimorfismo de un solo nucleótido; Chr, Cromosoma; Ref, Referencia.

Para la segunda fase del estudio, los SNPs se seleccionaron siguiendo varios criterios: el primero de ellos es que estuvieran en 234 genes descritos hasta la fecha como relacionados con la autofagia que se describen en la base de datos de autofagia (<http://autophagy.lu/clustering/index.html>, Tabla suplementaria 1, Anexo II). Se extrajeron estimaciones de asociación con el riesgo de LLC para un total de 55.583 SNPs genotipados o imputados dentro o cerca de estos genes (5 Kb aguas arriba y 3 Kb aguas abajo) de los conjuntos de datos de GWAS de descubrimiento y se analizaron mediante meta-análisis utilizando METAL (Willer et al., 2010). Se utilizó el control genómico (GC, por sus siglas en inglés) para tener en cuenta la estratificación de la población y se utilizó el estadístico I^2 para evaluar la heterogeneidad entre las poblaciones. A continuación, se calcularon las *Odds Ratios* (OR) agrupados utilizando un modelo de efectos fijos. Entre

las 55.583 variantes genéticas seleccionadas, un total de 49.612 SNPs fueron compartidos por todos los conjuntos de datos de GWAS y, por lo tanto, estaban disponibles para el análisis de asociación. De ellos, 1.903 se consideraron SNP comunes ($MAF > 0,05$) e independientes ($r^2 < 0,1$) según los datos de LDLink para cohortes europeas (<https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=snpclip>). Por lo tanto, el umbral de significación de pruebas múltiples para el análisis de asociación se estableció en $p = 2,63 \times 10^{-5}$ ($0,05/1.903$ SNPs).

Tras el meta-análisis de los datos de GWAS de las cohortes InterLymph, UK Biobank y FinnGen, seleccionamos para la replicación aquellos SNPs independientes relacionados con la autofagia asociados con el riesgo de LLC que cumplieron con los siguientes criterios: $r^2 < 0,1$ (umbral de LD para la selección de SNPs independientes), una $p \leq 0,0001$ para la asociación con el riesgo de LLC y ausencia de una heterogeneidad significativa entre poblaciones ($p_{Het} \geq 0,05$). De los 19 SNPs resultantes excluimos aquellos SNPs que se habían descrito previamente como marcadores de susceptibilidad para la LLC. Un total de 11 SNPs cumplieron con estos criterios y, por tanto, se genotiparon en la cohorte del Consorcio CRuCIAL (Tabla 15).

Tabla 15. Lista seleccionada de variantes asociadas con la autofagia mediante GWAS para la LLC.

SNP	Genes	Chr	Alelo Riesgo	Alelo Ref	Contexto	Referencias (PMID)
rs59952010	ARSB	5	T	C	Intron Variant	26956414
rs210143	BAK1	6	C	C	Intron Variant	22700719; 24292274; 23770605; 28165464
rs4987852	BCL2	18	C	T	3' UTR Variant	23770605
rs4987856	BCL2	18	T	C	3' UTR Variant	26956414; 23770605
rs1026825*	BCL2	18	G	A	Intron Variant	-
rs11152374*	BCL2	18	A	G	Intron Variant	-
rs11839271*	LPAR6, RB1	13	T	C	Intron Variant	-
rs12457371*	BCL2	18	G	C	Intron Variant	-
rs143052840*	PRKCD	3	A	G	Intron Variant	-
rs3731204*	CDKN2A	9	C	T	Intron Variant	-
rs4940571*	BCL2	18	G	A	Intron Variant	-
rs1926194	FAS	10	A	G	Intron Variant	24292274; 26956414; 28165464
rs7584971	ITGA6	2	A	C	Intron Variant	32887889
rs4947976*	EGFR	7	A	C	Intron Variant	-
rs6829366*	NAF1	4	T	G	Intron Variant	-
rs6910366*	TFEB	6	G	C	Intron Variant	-

rs7236090*	BCL2	18	C	T	Intron Variant	-
rs2645488	VMP1	17	G	T	Intron Variant	31407831
rs17885803	WRAP53, TP53	17	T	C	Intron Variant	32887889

Abreviaturas: SNP, Polimorfismo de un solo nucleótido; Chr, Cromosoma; Ref, Referencia. *, SNPs seleccionados para su genotipado en la cohorte de CRuCIAL.

4.4. Recogida de muestras biológicas y base de datos

En el momento de la consulta médica, los pacientes diagnosticados por hematólogos expertos fueron invitados a firmar el consentimiento informado, siempre que estuvieran dispuestos a participar en el estudio y en el consorcio CRuCIAL. A cada participante se le solicitó una muestra de sangre periférica, hisopo de saliva, lisado celular y/o pellet celular y se recopilaron una serie de datos clínicos que fueron registrados en la base de datos del consorcio. Entre las variables recogidas se incluyeron: edad, sexo, país de origen, etnia, fecha de nacimiento, fecha de fallecimiento, fecha de diagnóstico, tiempo de seguimiento, fecha del primer tratamiento, estadios de Rai y Binet, inmunofenotipo, alteraciones citogenéticas (del(13q), del(11q), del(17p) y trisomía del cromosoma 12), estado mutacional de los genes *IGHV* y *TP53*, niveles de $\beta 2M$, plaquetas, hemoglobina y linfocitos, presencia de adenopatías, líneas de tratamiento (primera, segunda y tercera) con sus respectivas respuestas, comorbilidades y recaídas en caso de presentarse.

4.5. Conservación, extracción y cuantificación del material biológico

Una vez recogidas las muestras biológicas de cada paciente, estas se mantuvieron congeladas a -20°C en el centro de origen hasta su envío en hielo seco al centro GENYO (Centro Pfizer–Universidad de Granada –Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica). En GENYO, las muestras fueron procesadas y conservadas a -20°C hasta el momento de su extracción.

La extracción de ADN se realizó en el centro GENYO a partir de las muestras de biológicas. La descongelación de las muestras se llevó a cabo de manera paulatina, y la extracción de ADN se efectuó utilizando el kit QIAamp[®] DNA Blood Mini (Qiagen, Valencia, CA, USA), el kit Maxwell[®] 16 Blood DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA), o un método combinado de purificación con Fenol-Cloroformo y

filtros de centrifugación Amicon® Ultra (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), dependiendo del tipo y estado del material biológico y siempre siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras que cumplían las condiciones específicas, se extrajeron utilizando el mismo método, en el mismo momento, por el mismo personal y en lotes, con el fin de evitar cualquier posible sesgo derivado de la manipulación.

La concentración y la calidad del ADN se midieron utilizando el fluorómetro Qubit 4 (Thermo Fisher, Waltham MA, USA) y el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), utilizando su propio software *NanoDrop 2000C*®. En los casos donde la cantidad de muestra biológica recibida era limitada y/o la concentración de ADN no era suficiente, llevamos a cabo una amplificación del ADN en lotes mediante el kit Illustra™ GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (Cytiva, Marlborough, MA, USA), siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante.

4.6. Genotipado y control de calidad

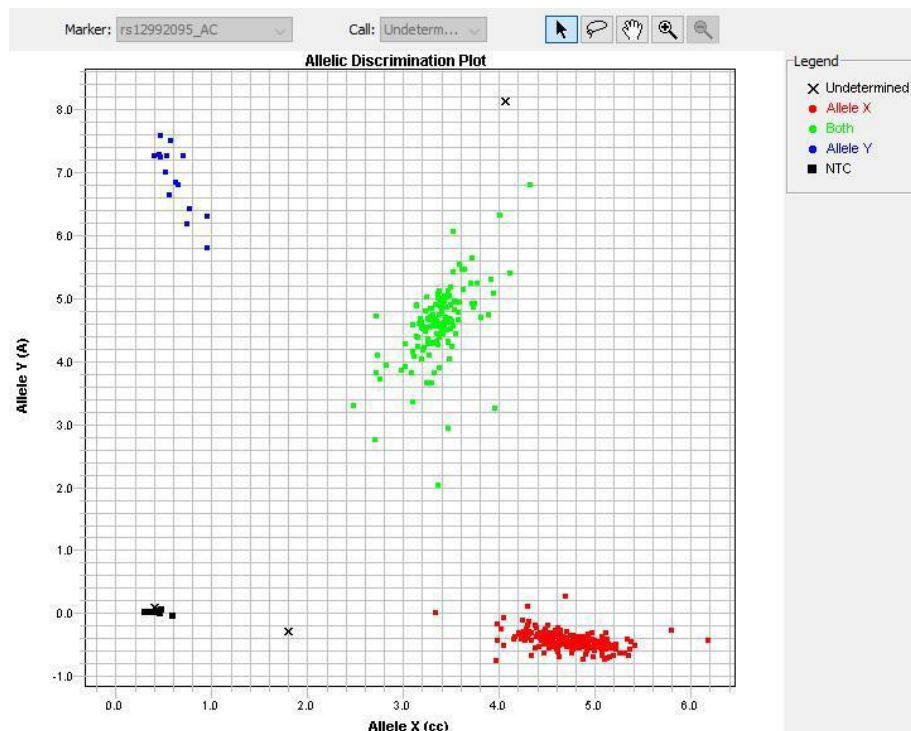
El genotipado se refiere a la caracterización alélica en una posición específica del genoma, mediante la amplificación del ADN de dicha región a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica emplea cebadores marcados con fluorescencia que, tras la amplificación de la región por la polimerasa, permiten identificar el alelo presente en la posición de interés. En este caso, para la realización de la PCR se utilizaron sondas KASPar® on Demand Primer Mix (LGC Genomics, Hoddesdon, Reino Unido), Master Mix 2x KASP-TF V4.0 (LGC Genomics, Hoddesdon, Reino Unido) y agua del sistema de purificación Milli-Q® Integral (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

El genotipado se realizó en placas de 384 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) generadas a partir de placas de 96 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo una distribución en “Z”. En estas placas se estandarizó la concentración y volumen de las muestras de ADN y para su dispensación y distribución en las placas de 384 pocillos con la mayor precisión se utilizó el robot automático epMotion® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Este robot garantiza una dispensación precisa del material biológico. Como control de calidad negativo, en cada placa de 384 pocillos se incluyeron ocho pocillos como controles negativos, denominados *No Template Control* (NTC), que

no contenían material biológico. No se detectó amplificación en estos NTC, lo que confirma la ausencia de contaminación o amplificación inespecífica en las muestras analizadas. En cuanto al control de calidad interno del genotipado, se seleccionaron aleatoriamente un 5% de las muestras, que se incluyeron por duplicado en las placas de genotipado. Se verificó que los genotipos obtenidos en los duplicados coincidían en más del 99% de los casos con los de las muestras originales.

A continuación, se llevó a cabo una PCR *touch-down* utilizando un Termociclador Mastercycler pro384 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), siguiendo un programa estandarizado y cumpliendo con rigor el protocolo pertinente de KASPar[®] on Demand Primer Mix (LGC Genomics, Hoddesdon, Reino Unido) (Smith & Maughan, 2015). La PCR *touch-down* es una variante de la PCR que optimiza la especificidad de la amplificación. En este método, la temperatura de alineamiento se establece inicialmente por encima de la temperatura de fusión teórica de los cebadores y se reduce progresivamente en los ciclos posteriores hasta alcanzar una temperatura más baja y estable. Este protocolo permite mejorar la especificidad durante los primeros ciclos, reduciendo las uniones inespecíficas, mientras que las últimas etapas favorecen una amplificación más eficiente (Don et al., 1991).

Al finalizar la PCR *touch-down* procedimos a la lectura de las placas con los productos resultantes mediante el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Para ello previamente introdujimos los mapas de las placas con la distribución de las muestras y las fluorescencias específicas correspondientes a cada uno de los alelos de las sondas que vamos a analizar con el software de lectura SDS v2.4. Este programa emplea un avanzado algoritmo de multicomponentes que permite la detección precisa de la señal correspondiente a cada alelo mediante la cuantificación de la fluorescencia de cada muestra. El sistema de análisis y lectura genera automáticamente una representación gráfica de los resultados, facilitando la identificación de los genotipos y garantizando una correcta interpretación de los resultados obtenidos por PCR. En todas las placas se trabajó bajo las mismas condiciones y metodología, con el fin de evitar la interferencia de posibles factores externos al estudio.

Figura 9. Captura del software de lectura SDS v2.4. Gráfico generado para la discriminación de alelos.

En el eje X se representa el alelo C, donde la nube de puntos rojos indica la proporción de pacientes con el genotipo CC. En el eje Y se representa el alelo A, y la nube de puntos azules corresponde a la proporción de pacientes con el genotipo AA. La nube de puntos verdes indica la proporción de pacientes con el genotipo AC. Los cuadrados negros representan los controles negativos (NTC), mientras que las cruces corresponden a muestras que no han expresado ningún genotipo.

4.7. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Una vez genotipados todos los SNPs en las poblaciones de estudio se realizó un análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE, por sus siglas en inglés) en el grupo control. El análisis consistió en una prueba de chi cuadrado (χ^2), para comprobar la estabilidad de las proporciones genotípicas observadas en la población de estudio y que las frecuencias observadas no diferían significativamente de las esperadas. El límite de significación se estableció en función del número de marcadores analizados en cada estudio 0,0011 (0,05/42 SNPs) para la primera fase del estudio y 0,0045 (0,05/11 SNPs) para la segunda fase del estudio. Aquellas variantes genéticas con un valor de HWE inferior al umbral establecido fueron excluidas del estudio. Afortunadamente, en las dos fases del estudio todas las variantes se encontraron en HWE en el grupo control y, por tanto, pudieron ser incluidas en los análisis.

4.8. Estudio de asociación

Se llevó a cabo un análisis de asociación para identificar los polimorfismos asociados con el riesgo de desarrollar LLC. Para este propósito, se utilizó un análisis de regresión logística multivariable ajustado por factores demográficos como la edad, el sexo y el país de origen. Este enfoque es apropiado cuando se trabaja con fenotipos dicotómicos claramente definidos, comparando una población sin afectación (grupo control) con una población afectada (casos de LLC). El umbral de significación estadística se determinó para cada estudio considerando el número de polimorfismos independientes analizados, así como el número de modelos de herencia evaluados (log-aditivo, dominante y recesivo). Estos análisis fueron realizados utilizando el software estadístico STATA (v12.1; Stata Corp, College Station, TX, USA).

Para el diseño de los estudios genéticos de riesgo incluidos en esta tesis, se realizó un análisis previo del poder estadístico con el objetivo de alcanzar un 80% de poder para detectar asociaciones. El cálculo del poder estadístico se efectuó utilizando el software Quanto (v12.4), asumiendo un modelo log-aditivo y un riesgo basal de 0,000046, basado en la incidencia de la enfermedad.

4.9. Meta-análisis

En las dos fases de este estudio se desarrollaron varios meta-análisis para confirmar asociaciones potencialmente interesantes asociadas con el riesgo a desarrollar la LLC, con la supervivencia de los pacientes o con la progresión de la enfermedad.

En la primera fase del estudio, se realizó un meta-análisis de los datos de progresión (THPT) de la cohorte CRuCIAL con datos de progresión de un estudio previo de GWAS (W. Y. Lin et al., 2021) publicado recientemente, utilizando el software METAL (Willer et al., 2010), calculando las OR combinadas utilizando un modelo de efectos fijos. Para evaluar la heterogeneidad estadística entre cohortes, se empleó el estadístico I^2 .

En la segunda fase del estudio, se realizó un meta-análisis de los datos extraídos de los conjuntos de datos de GWAS del consorcio InterLymph, el proyecto de investigación del genoma FinnGen y el proyecto UK Biobank. Este meta-análisis nos

permitió identificar los SNPs de autofagia asociados con el riesgo a desarrollar la LLC. El meta-análisis se realizó nuevamente con el software METAL. Para controlar la estratificación poblacional, se utilizó la corrección por GC, y para evaluar la heterogeneidad estadística entre las poblaciones de descubrimiento se empleó el estadístico I^2 . Posteriormente, se calcularon las OR combinadas utilizando un modelo de efectos fijos. Finalmente, se llevó a cabo un meta-análisis general de las estimaciones de asociación entre la cohorte CRuCIAL y las poblaciones de descubrimiento, siguiendo el mismo protocolo previamente mencionado, y utilizando el software METAL para integrar los resultados.

Este enfoque permitió evaluar de manera robusta las asociaciones genéticas en relación con la progresión de la LLC y los SNPs de autofagia asociados con el riesgo a desarrollar la LLC en diferentes poblaciones.

4.10. Análisis de supervivencia global y tiempo hasta el primer tratamiento en la cohorte CRuCIAL

Para evaluar el impacto de las variantes sobre la SG de los pacientes y la progresión de la enfermedad, analizamos si los SNPs seleccionados estaban asociados con el THPT o la SG de los pacientes con LLC en la cohorte CRuCIAL. El tiempo de SG se calculó desde el diagnóstico de LLC hasta la ocurrencia del evento censor, siendo este la fecha del fallecimiento o la última fecha de seguimiento observado. El THPT se definió como el intervalo de tiempo entre el diagnóstico de LLC y la fecha del primer tratamiento o la última fecha de seguimiento observado, siendo nuevamente el evento censor la fecha del fallecimiento o la última fecha de seguimiento observado.

La asociación de las variantes genéticas con la SG y el THPT, definido como *hazard ratio* (HR), se calculó para cada SNP utilizando un análisis de regresión de Cox ajustado por edad, sexo y país de origen. Los análisis de asociación se realizaron utilizando STATA (v12.1; Stata Corp, College Station, TX, USA) y los cálculos de potencia se estimaron con el paquete survSNP en el software R (v4.1.1; <http://www.r-project.org/>). Considerando el número de SNPs y los modelos de herencia evaluados, establecimos un umbral de significación aplicando la corrección de comparaciones múltiples.

4.11. Creación de modelos predictivos de supervivencia y progresión

Con el objetivo de utilizar los resultados genéticos obtenidos para mejorar la predicción del THPT y la SG de los pacientes, se construyeron modelos genéticos predictivos a través de la creación de PRSs. Este puntaje se generó integrando las múltiples variantes genéticas asociadas con el THPT o la SG y las variables demográficas, lo que permitió estratificar a los individuos según su predisposición genética al fenotipo seleccionado en quintiles. Los modelos predictivos basados en el PRS facilitan la identificación temprana de individuos en alto riesgo, optimizando así las estrategias de vigilancia y tratamiento personalizado en pacientes con LLC.

La creación de este tipo de modelos predictivos se basa en que, para cada SNP, se contabiliza el número de alelos asociados con un mayor riesgo y se suman para cada sujeto del estudio, lo que resulta en un PRS no ponderado, con un rango teórico de 0 (ningún alelo de riesgo asociado) a N (siendo N todos los alelos de riesgo presentes en homocigosis en cada SNP). Además, construimos un PRS ponderado utilizando las OR del modelo log-aditivo de la asociación de cada variante con el riesgo en la población de CRuCIAL, empleando estos OR como coeficientes para ponderar los efectos relativos de los SNP de riesgo. Para cada SNP en el PRS ponderado, se asignó un valor de 0 si no había alelos de riesgo presentes, el $\ln(\text{OR})$ del heterocigoto si había un alelo de riesgo presente, y el $\ln(\text{OR})$ del homocigoto si había dos alelos de riesgo presentes. Luego, todos los valores se sumaron para cada sujeto. Solo los sujetos del estudio que tenían una tasa de genotipado de los SNPs asociados superior al 80% y el 100% fueron incluidos en estos modelos predictivos. Para poder calcular puntajes comparables para todos los sujetos del estudio, también se consideraron puntajes "escalados", donde los valores del PRS para cada sujeto fueron multiplicados por la razón entre el número total de SNPs y el número de SNPs genotipados correctamente para el sujeto en cuestión.

Para ambos PRS (ponderado y no ponderado), se calcularon quintiles basados en la distribución de los valores en los controles. Las fórmulas para los puntajes no ponderados y ponderados son, respectivamente, $\sum_1^m a_j$ y $\sum_1^m a_j X_j$, donde a es el número de alelos de riesgo (0, 1, 2), m es el número total de SNPs, j es el j -ésimo sujeto y X es $\ln(\text{OR})$. La matemática y la metodología empleada para el cálculo de los PRSs se describe en detalle en un artículo previamente publicado por miembros del consorcio (Canzian et al., 2022).

4.12. Impacto de las variantes genéticas relacionadas con la autofagia en el flujo de autofagia

Para determinar el impacto de los SNPs analizados sobre el flujo de la autofagia y se analizó su correlación con los niveles de flujo de autofagia en una población de 68 donantes sanos de ascendencia europea. Inicialmente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) a partir de sangre completa mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Histopaque[®]. Las células fueron tratadas durante 2 horas con 10 μ M de bafilomicina A1 o 10 mM de metformina para inhibir o inducir la autofagia, respectivamente. Se sembraron un total de 5×10^5 PBMCs por pocillo y se sometieron a tratamientos con metformina o bafilomicina A1, de forma independiente o en combinación. Las células no tratadas se utilizaron como controles experimentales.

Posteriormente, se recogieron las células y se realizó la extracción de proteínas utilizando 50 μ L de tampón de lisis (1% NP-40, 500 mM Tris HCl, 2,5 M NaCl, 20 mM EDTA, inhibidores de fosfatasa y proteasa —de Roche— a pH 7,2). Se resolvieron 20 μ g de proteína total en un gel de SDS al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 10 minutos en un sistema de transferencia Trans-Blot Turbo. Las membranas se bloquearon durante 1 hora utilizando solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía 0,1% de Tween 20 (TBST) y 5% de BSA, y se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos policlonales primarios a 1:1000 en 1% de BSA (anticuerpo anti-LC3A/B de conejo, Cell-Signaling; anticuerpo anti-actina de ratón, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Tras lavar con TBST, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (IgG anti-conejo para LC3A/B e IgG anti-ratón para actina).

Los niveles de proteína se detectaron después de la incubación con SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) o Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las imágenes digitales de los Western blots se obtuvieron utilizando un sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y el análisis densitométrico de las bandas se realizó con el software Quantity One v4.6.5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para cuantificar la síntesis de autofagia, se

determinó la relación entre los valores de las células tratadas con metformina y bafilomicina A1 con respecto a aquellos de la condición sin metformina, pero con tratamiento con bafilomicina A1. Para cuantificar la degradación de la autofagia, se calculó la relación entre los valores densitométricos de las células tratadas con metformina, en presencia o ausencia de bafilomicina A1, de acuerdo con las pautas estándar de autofagia (Klionsky et al., 2021).

Se utilizaron análisis de regresión lineal ajustados por edad y sexo para determinar la correlación entre los SNPs relacionados con la autofagia y los valores de flujo de autofagia. Se estableció un umbral de significación de $p = 0,006$, considerando el número de SNPs evaluados ($n = 4$) y el número de tratamientos administrados *in vitro* ($n = 2$).

4.13. Efecto funcional de las SNPs identificados en las respuestas inmunitarias

Para comprender mejor el papel funcional de los SNPs analizados en las dos fases de este estudio, realizamos experimentos de estimulación en la cohorte de 500 individuos del *Human Functional Genomic Project* (HFGP; <http://www.humanfunctionalgenomics.org/site/>). El estudio del HFGP fue aprobado por el Comité Ético de Arnhem-Nijmegen (n.º 42561.091.12) y las muestras biológicas se recolectaron tras obtener el consentimiento informado de cada sujeto participante. Investigamos si alguno de los 32 SNPs que fueron validados exitosamente a través del meta-análisis de las poblaciones de estudio se correlacionaba con los niveles de 9 citocinas pro y antiinflamatorias (TNF α , IFN γ , IL1Ra, IL1 β , IL6, IL8, IL10, IL17 e IL22) tras la estimulación de sangre total, PBMCs o monocitos derivados de macrófagos (MDM) de 408 sujetos sanos. La estimulación se realizó con LPS (100 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis), PHA (10 μ g/ml, Sigma), Pam3Cys (10 μ g/ml, EMC microcollections), CpG (100 ng/ml, InvivoGen), *Bacteroides fragilis* (NCTC 10584) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) durante 24 o 48 horas. *Bacteroides fragilis* y *Staphylococcus aureus* fueron inactivados por calor durante 30 minutos a 95°C y 100°C, respectivamente. Los protocolos detallados para la extracción de PBMCs, diferenciación de macrófagos y ensayos de estimulación han sido descritos en detalle en publicaciones previas (Y. Li et al., 2016).

Brevemente, las PBMCs se lavaron dos veces con solución salina y se resuspendieron en medio (RPMI 1640) suplementado con gentamicina (10 mg/mL), L-glutamina (10 mM) y piruvato (10 mM). Las estimulaciones de PBMCs se realizaron con 5×10^5 células por pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner) durante 24 horas en presencia de suero humano al 10% a 37 °C y 5% de CO₂. Tras la estimulación *in vitro*, los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis posterior en ensayos ELISA. Los experimentos de estimulación de sangre total se realizaron utilizando 100 µl de sangre heparinizada que se añadió a una placa de 48 pocillos y se estimuló con 400 µl de LPS, PHA (volumen final de 500 µl) y *Staphylococcus aureus* durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -20°C hasta su uso en los ensayos ELISA.

Las concentraciones de TNF α , IFN γ , IL1Ra, IL1 β , IL6, IL8, IL10, IL17 e IL22 humanos se determinaron utilizando kits comerciales específicos de ELISA (PeliKine Compact, Ámsterdam, o R&D Systems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuando los valores estaban por debajo o por encima del límite de detección del ELISA, se utilizó el límite correspondiente. Después de la transformación logarítmica de los datos de *loci* cuantitativos de citocinas (cQTL), se realizaron análisis de regresión lineal ajustados por edad y sexo para determinar la correlación de los SNPs con los cQTLs. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el software R (<http://www.r-project.org/>), empleando scripts personalizados en el lenguaje de programación R basados en funciones existentes como *lm* (stats). Para tener en cuenta las comparaciones múltiples, utilizamos un umbral de significación de $2,92 \times 10^{-4}$ (Teniendo en cuenta los SNPs independientes significativos, las citocinas testadas y los estimulantes utilizados).

4.14. Correlación de los SNPs identificados con los recuentos de células sanguíneas y los perfiles proteómicos séricos/plasmáticos

Para evaluar el impacto de los SNP seleccionados en la variación de las frecuencias de las células inmunitarias, se midieron 91 poblaciones de células derivadas de la sangre mediante citometría de flujo de 10 colores (citómetro de flujo Navios, Beckman Coulter, Miami, FL, USA) tras la toma de muestras de sangre (2-3 horas) y se realizó un análisis del recuento celular utilizando el software Kaluza (Beckman Coulter, v.1.3). Con el fin

de reducir el ruido inter-experimental y aumentar la potencia estadística, se realizó un análisis del recuento celular calculando los porcentajes de las células parentales y las de sus progenitores, que se definieron como el porcentaje de un determinado tipo de células dentro de la población de células de las que se aislaron (Tabla suplementaria 2, Anexo II). Los protocolos de laboratorio para el aislamiento de células, los reactivos, la selección y el análisis por citometría de flujo se han descrito previamente en detalle (Aguirre-Gamboa et al., 2016; Orrù et al., 2013). El número de acceso de los datos de citometría de flujo sin procesar y los archivos de datos analizados están disponibles a pedido de los autores (<http://hfgp.bbmri.nl>).

Además de los análisis celulares también se realizó un análisis proteómico en muestras de suero y plasma de la población del HFGP. Las proteínas circulantes se midieron utilizando el ensayo de extensión de proximidad (panel de inflamación Olink[®], Olink, Suecia) que dio como resultado la medición de 103 biomarcadores diferentes (Tabla suplementaria 3, Anexo II). Los niveles de proteínas se expresaron en escala \log_2 como valores de expresión de proteínas y se normalizaron utilizando muestras puente para corregir la variación entre lotes.

Para tener en cuenta las comparaciones múltiples en el estudio de autofagia, utilizamos un umbral de significación de $2,55 \times 10^{-5}$ y $2,89 \times 10^{-5}$ para el análisis proteómico y de recuento de células sanguíneas, respectivamente. Todos los análisis funcionales se realizaron utilizando el software R (<http://www.r-project.org>), utilizando scripts personalizados en el lenguaje de programación R basados en funciones existentes. Los gráficos funcionales se mostraron utilizando el software Prism[®].

4.15. Correlación entre los SNPs identificados y las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroides

A continuación, investigamos la correlación de los SNPs con los niveles de 7 hormonas esteroides plasmáticas (androstenediona, cortisol, 11-desoxicortisol, 17-hidroxiprogesterona, progesterona, testosterona y 25-hidroxivitamina D3) en 279 sujetos seleccionados del proyecto HFGP, quienes no recibían terapias de reemplazo hormonal ni utilizaban anticonceptivos orales. Las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroides se determinaron mediante espectrometría de masas en tándem con

cromatografía, después de la precipitación de proteínas y extracción en fase sólida, siguiendo los protocolos previamente reportados.

Tras la transformación logarítmica de los datos, la correlación entre los niveles de hormonas esteroides y los SNPs identificados se evaluó mediante análisis de regresión lineal, ajustado por edad y sexo. El umbral de significación se estableció considerando el número de SNPs independientes analizados y el número de hormonas determinadas.

4.17. Análisis funcionales *in silico*

Finalmente, para evaluar el papel funcional de los SNPs seleccionados desde otra perspectiva, se llevaron a cabo análisis *in silico* con diversas herramientas:

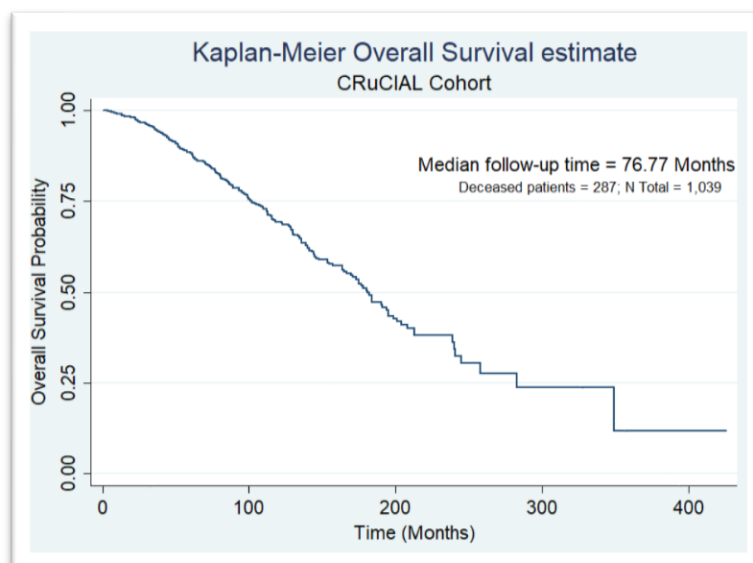
- Haploreg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) se utilizó para predecir el papel funcional de los SNPs seleccionados (Ward & Kellis, 2012). Además, se evaluó si todos estos SNPs de autofagia podrían representar *loci* de expresión cuantitativa (eQTL) para diferentes tipos de células y tejidos, utilizando datos del portal GTEx disponibles públicamente (<https://gtexportal.org/home/>).
- QTLbase se utilizó para verificar todas las características de los QTL (<http://www.mulinlab.org/qtlbase>). QTLbase agrega datos de diversas fuentes, incluyendo TCGA, GTEx, Pancan-MNVQTLdb y DICE. Para completar estos análisis funcionales *in silico*, se desarrollaron meta-puntuaciones que integran diversas anotaciones o puntuaciones individuales en una única puntuación cuantitativa (Zheng et al., 2020). Esta puntuación combinada considera datos sobre conservación, frecuencia poblacional y el impacto en las propiedades fisicoquímicas de la proteína estudiada.
- Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) (Rentzsch et al., 2019), Regulome DB (<https://regulomedb.org/>) (Boyle et al., 2012) y FORGEDb (<https://forge2.altiusinstitute.org/files/foragedb.html>) (Dunham et al., 2015) se utilizaron para proporcionar información adicional sobre el papel funcional de las variantes más prometedoras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera fase del estudio

5.1. Impacto de las variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para la LLC sobre la supervivencia general del paciente

Dado que este es el mayor estudio que se ha desarrollado hasta la fecha con el objetivo de investigar el impacto de las variantes de susceptibilidad identificadas mediante GWAS sobre la SG de los pacientes con LLC, resulta esencial, en primer lugar, describir clínica y demográficamente en detalle la población de estudio. Los pacientes con LLC incluidos en la cohorte CRuCIAL de los análisis de SG tenían una edad media de 65,87 años, con una proporción hombre/mujer de 1,57 (636/403). Estos resultados están en línea con las distribuciones de edad y género observadas a nivel mundial en el momento del diagnóstico de LLC (Bray et al., 2024; CALL et al., 1994; Noone, 2018). La mediana del tiempo de seguimiento fue de 76,77 meses, sin variación significativa en las estadísticas de seguimiento para los pacientes fallecidos, ni entre los resultados clínicos entre los países de origen, evitando la existencia de sesgos relacionados con el reclutamiento multicéntrico y aleatorizado de los pacientes. El número total de pacientes fallecidos en este grupo fue de 287 (Tabla 11). Para visualizar la probabilidad de supervivencia a lo largo del tiempo en la población de estudio se realizó una representación de Kaplan-Meier. En este tipo de gráfica, el eje vertical (Y) muestra la probabilidad de SG acumulada en porcentaje, el eje horizontal (X) representa el tiempo, en este caso en meses. Los escalones en la curva de Kaplan-Meier indican la ocurrencia del evento censor, en este caso el fallecimiento de los pacientes, y la altura del escalón muestra la proporción de individuos que continúan sobreviviendo justo después de cada evento (Figura 10).

Figura 10. Estimación de Kaplan-Meier de la SG para los 1.039 pacientes incluidos en los análisis.

A continuación, realizamos los análisis de asociación de la SG con las 41 variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para la LLC en la cohorte de CRuCIAL. El análisis se realizó mediante una regresión de Cox ajustada por las variables demográficas de edad, sexo y país de origen. Analizamos los modelos de herencia log-aditivo, dominante y recesivo con el objetivo de evaluar si los diferentes patrones de herencia influían en la SG de los pacientes con LLC. Los resultados de estos análisis identificaron diez variantes genéticas *CAMK2D*_{rs1476569}, *CASP8*_{rs3769825}, *CFLAR*_{rs7558911}, *CXXCI*_{rs1036935}, *GPR37*_{rs2267708}, *IRF8*_{rs391855}, *LEF1*_{rs898518}, *MYNN*_{rs10936599}, *PRKD2*_{rs11083846}, y *TERC*_{rs12638862} que mostraron asociación con la SG a un nivel de significación de $p < 0,05$ en al menos uno de los modelos de herencia analizados (Tabla 16). Si bien estos hallazgos son potencialmente interesantes, ninguna de estas asociaciones se mantuvo significativa tras la corrección por comparaciones múltiples ($0,05/41$ SNPs/3 modelos=0,0004), lo que sugiere que, de existir un efecto de estos genes en la determinación de la SG de los pacientes, éste sería débil.

Aunque hubiera sido interesante validar estos resultados, la ausencia de estudios previos que hayan evaluado el impacto estas variantes de riesgo sobre la SG limitó la posibilidad de confirmar o rechazar los resultados obtenidos. Este hecho destaca la necesidad de realizar estudios adicionales que permitan validar o descartar la implicación de estas variantes genéticas en la SG de los pacientes con la LLC.

Tabla 16. Asociación de variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para LLC y SG.

SNP	Chr	Genes	Alelo riesgo	HR (IC95%) ^δ	<i>p</i>	HR (IC95%) [†]	<i>p</i>	HR (IC95%) [‡]	<i>p</i>
rs4368253	18	<i>ACI07990.1</i> <i>NFE2L3P1</i>	C	0,94 (0,78-1,14)	0,539	0,93 (0,59-1,45)	0,746	0,93 (0,73-1,18)	0,545
rs1439287	2	<i>ACOXL</i>	T	1,03 (0,88-1,21)	0,700	0,99 (0,76-1,29)	0,957	1,10 (0,84-1,44)	0,481
rs58055674	2	<i>ACOXL</i>	C	1,08 (0,90-1,30)	0,424	1,12 (0,89-1,42)	0,335	1,02 (0,64-1,61)	0,936
rs7944004	11	<i>ASCL2</i> <i>C11orf21</i>	T	0,97 (0,82-1,15)	0,735	1,06 (0,79-1,43)	0,699	0,89 (0,69-1,16)	0,394
rs4987855	18	<i>BCL2</i>	G	0,97 (0,71-1,32)	0,848	0,68 (0,10-4,87)	0,701	0,98 (0,71-1,34)	0,886
rs2651823	11	<i>C11orf21</i> <i>TSPAN32</i>	A	0,95 (0,81-1,12)	0,523	1,03 (0,78-1,36)	0,857	0,85 (0,65-1,11)	0,233
rs1476569	4	<i>CAMK2D</i>	G	1,12 (0,95-1,32)	0,176	1,31 (1,03-1,67)	0,028	0,92 (0,64-1,32)	0,643
rs3769825	2	<i>CASP8</i>	T	1,20 (1,02-1,43)	0,033	1,23 (0,93-1,63)	0,150	1,32 (1,01-1,73)	0,041
rs7558911	2	<i>CFLAR</i>	A	1,19 (1,01-1,41)	0,040	1,22 (0,91-1,63)	0,175	1,30 (1,00-1,67)	0,046
rs1036935	18	<i>CXXCI</i>	A	1,27 (1,07-1,51)	0,008	1,34 (1,06-1,70)	0,015	1,43 (0,98-2,10)	0,066
rs1359742	9	<i>DMRTA1</i>	G	1,05 (0,89-1,23)	0,575	1,02 (0,78-1,34)	0,875	1,11 (0,85-1,45)	0,441
rs6546149	2	<i>DTNB</i>	G	1,09 (0,91-1,31)	0,356	1,06 (0,84-1,35)	0,607	1,29 (0,86-1,93)	0,222
rs9880772	3	<i>EOMES</i> <i>LINC01980</i>	T	0,98 (0,84-1,14)	0,787	1,04 (0,80-1,34)	0,787	0,90 (0,69-1,18)	0,455
rs13015798	2	<i>FAM126B</i>	A	1,06 (0,88-1,28)	0,548	1,00 (0,64-1,54)	0,989	1,10 (0,87-1,39)	0,444
rs6586163	10	<i>FAS</i>	A	0,99 (0,84-1,17)	0,916	1,08 (0,80-1,45)	0,631	0,92 (0,71-1,20)	0,554
rs2267708	7	<i>GPR37</i>	T	0,86 (0,72-1,02)	0,081	0,91 (0,70-1,19)	0,504	0,70 (0,51-0,97)	0,030
rs2953196	11	<i>GRAMD1B</i>	G	0,85 (0,70-1,04)	0,123	0,70 (0,42-1,17)	0,176	0,85 (0,67-1,09)	0,203
rs35923643	11	<i>GRAMD1B</i>	G	0,88 (0,72-1,07)	0,192	0,80 (0,63-1,02)	0,068	1,12 (0,71-1,78)	0,631
rs3800461	6	<i>ILRUN</i>	C	0,92 (0,67-1,27)	0,620	0,91 (0,65-1,27)	0,562	1,20 (0,30-4,86)	0,795
rs9392504	6	<i>IRF4</i>	A	0,88 (0,74-1,04)	0,143	0,80 (0,60-1,08)	0,145	0,88 (0,68-1,13)	0,322
rs391855	16	<i>IRF8</i>	A	0,87 (0,74-1,03)	0,104	0,99 (0,72-1,36)	0,946	0,74 (0,58-0,96)	0,021
rs898518	4	<i>LEF1</i>	A	1,12 (0,94-1,33)	0,215	1,50 (1,00-2,26)	0,049	1,04 (0,82-1,33)	0,721
rs34676223	1	<i>MDS2</i>	C	0,99 (0,83-1,18)	0,899	0,88 (0,61-1,27)	0,491	1,03 (0,81-1,30)	0,803
rs57214277	4	<i>MYL12BP2</i> <i>LINC02363</i>	T	1,02 (0,86-1,21)	0,805	1,01 (0,79-1,29)	0,926	1,06 (0,77-1,46)	0,729
rs10936599	3	<i>MYNN</i>	C	0,91 (0,74-1,11)	0,344	0,57 (0,36-0,90)	0,016	0,99 (0,77-1,26)	0,922
rs11715604	3	<i>NCK1</i>	T	0,98 (0,80-1,20)	0,831	1,06 (0,61-1,85)	0,842	0,96 (0,74-1,23)	0,723

rs6489882	12	<i>OAS3</i>	G	1,09 (0,92-1,29)	0,309	1,16 (0,90-1,50)	0,240	1,06 (0,78-1,45)	0,696
rs140522	22	<i>ODF3B</i>	T	1,02 (0,86-1,20)	0,854	1,11 (0,87-1,41)	0,410	0,87 (0,61-1,24)	0,431
rs2236256	6	<i>OPRM1</i> <i>IPCEF1</i>	C	1,03 (0,87-1,21)	0,752	0,96 (0,74-1,23)	0,729	1,14 (0,86-1,51)	0,348
rs11637565	15	<i>PCAT29</i> <i>LOC1079847</i> 88	G	0,97 (0,82-1,16)	0,753	0,96 (0,74-1,25)	0,753	0,97 (0,71-1,33)	0,842
rs17246404	7	<i>POT1</i>	C	0,95 (0,79-1,14)	0,572	0,95 (0,61-1,47)	0,818	0,93 (0,74-1,18)	0,557
rs2511714	8	<i>POU5FIP2</i> <i>ODF1</i>	G	0,91 (0,77-1,08)	0,268	0,92 (0,72-1,17)	0,485	0,82 (0,59-1,14)	0,240
rs11083846	19	<i>PRKD2</i>	A	1,20 (0,99-1,45)	0,061	1,16 (0,92-1,47)	0,209	1,62 (1,06-2,50)	0,027
rs888096	2	<i>QPCT</i> <i>RNU6-III16P</i>	A	0,95 (0,81-1,13)	0,590	0,97 (0,76-1,24)	0,837	0,88 (0,63-1,23)	0,454
rs41271473	1	<i>RHOU</i>	G	0,96 (0,74-1,25)	0,770	1,46 (0,64-3,32)	0,366	0,88 (0,64-1,21)	0,432
rs73718779	6	<i>SERPINB6</i>	A	1,03 (0,78-1,37)	0,823	1,04 (0,77-1,40)	0,806	0,97 (0,24-3,94)	0,970
rs12638862	3	<i>TERC</i>	A	0,89 (0,73-1,08)	0,229	0,62 (0,40-0,97)	0,037	0,94 (0,74-1,19)	0,602
rs7705526	5	<i>TERT</i>	A	1,07 (0,90-1,27)	0,468	1,00 (0,78-1,28)	0,997	1,25 (0,91-1,70)	0,163
rs61904987	11	<i>TMPRSS5</i> <i>DRD2</i>	T	0,94 (0,71-1,23)	0,632	0,94 (0,70-1,28)	0,712	0,73 (0,23-2,30)	0,588
rs926070	6	<i>TSBP1-AS1</i>	A	1,11 (0,92-1,33)	0,285	1,19 (0,77-1,82)	0,433	1,12 (0,88-1,42)	0,343
rs7254272	19	<i>ZBTB7A</i> <i>MAP2K2</i>	A	0,82 (0,66-1,02)	0,078	0,78 (0,61-1,00)	0,051	0,92 (0,50-1,69)	0,794

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; HR, *Hazard Ratio*; P, *Pvalue*. Resultados significativos destacados en negrita ($p < 0,05$). δ Análisis de regresión de Cox asumiendo un modelo de herencia log-aditivo. \ddagger Análisis de regresión de Cox asumiendo un modelo de herencia dominante. \yen Análisis de regresión de Cox asumiendo un modelo de herencia recesivo.

Considerando los resultados mostrados anteriormente, decidimos evaluar si las 41 variantes de GWAS para LLC podrían ser útiles para predecir la aparición de la enfermedad en la cohorte CRUCIAL. Para ello, realizamos PRSs ponderados y PRSs no ponderados en un subconjunto de casos de LLC que incluyó 1.003 casos para el modelo del 80% de tasa de genotipado y 891 casos para el modelo del 100% de tasa de genotipado de los 10 SNPs asociados con la SG de los pacientes ($p < 0,05$). Estos análisis se realizaron nuevamente ajustando por la edad, el sexo y el país de origen. Como se esperaba, encontramos unas asociaciones débiles entre los PRSs construidos con los 10 SNPs y las variables demográficas y la SG de los pacientes de LLC. Para los modelos de 100% de tasa de genotipado obtuvimos una HR = 2,36, IC95% 1,56–3,58, $p = 5,30 \times 10^{-5}$ para el

quintil más alto vs. el más bajo de la puntuación no ponderada, con una área bajo la curva ROC (AUROC, por sus siglas en inglés) de AUROC = 0,56, IC95 % 0,52-0,60, y HR = 2,50, IC95% 1,63–3,83, $p = 2,40 \times 10^{-5}$ para el quintil más alto vs. el más bajo de la puntuación ponderada, con una AUROC = 0,57, IC95 % 0,53-0,61. Para los modelos de 80% de tasa de genotipado obtuvimos una HR = 2,08, IC95% 1,41–3,07, $p = 2,41 \times 10^{-4}$ para el quintil más alto vs. el más bajo de la puntuación no ponderada, con una AUROC = 0,55, IC95 % 0,51-0,59, y HR = 2,19, IC95% 1,48–3,26, $p = 9,80 \times 10^{-5}$ para el quintil más alto vs. el más bajo de la puntuación ponderada, con una AUROC = 0,56, IC95 % 0,52-0,60 (Tabla 17).

Tabla 17. Asociaciones entre PRSs ponderados y no ponderados y la SG de los pacientes.

Puntuaje de riesgo poligénico (n=891)				AUROC
	Quintiles	HR IC95% ^a	p	AUROC (IC95%)
Sin ponderar, sujetos con 100% tasa de genotipado	1	1,00	-	
	2	1,06 (0,70-1,60)	0,787	
	3	1,67 (1,15-2,43)	0,007	
	4	1,42 (0,99-2,03)	0,053	
	5	2,36 (1,56-3,58)	5,30 × 10⁻⁵	
	Continuo ^b	1,20 (1,09-1,31)	8,70 × 10⁻⁵	0,56 (0,52-0,60)
Ponderados, sujetos con 100% tasa de genotipado	1	1,00	-	
	2	1,33 (0,85-2,09)	0,206	
	3	2,05 (1,34-3,15)	0,001	
	4	1,68 (1,08-2,59)	0,020	
	5	2,50 (1,63-3,83)	2,40 × 10⁻⁵	
	Continuo ^b	1,22 (1,11-1,33)	1,80 × 10⁻⁵	0,57 (0,53-0,61)
Puntuaje de riesgo poligénico (n=1003)				AUROC
	Quintiles	HR IC95% ^a	p	AUROC (IC95%)
Sin ponderar, sujetos con 80% tasa de genotipado	1	1,00	-	
	2	0,99 (0,66-1,46)	0,948	
	3	1,48 (1,05-2,11)	0,027	
	4	1,36 (0,98-1,90)	0,066	
	5	2,08 (1,41-3,07)	2,41 × 10⁻⁴	
	Continuo ^b	1,17 (1,08-1,28)	2,32 × 10⁻⁴	0,55 (0,51-0,59)

	1	1,00	-	
	2	1,29 (0,85-1,95)	0,224	
Ponderados, sujetos con 80% tasa de genotipado	3	1,78 (1,19-2,67)	0,005	
	4	1,57 (1,05-2,35)	0,028	
	5	2,19 (1,48-3,26)	9,80×10⁻⁵	
	Continuo ^b	1,19 (1,09-1,29)	7,61×10⁻⁵	0,56 (0,52-0,60)

a HR, hazards ratio; IC, intervalo de confianza. Todos los análisis se ajustaron por edad, sexo y región geográfica de origen. b La unidad para el análisis con la variable continua fue el incremento de un quintil. Resultados significativos destacados en negrita ($p < 0,05$).

Aunque la capacidad predictiva de todos los PRSs, solo se mejoraba aproximadamente un 7% (AUROC=0,57; Tabla 17), no debemos descartar que estas variantes genéticas junto con otras variables clínicas y/o alteraciones genéticas puedan resultar de utilidad para la construcción de nuevos modelos predictivos para la SG de los pacientes. Sin embargo, debemos ser cautos y reconocer que los resultados del estudio sugieren que las variantes de susceptibilidad a la LLC no tienen una gran influencia en la SG. No obstante, será necesario realizar estudios adicionales para confirmar estos resultados.

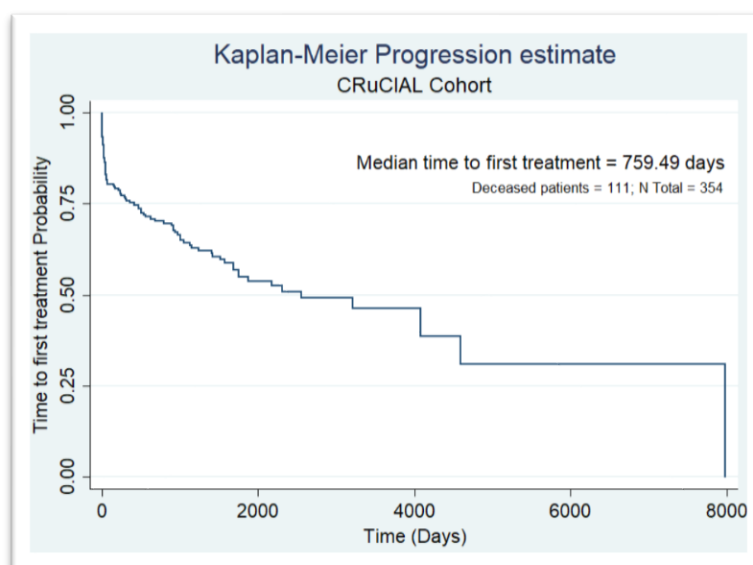
Además, como esperábamos, estos resultados concuerdan con un estudio previo recientemente publicado que demostró, utilizando un enfoque similar, que las variantes de susceptibilidad no influyen de manera significativa en la SG de los pacientes diagnosticados con mieloma múltiple, otra neoplasia maligna de células B (Macauda et al., 2022).

5.2. Impacto de las variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para la LLC sobre la progresión de la enfermedad

El análisis clínico y demográfico de los pacientes con LLC que presentaban datos de THPT en la cohorte CRuCIAL mostró que los casos de esta cohorte tenían una edad media de 65,03 años y una proporción hombre/mujer de 1,62 (219/135), que es consistente con las distribuciones observadas a nivel mundial en el momento del diagnóstico (Bray et al., 2024; CALL et al., 1994; Noone, 2018). La mediana del THPT fue de 759,49 días, mientras que el número total de fallecidos en este grupo fue de 111. Es importante señalar que no se observaron diferencias significativas en el THPT entre los diferentes países

participantes, lo que sugería la ausencia de sesgos relacionados con el reclutamiento multicéntrico y aleatorizado de los pacientes (Tabla 11). Nuevamente para visualizar la probabilidad del THPT en la población de estudio se realizó una representación de Kaplan-Meier. En este caso, el eje horizontal (X) representa el tiempo, en días. Los escalones en la curva de Kaplan-Meier indican la ocurrencia del evento censor, en este caso el fallecimiento de los pacientes. La altura del escalón muestra la proporción de individuos que sobreviven después de cada evento (Figura 11).

Figura 11. Estimación de Kaplan-Meier de la THPT estimada para los 354 pacientes incluidos en los análisis.



A continuación, realizamos los análisis de asociación del THPT de las 41 variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para la LLC en la cohorte de CRuCIAL mediante una regresión de Cox ajustada por las variables demográficas de edad, sexo y país de origen y siguiendo los modelos de herencia log-aditivo, dominante y recesivo. En estos análisis identificamos siete variantes genéticas *ACOXL*_{rs58055674}, *CASP8*_{rs3769825}, *GRAMD1B*_{rs35923643}, *MYNN*_{rs10936599}, *PRKD2*_{rs11083846}, *TERC*_{rs12638862} y *ZBTB7A|MAP2K2*_{rs7254272} asociadas con el THPT a un nivel de significación de $p < 0,05$ (Tabla 18). Aunque estos hallazgos resultan potencialmente interesantes, es importante destacar que ninguna de estas asociaciones se mantuvo significativa tras la corrección por comparaciones múltiples ($0,05/41$ SNPs/3 modelos = $0,0004$). Estos datos, sugieren que el efecto de estos genes en la determinación del THPT es nuevamente débil.

Tabla. 18. Asociación de variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para LLC y THPT.

SNP	Chr	Genes	Alelo riesgo	HR (IC95%) ^δ	<i>p</i>	HR (IC95%) [†]	<i>p</i>	HR (IC95%) [‡]	<i>p</i>
rs4368253	18	<i>ACI07990.1</i> <i>NFE2L3P1</i>	C	1,03 (0,74-1,42)	0,871	0,62 (0,31-1,25)	0,184	1,18 (0,80-1,74)	0,413
rs1439287	2	<i>ACOXL</i>	T	1,05 (0,81-1,37)	0,708	0,98 (0,65-1,50)	0,943	1,18 (0,76-1,83)	0,469
rs58055674	2	<i>ACOXL</i>	C	1,39 (1,02-1,90)	0,036	1,60 (1,08-2,38)	0,019	1,18 (0,51-2,73)	0,696
rs7944004	11	<i>ASCL2</i> <i>C11orf21</i>	T	1,04 (0,78-1,39)	0,769	1,01 (0,61-1,67)	0,967	1,09 (0,71-1,68)	0,684
rs4987855	18	<i>BCL2</i>	G	0,75 (0,44-1,27)	0,281	NA	NA	0,73 (0,43-1,25)	0,256
rs2651823	11	<i>C11orf21</i> <i>TSPAN32</i>	A	1,12 (0,85-1,46)	0,418	1,13 (0,73-1,76)	0,591	1,20 (0,77-1,85)	0,423
rs1476569	4	<i>CAMK2D</i>	G	1,01 (0,76-1,35)	0,951	1,02 (0,69-1,51)	0,915	0,99 (0,54-1,82)	0,971
rs3769825	2	<i>CASP8</i>	T	1,41 (1,06-1,87)	0,017	1,56 (0,98-2,47)	0,059	1,58 (1,00-2,48)	0,048
rs7558911	2	<i>CFLAR</i>	A	1,21 (0,93-1,58)	0,163	1,23 (0,78-1,95)	0,375	1,35 (0,89-2,05)	0,155
rs1036935	18	<i>CXXCI</i>	A	1,13 (0,83-1,53)	0,446	1,14 (0,77-1,69)	0,503	1,24 (0,59-2,61)	0,568
rs1359742	9	<i>DMRTA1</i>	G	0,98 (0,74-1,30)	0,884	0,85 (0,54-1,32)	0,468	1,11 (0,72-1,73)	0,636
rs6546149	2	<i>DTNB</i>	G	0,95 (0,69-1,31)	0,769	0,90 (0,61-1,33)	0,587	1,14 (0,55-2,36)	0,723
rs9880772	3	<i>EOMES</i> <i>LINC01980</i>	T	0,96 (0,73-1,24)	0,735	0,96 (0,64-1,43)	0,831	0,91 (0,56-1,48)	0,717
rs13015798	2	<i>FAM126B</i>	A	0,92 (0,68-1,23)	0,567	0,88 (0,45-1,70)	0,695	0,90 (0,61-1,33)	0,605
rs6586163	10	<i>FAS</i>	A	0,81 (0,62-1,07)	0,139	0,80 (0,51-1,26)	0,339	0,72 (0,45-1,13)	0,150
rs2267708	7	<i>GPR37</i>	T	0,76 (0,58-1,00)	0,052	0,69 (0,46-1,03)	0,069	0,71 (0,43-1,16)	0,172
rs2953196	11	<i>GRAMD1B</i>	G	0,82 (0,59-1,14)	0,240	0,85 (0,34-2,10)	0,724	0,76 (0,50-1,16)	0,202
rs35923643	11	<i>GRAMD1B</i>	G	0,71 (0,52-0,98)	0,040	0,68 (0,46-1,02)	0,061	0,54 (0,23-1,28)	0,164
rs3800461	6	<i>ILRUN</i>	C	0,97 (0,61-1,54)	0,881	0,94 (0,55-1,60)	0,808	1,17 (0,27-5,08)	0,832
rs9392504	6	<i>IRF4</i>	A	0,94 (0,72-1,23)	0,648	1,07 (0,63-1,81)	0,800	0,83 (0,55-1,26)	0,380
rs391855	16	<i>IRF8</i>	A	1,14 (0,87-1,49)	0,336	1,28 (0,77-2,14)	0,341	1,15 (0,77-1,72)	0,503
rs898518	4	<i>LEF1</i>	A	1,16 (0,87-1,54)	0,310	1,58 (0,82-3,04)	0,172	1,09 (0,74-1,62)	0,650
rs34676223	1	<i>MDS2</i>	C	1,28 (0,96-1,71)	0,098	1,96 (0,94-4,07)	0,073	1,24 (0,84-1,82)	0,280
rs57214277	4	<i>MYL12BP2</i> <i>LINC02363</i>	T	1,10 (0,85-1,43)	0,456	1,28 (0,86-1,91)	0,225	0,97 (0,58-1,61)	0,897
rs10936599	3	<i>MYNN</i>	C	1,03 (0,73-1,46)	0,866	0,42 (0,21-0,83)	0,013	1,30 (0,85-1,98)	0,222
rs11715604	3	<i>NCK1</i>	T	0,78 (0,55-1,10)	0,158	0,59 (0,24-1,48)	0,263	0,77 (0,51-1,17)	0,225

rs6489882	12	<i>OAS3</i>	G	1,01 (0,76-1,34)	0,929	1,06 (0,70-1,59)	0,797	0,96 (0,56-1,63)	0,868
rs140522	22	<i>ODF3B</i>	T	0,88 (0,66-1,18)	0,391	0,86 (0,58-1,28)	0,452	0,81 (0,43-1,53)	0,523
rs2236256	6	<i>OPRM1</i> <i>IPCEF1</i>	C	1,06 (0,79-1,41)	0,704	0,79 (0,52-1,21)	0,279	1,50 (0,97-2,33)	0,070
rs11637565	15	<i>PCAT29</i> <i>LOC1079847</i> 88	G	0,90 (0,68-1,20)	0,482	1,04 (0,67-1,61)	0,874	0,67 (0,38-1,16)	0,155
rs17246404	7	<i>POT1</i>	C	1,14 (0,83-1,56)	0,425	1,63 (0,70-3,79)	0,257	1,08 (0,72-1,61)	0,702
rs2511714	8	<i>POU5FIP2</i> <i>ODF1</i>	G	0,97 (0,72-1,31)	0,838	0,93 (0,61-1,40)	0,721	1,03 (0,57-1,86)	0,914
rs11083846	19	<i>PRKD2</i>	A	1,34 (1,00-1,80)	0,050	1,21 (0,82-1,78)	0,331	2,31 (1,31-4,08)	0,004
rs888096	2	<i>QPCT</i> <i>RNU6-III16P</i>	A	1,02 (0,76-1,35)	0,912	0,96 (0,64-1,44)	0,851	1,14 (0,66-1,96)	0,631
rs41271473	1	<i>RHOU</i>	G	0,76 (0,50-1,13)	0,176	0,85 (0,26-2,76)	0,786	0,69 (0,42-1,13)	0,139
rs73718779	6	<i>SERPINB6</i>	A	1,15 (0,74-1,78)	0,536	1,09 (0,68-1,74)	0,734	2,86 (0,69-11,9)	0,148
rs12638862	3	<i>TERC</i>	A	0,94 (0,66-1,33)	0,715	0,40 (0,19-0,84)	0,015	1,12 (0,74-1,69)	0,601
rs7705526	5	<i>TERT</i>	A	0,92 (0,70-1,23)	0,589	0,79 (0,53-1,17)	0,240	1,13 (0,69-1,86)	0,633
rs61904987	11	<i>TMPRSS5</i> <i>DRD2</i>	T	1,28 (0,86-1,92)	0,228	1,35 (0,85-2,16)	0,203	1,23 (0,30-5,10)	0,776
rs926070	6	<i>TSBP1-AS1</i>	A	1,00 (0,74-1,35)	0,987	0,87 (0,45-1,69)	0,684	1,04 (0,71-1,54)	0,835
rs7254272	19	<i>ZBTB7A</i> <i>MAP2K2</i>	A	0,74 (0,51-1,07)	0,110	0,62 (0,41-0,96)	0,030	1,34 (0,58-3,09)	0,497

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; HR, *Hazard Ratio*; NA, No Aplica. Resultados significativos en negrita ($p < 0,05$). δ Análisis de regresión de Cox asumiendo un modelo de herencia log-aditivo. \dagger Análisis de regresión de Cox asumiendo un modelo de herencia dominante. \ddagger Análisis de regresión de Cox asumiendo un modelo de herencia recesivo.

Resulta interesante señalar que, aunque ninguna de las variantes genéticas evaluadas mostró una asociación significativa con el THPT, cuatro de ellas (*CASP8*_{rs3769825}, *MYNN*_{rs10936599}, *PRKD2*_{rs11083846} y *TERC*_{rs12638862}) habían sido identificadas previamente como potencialmente asociadas con la SG en los análisis previos. Este hallazgo sugiere que, si bien estas variantes no parecen influir de manera significativa en la SG o en la progresión de la enfermedad medida por THPT, podrían estar relacionadas con otros aspectos de la evolución de la LLC, lo que justifica un análisis más detallado para comprender su impacto clínico.

A diferencia de lo que ocurría para el análisis de la SG, en el análisis de la asociación con el THPT existía un estudio previo de GWAS (W. Y. Lin et al., 2021). Que nos permitió

realizar un meta-análisis para confirmar los resultados obtenidos en nuestro estudio. Al integrar los datos de nuestro estudio con los del GWAS de este estudio, pudimos descartar definitivamente la existencia de un efecto de las variantes genéticas de susceptibilidad identificadas por GWAS sobre la progresión de la enfermedad. Estos resultados sugieren que el proceso de inicio y progresión de la enfermedad no están determinados por los mismos genes y, probablemente, por los mismos mecanismos biológicos.

Tabla 19. Meta-análisis de las estimaciones de asociación de las variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para la LLC y la THPT en las cohortes CRuCIAL con un estudio de GWAS previo.

SNP	Chr	Genes	Alelo riesgo	Cohorte CRuCIAL (354 casos de LLC)		Lin et al. (2021) (755 casos de LLC)		Meta-análisis (1109 casos de LLC)		
				HR (IC95%) ^δ	<i>p</i>	HR (IC95%) ^δ	<i>p</i>	HR (IC95%) ^δ	<i>p</i>	<i>p_{het}</i>
rs4368253	18	<i>AC107990.1</i> <i>NFE2L3P1</i>	C	1,03 (0,74-1,42)	0,871	1,03 (0,87-1,17)	0,684	1,03 (0,85-1,19)	0,726	0,985
rs1439287	2	<i>ACOXL</i>	T	1,05 (0,81-1,37)	0,708	1,00 (0,86-1,12)	0,990	1,01 (1,16-0,88)	0,858	0,765
rs58055674	2	<i>ACOXL</i>	C	1,39 (1,02-1,90)	0,036	0,98 (0,84-1,15)	0,837	1,08 (0,89-1,23)	0,398	0,096
rs7944004	11	<i>ASCL2</i> <i>C11orf21</i>	T	1,04 (0,78-1,39)	0,769	NA	NA	1,04 (1,35-0,80)	0,783	1,000
rs4987855	18	<i>BCL2</i>	G	0,75 (0,44-1,27)	0,281	0,82 (0,45-1,10)	0,230	0,78 (0,33-1,10)	0,205	0,734
rs2651823	11	<i>C11orf21</i> <i>TSPAN32</i>	A	1,12 (0,85-1,46)	0,418	0,93 (0,80-1,07)	0,302	0,98 (1,14-0,84)	0,796	0,303
rs1476569	4	<i>CAMK2D</i>	G	1,01 (0,76-1,35)	0,951	0,99 (0,85-1,15)	0,898	1,00 (0,83-1,14)	0,955	0,917
rs3769825	2	<i>CASP8</i>	T	1,41 (1,06-1,87)	0,017	1,10 (0,96-1,22)	0,149	1,01 (1,18-0,87)	0,870	0,018
rs7558911	2	<i>CFLAR</i>	A	1,21 (0,93-1,58)	0,163	0,81 (0,63-0,97)	0,019	0,94 (1,10-0,80)	0,421	0,048
rs1036935	18	<i>CXXCI</i>	A	1,13 (0,83-1,53)	0,446	0,96 (0,83-1,13)	0,660	1,01 (1,19-0,85)	0,949	0,444
rs1359742	9	<i>DMRTA1</i>	G	0,98 (0,74-1,30)	0,884	0,93 (0,76-1,07)	0,344	0,94 (0,77-1,10)	0,506	0,778
rs6546149	2	<i>DTNB</i>	G	0,95 (0,69-1,31)	0,769	0,86 (0,73-1,01)	0,067	0,87 (0,64-1,06)	0,192	0,652
rs9880772	3	<i>EOMES</i> <i>LINC01980</i>	T	0,96 (0,73-1,24)	0,735	1,00 (0,87-1,12)	0,954	0,98 (1,13-0,86)	0,828	0,815
rs13015798	2	<i>FAM126B</i>	A	0,92 (0,68-1,23)	0,567	0,78 (0,57-0,96)	0,015	0,85 (1,02-0,71)	0,076	0,556
rs6586163	10	<i>FAS</i>	A	0,81 (0,62-1,07)	0,139	1,00 (0,86-1,13)	0,972	0,95 (1,11-0,82)	0,527	0,249
rs2267708	7	<i>GPR37</i>	T	0,76 (0,58-1,00)	0,052	0,98 (0,85-1,12)	0,743	0,91 (1,07-0,78)	0,273	0,176
rs2953196	11	<i>GRAMD1B</i>	G	0,82 (0,59-1,14)	0,240	1,16 (0,99-1,31)	0,065	1,06 (0,84-1,23)	0,596	0,102

rs35923643	11	<i>GRAMD1B</i>	G	0,71 (0,52-0,98)	0,040	1,18 (1,00-1,39)	0,049	1,03 (0,84-1,19)	0,760	0,021
rs3800461	6	<i>ILRUN</i>	C	0,97 (0,61-1,54)	0,881	1,19 (0,96-1,47)	0,105	1,12 (1,41-0,88)	0,363	0,426
rs9392504	6	<i>IRF4</i>	A	0,94 (0,72-1,23)	0,648	1,03 (0,88-1,16)	0,678	1,00 (1,16-0,87)	0,970	0,597
rs391855	16	<i>IRF8</i>	A	1,14 (0,87-1,49)	0,336	1,00 (0,85-1,13)	0,967	1,04 (1,21-0,89)	0,624	0,477
rs898518	4	<i>LEF1</i>	A	1,16 (0,87-1,54)	0,310	0,92 (0,76-1,06)	0,282	0,98 (1,14-0,84)	0,818	0,234
rs34676223	1	<i>MDS2</i>	C	1,28 (0,96-1,71)	0,098	1,06 (0,90-1,19)	0,467	1,11 (0,93-1,25)	0,210	0,347
rs57214277	4	<i>MYL12BP2 LINC02363</i>	T	1,10 (0,85-1,43)	0,456	0,92 (0,79-1,06)	0,228	0,97 (1,13-0,84)	0,728	0,286
rs10936599	3	<i>MYNN</i>	C	1,03 (0,73-1,46)	0,866	0,91 (0,70-1,08)	0,314	0,94 (0,72-1,13)	0,586	0,587
rs11715604	3	<i>NCK1</i>	T	0,78 (0,55-1,10)	0,158	1,05 (0,87-1,27) ^η	0,614	0,96 (0,73-1,15)	0,719	0,207
rs6489882	12	<i>OAS3</i>	G	1,01 (0,76-1,34)	0,929	1,10 (0,95-1,27)	0,213	1,06 (0,91-1,18)	0,450	0,588
rs140522	22	<i>ODF3B</i>	T	0,88 (0,66-1,18)	0,391	1,04 (0,90-1,20)	0,641	0,99 (1,16-0,85)	0,927	0,397
rs2236256	6	<i>OPRM1 IPCEF1</i>	C	1,06 (0,79-1,41)	0,704	1,04 (0,91-1,20)	0,568	1,04 (0,88-1,18)	0,580	0,930
rs11637565	15	<i>PCAT29 LOC107984788</i>	G	0,90 (0,68-1,20)	0,482	0,89 (0,77-1,03)	0,112	0,88 (0,68-1,05)	0,182	0,958
rs17246404	7	<i>POT1</i>	C	1,14 (0,83-1,56)	0,425	1,01 (0,85-1,15)	0,872	1,04 (0,86-1,19)	0,636	0,577
rs2511714	8	<i>POU5F1P2 ODF1</i>	G	0,97 (0,72-1,31)	0,838	1,00 (0,87-1,14)	0,962	0,99 (0,83-1,13)	0,895	0,883
rs11083846	19	<i>PRKD2</i>	A	1,34 (1,00-1,80)	0,050	1,11 (0,94-1,30)	0,228	1,17 (1,41-0,98)	0,088	0,342
rs888096	2	<i>QPCT RNU6-III16P</i>	A	1,02 (0,76-1,35)	0,912	1,08 (0,93-1,24)	0,324	1,06 (1,26-0,90)	0,484	0,801
rs41271473	1	<i>RHOA</i>	G	0,76 (0,50-1,13)	0,176	0,92 (0,71-1,09)	0,368	0,87 (0,61-1,08)	0,247	0,453
rs73718779	6	<i>SERPIN6</i>	A	1,15 (0,74-1,78)	0,536	0,74 (0,42-0,99)	0,040	1,23 (1,59-0,95)	0,113	0,750
rs12638862	3	<i>TERC</i>	A	0,94 (0,66-1,33)	0,715	0,95 (0,76-1,11)	0,567	0,95 (1,14-0,79)	0,582	0,958
rs7705526	5	<i>TERT</i>	A	0,92 (0,70-1,23)	0,589	NA	NA	0,92 (1,27-0,67)	0,621	1,000
rs61904987	11	<i>TMPRSS5 DRD2</i>	T	1,28 (0,86-1,92)	0,228	1,06 (0,87-1,29)	0,570	1,11 (1,40-0,89)	0,357	0,481
rs926070	6	<i>TSBP1-AS1</i>	A	1,00 (0,74-1,35)	0,987	1,07 (0,91-1,19)	0,382	1,05 (1,25-0,89)	0,570	0,742
rs7254272	19	<i>ZBTB7A MAP2K2</i>	A	0,74 (0,51-1,07)	0,110	1,12 (0,93-1,35)	0,242	1,00 (1,22-0,82)	0,991	0,096

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; HR, *Hazard Ratio*. IC, intervalo de confianza; Phet, Pvalue de heterogeneidad; El meta-análisis se realizó asumiendo un modelo de efectos fijos. Resultados significativos en negrita (P<0,05). ^η Los autores informan el efecto encontrado para el rs62410363 (un SNP en completo desequilibrio de ligamiento con el rs11715604, $r^2 = 0,97$). ^δ El análisis de regresión de Cox se ajustó por edad, sexo y país de origen y se calculó de acuerdo con el modelo log-aditivo de herencia.

A pesar de los resultados obtenidos, decidimos evaluar si la construcción de modelos de predicción PRSs con las siete variantes asociadas con THPT podrían ser útiles para predecir la progresión de la enfermedad en la cohorte CRuCIAL. Para ello, realizamos PRSs ponderados y no ponderados en un subconjunto de 323 casos para el modelo del 80% de tasa de genotipado y 290 casos para el modelo del 100% de tasa de genotipado. Ajustando estos modelos por la edad, el sexo y el país de origen. Al igual que los modelos predictivos construidos para SG, encontramos una asociación modesta entre los PRSs ponderados y no ponderados y la progresión de la enfermedad en pacientes con LLC. En los modelos de PRSs del 100% de tasa de genotipado se observó una HR = 2,66, IC del 95% 1,45–4,88, $p = 1,50 \times 10^{-3}$ para el quintil más alto con respecto al más bajo de la puntuación no ponderada, con una AUROC = 0,59, IC del 95 % 0,52-0,66, y HR = 3,87, IC del 95% 1,89–7,94, $p = 2,10 \times 10^{-4}$ para el quintil más alto en comparación con el más bajo de la puntuación ponderada, con una AUROC = 0,60, IC del 95 % 0,53-0,67. Para los modelos de 80% de tasa de genotipado, se observó una HR = 3,00, IC del 95% 1,75–5,12, $p = 5,90 \times 10^{-5}$ para el quintil más alto vs. el más bajo de la puntuación no ponderada, con una AUROC = 0,61, IC del 95 % 0,54-0,67, y HR = 3,58, IC del 95% 1,85–6,93, $p = 1,50 \times 10^{-4}$ para el quintil más alto vs. el más bajo de la puntuación ponderada, con una AUROC = 0,61, IC del 95 % 0,55-0,67 (Tabla 20).

Tabla 20. Asociaciones entre PRSs ponderados y no ponderados y THPT.

	Puntuaje de riesgo poligénico (n=290)			AUROC
	Quintiles	HR IC95% ^a	p	AUROC (IC95%)
Sin ponderar, sujetos con 100% tasa de genotipado	1	1,00	-	
	2	1,23 (0,68-2,22)	0,487	
	3	-	-	
	4	1,89 (1,08-3,31)	0,026	
	5	2,66 (1,45-4,88)	1,50×10⁻⁰³	
	Continuo ^b	1,26 (1,11-1,45)	6,20×10⁻⁰⁴	0,59 (0,52-0,66)
Ponderados, sujetos con 100% tasa de genotipado	1	1,00	-	
	2	2,22 (1,05-4,71)	0,037	
	3	1,45 (0,66-3,16)	0,353	
	4	2,34 (1,14-4,79)	0,020	
	5	3,87 (1,89-7,94)	2,10×10⁻⁰⁴	

		Continuo ^b	1,32 (1,13-1,54)	5,17×10⁻⁰⁴	0,60 (0,53-0,67)
Puntuaje de riesgo poligénico (n=323)			AUROC		
	Quintiles	HR IC95%^a	p	AUROC (IC95%)	
Sin ponderar, sujetos con 80% tasa de genotipado	1	1,00	-		
	2	1,27 (0,73-2,21)	0,392		
	3	-	-		
	4	1,85 (1,07-3,19)	0,027		
	5	3,00 (1,75-5,12)	5,90×10⁻⁰⁵		
	Continuo ^b	1,29 (1,14-1,46)	4,40×10⁻⁰⁵	0,61 (0,54-0,67)	
Ponderados, sujetos con 80% tasa de genotipado	1	1,00	-		
	2	1,89 (0,93-3,85)	0,080		
	3	1,64 (0,81-3,32)	0,172		
	4	2,64 (1,37-5,10)	3,80×10⁻⁰³		
	5	3,58 (1,85-6,93)	1,50×10⁻⁰⁴		
	Continuo ^b	1,34 (1,16-1,54)	6,60×10⁻⁰⁵	0,61 (0,55-0,67)	

a HR, hazards ratio; IC, intervalo de confianza. Todos los análisis se ajustaron por edad, sexo y región geográfica de origen. b La unidad para el análisis con la variable continua fue el incremento de un quintil. Resultados significativos destacados en negrita ($p < 0,05$).

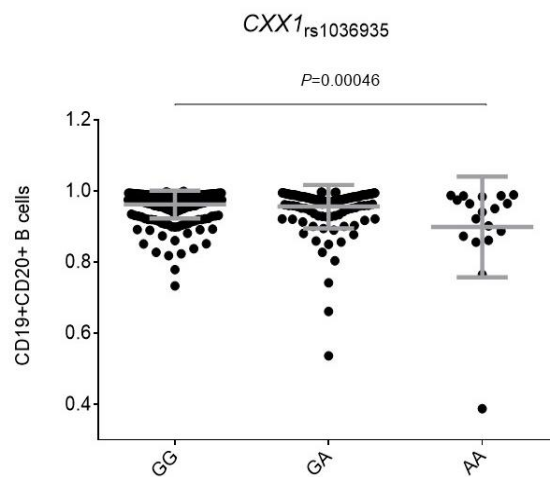
En este caso, la capacidad predictiva global de los PRSs, mejoraba aproximadamente un 10% la detección de la progresión de la enfermedad medida mediante el THPT (AUROC=0,61; Tabla 20). Sin embargo, dada la modesta asociación observada y el limitado tamaño de la población analizada, no pudimos demostrar la utilidad de estas variantes genéticas para predecir el THPT. No obstante, considerando el relativamente bajo poder estadístico de nuestro estudio (80% de poder para detectar un HR de 1,45 para un SNP con una frecuencia de 0,25) y el escaso número de estudios que evalúan el impacto de las variantes de riesgo identificadas por GWAS para la LLC sobre la SG y el THPT, no podemos descartar la posibilidad de que algunos de estos SNPs puedan tener un efecto más fuerte en la modulación de estos parámetros.

5.3. Análisis funcionales de las variantes de riesgo identificadas mediante GWAS para la LLC sobre la supervivencia y progresión de la enfermedad

Los análisis funcionales realizados en la cohorte del HFGP en relación a los SNPs de susceptibilidad para LLC ya fueron previamente publicados por nuestro grupo (García-Martín et al., 2022). Estos experimentos funcionales mostraron interesantes correlaciones que se detallan a continuación.

Los portadores del alelo *CXXCI*_{rs1036935A} que tenían una peor SG ($p = 0,008$; Tabla 16) tenían además un número menor de células B CD19⁺CD20⁺ circulantes ($p = 0,00046$; Figura 12). Este tipo celular es un subconjunto de células B poco expresadas en pacientes con LLC en comparación con otras neoplasias malignas de células B (García-Martín et al., 2022; Ginaldi et al., 1998). El *locus* *CXXCI* codifica una proteína del complejo SETD1 que actúa como un activador transcripcional epigenético que, cuando se desregula ha demostrado inducir la progresión tumoral (M. Wu et al., 2018) y reducir la supervivencia (J. Wu et al., 2020).

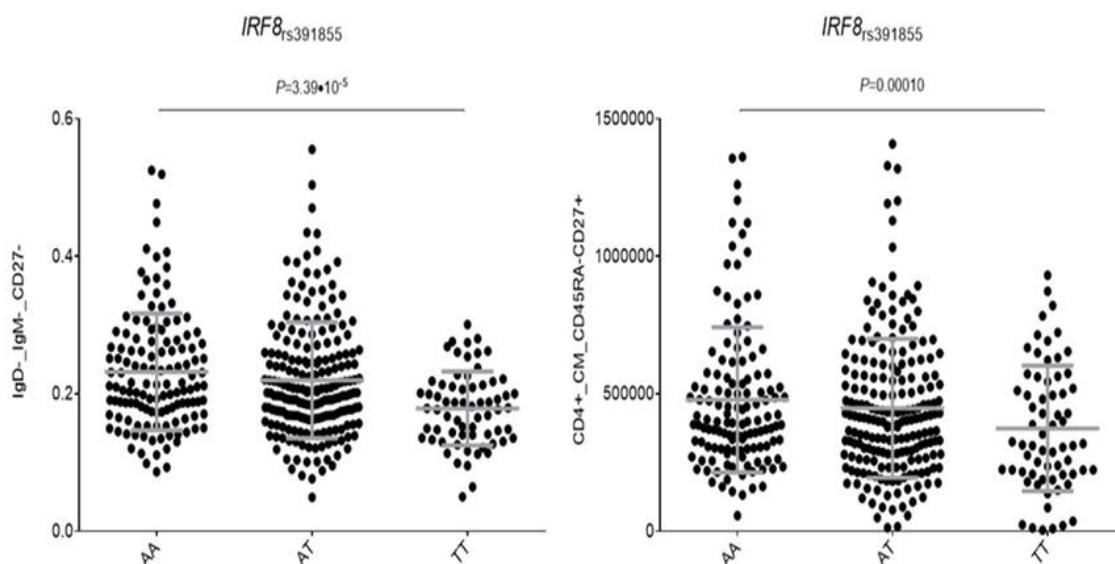
Figura 12. Correlación del *CXXCI*_{rs1036935} con el número absoluto de células B CD19⁺CD20⁺ (García-Martín et al., 2022).



Los portadores del alelo *IRF8*_{rs391855A} que tenían ligeramente incrementada la SG ($p = 0,021$; Tabla 16), correlacionan con un mayor número de células B de memoria CD27⁻IgM⁻IgD⁻ ($p = 3,39 \times 10^{-5}$; Figura 13A) y células T de memoria central CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺ ($p = 0,0001$; Figura 13B). El *locus* *IRF8* codifica para un factor de transcripción

de la familia de los factores reguladores del interferón (IFN) que se expresan en células endoteliales y epiteliales, pero principalmente en células del sistema inmunitario. El gen *IRF8* regula la expresión de genes estimulados por los IFN de tipo I que, a su vez, afectan la activación y supervivencia de las células B mediada por el factor activador de células B (BAFF) (Kiefer et al., 2012). Además, se ha descrito que *IRF8* orquesta la respuesta adaptativa de las células NK y es un regulador maestro de la diferenciación de las células T CD8/CD4 (Miyagawa et al., 2012). Estas evidencias podrían explicar porque los pacientes portadores del genotipo la mayor SG de los pacientes portadores del genotipo *IRF8*_{rs391855AA} tienen una mayor SG en comparación con los pacientes que no portan este genotipo.

Figura 13. [A] Correlación del *IRF8*_{rs391855} con el número absoluto de células B circulantes de memoria CD27-IgM-IgD⁻ con cambio de clase; [B] Correlación del *IRF8*_{rs391855} con el número absoluto de células T CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺ de memoria central (García-Martín et al., 2022).



Los portadores del alelo *GRAMD1B*_{rs35923643G} que asocia ligeramente con un mayor THPT ($p = 0,040$; Tabla 18) mostraban un mayor número de células B transicionales CD24⁺CD38⁺ en sangre y mayores concentraciones séricas circulantes de IL18R1 ($p = 4,25 \cdot 10^{-5}$ y $0,00085$ respectivamente; Figura 14) (García-Martín et al., 2022). Esta variante genética ha sido identificada como la variante genética más asociadas con el riesgo a desarrollar LLC a través de numerosos estudios de GWAS (Berndt et al., 2016, 2022; Law, Sud, et al., 2017) y de validación en cohortes independientes (García-Martín

et al., 2022). Las células B $CD24^+CD38^+$ son células B reguladoras (B_{reg}) con un efecto inmunosupresor dependiente de IL10 (Carter et al., 2011) que perjudica la función de las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) y la liberación de citocinas proinflamatorias por los monocitos, limitando así la respuesta inmunitaria del huésped contra las células cancerosas. En consonancia con nuestros hallazgos funcionales, se ha descubierto que la expresión de IL18R1 está desregulada en los trastornos linfoproliferativos crónicos de células B, incluida la LLC, lo que podría contribuir al escape del tumor del sistema inmunitario del huésped (Airoldi et al., 2004). Además, los análisis *in silico* del SNP $GRAMD1B_{rs35923643}$ muestran por un lado que esta variante genética se encuentra asociada a una región reguladora con numerosas marcas de histonas para células B primarias de sangre del cordón umbilical y sangre periférica y monocitos primarios y determina motivos alterados para factores de transcripción como PU1, MEF2A, POU2F2, NKFB, OCT2 e IRF444, que también se han vinculado con la aparición de LLC (Law, Berndt, et al., 2017). Por otro lado, los análisis *in silico* llevados a cabo en el GTex Portal muestran que el SNP $GRAMD1B_{rs35923643}$ se correlaciona de forma muy significativa con un aumento de la expresión del propio gen $GRAMD1B$ en sangre periférica ($p = 3,10 \times 10^{-6}$; Figura 15) y que, por tanto, su presencia podría afectar al estado de la cromatina y a las marcas epigenéticas de metilación en monocitos $CD14^+$ y células B de sangre periférica.

Figura 14. [A] Correlación de $GRAMD1B_{rs35923643}$ con el número absoluto de células B transicionales $CD24^+38^+$; [B] Correlación de $GRAMD1B_{rs35923643}$ con los niveles de concentraciones séricas de IL18R1 (García-Martín et al., 2022).

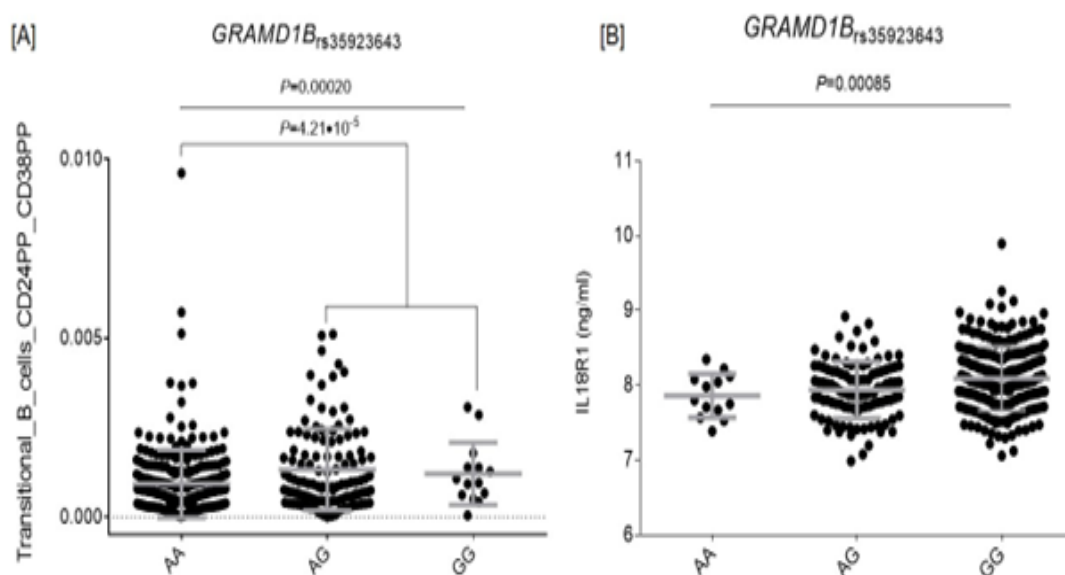
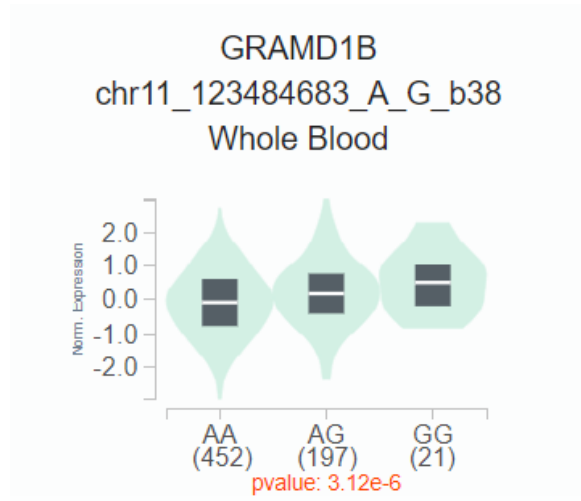


Figura 15. Resultados funcionales *in silico* de expresión génica derivados del análisis de *expression quantitative trait loci* (eQTLs) de GRAMD1B_{rs35923643} utilizando datos obtenidos de GTEx Portal.



Por último, los análisis funcionales en el HFGP mostraron que, los portadores del genotipo *PRKD2*_{rs11083846}^{AA} asociado con una menor SG de los pacientes ($p = 0,027$; Tabla 16) y un menor THPT ($p = 0,004$; Tabla 18) tenían menor cantidad circulante de células B transicionales CD24⁺CD38⁺ ($p = 0,00075$; Figura 16). Estas células B se encuentran en una fase intermedia de diferenciación entre las células B inmaduras de la médula ósea y las células B maduras periféricas. Desempeñan un papel esencial en la tolerancia inmunológica central y periférica, ayudando a prevenir la activación de linfocitos autorreactivos que podrían desencadenar respuestas inmunitarias alteradas (Caligaris-Cappio & Hamblin, 1999). La disminución de este tipo celular podría afectar la respuesta inmunitaria antitumoral y al mantenimiento de un entorno inmunosupresor, favoreciendo la supervivencia de las células afectadas y contribuyendo a la progresión de la enfermedad (Åhsberg et al., 2020). Por otro lado, los análisis *in silico* para este SNP *PRKD2*_{rs11083846} han demostrado que constituye un eQTL para los genes *PRKD2* y *FKRP* en sangre completa ($p = 1,19 \times 10^{-23}$; $p = 6,42 \times 10^{-6}$; respectivamente; Figura 17), entre otros genes (incluidos *SLC1A5* y *CALM3*). Estos genes se han relacionado con la aparición de LLC (Sillé et al., 2012) y suelen aparecer alterados epigenéticamente en la leucemia participando en el control del ciclo celular y la respuesta inmune del huésped lo que favorece la progresión de la enfermedad (Navarrete-Meneses & Pérez-Vera, 2017).

Figura 16. Correlación de $PRKD2_{rs11083846}$ con el número absoluto de células B transicionales $CD24^{+}38^{+}$ (García-Martín et al., 2022).

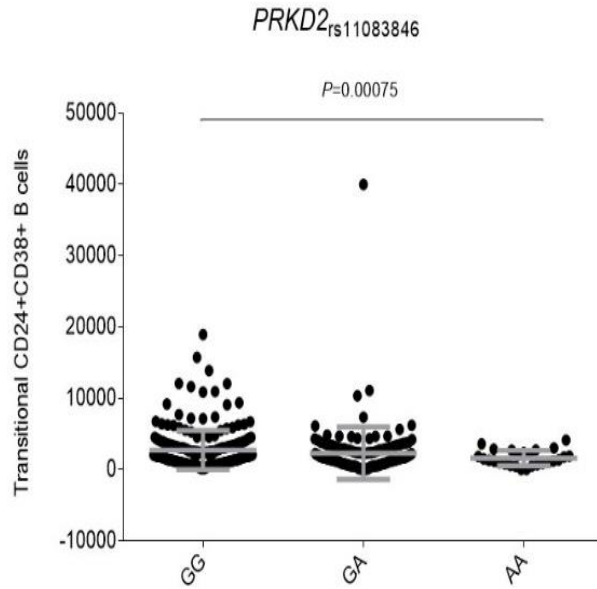
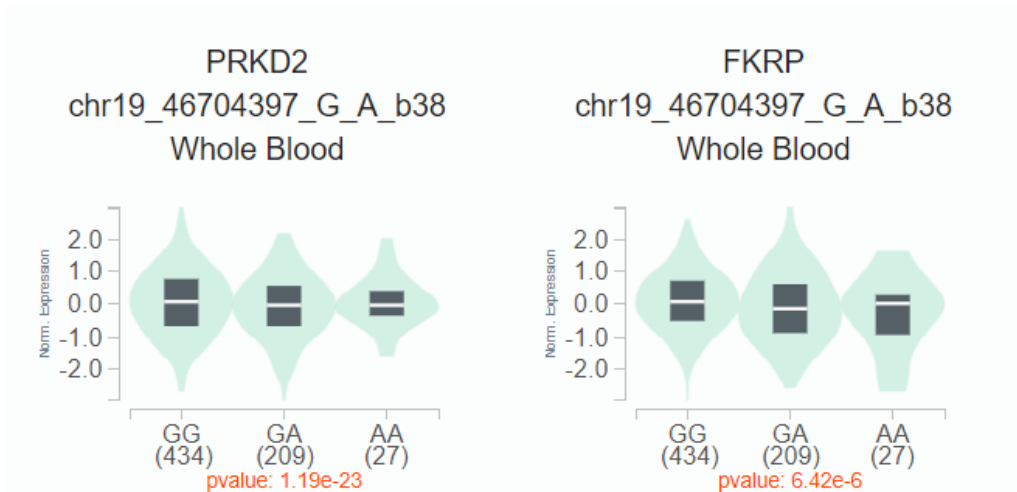


Figura 16. Resultados funcionales *in silico* de expresión génica derivados del análisis de *expression quantitative trait loci* (eQTLs), de $PRKD2_{rs11083846}$ utilizando datos obtenidos de GTEx Portal.



Segunda fase del estudio

5.4. Impacto de las variantes genéticas asociadas con la autofagia en el riesgo a desarrollar la LLC

En la segunda fase de este estudio, se realizó un meta-análisis de las variantes genéticas seleccionadas, asociadas con la autofagia, en diversas poblaciones de descubrimiento, con un total de 4.272 pacientes con LLC y 724.567 controles sanos. Estas poblaciones incluyeron la cohorte del consorcio InterLymph, (con 3.099 pacientes con LLC y 7.666 controles sanos), el proyecto de investigación del genoma FinnGen (668 pacientes con LLC y 314.189 controles sanos), y el UK Biobank (505 pacientes con LLC y 402.712 controles sanos). En la Tabla 21 se muestran los principales SNPs resultantes del meta-análisis de estas poblaciones que cumplieron los siguientes criterios: independencia genética ($r^2 < 0,1$), una asociación con el riesgo de LLC con $p \leq 0,0001$ y sin una heterogeneidad significativa entre poblaciones ($p_{\text{Het}} \geq 0,05$).

Tabla 21. Meta-análisis de las variantes de riesgo relacionadas con la autofagia para la LLC en las cohortes de descubrimiento.

SNP	Genes	Chr	Alelo efecto	Cohorte InterLymph (N = 3.099 casos de LLC y 7.666 controles sanos)		Cohorte UKBiobank (N = 505 casos de LLC y 402.712 controles sanos)		Cohorte FinnGen Ristey 10 (N = 668 casos de LLC y 314.189 controles sanos)		Meta-análisis de descubrimiento (N = 4.272 casos de LLC y 724.567 controles sanos)		
				OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>	<i>phet</i>
rs59952010	<i>ARSB</i>	5	T	1,13 (1,06-1,21)	2,16×10 ⁻⁴	1,17 (1,03-1,34)	0,020	1,05 (0,93-1,19)	0,418	1,13 (1,06-1,19)	6,29×10 ⁻⁵	0,831
rs210143	<i>BAK1</i>	6	C	1,21 (1,13-1,30)	9,52×10⁻⁸	1,08 (0,94-1,24)	0,260	1,29 (1,13-1,48)	1,65×10 ⁻⁴	1,20 (1,13-1,27)	3,39×10⁻⁹	0,083
rs4987852	<i>BCL2</i>	18	C	1,43 (1,28-1,61)	1,61×10⁻⁹	1,06 (0,84-1,34)	0,640	1,47 (1,27-1,72)	5,30×10⁻⁷	1,38 (1,26-1,51)	5,40×10⁻¹²	0,148
rs4987856	<i>BCL2</i>	18	T	0,69 (0,66-0,77)	3,55×10⁻¹¹	0,75 (0,60-0,93)	7,50×10 ⁻³	0,87 (0,68-1,11)	0,249	0,72 (0,66-0,80)	7,35×10⁻¹¹	0,518
rs1026825	<i>BCL2</i>	18	G	1,09 (1,03-1,16)	4,08×10 ⁻³	1,21 (1,07-1,37)	3,50×10 ⁻³	1,10 (0,99-1,23)	0,078	1,12 (1,06-1,18)	6,62×10 ⁻⁵	0,672
rs11152374	<i>BCL2</i>	18	A	1,12 (1,04-1,21)	3,72×10 ⁻³	1,15 (0,99-1,34)	0,078	1,09 (0,97-1,24)	0,159	1,12 (1,05-1,20)	5,42×10 ⁻⁴	0,377
rs4940571	<i>BCL2</i>	18	G	1,20 (1,08-1,34)	9,11×10 ⁻⁴	1,19 (0,96-1,47)	0,120	1,13 (0,96-1,34)	0,143	1,18 (1,08-1,29)	3,05×10 ⁻⁴	0,969
rs7236090	<i>BCL2</i>	18	C	1,10 (1,03-1,17)	3,84×10 ⁻³	1,16 (1,02-1,32)	0,017	1,09 (0,98-1,22)	0,121	1,11 (1,05-1,17)	1,92×10 ⁻⁴	0,896
rs12457371	<i>BCL2</i>	18	G	0,89 (0,83-0,94)	3,66×10 ⁻⁴	0,91 (0,79-1,05)	0,210	0,86 (0,77-0,97)	0,010	0,88 (0,83-0,93)	2,77×10 ⁻⁵	0,988
rs3731204	<i>CDKN2A</i>	9	C	0,79 (0,72-0,87)	4,42×10⁻⁷	0,76 (0,64-0,91)	2,90×10 ⁻³	0,76 (0,63-0,91)	3,41×10 ⁻³	0,78 (0,72-0,85)	1,03×10⁻⁹	0,972
rs4947976	<i>EGFR</i>	7	A	1,03 (0,97-1,09)	0,383	1,22 (1,08-1,38)	2,40×10 ⁻³	1,12 (1,01-1,25)	0,039	1,15 (1,07-1,24)	1,15×10 ⁻⁴	0,780
rs1926194	<i>FAS</i>	10	A	1,27 (1,19-1,35)	1,15×10⁻¹³	1,32 (1,16-1,50)	1,70×10⁻⁵	1,34 (1,20-1,50)	1,61×10⁻⁷	1,29 (1,23-1,36)	4,73×10⁻²¹	0,145
rs7584971	<i>ITGA6</i>	2	A	1,01 (0,93-1,11)	0,800	1,20 (1,00-1,44)	0,050	1,22 (1,08-1,38)	1,14×10 ⁻³	1,17 (1,07-1,29)	6,07×10 ⁻⁴	0,578
rs11839271	<i>LPAR6, RBL1</i>	13	T	0,90 (0,84-0,96)	2,28×10 ⁻³	0,92 (0,80-1,05)	0,220	0,89 (0,79-1,00)	0,052	0,90 (0,85-0,96)	4,34×10 ⁻⁴	0,991
rs6829366	<i>NAFI</i>	4	T	1,13 (1,05-1,21)	1,49×10 ⁻³	1,16 (1,00-1,35)	0,055	1,05 (0,91-1,21)	0,478	1,12 (1,05-1,20)	4,26×10 ⁻⁴	0,022
rs143052840	<i>PRKCD</i>	3	A	1,25 (1,09-1,44)	1,14×10 ⁻³	1,54 (1,19-1,98)	7,30×10 ⁻⁴	0,96 (0,72-1,29)	0,786	1,26 (1,11-1,42)	1,80×10 ⁻⁴	0,339
rs6910366	<i>TFEB</i>	6	G	0,83 (0,76-0,91)	5,11×10 ⁻⁵	0,84 (0,70-1,02)	0,068	0,94 (0,81-1,09)	0,429	0,86 (0,80-0,93)	8,28×10 ⁻⁵	0,850
rs2645488	<i>VMP1</i>	17	G	1,14 (1,07-1,22)	1,60×10 ⁻⁴	1,19 (1,03-1,36)	0,017	0,95 (0,85-1,07)	0,403	1,11 (1,04-1,18)	7,71×10 ⁻⁴	0,043
rs17885803	<i>WRAP53, TP53</i>	17	T	1,27 (1,11-1,44)	2,93×10 ⁻⁴	1,36 (1,06-1,76)	0,017	1,10 (0,93-1,31)	0,265	1,22 (1,11-1,36)	1,10×10 ⁻⁴	0,480

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; Chr, cromosoma; OR, *Odd Ratio*; IC, intervalo de confianza; *p*, *Pvalue*, Estimaciones calculadas según un modelo log-aditivo de herencia y ajustadas por edad, sexo y país de origen, El meta-análisis se realizó asumiendo un modelo de efectos fijos utilizando METAL, $P < 2,63 \times 10^{-5}$ en negrita.

Tras los análisis estadísticos, se consideraron asociaciones estadísticamente significativas aquellas que tenían un valor de p por debajo del umbral de significancia para el test de comparaciones múltiples (establecido en $p = 2,63 \times 10^{-5}$; $0,05/1,903$ SNPs independientes/1 modelo de herencia. Este criterio permitió identificar y analizar solo aquellas variantes que mostraban una asociación robusta con la LLC, minimizando así el riesgo de falsos positivos.

Tras el filtrado considerando los criterios de validación arriba descritos, se seleccionaron para el análisis de genotipado y asociación en la población de replicación de CRuCIAL todas las variantes que asociaban con el riesgo a desarrollar LLC. Se excluyeron de la etapa de replicación aquellos marcadores que habían sido descritos como marcadores de susceptibilidad en estudios previos de GWAS. Un total de 11 SNPs (Tabla 15) fueron seleccionados para el análisis de asociación en la cohorte CRuCIAL, que incluyó 1.200 pacientes con LLC y 1.898 controles sanos. Las características clínicas y demográficas de los pacientes de la cohorte de replicación de CRuCIAL se han descrito previamente en la Tabla 12. Se llevó a cabo un análisis de asociación entre los casos y controles tras el genotipado de los SNPs seleccionados, utilizando un modelo de regresión logística multivariable. Este análisis se ajustó por variables demográficas, incluyendo sexo, edad y país de origen, y se basó en un modelo de herencia log-aditivo para facilitar el meta-análisis con las poblaciones de descubrimiento que dio lugar a los resultados finales de asociación. En total, este meta-análisis incluyó cuatro grandes poblaciones europeas, compuestas por 5.472 pacientes con LLC y 726.465 controles sanos. El meta-análisis de estas cuatro cohortes independientes permitió confirmar la asociación significativa de variantes que no habían sido previamente descritas en estudios de GWAS o genes candidato. Dichas variantes y su nivel de asociación con el riesgo a desarrollar LLC se describen en detalle en la Tabla 22.

Tabla 22. Meta-análisis general de las estimaciones de asociación de las variantes de riesgo relacionadas con la autofagia para la LLC.

SNP	Genes	Chr	Alelo efecto	Meta-análisis de descubrimiento			Cohorte CRuCIAL		Meta-análisis final		
				(N = 4272 casos de LLC y 724.567 controles sanos)			(N = 1200 casos de LLC y 1898 controles sanos)		(N = 5472 casos de LLC y 726465 controles sanos)		
				OR (IC95%)	P	P _{Het}	OR (IC95%)	P	OR (IC95%)	P	P _{Het}
rs59952010	<i>ARSB</i>	5	T	1.13 (1.06-1.19)	6.29×10 ⁻⁰⁵	0.831	-	-	-	-	-
rs210143	<i>BAK1</i>	6	C	1.20 (1.13-1.27)	3.39×10⁻⁰⁹	0.083	-	-	-	-	-
rs4987852	<i>BCL2</i>	18	C	1.38 (1.26-1.51)	5.40×10⁻¹²	0.148	-	-	-	-	-
rs4987856	<i>BCL2</i>	18	T	0.72 (0.66-0.80)	7.35×10⁻¹¹	0.518	-	-	-	-	-
rs1026825	<i>BCL2</i>	18	G	1.12 (1.06-1.18)	6.62×10 ⁻⁰⁵	0.672	1.06 (0.94-1.19)	0.353	1.11 (1.06-1.16)	1.75×10⁻⁰⁵	0.698
rs11152374	<i>BCL2</i>	18	A	1.12 (1.05-1.20)	5.42×10 ⁻⁰⁴	0.377	0.97 (0.84-1.13)	0.716	1.10 (1.04-1.16)	1.13×10 ⁻⁰³	0.193
rs11839271	<i>LPAR6, RB1</i>	13	T	0.90 (0.85-0.96)	4.34×10 ⁻⁰⁴	0.991	1.13 (0.96-1.33) [¥]	0.131	0.92 (0.88-0.97)	1.63×10 ⁻⁰³	0.268
rs12457371	<i>BCL2</i>	18	G	0.88 (0.83-0.93)	2.77×10 ⁻⁰⁵	0.988	0.92 (0.78-1.08)	0.294	0.89 (0.84-0.93)	3.69×10⁻⁰⁶	0.989
rs143052840	<i>PRKCD</i>	3	A	1.26 (1.11-1.42)	1.80×10 ⁻⁰⁴	0.339	0.82 (0.62-1.00) [¥]	0.152	1.18 (1.06-1.31)	1.59×10 ⁻⁰³	0.027
rs3731204	<i>CDKN2A</i>	9	C	0.78 (0.72-0.85)	1.03×10⁻⁰⁹	0.972	0.80 (0.67-0.94)	8.72×10 ⁻⁰³	0.78 (0.73-0.84)	1.57×10⁻¹²	0.982
rs4940571	<i>BCL2</i>	18	G	1.18 (1.08-1.29)	3.05×10 ⁻⁰⁴	0.969	1.40 (1.15-1.71)	8.66×10 ⁻⁰⁴	1.21 (1.12-1.31)	3.25×10⁻⁰⁶	0.445
rs1926194	<i>FAS</i>	10	A	1.29 (1.23-1.36)	4.73×10⁻²¹	0.145	-	-	-	-	-
rs7584971	<i>ITGA6</i>	2	A	1.17 (1.07-1.29)	6.07×10 ⁻⁰⁴	0.578	-	-	-	-	-
rs4947976	<i>EGFR</i>	7	A	1.15 (1.07-1.24)	1.15×10 ⁻⁰⁴	0.780	1.02 (0.91-1.14) ^h	0.723	1.11 (1.05-1.17)	4.04×10 ⁻⁰⁴	0.360
rs6829366	<i>NAF1</i>	4	T	1.12 (1.05-1.20)	4.26×10 ⁻⁰⁴	0.022	1.14 (0.98-1.31)	0.087	1.12 (1.06-1.19)	5.73×10 ⁻⁰⁵	0.024
rs6910366	<i>TFEB</i>	6	G	0.86 (0.80-0.93)	8.28×10 ⁻⁰⁵	0.850	1.07 (0.85-1.33) [¥]	0.574	0.87 (0.82-0.93)	8.74×10 ⁻⁰⁵	0.474
rs7236090	<i>BCL2</i>	18	C	1.11 (1.05-1.17)	1.92×10 ⁻⁰⁴	0.896	0.99 (0.88-1.12)	0.912	1.10 (1.04-1.15)	1.83×10 ⁻⁰⁴	0.746
rs2645488	<i>VMP1</i>	17	G	1.11 (1.04-1.18)	7.71×10 ⁻⁰⁴	0.043	-	-	-	-	-
rs17885803	<i>WRAP53, TP53</i>	17	T	1.22 (1.11-1.36)	1.10×10 ⁻⁰⁴	0.480	-	-	-	-	-

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; Chr, cromosoma; OR, *Odds Ratio*; IC, intervalo de confianza; P, *Pvalue*, Estimaciones calculadas según un modelo log-aditivo de herencia y ajustado por edad y sexo, El meta-análisis se realizó asumiendo un modelo de efectos fijos utilizando el software METAL, $P < 2,63 \times 10^{-5}$ en negrita, [¥] Las estimaciones de asociación se calcularon en un subconjunto de 1.055 controles sanos y 1.024 casos de LLC de la cohorte CRuCIAL, Los autores informan el efecto encontrado para el rs12718945 (un SNP en completo desequilibrio de ligamiento con el rs4947976, $r^2=0,996$).

El meta-análisis identificó, por primera vez, una asociación significativa con el riesgo a desarrollar LLC para los SNPs *CDKN2A*_{rs3731204}, *BCL2*_{rs1026825}, *BCL2*_{rs12457371} y *BCL2*_{rs4940571}, con el riesgo a desarrollar LLC (OR = 0,78, IC95% 0,73-0,84, $p = 1,57 \times 10^{-12}$; OR = 1,11, IC95% 1,06-1,16, $p = 1,75 \times 10^{-5}$; OR = 0,89, IC95% 0,84-0,93, $p = 3,69 \times 10^{-6}$ y OR = 1,21, IC95% 1,12-1,31, $p = 3,25 \times 10^{-6}$, respectivamente, Tabla 22). Todas estas asociaciones superaron el umbral de significación de comparaciones múltiples, establecido en $p = 2,63 \times 10^{-5}$ (0,05/1,903 SNPs independientes).

Entre los SNPs analizados, el *CDKN2A*_{rs3731204} mostró el efecto más significativo sobre el riesgo de LLC. En concreto, cada copia del alelo *CDKN2A*_{rs3731204C} en el *locus CDKN2A* se asoció con una reducción del riesgo de desarrollar LLC en un 22%, subrayando su relevancia como marcador genético en la susceptibilidad a la enfermedad. Este estudio descubrió, por primera vez, que el *locus CDKN2A* es un gen de susceptibilidad para la LLC. El gen *CDKN2A* es un gen supresor de tumores que regula procesos biológicos clave como la división de células B, la diferenciación celular, la autofagia y la muerte celular. Más concretamente, el *CDKN2A* codifica una proteína inhibidora del ciclo celular (p16^{CDKN2A}) que impide un crecimiento y proliferación anormal de células a través de la unión a complejos con las quinasas dependientes de ciclina (CDK, por sus siglas en inglés) 4 y 6 y ciclina D, que conducen a la detención del ciclo celular en la fase G1/S (Foulkes et al., 1997). Las variantes o deleciones de la línea germinal, tanto comunes como raras, dentro del gen *CDKN2A* se han asociado sistemáticamente con el desarrollo de tumores, incluyendo el melanoma (Landi et al., 2020) y el cáncer de páncreas endocrino (Campa et al., 2016; Rashkin et al., 2020), pero también con cánceres hematológicos como el MM (Clavero et al., 2023), la LLA (Al-Zayan et al., 2024; Migliorini et al., 2013; Sherborne et al., 2010; Vijayakrishnan et al., 2019) y el linfoma difuso de células B grandes (Guney et al., 2012).

Por otro lado, este estudio mostró como resultado novedoso e interesante la asociación con el riesgo de LLC de 3 SNPs independientes dentro del gen *BCL2* (*BCL2*_{rs1026825}, *BCL2*_{rs12457371} y *BCL2*_{rs4940571}). El *locus BCL2* es un gen de susceptibilidad bien conocido para la LLC que codifica una proteína que regula la apoptosis. Curiosamente, a diferencia de muchos otros oncogenes, *BCL2* no promueve la proliferación celular, sino que induce la supervivencia celular (Vaux et al., 1988). Aunque la translocación t(14;18) que afecta a *BCL2* se ha asociado con el desarrollo de leucemias y linfomas de células B, múltiples estudios han demostrado que la alta expresión del ARNm de *BCL2* observada en la

mayoría de los pacientes con LLC (Aviram et al., 2000; Robertson et al., 1996) no depende estrictamente de la translocación t(14;18) (Dyer et al., 1994). Además, este estudio también fue capaz de validar otros dos marcadores independientes ($r^2 > 0,1$) en este mismo gen asociados previamente con la LLC, *BCL2*_{rs4987856} y *BCL2*_{rs4987852} (Berndt et al., 2013b; Law, Berndt, et al., 2017), lo que confirma la importancia del gen *BCL2* en la modulación del riesgo de LLC, pero también las dificultades existentes para descifrar su compleja regulación genómica y su papel en la LLC. Aunque se han propuesto múltiples mecanismos, incluida la hipometilación del promotor (Hanada et al., 1993), la pérdida de expresión de miRNA-15 y miRNA-16 (Cimmino et al., 2005), la sobreexpresión de nucleolina (Otake et al., 2007) o incluso la existencia de un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) 5'-UTR que podría reprimir la expresión del ARNm de *BCL2* (Harigai et al., 1996), el mecanismo que impulsa la expresión de *BCL2* en la LLC sigue siendo desconocido hasta la fecha.

Además de estos nuevos hallazgos, el meta-análisis de las cuatro poblaciones europeas también validó las asociaciones previamente informadas con el riesgo de LLC para cuatro variantes genéticas, las dos previamente comentadas en *BCL2* y *FAS*_{rs1926194} y *BAK1*_{rs210143} (Berndt et al., 2013b, 2016; Law, Berndt, et al., 2017; Speedy et al., 2014b) (Tabla 21), todas ellas permanecían como significativas después de la corrección por comparaciones múltiples.

5.4.1. Análisis estratificado por género de las variantes genéticas asociadas con la autofagia en el riesgo a desarrollar la LLC en la cohorte CRuCIAL

Además del meta-análisis, realizamos un análisis estratificado por género en la población CRuCIAL para evaluar la influencia de posibles diferencias de género en la asociación de variantes genéticas con el riesgo de enfermedad. Para este análisis, se consideraron los modelos de herencia log-aditivo, dominante y recesivo.

Este análisis nos permitió identificar una mayor asociación de la variante genética *CDKN2A*_{rs3731204} en hombres (OR = 0,78, IC95% 0,73-0,84, $p = 1,57 \times 10^{-12}$; Tabla 23), estos resultados sugieren una menor susceptibilidad en los hombres portadores de esta variante. Este resultado contrasta con el análisis en mujeres, en el cual la misma variante

presenta una clara menor asociación con el riesgo a desarrollar LLC (OR = 0,83, IC95% 0,64-1,07, $p = 0,150$; Tabla 23).

Por otro lado, el análisis estratificado mostró que la variable genética $BCL2_{rs12457371}$ presentaba una fuerte asociación en ambos géneros, aunque con un mayor efecto en hombres (OR = 1,49, IC95% 1,12-1,98, $p = 5,77 \times 10^{-3}$ y OR = 1,35, IC95% 1,00-1,80, $p = 4,70 \times 10^{-2}$, respectivamente; Tabla 23 y 24).

El resto de los SNPs analizados no mostraron asociaciones destacables en el análisis estratificado por género, indicando que su efecto no parece estar influenciado por el género en esta cohorte. Es importante señalar que ninguno de los efectos observados mantuvo la significancia estadística tras aplicar el ajuste por comparaciones múltiples. Sin embargo, la diferencia en los efectos observados entre géneros resalta la importancia de analizar las variantes genéticas en subgrupos diferenciados. Este enfoque no solo contribuye a una comprensión más integral de las variantes genéticas en la etiología de la enfermedad, sino que también abre la posibilidad de identificar asociaciones específicas de cada género, proporcionando así información valiosa para el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas más personalizadas.

Tabla 23. Estimaciones de asociación de variantes de riesgo relacionadas con la autofagia para la LLC en la cohorte de hombres de CRuCIAL.

SNP	Chr	Genes	Alelo riesgo	OR (IC95%) ^δ	<i>P</i>	OR (IC95%) [†]	<i>P</i>	OR (IC95%) [‡]	<i>P</i>
rs3731204	9	<i>CDKN2A</i>	C	0,73 (0,58-0,92)	$7,23 \times 10^{-3}$	0,65 (0,50-0,86)	$2,09 \times 10^{-3}$	0,95 (0,47-1,94)	0,888
rs1026825	18	<i>BCL2</i>	G	1,00 (0,85-1,17)	0,961	0,98 (0,76-1,26)	0,870	1,01 (0,76-1,35)	0,921
rs11152374	18	<i>BCL2</i>	A	1,01 (0,82-1,24)	0,941	1,00 (0,79-1,27)	0,999	1,07 (0,59-1,93)	0,931
rs12457371	18	<i>BCL2</i>	G	1,01 (0,79-1,30)	0,951	0,67 (0,38-1,20)	0,179	1,15 (0,83-1,60)	0,390
rs4940571	18	<i>BCL2</i>	G	1,49 (1,12-1,98)	$5,77 \times 10^{-3}$	1,61 (1,17-2,20)	$3,13 \times 10^{-3}$	1,22 (0,41-3,59)	0,721
rs7236090	18	<i>BCL2</i>	C	1,06 (0,90-1,26)	0,479	1,10 (0,80-1,51)	0,563	1,07 (0,84-1,37)	0,560
rs12718945	7	<i>EGFR</i>	G	1,29 (0,96-1,33)	0,148	1,09 (0,82-1,45)	0,554	1,25 (0,97-1,64)	0,089
rs11839271	13	<i>LPAR6 RBI</i>	T	1,07 (0,84-1,38)	0,584	1,16 (0,66-2,04)	0,605	1,07 (0,77-1,49)	0,675
rs6829366	4	<i>NAFI</i>	T	1,29 (1,06-1,59)	0,013	1,39 (0,79-2,45)	0,255	1,36 (1,07-1,73)	0,013
rs143052840	3	<i>PRKCD</i>	A	0,77 (0,52-1,14)	0,194	0,76 (0,49-1,19)	0,233	0,54 (0,13-2,26)	0,396
rs6910366	6	<i>TFEB</i>	G	1,14 (0,81-1,61)	0,439	1,20 (0,82-1,77)	0,352	0,92 (0,30-2,84)	0,880

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, *Odd Ratio*; NA, No Aplica. Resultados significativos en negrita ($p < 0,05$). δ Análisis de regresión logística asumiendo un modelo de herencia log-aditivo. \ddagger Análisis de regresión logística asumiendo un modelo de herencia dominante. \yen Análisis de regresión logística asumiendo un modelo de herencia recesivo.

Tabla 24. Estimaciones de asociación de variantes de riesgo relacionadas con la autofagia para la LLC en la cohorte de mujeres de CRuCIAL.

SNP	Chr	Genes	Alelo riesgo	OR (IC95%) δ	P	OR (IC95%) \ddagger	P	OR (IC95%) \yen	P
rs3731204	9	<i>CDKN2A</i>	C	0,83 (0,64-1,07)	0,150	0,86 (0,64-1,15)	0,308	0,41 (0,15-1,12)	0,082
rs1026825	18	<i>BCL2</i>	G	1,16 (0,97-1,38)	0,103	1,11 (0,85-1,46)	0,441	1,35 (1,00-1,81)	0,049
rs11152374	18	<i>BCL2</i>	A	0,94 (0,75-1,19)	0,626	0,89 (0,68-1,16)	0,388	1,29 (0,67-2,51)	0,449
rs12457371	18	<i>BCL2</i>	G	0,82 (0,66-1,02)	0,076	0,83 (0,51-1,36)	0,461	0,76 (0,57-1,01)	0,059
rs4940571	18	<i>BCL2</i>	G	1,35 (1,00-1,80)	$4,70 \times 10^{-2}$	1,34 (0,98-1,83)	$7,10 \times 10^{-2}$	2,46 (0,66-9,17)	0,181
rs7236090	18	<i>BCL2</i>	C	0,91 (0,77-1,09)	0,313	0,76 (0,55-1,05)	0,093	0,98 (0,76-1,27)	0,875
rs12718945	7	<i>EGFR</i>	G	0,92 (0,77-1,09)	0,328	0,81 (0,60-1,09)	0,172	0,96 (0,73-1,26)	0,770
rs11839271	13	<i>LPAR6 RBI</i>	T	1,21 (0,97-1,51)	0,091	1,08 (0,66-1,78)	0,756	1,34 (1,01-1,78)	0,044
rs6829366	4	<i>NAF1</i>	T	1,00 (0,80-1,23)	0,952	0,97 (0,55-1,71)	0,908	1,00 (0,77-1,30)	0,984
rs143052840	3	<i>PRKCD</i>	A	0,85 (0,58-1,24)	0,405	0,86 (0,58-1,27)	0,455	NA	NA
rs6910366	6	<i>TFEB</i>	G	1,00 (0,74-1,35)	0,998	1,04 (0,74-1,48)	0,807	0,72 (0,27-1,92)	0,513

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; OR, *Odd Ratio*; NA, No Aplica. Resultados significativos en negrita ($p < 0,05$). δ Análisis de regresión logística asumiendo un modelo de herencia log-aditivo. \ddagger Análisis de regresión logística asumiendo un modelo de herencia dominante. \yen Análisis de regresión logística asumiendo un modelo de herencia recesivo.

5.5. Análisis de asociación de las variantes relacionadas con la autofagia en la supervivencia global y la progresión de los pacientes de LLC en la cohorte CRuCIAL

Dado el papel central de la autofagia en la regulación de la supervivencia celular y la respuesta al estrés, la identificación de variantes genéticas que puedan influir en la determinación de la SG de los pacientes y el THPT resulta clave para comprender mejor los mecanismos de progresión de la LLC. Por ello, investigamos si los SNPs relacionados con la autofagia podrían influir en la SG de los pacientes con LLC y en el THPT en la

cohorte CRuCIAL. Las características clínicas y demográficas de los pacientes de esta cohorte de replicación han sido previamente descritas en la Tabla 13. Los pacientes incluidos en el análisis de SG tenían una edad media de 68,18 años y la proporción hombre/mujer fue de 1,56 (713/457). Los pacientes incluidos en el análisis de THPT presentaban una ratio idéntica de hombre/mujer de 1,56 (318/204), pero fueron ligeramente mayores, con una edad media de 64,95 años. Estos datos demográficos están en consonancia con las distribuciones de edad y género observadas a nivel mundial y en el momento del diagnóstico para esta patología (Bray et al., 2024; CALL et al., 1994; Noone, 2018). La mediana del tiempo de seguimiento para el análisis de SG fue de 89,53 meses, con un número total de pacientes fallecidos en este grupo de 289. Para el THPT, la mediana del tiempo de seguimiento fue de 1.286,01 días, con un número total de pacientes fallecidos en este grupo de 126. No existió ninguna variación significativa en las estadísticas de seguimiento para los pacientes fallecidos, ni entre los resultados clínicos estratificados por el país de origen, lo que evitó posibles sesgos relacionados con el reclutamiento multicéntrico y aleatorizado de pacientes (Tabla 13).

En los análisis realizados, se observó únicamente una modesta asociación del SNP *TFEB*_{rs6910366} con una mayor SG (HR = 0,70, IC95% 0,52-0,94, $p = 0,016$; Tabla 25) y del SNP *BCL2*_{rs4940571} con un menor THPT (HR = 1,43, IC95% 1,01-2,04, $p = 0,046$; Tabla 25), No obstante, ninguna de estas asociaciones se mantuvo significativa tras la corrección por comparaciones múltiples, lo que sugiere que las variantes relacionadas con la autofagia no ejercen un fuerte efecto sobre la SG o el THPT en los pacientes con LLC. Aunque un estudio previo sugirió que una variante en el promotor del gen *BCL2* mostraba una débil asociación con la progresión de la enfermedad (Nüchel et al., 2007), estos hallazgos no pudieron ser replicados en estudios posteriores (Zenz et al., 2009). Esta falta de consistencia entre los resultados refuerza la hipótesis de un efecto nulo de las variantes genéticas de autofagia sobre la SG y la progresión de la LLC, confirmando los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo y que forman parte de esta tesis (Anexo I) (Cabrera-Serrano et al., 2023).

Tabla 25. Estimaciones de asociación de variantes relacionadas con la autofagia con la SG y el tiempo de THPT en la cohorte CRuCIAL.

SNP	Chr	Genes	Alelo riesgo	Supervivencia general (N = 1.170 casos de LLC)		Tiempo hasta el primer tratamiento (N = 522 casos de LLC)	
				HR (IC95%)	p	HR (IC95%)	p
rs9944895	18	<i>BCL2</i>	C	0,96 (0,79-1,16)	0,687	0,99 (0,76-1,31)	0,959
rs1026825	18	<i>BCL2</i>	G	0,89 (0,75-1,06)	0,202	1,07 (0,83-1,39)	0,604
rs7236090	18	<i>BCL2</i>	C	0,88 (0,74-1,04)	0,138	0,99 (0,77-1,28)	0,952
rs4940571	18	<i>BCL2</i>	G	1,11 (0,85-1,44)	0,445	1,43 (1,01-2,04)	0,046
rs11152374	18	<i>BCL2</i>	A	0,93 (0,75-1,14)	0,479	0,91 (0,64-1,30)	0,621
rs12457371	18	<i>BCL2</i>	G	1,01 (0,83-1,22)	0,946	1,17 (0,77-1,35)	0,906
rs3731204	9	<i>CDKN2A</i>	C	0,97 (0,75-1,25)	0,806	0,85 (0,57-1,27)	0,438
rs12718945	7	<i>EGFR</i>	G	1,02 (0,86-1,19)	0,853	1,00 (0,78-1,20)	0,993
rs11839271	13	<i>LPAR6, RBI</i>	T	1,01 (0,84-1,22)	0,880	0,91 (0,68-1,21)	0,499
rs6829366	4	<i>NAFI</i>	T	1,04 (0,84-1,28)	0,749	0,92 (0,66-1,28)	0,616
rs143052840	3	<i>PRKCD</i>	A	1,12 (0,78-1,60)	0,531	1,36 (0,83-2,23)	0,222
rs6910366	6	<i>TFEB</i>	G	0,70 (0,52-0,94)	0,016	0,83 (0,54-1,27)	0,394

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; HR, Hazard ratio. Estimaciones de asociación calculadas según un modelo log-aditivo de herencia y ajustadas por edad, sexo y país de origen, Resultados significativos en negrita ($p < 0,05$).

5.6. Impacto de las variantes relacionadas con la autofagia en el flujo de autofagia

El impacto funcional de las variantes genéticas en genes de la autofagia sobre el flujo de autofagia se llevó a cabo en una población de 68 donantes sanos de ascendencia europea. Como hemos visto, la autofagia, es un proceso celular crucial para el mantenimiento de la homeostasis, es regulada por una serie de genes clave, cuyas alteraciones pueden tener consecuencias directas sobre la supervivencia celular y la progresión de la enfermedad. En este apartado, se analizan los efectos de las variantes genéticas previamente identificadas en la modulación del flujo de autofagia, con el objetivo de dilucidar su papel

en el contexto de la LLC y su posible relación con los mecanismos de resistencia al tratamiento.

Los análisis funcionales realizados no revelaron un impacto significativo de los SNPs estudiados sobre el flujo autofágico a un nivel de $p > 0,006$ (Tabla 26),

Tabla 26. Correlación de los SNP relacionados con la autofagia y el flujo de autofagia.

SNP	Gen	Alelo riesgo	Análisis	beta	se	p value
rs1026825	<i>BCL2</i>	G	LC3_synthesis	-0.0550	0.0370	0.1400
			LC3_degradation	0.0060	0.0460	0.9040
			%_LC3_II_levels	-0.0005	0.0004	0.1400
			p62_synthesis	-0.0340	0.1330	0.7990
			p62_accumulation	-0.0070	0.0360	0.8530
			%_p62_levels	-0.0003	0.0010	0.7990
rs3731204	<i>CDKN2A</i>	C	LC3_synthesis	0.0200	0.0270	0.4620
			LC3_degradation	-0.0211	0.0270	0.4440
			%_LC3_II_levels	0.0002	0.0003	0.4620
			p62_synthesis	0.0196	0.0510	0.7030
			p62_accumulation	-0.0073	0.0273	0.7910
			%_p62_levels	0.0002	0.0005	0.7030
rs4940571	<i>BCL2</i>	G	LC3_synthesis	-0.0570	0.0300	0.0650
			LC3_degradation	-0.0422	0.0290	0.1640
			%_LC3_II_levels	-0.0006	0.0003	0.0650
			p62_synthesis	0.1093	0.0529	0.0430
			p62_accumulation	-0.0259	0.0290	0.3770
			%_p62_levels	0.0011	0.0005	0.0430
rs12457371	<i>BCL2</i>	G	LC3_synthesis	0.0810	0.0620	0.1990
			LC3_degradation	-0.0128	0.0410	0.7570
			%_LC3_II_levels	0.0008	0.0006	0.1990
			p62_synthesis	-0.1220	0.0699	0.0880
			p62_accumulation	0.0374	0.0379	0.3290
			%_p62_levels	-0.0012	0.0007	0.0880

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; se, estándar error. Resultados significativos en negrita ($p < 0,05$).

Estos resultados sugieren que el efecto de las variantes genéticas de la autofagia sobre el riesgo de desarrollar LLC no está directamente mediado por control sobre el flujo autofágico. No obstante, la ausencia de efectos detectables podría reflejar limitaciones en el tamaño muestral o en la sensibilidad del modelo experimental empleado. En consecuencia, será necesario llevar a cabo estudios adicionales con cohortes amplias de

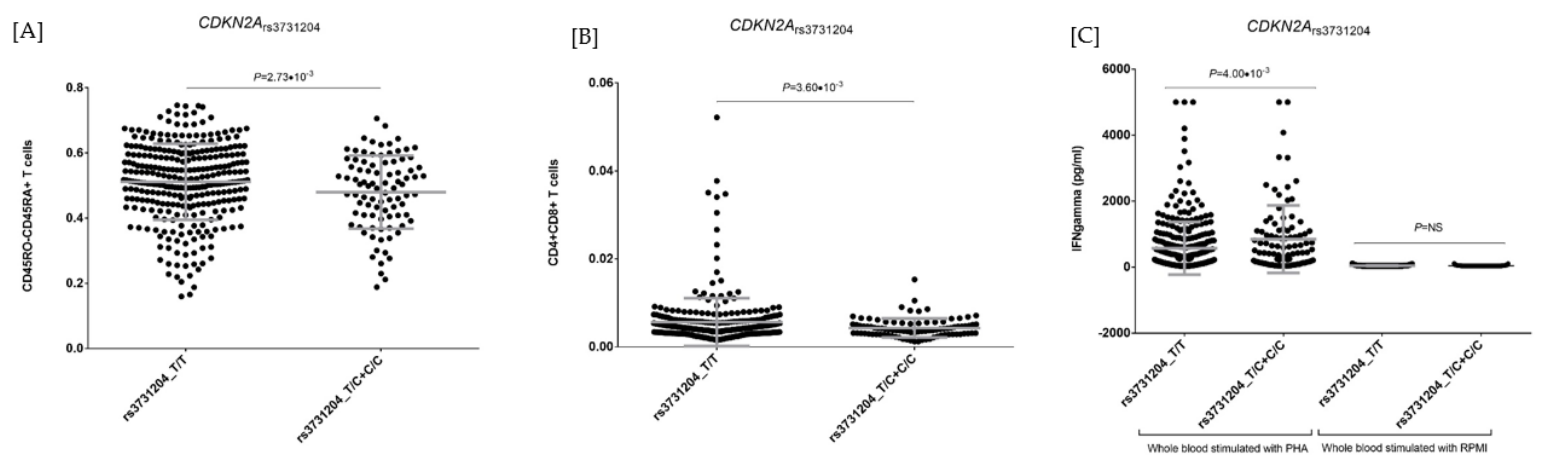
pacientes con LLC para validar y confirmar estos hallazgos. Además, será necesario realizar estudios adicionales para explorar mecanismos alternativos mediante los cuales estas variantes podrían influir en la LLC.

5.7. Análisis funcionales de las variantes relacionadas con la autofagia

El análisis funcional de las variantes genéticas relacionadas con la autofagia (nuevas y validadas) se realizó utilizando una combinación de enfoques experimentales en la población del HFGP y herramientas *in silico* descritas previamente en la sección de métodos.

Los experimentos funcionales en la población del HFGP revelaron, por primera vez, una correlación del alelo protector $CDKN2A_{rs3731204C}$ con una disminución de los números absolutos de células T efectoras $CD45RO^-CD45RA^+$ y células T $CD4^+CD8^+$ ($p = 0,0027$ y $p = 0,0036$; respectivamente, Figura 17A y B). Por otro lado, encontramos también que los portadores del alelo protector $CDKN2A_{rs3731204C}$ tenían mayores niveles de $IFN\gamma$ después de la estimulación de sangre completa con PHA ($p = 0,0040$; Figura 17C), lo que sugiere un papel funcional de este SNP en el riesgo de LLC a través de la modulación de los niveles de proteína $CDKN2A$ y subconjuntos específicos de células inmunes.

Figura 17. Correlación del SNP $CDKN2A_{rs3731204}$ con números absolutos de subconjuntos específicos de células T y niveles de $IFN\gamma$ tras de la estimulación *in vitro* de sangre completa con PHA.



Abreviaturas: NS, No significativo; PHA, Fitohemaglutinina; WB, Sangre total.

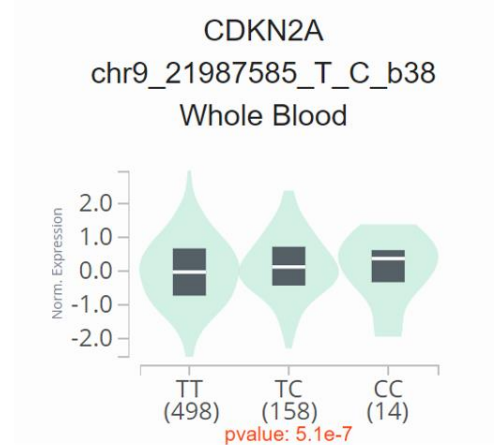
En línea con la disminución de células T CD45RO⁻CD45RA⁺ de los portadores del alelo protector *CDKN2A*_{rs3731204C} en la población del HFGP (Figura 17A), se ha descrito que estas células están enriquecidas en pacientes con LLC en estadios avanzados de Rai (III o IV) en comparación con estadios tempranos (0-II) (Peller & Kaufman, 1991). Además, se ha demostrado que estas células tienen características de falta de respuesta a la coestimulación con antígenos tumorales, lo que podría facilitar el inicio y desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, las células T efectoras CD45RO⁻CD45RA⁺, que hemos encontrado disminuidos niveles de en los portadores del alelo *CDKN2A*_{rs3731204C} (Figura 17B), son un tipo de células T que se encuentran con mayor frecuencia en pacientes con LLC con una enfermedad activa (Palma et al., 2017). Un estudio reciente además sugiere que este tipo de células están implicadas en la progresión de la LLC (Valvano et al., 2023), sugiriendo un papel potencial de *CDKN2A* en la progresión de la enfermedad, posiblemente a través de la regulación específica de estos tipos celulares. Por otro lado, los análisis funcionales también mostraron que los portadores del alelo protector *CDKN2A*_{rs3731204C} tenían mayores niveles de IFN γ después de la estimulación de sangre completa con PHA. El IFN γ es una citocina producida principalmente por células del sistema inmunológico, con un importante papel en la regulación de la respuesta inmunitaria y su capacidad para modular la actividad de las células inmunes implicadas en la vigilancia tumoral. Así pues, unos mayores niveles de IFN γ podrían influir en la progresión de la enfermedad y en la interacción entre las células tumorales y el microambiente. En particular, la disfunción de la vía del IFN γ contribuye a una disminución en la producción de esta citocina, lo que resulta en una menor activación de los macrófagos y una alteración de la respuesta inmunitaria frente a las células tumorales en LLC (Scrivener et al., 2003), que a su vez han demostrado su capacidad de inducir un estado inmunosupresor en el microambiente tumoral, limitando la eficacia de las respuestas mediadas por IFN γ (A. G. Ramsay et al., 2008a).

Todos estos resultados funcionales respaldan los datos obtenidos mediante el análisis funcional *in silico* con CADD, FORGEDb y RegulomeDB (Tabla suplementaria 4, Anexo II).

Según los resultados *in silico* obtenidos de GTEX, el alelo protector *CDKN2A*_{rs3731204C} está fuertemente asociado con unos niveles elevados de expresión de ARNm del gen *CDKN2A* en sangre completa ($p = 5,1 \times 10^{-7}$; Figura 18). Estos hallazgos concuerdan con

resultados previos que sugirieron que la pérdida de la función de *CDKN2A* podría contribuir a la desregulación de la autofagia en modelos animales (Budina-Kolomets et al., 2013), al desarrollo de cáncer a través de la inactivación de la desestabilización de la proteína p53 que aumenta las tasas de división celular y a la inhibición de la apoptosis mediada por p53. En línea con esta hipótesis, los datos de QTLbase y Haploreg mostraron que el SNP *CDKN2A*_{rs3731204} se asocia con hQTL (por sus siglas en inglés) en Monocitos CD14⁺ y Neutrófilos CD16⁺ ($p = 0,00746$ y $p = 0,00813$, respectivamente), y se localiza en las marcas de histonas (H3K4me1 y H3K4me3) en múltiples tipos de células inmunes. Además, este marcador genético altera los sitios de unión para factores de transcripción clave como DMRT1-7, HDAC2, FOXD3 y Evi-1, que desempeñan papeles importantes en la represión epigenética (S. S. Chen et al., 2009), la estructura de la cromatina y la regulación transcripcional, la progresión del ciclo celular, el desarrollo (Arai et al., 2011) y la progresión de la LLC (Van Damme et al., 2012; Vasyutina et al., 2015).

Figura 18. Resultados funcionales *in silico* de expresión génica derivados del análisis de *expression quantitative trait loci* (eQTLs) de *CDKN2A*_{rs3731204} utilizando datos obtenidos de GTEx Portal.



Estos resultados se pueden sumar a los de estudios previos que han descrito que el gen *CDKN2A* da forma a las respuestas inmunitarias mediadas por células T y macrófagos en diferentes tipos de cáncer (Y. Dong et al., 2023; Zhao et al., 2013; Zhu et al., 2021) e incluso puede participar en la modulación de la respuesta a ciertos protocolos de inmunoterapia (Adib et al., 2021; Gutiontov et al., 2021). Considerando que no encontramos una asociación significativa entre el SNP *CDKN2A*_{rs3731204} y los niveles de flujo de autofagia, en conjunto estos resultados sugieren que este SNP influye en el riesgo

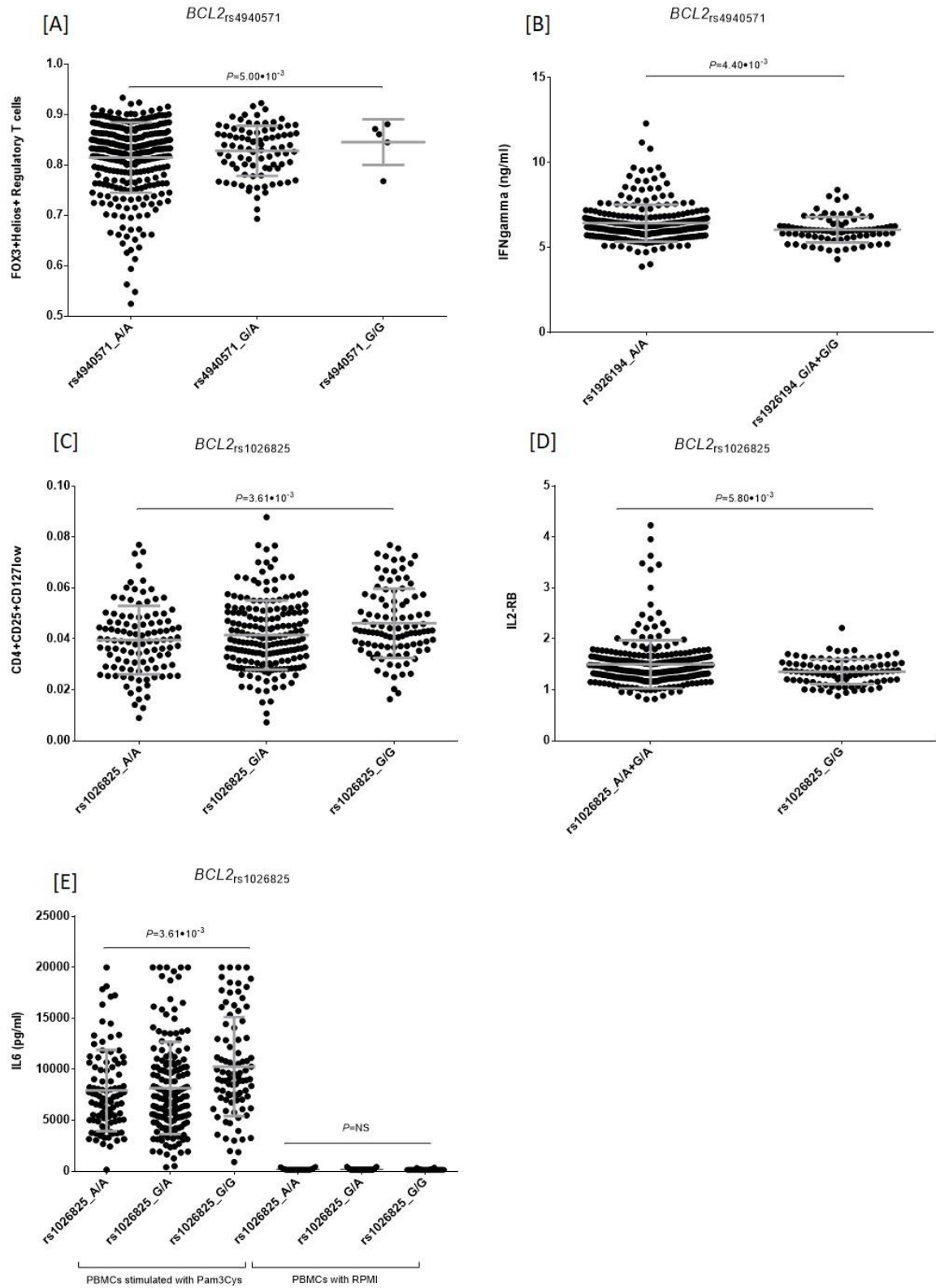
de LLC a través de la modulación del número de ciertos subconjuntos específicos de células T.

Nuestros análisis funcionales además mostraron, por primera vez, que los portadores del alelo de riesgo *BCL2*_{rs4940571G} se asociaba con un incremento en el número absoluto de células T reguladoras FOXP3⁺Helios⁺ ($p = 0,005$; Figura 19A) y una disminución de los niveles circulantes de IFN γ ($p = 0,0044$; Figura 19B). Las células T reguladoras FOXP3⁺Helios⁺ están involucradas en la supresión de la actividad antitumoral de múltiples tipos de células inmunes, incluyendo células T efectoras y reguladoras, células B, células NK, células NKT, monocitos y células dendríticas. Se han descrito varias características supresoras para estas células T reguladoras, incluyendo una mayor producción de citocinas antiinflamatorias, una mayor liberación de perforinas y granzimas, una alta expresión de PD-1, CTLA-4 y LAG3 o interferencias en el metabolismo a través de la privación de IL2 (C. Li et al., 2020; Schmidt et al., 2012). Además, la disminución de los niveles circulantes de IFN γ , una citocquina que activa la función de los macrófagos y las células T citotóxicas, por el alelo de riesgo *BCL2*_{rs4940571G} va en línea con los resultados anteriormente descritos para el SNP *CDKN2A*_{rs3731204}, a los que cabe añadir que estudios recientes en la LLC han demostrado que esta esta citoquina está involucrada en la modulación de la resistencia a la apoptosis (Bauvois et al., 2021) y la supervivencia de la LLC (Bauvois et al., 2021; Y. Chen et al., 2023), pero también la respuesta a los fármacos utilizados para tratar a los pacientes con LLC (Shao et al., 2023).

Los análisis funcionales del HFGP en el otro SNP en este *locus* identificaron por primera vez que los portadores del alelo de riesgo *BCL2*_{rs1026825G} se asociaban con un incremento del número absoluto de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺CD127^{low} ($p = 0,0036$, Figura 19C), una disminución de las concentraciones circulantes de IL2RB ($p = 0,0058$, Figura 19D) y una mayor producción de IL6 después de la estimulación *in vitro* de PBMCs con Pam3Cys ($p = 0,0036$; Figura 19E). En primer lugar, las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺CD127^{low} aumentan con la edad (Gregg et al., 2005) y parecen estar presentes en una mayor proporción en pacientes de LLC (D'Arena et al., 2011). Su función principal es contribuir a la inmunosupresión que permite a las células afectadas evadir la detección y eliminación por parte del sistema inmunológico, facilitando la progresión de la enfermedad (D'Arena et al., 2011). Por este motivo, la presencia de estas células se ha asociado con una mayor carga tumoral, la capacidad de las células de LLC

para resistir la apoptosis (Beyer & Schultze, 2006) y con una función reguladora y proliferativa específica en humanos (Baecher-Allan et al., 2001, 2004). Con respecto a la correlación del SNP *BCL2*_{rs1026825} con menores concentraciones circulantes de IL2RB, el receptor beta de interleucina 2, resulta plausible sugerir que este SNP pueda tener un papel clave en la activación y proliferación de células T y células NK, ya que la expresión elevada de IL2RB en las células T de pacientes con LLC se ha vinculado a un aumento en la actividad inmunosupresora de estas células, promoviendo la progresión de la enfermedad y un peor pronóstico (Beyer & Schultze, 2006; A. G. Ramsay et al., 2008b). Finalmente, la correlación del alelo *BCL2*_{rs1026825G} con una mayor producción de IL6 resulta relevante ya que la presencia de IL6 se ha asociado con una mayor carga tumoral y con la resistencia al tratamiento en pacientes con LLC (Burger & Gribben, 2014). Asimismo, se ha demostrado que la interacción entre las células B afectadas y el microambiente tumoral está, al menos en parte, mediada por la IL6 que, promueve la resistencia a la apoptosis y facilita una supervivencia prolongada de las células tumorales (Burger, 2011; Caligaris-Cappio & Ghia, 2007).

Figura 19. Correlación de los SNP $BCL2_{rs4940571}$ y $BCL2_{rs1026825}$ con números absolutos de subconjuntos específicos de células T y células T reguladoras, concentraciones circulantes de proteínas inflamatorias (IFN γ e IL2RB) y niveles de IL6 después de la estimulación de PBMC con Pam3Cys.



Los análisis funcionales *in silico* también mostraron que los SNPs *BCL2*_{rs4940571} y *BCL2*_{rs1026825} se mapean en numerosas marcas de histonas, en QTL y que influyen en los estados de la cromatina en las células sanguíneas (Tabla suplementaria 4, Anexo II). Además, el análisis QTL mediante QTLbase mostró que el SNP *BCL2*_{rs1026825} está fuertemente asociado con un *locus* de rasgo cuantitativo de accesibilidad de la cromatina (caQTL) en los linfocitos ($p = 4,15 \times 10^{-7}$), lo que sugiere una implicación de este marcador en la regulación de la accesibilidad de los factores de transcripción a la cromatina y la transcripción, lo cual se propuso desempeñan un papel en el desarrollo de la LLC a través de la supervivencia y agresividad de las células B afectadas (Friedman et al., 2016; Maffei et al., 2013). Estos resultados, junto con los que muestran que el SNP *BCL2*_{rs4940571} altera los sitios de unión para BDP1, un factor de transcripción involucrado en la transcripción de la ARN polimerasa III que se ha asociado recientemente con el desarrollo del cáncer (Son et al., 2020) y la progresión tumoral en cánceres sólidos (Cabarcas-Petroski & Schramm, 2022), sugieren que estos SNPs podrían modular el riesgo de LLC a través tanto de mecanismos inmunológicos como no inmunológicos.

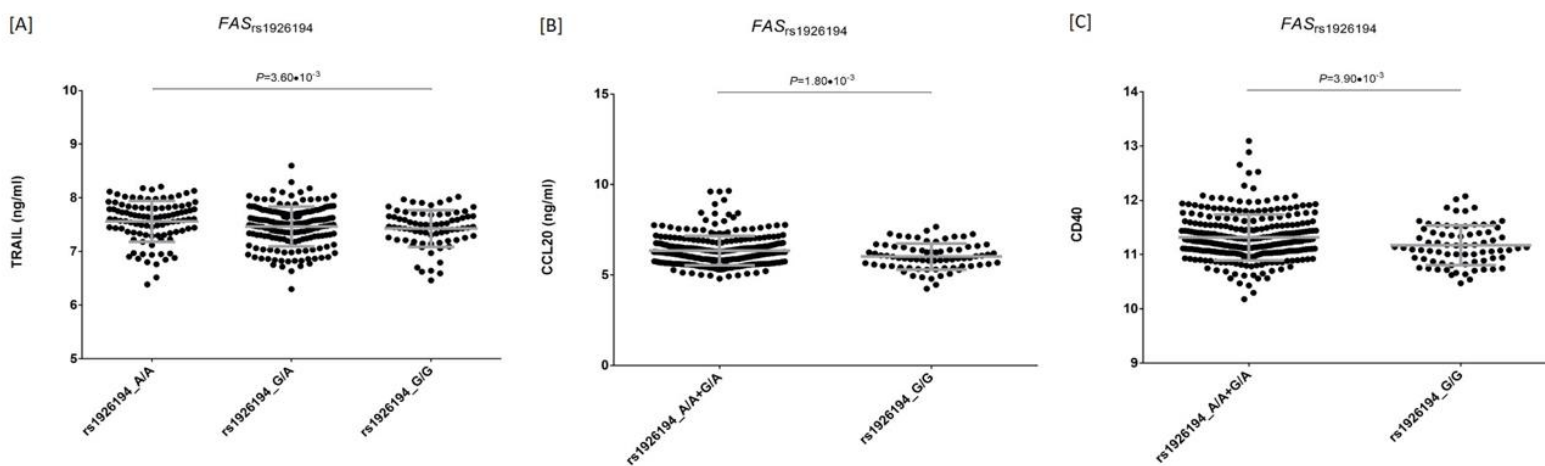
En definitiva, aunque ninguno de los hallazgos funcionales realizados en la cohorte HFGP fue significativo tras de la corrección por comparaciones múltiples, estos resultados sugieren que los SNPs *BCL2*_{rs4940571} y *BCL2*_{rs1026825} podrían influir en el riesgo de LLC a través de la modulación del número de células T reguladoras, la respuesta inmunitaria mediadas por distintas citoquinas e interleucinas, las marcas epigenéticas y los cambios en la accesibilidad de la cromatina.

Finalmente, el análisis funcional en el HFGP de los *hits* de GWAS que fueron validados en este estudio, demostró que los portadores sanos del alelo de riesgo *FAS*_{rs1926194A} tenían una mayor concentración circulante de TRAIL, CCL20 y CD40 ($p = 0,0036$, $p = 0,0018$ y $p = 0,0039$; Figura 20A-C). TRAIL es una citocina que pertenece a la familia de los factores de necrosis tumoral y tiene principalmente un papel importante en la inducción de la apoptosis en células tumorales a través de la modulación de la respuesta inmune (Aggarwal et al., 2012; Dostert et al., 2019). En el contexto de la LLC, se ha observado que las células B malignas pueden evadir la apoptosis inducida por TRAIL, contribuyendo a su supervivencia y resistencia al tratamiento (Dicker et al., 2005; MacFarlane et al., 2002, 2005). Además, su expresión aberrante en la LLC promueve la supervivencia celular (Secchiero et al., 2005). Por otro lado, CCL20 es una quimioquina

implicada en la migración y proliferación de células B y aunque actualmente no se ha asociado con la LLC, otras quemoquinas similares como CCL19 y CCL21 se han asociado con un peor pronóstico en pacientes con LLC. El efecto sobre la supervivencia parece estar mediado por la interacción entre las células tumorales y el microambiente, lo que promueve la supervivencia de las células tumorales y la resistencia a la apoptosis (Cuesta-Mateos et al., 2010). Por último, CD40 es una molécula de coestimulación que juega un papel importante en la activación de células B y la respuesta inmune. Está asociada a la proliferación y supervivencia de las células B afectadas, pudiendo inducir la producción de citocinas, como TRAIL (Dicker et al., 2005), que promueven un ambiente proinflamatorio y contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Ferrer et al., 2014; Ringelstein-Harlev et al., 2018).

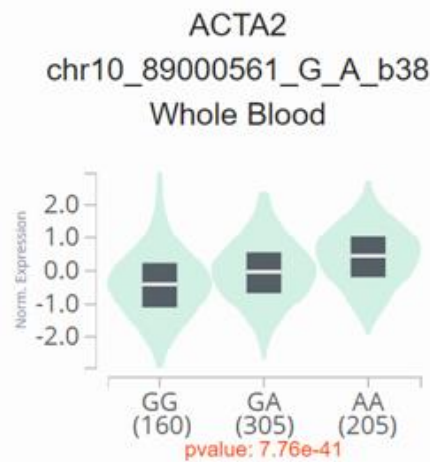
A pesar de que ninguno de estos resultados funcionales siguió era significativo tras la corrección por comparaciones múltiples, estos hallazgos sugirieron que esta variante genética podría modular el riesgo a desarrollar la LLC a través de mecanismos inmunológicos.

Figura 20. Correlación del SNP $FAS_{rs1926194}$ con las concentraciones circulantes de TRAIL, CCL20 y CD40.



Los resultados funcionales *in silico* obtenidos de GTEx y QTLbase, mostraron además que el alelo de riesgo $FAS_{rs1926194A}$ está fuertemente asociado con los niveles de expresión de ARNm de *ACTA2* en sangre completa y linfocitos ($p = 7,8 \times 10^{-41}$ y $p = 1,58 \times 10^{-21}$, respectivamente; Figura 21 y Tabla suplementaria 4, Anexo II). Esta fuerte correlación sugiere que este SNP podría influir sobre el riesgo de LLC a través de la modulación de la expresión génica de *ACTA2*, un *locus* de susceptibilidad bien conocido para la LLC.

Figura 21. Resultados funcionales *in silico* de expresión génica derivados del análisis de *expression quantitative trait loci* (eQTLs) de $FAS_{rs1926194}$ utilizando datos obtenidos de GTEx Portal.



Dado que no se encontraron resultados potencialmente significativos del SNP $BCL2_{rs12457371}$, será necesario seguir investigando la función biológica de este marcador que hemos descrito por primera vez como asociado con el riesgo a desarrollar LLC. De manera similar, serán necesarios estudios adicionales para arrojar algo de luz sobre la función biológica de los SNPs $BCL2_{rs4987856}$, $BCL2_{rs4987852}$ y $BAKI_{rs210143}$ cuya asociación hemos podido validar en este estudio.

A pesar de que los hallazgos funcionales no alcanzaron significancia tras la corrección por múltiples pruebas, sugieren que las variantes genéticas analizadas podrían tener un impacto en el riesgo y la progresión de la LLC a través de mecanismos que involucran la modulación de la respuesta inmunitaria, la regulación epigenética y cambios en la accesibilidad de la cromatina. Estos resultados abren nuevas vías para explorar la relación entre la genética y la inmunología en el contexto de la LLC, lo que podría contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas en el futuro.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se presentan los resultados de dos estudios clave sobre la influencia de variantes genéticas en la leucemia linfocítica crónica (LLC).

Aunque el primer estudio representa el análisis más grande hasta la fecha sobre el efecto de las variantes genéticas de susceptibilidad identificadas mediante estudios de asociación del genoma completo en la supervivencia global de los pacientes con LLC, nuestros hallazgos sugieren que estas variantes no tienen un impacto sustancial significativo en la supervivencia general. Además, se confirma el efecto nulo de estas variantes genéticas en el THPT, reafirmando los resultados de investigaciones previas. Curiosamente, los SNPs *CASP8*_{rs3769825}, *MYNN*_{rs10936599}, *PRKD2*_{rs11083846} y *TERC*_{rs12638862} mostraron una asociación en común tanto con la supervivencia global como con la progresión de la enfermedad en la cohorte CRuCIAL, aunque no fueron significativamente asociadas tras la corrección por pruebas múltiples, permaneciendo solo bajo un nivel nominal de $p < 0,05$. Estos resultados sugieren que estas variantes podrían tener un papel potencial en la evolución de la LLC, lo que justifica estudios adicionales para confirmar su relevancia.

En el segundo estudio, se logró identificar por primera vez a *CDKN2A* como un nuevo *locus* de susceptibilidad para la LLC a través del SNP *CDKN2A*_{rs3731204}. Además, se descubrieron nuevas variantes de susceptibilidad en el gen *BCL2* (*BCL2*_{rs1026825}, *BCL2*_{rs12457371} y *BCL2*_{rs4940571}) y se confirmaron las asociaciones previamente descritas en los genes *BCL2*, *FAS* y *BAK1* con el riesgo de desarrollar LLC. Los datos funcionales obtenidos sugieren que el efecto de los *loci* *CDKN2A*, *BCL2* y *FAS* en el riesgo de LLC está mediado por variantes genéticas que regulan la expresión de ARNm de *CDKN2A* y *ACTA2*, y modulan las respuestas inmunitarias del huésped.

Aunque ninguno de los SNPs analizados mostró correlación con los niveles de flujo autofágico, este estudio también reveló que las variantes relacionadas con la autofagia no parecen desempeñar un papel relevante en la progresión de la enfermedad ni en la supervivencia de los pacientes. Estos resultados, sin embargo, requieren confirmación en poblaciones independientes para consolidar su validez y aplicabilidad clínica.

En definitiva, estos estudios contribuyen significativamente al conocimiento de los mecanismos genéticos subyacentes en la LLC y ofrecen nuevas perspectivas para futuras

investigaciones orientadas al desarrollo de estrategias terapéuticas personalizadas basadas en el perfil genético de los pacientes.

6. CONCLUSIONS

In this thesis, we present the results of two key studies on the influence of genetic variants in chronic lymphocytic leukemia (CLL).

Although the first study represents the largest analysis to date on the effect of susceptibility genetic variants identified through genome-wide association studies (GWAS) on the overall survival of CLL patients, our findings suggest that these variants do not have a significant impact on overall survival. Furthermore, the null effect of these genetic variants on the time to first treatment is confirmed, reaffirming the results of previous research. Interestingly, the SNPs *CASP8*_{rs3769825}, *MYNN*_{rs10936599}, *PRKD2*_{rs11083846} and *TERC*_{rs12638862} showed a common association with both overall survival and disease progression in the CRuCIAL cohort; however, they were not significantly associated after correction for multiple testing, remaining only under a nominal *p*-value level of < 0.05. These results suggest that these variants could potentially play a role in the evolution of CLL, justifying further studies to confirm their relevance.

In the second study, *CDKN2A* was identified for the first time as a new susceptibility *locus* for CLL through the SNP *CDKN2A*_{rs3731204}. Additionally, new susceptibility variants in the *BCL2* gene (*BCL2*_{rs1026825}, *BCL2*_{rs12457371} y *BCL2*_{rs4940571}) were discovered, and previously described associations in the *BCL2*, *FAS*, and *BAK1* genes with the risk of developing CLL were confirmed. The functional data obtained suggest that the effect of the *CDKN2A*, *BCL2*, and *FAS* *loci* on the risk of CLL is mediated by genetic variants that regulate the mRNA expression of *CDKN2A* and *ACTA2* and modulate the host's immune responses.

Although none of the analyzed SNPs showed correlation with autophagic flux levels, this study also revealed that variants related to autophagy do not seem to play a significant role in disease progression or patient survival. However, these results require confirmation in independent populations to consolidate their validity and clinical applicability.

In summary, these studies contribute significantly to enhance our understanding of the underlying genetic mechanisms in CLL and offer new perspectives for future research aimed at developing personalized therapeutic strategies based on patients' genetic profiles.

7, BIBLIOGRAFIA

- Adib, E., Nassar, A. H., Akl, E. W., Alaiwi, S. A., Nuzzo, P. V., Mouhieddine, T. H., Sonpavde, G., Haddad, R. I., Mouw, K. W., Giannakis, M., Hodi, F. S., Shukla, S. A., Gusev, A., Braun, D. A., Choueiri, T. K., & Kwiatkowski, D. J. (2021). CDKN2A Alterations and Response to Immunotherapy in Solid Tumors. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 27(14), 4025–4035. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0575>
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119(3), 651–665. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-04-325225>
- Aguirre-Gamboa, R., Joosten, I., Urbano, P. C. M., van der Molen, R. G., van Rijssen, E., van Cranenbroek, B., Oosting, M., Smeeckens, S., Jaeger, M., Zorro, M., Withoff, S., van Herwaarden, A. E., Sweep, F. C. G. J., Netea, R. T., Swertz, M. A., Franke, L., Xavier, R. J., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., ... Koenen, H. J. P. M. (2016). Differential Effects of Environmental and Genetic Factors on T and B Cell Immune Traits. *Cell Reports*, 17(9), 2474–2487. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.10.053>
- Ahn, I. E., Tian, X., Ipe, D., Cheng, M., Albitar, M., Tsao, L. C., Zhang, L., Ma, W., Herman, S. E. M., Gaglione, E. M., Soto, S., Dean, J. P., & Wiestner, A. (2021). Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With Ibrutinib: Development and Validation of a Four-Factor Prognostic Model. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(6), 576–585. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00979>
- Åhsberg, J., Xiao, P., Okuyama, K., Somasundaram, R., Strid, T., Qian, H., & Sigvardsson, M. (2020). Progression of progenitor B-cell leukemia is associated with alterations of the bone marrow micro-environment. *Haematologica*, 105(3), E102–E106. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2018.214031>
- Airoldi, I., Raffaghello, L., Cocco, C., Guglielmino, R., Roncella, S., Fedeli, F., Gambini, C., & Pistoia, V. (2004). Heterogeneous expression of interleukin-18 and its receptor in B-cell lymphoproliferative disorders deriving from naive, germinal center, and memory B lymphocytes. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the*

- American Association for Cancer Research*, 10(1 Pt 1), 144–154.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1026-3>
- Akintola-Ogunremi, O., Whitney, C., Mathur, S. C., & Finch, C. N. (2002). Chronic lymphocytic leukemia presenting with symptomatic central nervous system involvement. *Annals of Hematology*, 81(7), 402–404.
<https://doi.org/10.1007/S00277-002-0475-2>
- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. de O., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A. M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J. K. C., Cheuk, W., Chng, W. J., Choi, J. K., Chuang, S. S., Coupland, S. E., Czader, M., Dave, S. S., ... Xiao, W. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022 36:7, 36(7), 1720–1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
- Alhourani, E., Rincic, M., Othman, M. A. K., Pohle, B., Schlie, C., Glaser, A., & Liehr, T. (2014). Comprehensive chronic lymphocytic leukemia diagnostics by combined multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) and interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH). *Molecular Cytogenetics*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/S13039-014-0079-2>
- Al-Zayan, N. R., Ashour, M. J., Abuwarda, H. N., & Sharif, F. A. (2024). ARID5B, IKZF1, GATA3, CEBPE, and CDKN2A germline polymorphisms and predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Hematology and Oncology*, 41(2), 103–113. <https://doi.org/10.1080/08880018.2023.2234946>
- American Cancer Society. (2024). *Key statistics for chronic lymphocytic leukemia*.
- Arai, S., Yoshimi, A., Shimabe, M., Ichikawa, M., Nakagawa, M., Imai, Y., Goyama, S., & Kurokawa, M. (2011). Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells. *Blood*, 117(23), 6304–6314.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-07-234310>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R. P., Borowitz, M. J., Calvo, K. R., Kvasnicka, H. M., Wang, S. A., Bagg, A., Barbui, T., Branford, S., Bueso-Ramos, C. E., Cortes, J. E., Dal Cin, P., DiNardo, C. D., Dombret, H., Duncavage, E. J., Ebert, B. L., Estey, E. H., Facchetti, F., ... Tefferi, A. (2022). International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and

- genomic data. *Blood*, *140*(11), 1200–1228. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2022015850>
- Arroyo, D. S., Rodriguez, C. M., Bussi, C., Manzone-Rodriguez, C., Sastre, D., Heller, V., Stanganelli, C., Slavutsky, I., & Iribarren, P. (2020). Increased Expression of Autophagy Protein LC3 in Two Patients With Progressing Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.00321>
- Asslaber, D., Piñón, J. D., Seyfried, I., Desch, P., Stöcher, M., Tinhofer, I., Egle, A., Merkel, O., & Greil, R. (2010). microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *115*(21), 4191–4197. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-07-234823>
- Auberger, P., & Puissant, A. (2017). Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. *Blood*, *129*(5), 547–552. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-07-692707>
- Aviram, A., Rabizadeh, E., Zimra, Y., Yeshoron, M., Marmelstein, M., Shaklai, M., & Bairey, O. (2000). Expression of bcl-2 and bax in cells isolated from B-chronic lymphocytic leukemia patients at different stages of the disease. *European Journal of Haematology*, *64*(2), 80–84. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0609.2000.90042.X>
- Avsec, D., Djordjevič, A. T. J., Kandušer, M., Podgornik, H., Škerget, M., & Mlinarič-raščan, I. (2021). Targeting Autophagy Triggers Apoptosis and Complements the Action of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Cancers*, *13*(18). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13184557>
- Backman, J. D., Li, A. H., Marcketta, A., Sun, D., Mbatchou, J., Kessler, M. D., Benner, C., Liu, D., Locke, A. E., Balasubramanian, S., Yadav, A., Banerjee, N., Gillies, C. E., Damask, A., Liu, S., Bai, X., Hawes, A., Maxwell, E., Gurski, L., ... Ferreira, M. A. R. (2021). Exome sequencing and analysis of 454,787 UK Biobank participants. *Nature*, *599*(7886), 628–634. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-04103-Z>
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., & Hafler, D. A. (2001). CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(3), 1245–1253. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.3.1245>

- Baecher-Allan, C., Viglietta, V., & Hafler, D. A. (2004). Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Seminars in Immunology*, *16*(2), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.12.005>
- Balatti, V., Bottoni, A., Palamarchuk, A., Alder, H., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Pekarsky, Y., & Croce, C. M. (2012). NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*, *119*(2), 329–331. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-10-386144>
- Balatti, V., Rizzotto, L., Miller, C., Palamarchuk, A., Fadda, P., Pandolfo, R., Rassenti, L. Z., Hertlein, E., Ruppert, A. S., Lozanski, A., Lozanski, G., Kipps, T. J., Byrd, J. C., Croce, C. M., & Pekarsky, Y. (2015). TCL1 targeting miR-3676 is codeleted with tumor protein p53 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(7), 2169–2174. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1500010112>
- Baliakas, P., Hadzidimitriou, A., Sutton, L. A., Rossi, D., Minga, E., Villamor, N., Larrayoz, M., Kminkova, J., Agathangelidis, A., Davis, Z., Tausch, E., Stalika, E., Kantorova, B., Mansouri, L., Scarfò, L., Cortese, D., Navrkalova, V., Rose-Zerilli, M. J. J., Smedby, K. E., ... Rosenquist, R. (2015). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *29*(2), 329–336. <https://doi.org/10.1038/LEU.2014.196>
- Baliakas, P., Iskas, M., Gardiner, A., Davis, Z., Plevova, K., Nguyen-Khac, F., Malcikova, J., Anagnostopoulos, A., Glide, S., Mould, S., Stepanovska, K., Brejcha, M., Belessi, C., Davi, F., Pospisilova, S., Athanasiadou, A., Stamatopoulos, K., & Oscier, D. (2014). Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American Journal of Hematology*, *89*(3), 249–255. <https://doi.org/10.1002/AJH.23618>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/CR.2011.22>
- Bauvois, B., Pramil, E., Jondreville, L., Quiney, C., Nguyen-Khac, F., & Susin, S. A. (2021). Activation of Interferon Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Contributes to Apoptosis Resistance via a JAK-Src/STAT3/Mcl-1 Signaling

Pathway. *Biomedicines*, 9(2), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9020188>

Bekri, S., Adélaide, J., Merscher, S., Grosgeorge, J., Caroli-Bosc, F., Perucca-Lostanlen, D., Kelley, P. M., Pébusque, M. J., Theillet, C., Birnbaum, D., & Gaudray, P. (1997). Detailed map of a region commonly amplified at 11q13-->q14 in human breast carcinoma. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 79(1–2), 125–131.
<https://doi.org/10.1159/000134699>

Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouysségur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2570–2581. <https://doi.org/10.1128/MCB.00166-09>

Berndt, S. I., Camp, N. J., Skibola, C. F., Vijai, J., Wang, Z., Gu, J., Nieters, A., Kelly, R. S., Smedby, K. E., Monnereau, A., Cozen, W., Cox, A., Wang, S. S., Lan, Q., Teras, L. R., Machado, M., Yeager, M., Brooks-Wilson, A. R., Hartge, P., ... Slager, S. L. (2016). Meta-analysis of genome-wide association studies discovers multiple loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature Communications*, 7.
<https://doi.org/10.1038/NCOMMS10933>

Berndt, S. I., Skibola, C. F., Joseph, V., Camp, N. J., Nieters, A., Wang, Z., Cozen, W., Monnereau, A., Wang, S. S., Kelly, R. S., Lan, Q., Teras, L. R., Chatterjee, N., Chung, C. C., Yeager, M., Brooks-Wilson, A. R., Hartge, P., Purdue, M. P., Birmann, B. M., ... Slager, S. L. (2013a). Genome-wide Association Study Identifies Multiple Risk Loci for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Nature Genetics*, 45(8), 868.
<https://doi.org/10.1038/NG.2652>

Berndt, S. I., Skibola, C. F., Joseph, V., Camp, N. J., Nieters, A., Wang, Z., Cozen, W., Monnereau, A., Wang, S. S., Kelly, R. S., Lan, Q., Teras, L. R., Chatterjee, N., Chung, C. C., Yeager, M., Brooks-Wilson, A. R., Hartge, P., Purdue, M. P., Birmann, B. M., ... Slager, S. L. (2013b). Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, 45(8), 868–876.
<https://doi.org/10.1038/NG.2652>

Berndt, S. I., Vijai, J., Benavente, Y., Camp, N. J., Nieters, A., Wang, Z., Smedby, K. E., Kleinstern, G., Hjalgrim, H., Besson, C., Skibola, C. F., Morton, L. M., Brooks-

- Wilson, A. R., Teras, L. R., Breeze, C., Arias, J., Adami, H. O., Albanes, D., Anderson, K. C., ... Rothman, N. (2022). Distinct germline genetic susceptibility profiles identified for common non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Leukemia*, *36*(12), 2835. <https://doi.org/10.1038/S41375-022-01711-0>
- Beyer, M., & Schultze, J. L. (2006). Regulatory T cells in cancer. *Blood*, *108*(3), 804–811. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-02-002774>
- Bialik, S., Dasari, S. K., & Kimchi, A. (2018). Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death. *Journal of Cell Science*, *131*(18). <https://doi.org/10.1242/JCS.215152>
- Biankin, A. V., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M. C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., Miller, D. K., Wilson, P. J., Patch, A. M., Wu, J., Chang, D. K., Cowley, M. J., Gardiner, B. B., Song, S., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Manning, S., ... Grimmond, S. M. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, *491*(7424), 399–405. <https://doi.org/10.1038/NATURE11547>
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguet, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Belabbes, S., & Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, *48*(1), 198–206. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19810701\)48:1<198::aid-cncr2820480131>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19810701)48:1<198::aid-cncr2820480131>3.0.co;2-v)
- Blume, C. J., Hotz-Wagenblatt, A., Hüllelin, J., Sellner, L., Jethwa, A., Stolz, T., Slabicki, M., Lee, K., Sharathchandra, A., Benner, A., Dietrich, S., Oakes, C. C., Dreger, P., Te Raa, D., Kater, A. P., Jauch, A., Merkel, O., Oren, M., Hielscher, T., & Zenz, T. (2015). p53-dependent non-coding RNA networks in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *29*(10), 2015–2023. <https://doi.org/10.1038/LEU.2015.119>
- Bologna, C., Buonincontri, R., Serra, S., Vaisitti, T., Audrito, V., Brusa, D., Pagnani, A., Coscia, M., D'Arena, G., Mereu, E., Piva, R., Furman, R. R., Rossi, D., Gaidano, G., Terhorst, C., & Deaglio, S. (2016). SLAMF1 regulation of chemotaxis and

- autophagy determines CLL patient response. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 181–194. <https://doi.org/10.1172/JCI83013>
- Bosch, F., & Dalla-Favera, R. (2019). Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019 16:11, 16(11), 684–701. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0239-8>
- Boyle, A. P., Hong, E. L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M. A., Kasowski, M., Karczewski, K. J., Park, J., Hitz, B. C., Weng, S., Cherry, J. M., & Snyder, M. (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, 22(9), 1790–1797. <https://doi.org/10.1101/GR.137323.112>
- Brandes, N., Linial, N., & Linial, M. (2021). Genetic association studies of alterations in protein function expose recessive effects on cancer predisposition. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-94252-Y>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21834>
- Budina-Kolomets, A., Hontz, R. D., Pimkina, J., & Murphy, M. E. (2013). A conserved domain in exon 2 coding for the human and murine ARF tumor suppressor protein is required for autophagy induction. *Autophagy*, 9(10), 1553–1565. <https://doi.org/10.4161/AUTO.25831>
- Burger, J. A. (2011). Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2011, 96–103. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2011.1.96>
- Burger, J. A., & Gribben, J. G. (2014). The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Seminars in Cancer Biology*, 24, 71–81. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2013.08.011>
- Bush, W. S., & Moore, J. H. (2012). Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Computational Biology*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1002822>

- Cabarcas-Petroski, S., & Schramm, L. (2022). BDP1 Alterations Correlate with Clinical Outcomes in Breast Cancer. *Cancers*, *14*(7). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14071658>
- Cabrera-Serrano, A. J., Sánchez-Maldonado, J. M., ter Horst, R., Macaudo, A., García-Martín, P., Benavente, Y., Landi, S., Clay-Gilmour, A., Niazi, Y., Espinet, B., Rodríguez-Sevilla, J. J., Pérez, E. M., Maffei, R., Blanco, G., Giaccherini, M., Cerhan, J. R., Marasca, R., López-Nevot, M. Á., Chen-Liang, T., ... Sainz, J. (2023). Do GWAS-Identified Risk Variants for Chronic Lymphocytic Leukemia Influence Overall Patient Survival and Disease Progression? *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS24098005>
- Caligaris-Cappio, F., & Ghia, P. (2007). The normal counterpart to the chronic lymphocytic leukemia B cell. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, *20*(3), 385–397. <https://doi.org/10.1016/J.BEHA.2007.02.005>
- Caligaris-Cappio, F., & Hamblin, T. J. (1999). B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *17*(1), 399–408. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.1.399>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/PNAS.242606799>
- CALL, T. G., PHYLIKY, R. L., NOËL, P., HABERMANN, T. M., BEARD, C. M., O'FALLON, W. M., & KURLAND, L. T. (1994). Incidence of chronic lymphocytic leukemia in Olmsted County, Minnesota, 1935 through 1989, with emphasis on changes in initial stage at diagnosis. *Mayo Clinic Proceedings*, *69*(4), 323–328. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)62215-0](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)62215-0)
- Campa, D., Capurso, G., Pastore, M., Talar-Wojnarowska, R., Milanetto, A. C., Landoni, L., Maiello, E., Lawlor, R. T., Malecka-Panas, E., Funel, N., Gazouli, M., De Bonis, A., Klüter, H., Rinzivillo, M., Delle Fave, G., Hackert, T., Landi, S., Bugert, P.,

- Bambi, F., ... Canzian, F. (2016). Common germline variants within the CDKN2A/2B region affect risk of pancreatic neuroendocrine tumors. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP39565>
- Canzian, F., Piredda, C., Macaudo, A., Zawirska, D., Andersen, N. F., Nagler, A., Zaucha, J. M., Mazur, G., Dumontet, C., Wątek, M., Jamroziak, K., Sainz, J., Várkonyi, J., Butrym, A., Beider, K., Abildgaard, N., Lesueur, F., Dudziński, M., Vangsted, A. J., ... Campa, D. (2022). A polygenic risk score for multiple myeloma risk prediction. *European Journal of Human Genetics*, 30(4), 474–479. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00986-8>
- Cao, Y., Zhang, S., Yuan, N., Wang, J., Li, X., Xu, F., Lin, W., Song, L., Fang, Y., Wang, Z., Wang, Z., Zhang, H., Zhang, Y., Zhao, W., Hu, S., Zhang, X., & Wang, J. (2015). Hierarchical autophagic divergence of hematopoietic system. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29240. <https://doi.org/10.1074/JBC.A115.650028>
- Carter, N. A., Vasconcellos, R., Rosser, E. C., Tulone, C., Muñoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M. R., Flavell, R. A., & Mauri, C. (2011). Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(10), 5569–5579. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1100284>
- Cerhan, J. R., & Slager, S. L. (2015). Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood*, 126(20), 2265–2273. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-04-537498>
- Cervantes-Gomez, F., Lamothe, B., Woyach, J. A., Wierda, W. G., Keating, M. J., Balakrishnan, K., & Gandhi, V. (2015). Pharmacological and Protein Profiling Suggests Venetoclax (ABT-199) as Optimal Partner with Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(16), 3705–3715. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2809>
- Chang, N. C. (2020). Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 526120. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00138/BIBTEX>

- Chatzidimitriou, C., & Vassilakopoulos, T. P. (2021). Rapidly deteriorating B-CLL at presentation: clonally related Burkitt leukemia as an atypical Richter transformation? *Blood*, *137*(16), 2272. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2021010664>
- Chen, C. C., Jeon, S. M., Bhaskar, P. T., Nogueira, V., Sundararajan, D., Tonic, I., Park, Y., & Hay, N. (2010). FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor. *Developmental Cell*, *18*(4), 592–604. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2010.03.008>
- Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K. L., Liu, Y., & Zheng, P. (2008). TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(10), 2397–2408. <https://doi.org/10.1084/JEM.20081297>
- Chen, S. S., Sherman, M. H., Hertlein, E., Johnson, A. J., Teitell, M. A., Byrd, J. C., & Plass, C. (2009). Epigenetic alterations in a murine model for chronic lymphocytic leukemia. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *8*(22), 3663–3667. <https://doi.org/10.4161/CC.8.22.9957>
- Chen, Y., Shao, X., Yang, H., Ren, L., Cui, Y., Zhang, W., Macip, S., & Meng, X. (2023). Interferon gamma regulates a complex pro-survival signal network in chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Haematology*, *110*(4), 435–443. <https://doi.org/10.1111/EJH.13921>
- Cherng, H. J. J., & Jain, N. (2021). First-Line Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia: Bruton Tyrosine Kinase or BCL2 or Both? *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *35*(4), 725–738. <https://doi.org/10.1016/J.HOC.2021.03.005>
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Rai, K. R., Grever, M. R., Kay, N. E., Schiffer, C. A., Oken, M. M., Keating, M. J., Boldt, D. H., Kempin, S. J., & Foon, K. A. (1988). Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. *American Journal of Hematology*, *29*(3), 152–163. <https://doi.org/10.1002/AJH.2830290307>
- Cheung, T. H., & Rando, T. A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(6), 329–340. <https://doi.org/10.1038/NRM3591>

- Chun, Y., & Kim, J. (2018). Autophagy: An Essential Degradation Program for Cellular Homeostasis and Life. *Cells*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/CELLS7120278>
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944–13949. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0506654102>
- Clavero, E., Sanchez-Maldonado, J. M., Macaуда, A., Ter Horst, R., Sampaio-Marques, B., Jurczyszyn, A., Clay-Gilmour, A., Stein, A., Hildebrandt, M. A. T., Weinhold, N., Buda, G., García-Sanz, R., Tomczak, W., Vogel, U., Jerez, A., Zawirska, D., Wątek, M., Hofmann, J. N., Landi, S., ... Sainz, J. (2023). Polymorphisms within Autophagy-Related Genes as Susceptibility Biomarkers for Multiple Myeloma: A Meta-Analysis of Three Large Cohorts and Functional Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS24108500>
- Conde, L., Halperin, E., Akers, N. K., Brown, K. M., Smedby, K. E., Rothman, N., Nieters, A., Slager, S. L., Brooks-Wilson, A., Agana, L., Riby, J., Liu, J., Adami, H. O., Darabi, H., Hjalgrim, H., Low, H. Q., Humphreys, K., Melbye, M., Chang, E. T., ... Skibola, C. F. (2010). Genome-wide association study of follicular lymphoma identifies a risk locus at 6p21.32. *Nature Genetics*, 42(8), 661. <https://doi.org/10.1038/NG.626>
- Condoluci, A., Di Bergamo, L. T., Langerbeins, P., Hoechstetter, M. A., Herling, C. D., De Paoli, L., Delgado, J., Rabe, K. G., Gentile, M., Doubek, M., Mauro, F. R., Chiodin, G., Mattsson, M., Bahlo, J., Cutrona, G., Kotaskova, J., Deambrogi, C., Smedby, K. E., Spina, V., ... Rossi, D. (2020). International prognostic score for asymptomatic early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 135(21), 1859–1869. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2019003453>
- Corrionero, A., Miñana, B., & Valcárcel, J. (2011). Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes & Development*, 25(5), 445–459. <https://doi.org/10.1101/GAD.2014311>

- Cortese, D., Sutton, L.-A., Cahill, N., Smedby, K. E., Geisler, C., Gunnarsson, R., Juliusson, G., Mansouri, L., & Rosenquist, R. (2014). On the way towards a “CLL prognostic index”: focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia*, 28(3), 710–713. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.333>
- Costas, M. A., & Rubio, M. F. (2017). *AUTOFAGIA, UNA ESTRATEGIA DE SUPERVIVENCIA CELULAR*. 4, 314–320.
- Cramer, P., & Hallek, M. (2011). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia—what do we need to know? *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 8(1), 38–47. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.167>
- Crowther-Swanepoel, D., & Houlston, R. S. (2009). The molecular basis of familial chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 94(5), 606–609. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2009.006296>
- Cuervo, A. M., & Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research*, 24(1), 92–104. <https://doi.org/10.1038/CR.2013.153>
- Cuesta-Mateos, C., López-Giral, S., Alfonso-Pérez, M., de Soria, V. G. G., Loscertales, J., Guasch-Vidal, S., Beltrán, A. E., Zapata, J. M., & Muñoz-Calleja, C. (2010). Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Experimental Hematology*, 38(9), 756–764.e4. <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2010.05.003>
- Cui, B., Chen, L., Zhang, S., Mraz, M., Fecteau, J. F., Yu, J., Ghia, E. M., Zhang, L., Bao, L., Rassenti, L. Z., Messer, K., Calin, G. A., Croce, C. M., & Kipps, T. J. (2014). MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 124(4), 546–554. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-03-559690>
- Cuneo, A., Rigolin, G. M., Bigoni, R., De Angeli, A., Veronese, A., Cavazzani, F., Bardi, A., Roberti, M. G., Tammiso, E., Agostini, P., Ciccone, M., Della Porta, M., Tieghi, A., Cavazzini, L., Negrini, M., & Castoldi, G. (2004). Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*, 18(3), 476–483. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2403242>

- Da Cunha-Bang, C., Christiansen, I., & Niemann, C. U. (2016). The CLL-IPI applied in a population-based cohort. *Blood*, *128*(17), 2181–2183. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-07-724740>
- Dal Bo, M., Rossi, F. M., Rossi, D., Deambrogi, C., Bertoni, F., Del Giudice, I., Palumbo, G., Nanni, M., Rinaldi, A., Kwee, I., Tissino, E., Corradini, G., Gozzetti, A., Cencini, E., Ladetto, M., Coletta, A. M., Luciano, F., Bulian, P., Pozzato, G., ... Gattei, V. (2011). 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *50*(8), 633–643. <https://doi.org/10.1002/GCC.20885>
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *94*(6), 1840–1847.
- D'Arena, G., Laurenti, L., Minervini, M. M., Deaglio, S., Bonello, L., De Martino, L., De Padua, L., Savino, L., Tarnani, M., De Feo, V., & Cascavilla, N. (2011). Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leukemia Research*, *35*(3), 363–368. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2010.08.010>
- Davari, N., Ahmadpour, F., Kiani, A. A., Azadpour, M., & Asadi, Z. T. (2021). Evaluation of microRNA-223 and microRNA-125a expression association with STAT3 and Bcl2 genes in blood leukocytes of CLL patients: a case-control study. *BMC Research Notes*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/S13104-020-05428-0>
- De Silva, N. S., Simonetti, G., Heise, N., & Klein, U. (2012). The diverse roles of IRF4 in late germinal center B-cell differentiation. *Immunological Reviews*, *247*(1), 73–92. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2012.01113.X>
- Dearden, C. (2008). Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 450–456. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2008.1.450>
- Del Poeta, G., Dal Bo, M., Del Principe, M. I., Pozzo, F., Rossi, F. M., Zucchetto, A., Bomben, R., Degan, M., Rasi, S., Rossi, D., Bulian, P., Gaidano, G., Amadori, S., &

- Gattei, V. (2013). Clinical significance of c.7544-7545 delCT NOTCH1 mutation in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *160*(3), 415–418. <https://doi.org/10.1111/BJH.12128>
- Delgado, J., Doubek, M., Baumann, T., Kotaskova, J., Molica, S., Mozas, P., Rivas-Delgado, A., Morabito, F., Pospisilova, S., & Montserrat, E. (2017). Chronic lymphocytic leukemia: A prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. *American Journal of Hematology*, *92*(4), 375–380. <https://doi.org/10.1002/AJH.24660>
- Devereaux, K., Dall'Armi, C., Alcazar-Roman, A., Ogasawara, Y., Zhou, X., Wang, F., Yamamoto, A., de Camilli, P., & Di Paolo, G. (2013). Regulation of mammalian autophagy by class II and III PI 3-kinases through PI3P synthesis. *PLoS One*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076405>
- Di Bernardo, M. C., Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Webb, E., Sellick, G., Wild, R., Sullivan, K., Vijayakrishnan, J., Wang, Y., Pittman, A. M., Sunter, N. J., Hall, A. G., Dyer, M. J. S., Matutes, E., Dearden, C., Mainou-Fowler, T., Jackson, G. H., Summerfield, G., Harris, R. J., ... Houlston, R. S. (2008). A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, *40*(10), 1204–1210. <https://doi.org/10.1038/NG.219>
- Dicker, F., Kater, A. P., Fukuda, T., & Kipps, T. J. (2005). Fas-ligand (CD178) and TRAIL synergistically induce apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, *105*(8), 3193–3198. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-10-3684>
- Dierlamm, J., Michaux, L., Criel, A., Wlodarska, I., Van Den Berghe, H., & Hossfeld, D. K. (1997). Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic implications. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *94*(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(96\)00246-4](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(96)00246-4)
- Dighiero, G., Maloum, K., Desablens, B., Cazin, B., Navarro, M., Leblay, R., Leporrier, M., Jaubert, J., Lepeu, G., Dreyfus, B., Binet, J.-L., Travade, P., Turpin, F.-L., Tertian, G., & Bichoffe, A. (1998). Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New*

- England Journal of Medicine*, 338(21), 1506–1514.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199805213382104>
- Din, L., Sheikh, M., Kosaraju, N., Smedby, K. E., Bernatsky, S., Berndt, S. I., Skibola, C. F., Nieters, A., Wang, S., McKay, J. D., Cocco, P., Maynadié, M., Foretová, L., Staines, A., Mack, T. M., de Sanjosé, S., Vyse, T. J., Padyukov, L., Monnereau, A., ... Khankhanian, P. (2019). Genetic overlap between autoimmune diseases and non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Genetic Epidemiology*, 43(7), 844–863.
<https://doi.org/10.1002/gepi.22242>
- Ding, L., Zhang, W., Yang, L., Pelicano, H., Zhou, K., Yin, R., Huang, R., & Zeng, J. (2018). Targeting the autophagy in bone marrow stromal cells overcomes resistance to vorinostat in chronic lymphocytic leukemia. *OncoTargets and Therapy*, 11, 5151–5170. <https://doi.org/10.2147/OTT.S170392>
- Diop, F., Moia, R., Favini, C., Spaccarotella, E., De Paoli, L., Brusca, A., Spina, V., Terzi-Di-Bergamo, L., Arruga, F., Tarantelli, C., Deambrogi, C., Rasi, S., Adhinaveni, R., Patriarca, A., Favini, S., Sagiraju, S., Jabangwe, C., Kodipad, A. A., Peroni, D., ... Rossi, D. (2020). Biological and clinical implications of BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 105(2), 448–456.
<https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2019.219550>
- Djavaheri-Mergny, M., Giuriato, S., Tschan, M. P., & Humbert, M. (2019a). Therapeutic Modulation of Autophagy in Leukaemia and Lymphoma. *Cells 2019, Vol. 8, Page 103*, 8(2), 103. <https://doi.org/10.3390/CELLS8020103>
- Djavaheri-Mergny, M., Giuriato, S., Tschan, M. P., & Humbert, M. (2019b). Therapeutic Modulation of Autophagy in Leukaemia and Lymphoma. *Cells*, 8(2).
<https://doi.org/10.3390/CELLS8020103>
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., & Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 343(26), 1910–1916.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432602>
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., James, M. R., Benner, A., Weilguni, T., Bentz, M., Fischer, K., Hunstein, W., & Lichter, P. (1997). 11q Deletions Identify a New Subset of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Characterized by Extensive Nodal

- Involvement and Inferior Prognosis. *Blood*, 89(7), 2516–2522. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V89.7.2516>
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., & Mattick, J. S. (1991). “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 19(14), 4008. <https://doi.org/10.1093/NAR/19.14.4008>
- Dong, Y., Zheng, M., Wang, X., Yu, C., Qin, T., & Shen, X. (2023). High expression of CDKN2A is associated with poor prognosis in colorectal cancer and may guide PD-1-mediated immunotherapy. *BMC Cancer*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-023-11603-W>
- Dong, Z., Liang, S., Hu, J., Jin, W., Zhan, Q., & Zhao, K. (2016). Autophagy as a target for hematological malignancy therapy. *Blood Reviews*, 30(5), 369–380. <https://doi.org/10.1016/J.BLRE.2016.04.005>
- Dostert, C., Grusdat, M., Letellier, E., & Brenner, D. (2019). The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiological Reviews*, 99(1), 115–160. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00045.2017>
- Dreger, P., Ghia, P., Schetelig, J., Van Gelder, M., Kimby, E., Michallet, M., Moreno, C., Robak, T., Stilgenbauer, S., & Montserrat, E. (2018). High-risk chronic lymphocytic leukemia in the era of pathway inhibitors: integrating molecular and cellular therapies. *Blood*, 132(9), 892–902. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-01-826008>
- Dreger, P., Michallet, M., Bosman, P., Dietrich, S., Sobh, M., Boumendil, A., Nagler, A., Scheid, C., Cornelissen, J., Niederwieser, D., Müller, L., Vandenberghe, E., Scortechini, I., Schoemans, H., Andersen, N. S., Finke, J., Russo, D., Ljungman, P., Passweg, J., ... Schetelig, J. (2018). Ibrutinib for bridging to allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with chronic lymphocytic leukemia or mantle cell lymphoma: a study by the EBMT Chronic Malignancies and Lymphoma Working Parties. *Bone Marrow Transplantation* 2018 54:1, 54(1), 44–52. <https://doi.org/10.1038/s41409-018-0207-4>
- Dunham, I., Kulesha, E., Iotchkova, V., Morganello, S., Birney, E., Semple, C. A., & Knight, J. (2015). FORGE: A tool to discover cell specific enrichments of GWAS

- associated SNPs in regulatory regions. *F1000Research* 2015 4:18, 4, 18. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6032.1>
- Dyer, M. J. S., Zani, V. J., Lu, W. Z., O'Byrne, A., Mould, S., Chapman, R., Heward, J. M., Kayano, H., Jadayel, D., Matutes, E., Catovsky, D., & Oscier, D. G. (1994). BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. *Blood*, 83(12), 3682–3688. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V83.12.3682.3682>
- Eclache, V., Caulet-Maugendre, S., Poirel, H. A., Djemai, M., Robert, J., Lejeune, F., & Raphaël, M. (2004). Cryptic deletion involving the ATM locus at 11q22.3~q23.1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 152(1), 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2003.10.010>
- Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Niemann, C. U., Kater, A. P., Gregor, M., Cymbalista, F., Buske, C., Hillmen, P., Hallek, M., & Mey, U. (2021). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 32(1), 23–33. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.09.019/ATTACHMENT/07F624C3-C798-4254-942F-E2481F398970/MMC1.PDF>
- Eid, O. M., Abdel Kader, R. M. A., Fathalla, L. A., Abdelrahman, A. H., Rabea, A., Mahrous, R., & Eid, M. M. (2021). Evaluation of MLPA as a comprehensive molecular cytogenetic tool to detect cytogenetic markers of chronic lymphocytic leukemia in Egyptian patients. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S43141-021-00198-Z>
- El-Khoury, V., Pierson, S., Szwarcbart, E., Brons, N. H. C., Roland, O., Cherrier-De Wilde, S., Plawny, L., Van Dyck, E., & Berchem, G. (2014). Disruption of autophagy by the histone deacetylase inhibitor MGCD0103 and its therapeutic implication in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 28(8), 1636–1646. <https://doi.org/10.1038/LEU.2014.19>
- Ellis, M. J., Ding, L., Shen, D., Luo, J., Suman, V. J., Wallis, J. W., Van Tine, B. A., Hoog, J., Goiffon, R. J., Goldstein, T. C., Ng, S., Lin, L., Crowder, R., Snider, J., Ballman, K., Weber, J., Chen, K., Koboldt, D. C., Kandoth, C., ... Mardis, E. R. (2012). Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature*, 486(7403), 353–360. <https://doi.org/10.1038/NATURE11143>

- Elton, T. S., Selemon, H., Elton, S. M., & Parinandi, N. L. (2013). Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*, *532*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2012.12.009>
- Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F. M., Reiter, A., Hochhaus, A., Drexler, H. G., Duncombe, A., Cervantes, F., Oscier, D., Boultonwood, J., Grand, F. H., & Cross, N. C. P. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genetics*, *42*(8), 722–726. <https://doi.org/10.1038/NG.621>
- Fabbri, G., Rasi, S., Rossi, D., Trifonov, V., Khiabanian, H., Ma, J., Grunn, A., Fangazio, M., Capello, D., Monti, S., Cresta, S., Gargiulo, E., Forconi, F., Guarini, A., Arcaini, L., Paulli, M., Laurenti, L., Larocca, L. M., Marasca, R., ... Gaidano, G. (2011). Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(7), 1389–1401. <https://doi.org/10.1084/JEM.20110921>
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S. L., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Dighiero, G., Schroeder, H. W., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, *102*(8), 1515–1525. <https://doi.org/10.1172/JCI3009>
- Fan, L., Wang, L., Zhang, R., Fang, C., Zhu, D. X., Wang, Y. H., Zou, Z. J., Li, J. Y., & Xu, W. (2012). Richter transformation in 16 of 149 Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *53*(9), 1749–1756. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.664845>
- Faria, J. R., Yamamoto, M., Faria, R. M. D., Kerbauy, J., & Oliveira, J. S. R. (2006). Fludarabine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia--the role of P53, Bcl-2, Bax, Mcl-1, and Bag-1 proteins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, *39*(3), 327–333. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006000300003>
- Ferracin, M., Zagatti, B., Rizzotto, L., Cavazzini, F., Veronese, A., Ciccone, M., Saccenti, E., Lupini, L., Grilli, A., De Angeli, C., Negrini, M., & Cuneo, A. (2010).

- MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Molecular Cancer*, 9. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-123>
- Ferrer, G., Bosch, R., Hodgson, K., Tejero, R., Roué, G., Colomer, D., Montserrat, E., & Moreno, C. (2014). B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL. *British Journal of Haematology*, 164(4), 570–578. <https://doi.org/10.1111/BJH.12645>
- Folmes, C. D. L., & Terzic, A. (2016). Energy metabolism in the acquisition and maintenance of stemness. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 52, 68–75. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2016.02.010>
- Foulkes, W. D., Flanders, T. Y., Pollock, P. M., & Hayward, N. K. (1997). The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Molecular Medicine*, 3(1), 5. <https://doi.org/10.1007/bf03401664>
- Fraiberg, M., & Elazar, Z. (2020). Genetic defects of autophagy linked to disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 172, 293–323. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2020.04.001>
- Fraietta, J. A., Beckwith, K. A., Patel, P. R., Ruella, M., Zheng, Z., Barrett, D. M., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., McGettigan, S. E., Cook, D. R., Zhang, C., Xu, J., Do, P., Hulitt, J., Kudchodkar, S. B., Cogdill, A. P., Gill, S., Porter, D. L., Woyach, J. A., ... Maus, M. V. (2016). Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood*, 127(9), 1117–1127. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-11-679134>
- Frey, N. V., Gill, S., Hexner, E. O., Schuster, S., Nasta, S., Loren, A., Svoboda, J., Stadtmauer, E., Landsburg, D. J., Mato, A., Levine, B. L., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Veloso, E., Gaymon, A., Pequignot, E., Shan, X., Hwang, W. T., June, C. H., & Porter, D. L. (2020). Long-term outcomes from a randomized dose optimization study of chimeric antigen receptor modified T cells in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 38(25), 2862–2871. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.03237/ASSET/BFD86F57-3FE4-4844-AFD7-C341EE60E94A/ASSETS/IMAGES/LARGE/JCO.19.03237APP6.JPG>
- Friedman, D. R., Sibley, A. B., Owzar, K., Chaffee, K. G., Slager, S., Kay, N. E., Hanson, C. A., Ding, W., Shanafelt, T. D., Weinberg, J. B., & Wilcox, R. A. (2016).

- Relationship of blood monocytes with chronic lymphocytic leukemia aggressiveness and outcomes: a multi-institutional study. *American Journal of Hematology*, 91(7), 687–691. <https://doi.org/10.1002/AJH.24376>
- Gagliano Taliun, S. A., VandeHaar, P., Boughton, A. P., Welch, R. P., Taliun, D., Schmidt, E. M., Zhou, W., Nielsen, J. B., Willer, C. J., Lee, S., Fritsche, L. G., Boehnke, M., & Abecasis, G. R. (2020). Exploring and visualizing large-scale genetic associations by using PheWeb. *Nature Genetics*, 52(6), 550–552. <https://doi.org/10.1038/S41588-020-0622-5>
- Gaidano, G., & Rossi, D. (2017). The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2017(1), 329–337. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2017.1.329>
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., ... Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201796697>
- García Ruiz, O., Sánchez-Maldonado, J. M., López-Nevot, M. Á., García, P., Macaуда, A., Hernández-Mohedo, F., González-Sierra, P. A., Martínez-Bueno, M., Pérez, E., Reyes-Zurita, F. J., Campa, D., Canzian, F., Jurado, M., Rodríguez-Sevilla, J. J., & Sainz, J. (2022). Autophagy in Hematological Malignancies. *Cancers*, 14(20), 5072. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14205072>
- García-Martín, P., Díez, A. M., Maldonado, J. M. S., Serrano, A. J. C., Ter Horst, R., Benavente, Y., Landi, S., Macaуда, A., Clay-Gilmour, A., Hernández-Mohedo, F., Niazi, Y., González-Sierra, P., Espinet, B., Rodríguez-Sevilla, J. J., Maffei, R., Blanco, G., Giaccherini, M., Puiggros, A., Cerhan, J., ... Sainz, J. (2022). Validation and functional characterization of GWAS-identified variants for chronic lymphocytic leukemia: a CRuCIAL study. *Blood Cancer Journal*, 12(5), 79. <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00676-8>

- Garding, A., Bhattacharya, N., Claus, R., Ruppel, M., Tschuch, C., Filarsky, K., Idler, I., Zucknick, M., Caudron-Herger, M., Oakes, C., Fleig, V., Keklikoglou, I., Allegra, D., Serra, L., Thakurela, S., Tiwari, V., Weichenhan, D., Benner, A., Radlwimmer, B., ... Mertens, D. (2013). Epigenetic upregulation of lncRNAs at 13q14.3 in leukemia is linked to the In Cis downregulation of a gene cluster that targets NF-kB. *PLoS Genetics*, *9*(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003373>
- Gentile, M., Shanafelt, T. D., Mauro, F. R., Laurenti, L., Rossi, D., Molica, S., Vincelli, I., Cutrona, G., Uccello, G., Pepe, S., Vigna, E., Tripepi, G., Chaffee, K. G., Parikh, S. A., Bossio, S., Recchia, A. G., Innocenti, I., Pasquale, R., Neri, A., ... Morabito, F. (2018). Comparison between the CLL-IPI and the Barcelona-Brno prognostic model: Analysis of 1299 newly diagnosed cases. *American Journal of Hematology*, *93*(2), E35–E37. <https://doi.org/10.1002/AJH.24960>
- Gentile, M., Shanafelt, T. D., Rossi, D., Laurenti, L., Mauro, F. R., Molica, S., Cutrona, G., Uccello, G., Campanelli, M., Vigna, E., Tripepi, G., Chaffee, K. G., Parikh, S. A., Bossio, S., Recchia, A. G., Innocenti, I., Pasquale, R., Neri, A., Ferrarini, M., ... Morabito, F. (2016). Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood*, *128*(16), 2093–2095. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-07-728261>
- Gentiluomo, M., Giaccherini, M., Gào, X., Guo, F., Stocker, H., Schöttker, B., Brenner, H., Canzian, F., & Campa, D. (2022). Genome-wide association study of mitochondrial copy number. *Human Molecular Genetics*, *31*(8), 1346–1355. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab341>
- Ginaldi, L., De Martinis, M., Matutes, E., Farahat, N., Morilla, R., & Catovsky, D. (1998). Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of Clinical Pathology*, *51*(5), 364–369. <https://doi.org/10.1136/JCP.51.5.364>
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, *221*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/PATH.2697>
- Goldin, L. R., Björkholm, M., Kristinsson, S. Y., Turesson, I., & Landgren, O. (2009). Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia.

Haematologica, 94(5), 647–653.
<https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2008.003632>

Goldin, L. R., McMaster, M. L., Rotunno, M., Herman, S. E. M., Jones, K., Zhu, B., Boland, J., Burdett, L., Hicks, B., Ravichandran, S., Luke, B. T., Yeager, M., Fontaine, L., Goldstein, A. M., Chanock, S. J., Tucker, M. A., Wiestner, A., Marti, G., & Caporaso, N. E. (2016). Whole exome sequencing in families with CLL detects a variant in Integrin β 2 associated with disease susceptibility. *Blood*, 128(18), 2261–2263. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-02-697771>

Goldin, L. R., Pfeiffer, R. M., Li, X., & Hemminki, K. (2004). Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood*, 104(6), 1850–1854. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-01-0341>

Golovina, E., Heizer, T., Daumova, L., Bajecny, M., Fontana, S., Griggio, V., Jones, R., Coscia, M., Riganti, C., & Savvulidi Vargova, K. (2024). MiR-155 deficiency and hypoxia results in metabolism switch in the leukemic B-cells. *Cancer Cell International*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/S12935-024-03437-8>

Gonzalez, D., Martinez, P., Wade, R., Hockley, S., Oscier, D., Matutes, E., Dearden, C. E., Richards, S. M., Catovsky, D., & Morgan, G. J. (2011). Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(16), 2223–2229. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.0838>

Gregg, R., Smith, C. M., Clark, F. J., Dunnion, D., Khan, N., Chakraverty, R., Nayak, L., & Moss, P. A. (2005). The number of human peripheral blood CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells increases with age. *Clinical and Experimental Immunology*, 140(3), 540–546. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2005.02798.X>

Gruber, M., & Wu, C. J. (2014). Evolving understanding of the CLL genome. *Seminars in Hematology*, 51(3), 177–187. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINHEMATOL.2014.05.004>

- Guan, J. L., Simon, A. K., Prescott, M., Menendez, J. A., Liu, F., Wang, F., Wang, C., Wolvetang, E., Vazquez-Martin, A., & Zhang, J. (2013). Autophagy in stem cells. *Autophagy*, *9*(6), 830–849. <https://doi.org/10.4161/AUTO.24132>
- Guney, S., Jardin, F., Bertrand, P., Mareschal, S., Parmentier, F., Picquenot, J. M., Tilly, H., & Bastard, C. (2012). Several mechanisms lead to the inactivation of the CDKN2A (P16), P14ARF, or CDKN2B (P15) genes in the GCB and ABC molecular DLBCL subtypes. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *51*(9), 858–867. <https://doi.org/10.1002/GCC.21970>
- Gunn, S. R., Bolla, A. R., Barron, L. L., Gorre, M. E., Mohammed, M. S., Bahler, D. W., Mellink, C. H. M., van Oers, M. H. J., Keating, M. J., Ferrajoli, A., Coombes, K. R., Abruzzo, L. V., & Robetorye, R. S. (2009). Array CGH analysis of chronic lymphocytic leukemia reveals frequent cryptic monoallelic and biallelic deletions of chromosome 22q11 that include the PRAME gene. *Leukemia Research*, *33*(9), 1276–1281. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2008.10.010>
- Gunz, F. W., Gunz, J. P., Chapman, C. J., & Houston, I. B. (1975). Familial leukaemia: a study of 909 families. *Scandinavian Journal of Haematology*, *15*(2), 117–131. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0609.1975.TB01063.X>
- Gutiontov, S. I., Turchan, W. T., Spurr, L. F., Rouhani, S. J., Chervin, C. S., Steinhardt, G., Lager, A. M., Wanjari, P., Malik, R., Connell, P. P., Chmura, S. J., Juloori, A., Hoffman, P. C., Ferguson, M. K., Donington, J. S., Patel, J. D., Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R., Bestvina, C. M., ... Pitroda, S. P. (2021). CDKN2A loss-of-function predicts immunotherapy resistance in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-99524-1>
- Haferlach, C., Dicker, F., Schnittger, S., Kern, W., & Haferlach, T. (2007). Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*, *21*(12), 2442–2451. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2404935>
- Haines, J. L., Hauser, M. A., Schmidt, S., Scott, W. K., Olson, L. M., Gallins, P., Spencer, K. L., Shu, Y. K., Nouredine, M., Gilbert, J. R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E. A., & Pericak-Vance, M. A. (2005). Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*, *308*(5720), 419–

421.

https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1110359/SUPPL_FILE/HAINES.SOM.PDF

Hallek, M., & Al-Sawaf, O. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*, *96*(12), 1679–1705. <https://doi.org/10.1002/ajh.26367>

Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M. J., Montserrat, E., Rai, K. R., & Kipps, T. J. (2008). 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*, *111*(12), 5446–5456. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-06-093906>

Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J. F., & Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, *131*(25), 2745–2760. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-09-806398>

Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A. M., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., Von Grünhagen, U., Bergmann, M., Catalano, J., Zinzani, P. L., Caligaris-Cappio, F., Seymour, J. F., Berrebi, A., Jäger, U., Cazin, B., Trnely, M., ... Stilgenbauer, S. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, *376*(9747), 1164–1174. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61381-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61381-5)

Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *94*(6), 1848–1854.

Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., & Reed, J. (1993). bcl-2 Gene Hypomethylation and High-Level Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, *82*(6), 1820–1828. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V82.6.1820.1820>

- Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>
- Harbour, J. W., Roberson, E. D. O., Anbunathan, H., Onken, M. D., Worley, L. A., & Bowcock, A. M. (2013). Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma. *Nature Genetics*, *45*(2), 133–135. <https://doi.org/10.1038/NG.2523>
- Harigai, M., Miyashita, T., Hanada, M., & Reed, J. C. (1996). A cis-acting element in the BCL-2 gene controls expression through translational mechanisms. *Oncogene*, *12*(6), 1369–1374. <https://europepmc.org/article/med/8649841>
- Harris, R. A., Wang, T., Coarfa, C., Nagarajan, R. P., Hong, C., Downey, S. L., Johnson, B. E., Fouse, S. D., Delaney, A., Zhao, Y., Olshen, A., Ballinger, T., Zhou, X., Forsberg, K. J., Gu, J., Echipare, L., O’Geen, H., Lister, R., Pelizzola, M., ... Costello, J. F. (2010). Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nature Biotechnology*, *28*(10), 1097–1105. <https://doi.org/10.1038/NBT.1682>
- Herling, C. D., Cymbalista, F., Groß-Ophoff-Müller, C., Bahlo, J., Robrecht, S., Langerbeins, P., Fink, A. M., Al-Sawaf, O., Busch, R., Porcher, R., Cazin, B., Dreyfus, B., Ibach, S., Leprêtre, S., Fischer, K., Kaiser, F., Eichhorst, B., Wentner, C. M., Hoehstetter, M. A., ... Levy, V. (2020). Early treatment with FCR versus watch and wait in patients with stage Binet A high-risk chronic lymphocytic leukemia (CLL): a randomized phase 3 trial. *Leukemia*, *34*(8), 2038–2050. <https://doi.org/10.1038/S41375-020-0747-7>
- Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., & Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, *348*(6299), 334–336. <https://doi.org/10.1038/348334A0>
- Hodgson, K., Ferrer, G., Pereira, A., Moreno, C., & Montserrat, E. (2011). Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia: diagnosis and treatment. *British Journal of Haematology*, *154*(1), 14–22. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2011.08707.X>

- Hoechstetter, M. A., Busch, R., Eichhorst, B., Bühler, A., Winkler, D., Bahlo, J., Robrecht, S., Eckart, M. J., Vehling-Kaiser, U., Jacobs, G., Jäger, U., Hurtz, H. J., Hopfinger, G., Hartmann, F., Fuss, H., Abenhardt, W., Blau, I., Freier, W., Müller, L., ... Hallek, M. (2020). Prognostic model for newly diagnosed CLL patients in Binet stage A: results of the multicenter, prospective CLL1 trial of the German CLL study group. *Leukemia*, *34*(4), 1038–1051. <https://doi.org/10.1038/S41375-020-0727-Y>
- Hoechstetter, M. A., Busch, R., Eichhorst, B., Bühler, A., Winkler, D., Eckart, M. J., Vehling-Kaiser, U., Schimke, H., Jäger, U., Hurtz, H. J., Hopfinger, G., Hartmann, F., Fuss, H., Abenhardt, W., Blau, I., Freier, W., Müller, L., Goebeler, M., Wendtner, C. M., ... Stilgenbauer, S. (2017). Early, risk-adapted treatment with fludarabine in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: results of the CLL1 trial of the German CLL study group. *Leukemia*, *31*(12), 2833–2837. <https://doi.org/10.1038/LEU.2017.246>
- Huang, Y., Wu, J.-Z., Li, J.-Y., & Xu, W. (2015). Know the enemy as well as the weapons in hand: the aberrant death pathways and therapeutic agents in chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Cancer Research*, *5*(8), 2361. </pmc/articles/PMC4568772/>
- Imataki, O., & Uemura, M. (2018). B-chronic lymphocytic leukemia showed triple transformation, to diffuse large B cell, CD20-negative, and T-cell neoplasm during ofatumumab treatment: a case report. *BMC Clinical Pathology*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/S12907-018-0072-5>
- International CLL IPI working group. (2016). An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology*, *17*(6), 779–790. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30029-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30029-8)
- Isono, K., Mizutani-Koseki, Y., Komori, T., Schmidt-Zachmann, M. S., & Koseki, H. (2005). Mammalian polycomb-mediated repression of Hox genes requires the essential spliceosomal protein Sf3b1. *Genes & Development*, *19*(5), 536–541. <https://doi.org/10.1101/GAD.1284605>
- Itchaki, G. , T. G. , I. M. R. D. , K. S. , T. B. , F. S. M. , . . . & B. J. R. (2017). Rare Germline Variant in NFATC4 Associated with Familial Chronic Lymphocytic

- Leukemia. *Blood*, 130, 2993.
https://doi.org/10.1182/BLOOD.V130.SUPPL_1.2993.2993
- Jaffe, E. S. (2009). The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 523–531. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2009.1.523>
- Jaganathan, S., Malek, E., Vallabhapurapu, S., Vallabhapurapu, S., & Driscoll, J. J. (2014). Bortezomib induces AMPK-dependent autophagosome formation uncoupled from apoptosis in drug resistant cells. *Oncotarget*, 5(23), 12358–12370. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2590>
- Jain, N., Keating, M. J., Thompson, P. A., Ferrajoli, A., Burger, J. A., Borthakur, G., Takahashi, K., Estrov, Z. E., Sasaki, K., Fowler, N. H., Kadia, T. M., Konopleva, M., Alvarado, Y., Yilmaz, M., DiNardo, C. D., Bose, P., Ohanian, M., Pemmaraju, N., Jabbour, E., ... Wierda, W. G. (2020). Combined Ibrutinib and Venetoclax for First-Line Treatment for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Focus on MRD Results. *Blood*, 136(Supplement 1), 42–43. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2020-142014>
- Jain, N., Keating, M. J., Thompson, P. A., Ferrajoli, A., Senapati, J., Burger, J. A., Borthakur, G., Takahashi, K., Estrov, Z. E., Konopleva, M., Sasaki, K., Kadia, T. M., Pemmaraju, N., Daver, N., Jabbour, E., DiNardo, C. D., Alvarado, Y., Yilmaz, M., Bose, P., ... Wierda, W. G. (2022). Combined Ibrutinib and Venetoclax for First-Line Treatment of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): 4-Year Follow-up Data. *Blood*, 140(Supplement 1), 234–237. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2022-170850>
- Jain, N., Keating, M., Thompson, P., Ferrajoli, A., Burger, J., Borthakur, G., Takahashi, K., Estrov, Z., Fowler, N., Kadia, T., Konopleva, M., Alvarado, Y., Yilmaz, M., DiNardo, C., Bose, P., Ohanian, M., Pemmaraju, N., Jabbour, E., Sasaki, K., ... Wierda, W. (2019). Ibrutinib and Venetoclax for First-Line Treatment of CLL. *The New England Journal of Medicine*, 380(22), 2095–2103. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1900574>

- Jain, N., Wierda, W. G., & O'Brien, S. (2024). Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*, *404*(10453), 694–706. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00595-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00595-6)
- Jasim, Z. F., Cooke, N., Somerville, J. E., & Hay, R. J. (2006). Chronic lymphocytic leukaemia skin infiltrates affecting prominent parts of the face and the scalp. *The British Journal of Dermatology*, *154*(5), 981–982. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2133.2006.07129.X>
- Jiang, L., Zheng, Z., Fang, H., & Yang, J. (2021). A generalized linear mixed model association tool for biobank-scale data. *Nature Genetics*, *53*(11), 1616–1621. <https://doi.org/10.1038/S41588-021-00954-4>
- Jønsson, V., Houlston, R. S., Catovsky, D., Yuille, M. R., Hilden, M. R., Olsen, J. H., Fajber, M., Brandt, B., Sellick, G., Allinson, R., & Wiik, A. (2005). CLL family “Pedigree 14” revisited: 1947–2004. *Leukemia*, *19*(6), 1025–1028. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2403727>
- Joshi, A., & Kundu, M. (2013). Mitophagy in hematopoietic stem cells: the case for exploration. *Autophagy*, *9*(11), 1737–1749. <https://doi.org/10.4161/AUTO.26681>
- Juliusson, G., & Gahrton, G. (1990). Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *45*(2), 143–160. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(90\)90079-P](https://doi.org/10.1016/0165-4608(90)90079-P)
- Juliusson, G., Oscier, D. G., Fitchett, M., Ross, F. M., Stockdill, G., Mackie, M. J., Parker, A. C., Castoldi, G. L., Cuneo, A., Knuutila, S., Elonen, E., & Gahrton, G. (1990). Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *The New England Journal of Medicine*, *323*(11), 720–724. <https://doi.org/10.1056/NEJM199009133231105>
- Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S., & Yoshida, M. (2007). Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nature Chemical Biology*, *3*(9), 576–583. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.2007.18>

- Kay, N. E., Hampel, P. J., Van Dyke, D. L., & Parikh, S. A. (2022). CLL update 2022: A continuing evolution in care. *Blood Reviews*, *54*.
<https://doi.org/10.1016/J.BLRE.2022.100930>
- Kerber, R. A., & O'Brien, E. (2005). A cohort study of cancer risk in relation to family histories of cancer in the Utah population database. *Cancer*, *103*(9), 1906–1915.
<https://doi.org/10.1002/CNCR.20989>
- Khalid, K., Padda, J., Syam, M., Moosa, A., Kakani, V., Sanka, S., Zubair, U., Padda, S., Cooper, A. C., & Jean-Charles, G. (2021). 13q14 Deletion and Its Effect on Prognosis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cureus*, *13*(8).
<https://doi.org/10.7759/CUREUS.16839>
- Khoury, J. D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J. F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J. K. C., Chen, W., Chen, X., Chng, W. J., Choi, J. K., Colmenero, I., Coupland, S. E., Cross, N. C. P., De Jong, D., Elghetany, M. T., ... Hochhaus, A. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* *2022* *36*:7, *36*(7), 1703–1719.
<https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>
- Kiefer, K., Oropallo, M. A., Cancro, M. P., & Marshak-Rothstein, A. (2012). Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells. *Immunology and Cell Biology*, *90*(5), 498–504. <https://doi.org/10.1038/ICB.2012.10>
- Kim, D. H., Lee, S. T., Won, H. H., Kim, S., Kim, M. J., Kim, H. J., Kim, S. H., Kim, J. W., Kim, H. J., Kim, Y. K., Sohn, S. K., Moon, J. H., Jung, C. W., & Lipton, J. H. (2011). A genome-wide association study identifies novel loci associated with susceptibility to chronic myeloid leukemia. *Blood*, *117*(25), 6906–6911.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-01-329797>
- Kim, H. T., Shaughnessy, C. J., Rai, S. C., Reynolds, C., Ho, V. T., Cutler, C., Koreth, J., Goptu, M., Romee, R., Nikiforow, S., Armand, P., Alyea, E. P., Antin, J. H., Wu, C. J., Soiffer, R. J., Ritz, J., & Brown, J. R. (2020). Allogeneic hematopoietic cell transplantation after prior targeted therapy for high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood Advances*, *4*(17), 4113–4123.
<https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020002184>

- Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., O'Brien, S., Gribben, J., & Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2016.96>
- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., & Dalla-Favera, R. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, 17(1), 28–40. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2009.11.019>
- Kleinstern, G., & Slager, S. L. (2023). The inherited genetic contribution and polygenic risk score for risk of CLL and MBL: a narrative review. *Leukemia & Lymphoma*, 64(4), 788–798. <https://doi.org/10.1080/10428194.2022.2157215>
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C. K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy*, 17(1), 1–382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Knight, S. J. L., Yau, C., Clifford, R., Timbs, A. T., Sadighi Akha, E., Dréau, H. M., Burns, A., Ciria, C., Oscier, D. G., Pettitt, A. R., Dutton, S., Holmes, C. C., Taylor, J., Cazier, J. B., & Schuh, A. (2012). Quantification of subclonal distributions of recurrent genomic aberrations in paired pre-treatment and relapse samples from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 26(7), 1564–1575. <https://doi.org/10.1038/LEU.2012.13>
- Kong, Y. L., Huang, Y., Wu, J. Z., Cao, X., Liang, J. H., Xia, Y., Wu, W., Cao, L., Zhu, H. Y., Wang, L., Fan, L., Li, J. Y., & Xu, W. (2018). Expression of autophagy related genes in chronic lymphocytic leukemia is associated with disease course. *Leukemia Research*, 66, 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2017.12.007>
- Koníková, E., & Kusenda, J. (2003). Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies. *Neoplasma*, 50(1), 31–40.
- Kosmaczewska, A., Ciszak, L., Suwalska, K., Wolowiec, D., & Frydecka, I. (2005). CTLA-4 overexpression in CD19+/CD5+ cells correlates with the level of cell cycle

- regulators and disease progression in B-CLL patients. *Leukemia*, *19*(2), 301–304.
<https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2403588>
- Krämer, I., Stilgenbauer, S., Dietrich, S., Böttcher, S., Zeis, M., Stadler, M., Bittenbring, J., Uharek, L., Scheid, C., Hegenbart, U., Ho, A., Hallek, M., Kneba, M., Schmitz, N., Döhner, H., & Dreger, P. (2017). Allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk CLL: 10-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood*, *130*(12), 1477–1480. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-04-775841>
- Kretzmer, H., Biran, A., Purroy, N., Lemvigh, C. K., Clement, K., Gruber, M., Gu, H., Rassenti, L., Mohammad, A. W., Lesnick, C., Slager, S. L., Braggio, E., Shanafelt, T. D., Kay, N. E., Fernandes, S. M., Brown, J. R., Wang, L., Li, S., Livak, K. J., ... Meissner, A. (2021). Preneoplastic Alterations Define CLL DNA Methylome and Persist through Disease Progression and Therapy. *Blood Cancer Discovery*, *2*(1), 54–69. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-19-0058>
- Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, *40*(2), 280–293.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.09.023>
- Kulis, M., Heath, S., Bibikova, M., Queirós, A. C., Navarro, A., Clot, G., Martínez-Trillos, A., Castellano, G., Brun-Heath, I., Pinyol, M., Barberán-Soler, S., Pappasakias, P., Jares, P., Beà, S., Rico, D., Ecker, S., Rubio, M., Royo, R., Ho, V., ... Martín-Subero, J. I. (2012). Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, *44*(11), 1236–1242. <https://doi.org/10.1038/NG.2443>
- Kurki, M. I., Karjalainen, J., Palta, P., Sipilä, T. P., Kristiansson, K., Donner, K. M., Reeve, M. P., Laivuori, H., Aavikko, M., Kaunisto, M. A., Loukola, A., Lahtela, E., Mattsson, H., Laiho, P., Della Briotta Parolo, P., Lehisto, A. A., Kanai, M., Mars, N., Rämö, J., ... Palotie, A. (2023). FinnGen provides genetic insights from a well-phenotyped isolated population. *Nature*, *613*(7944), 508–518.
<https://doi.org/10.1038/S41586-022-05473-8>
- Lai, A. Y., & Kondo, M. (2008). T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in Immunology*, *20*(4), 207.
<https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2008.05.002>

- Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., ... Wu, C. J. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, *152*(4), 714–726. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.01.019>
- Landau, D. A., & Wu, C. J. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome Medicine*, *5*(5). <https://doi.org/10.1186/GM451>
- Landi, M. T., Bishop, D. T., MacGregor, S., Machiela, M. J., Stratigos, A. J., Ghiorzo, P., Brossard, M., Calista, D., Choi, J., Fargnoli, M. C., Zhang, T., Rodolfo, M., Trower, A. J., Menin, C., Martinez, J., Hadjisavvas, A., Song, L., Stefanaki, I., Scolyer, R., ... Law, M. H. (2020). Genome-wide association meta-analyses combining multiple risk phenotypes provide insights into the genetic architecture of cutaneous melanoma susceptibility. *Nature Genetics*, *52*(5), 494–504. <https://doi.org/10.1038/S41588-020-0611-8>
- Langerbeins, P., Zhang, C., Robrecht, S., Cramer, P., Fürstenau, M., Al-Sawaf, O., von Tresckow, J., Fink, A. M., Kreuzer, K. A., Vehling-Kaiser, U., Tausch, E., Müller, L., Eckart, M. J., Schlag, R., Freier, W., Gaska, T., Balser, C., Reiser, M., Stauch, M., ... Hallek, M. (2022). The CLL12 trial: ibrutinib vs placebo in treatment-naïve, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *139*(2), 177–187. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2021010845>
- Law, P. J., Berndt, S. I., Speedy, H. E., Camp, N. J., Sava, G. P., Skibola, C. F., Holroyd, A., Joseph, V., Sunter, N. J., Nieters, A., Bea, S., Monnereau, A., Martin-Garcia, D., Goldin, L. R., Clot, G., Teras, L. R., Quintela, I., Birmann, B. M., Jayne, S., ... Slager, S. (2017). Genome-wide association analysis implicates dysregulation of immunity genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS14175>
- Law, P. J., Sud, A., Mitchell, J. S., Henrion, M., Orlando, G., Lenive, O., Broderick, P., Speedy, H. E., Johnson, D. C., Kaiser, M., Weinhold, N., Cooke, R., Sunter, N. J., Jackson, G. H., Summerfield, G., Harris, R. J., Pettitt, A. R., Allsup, D. J.,

- Carmichael, J., ... Houlston, R. S. (2017). Genome-wide association analysis of chronic lymphocytic leukaemia, Hodgkin lymphoma and multiple myeloma identifies pleiotropic risk loci. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/SREP41071>
- Lebovitz, C. B., Robertson, A. G., Goya, R., Jones, S. J., Morin, R. D., Marra, M. A., & Gorski, S. M. (2015). Cross-cancer profiling of molecular alterations within the human autophagy interaction network. *Autophagy*, 11(9), 1668–1687. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1067362>
- Lee, A., Skelly, M. E., Kingma, D. W., & Medeiros, L. J. (1995). B-cell chronic lymphocytic leukemia followed by high grade T-cell lymphoma. An unusual variant of Richter's syndrome. *American Journal of Clinical Pathology*, 103(3), 348–352. <https://doi.org/10.1093/AJCP/103.3.348>
- Lee, J. H., Budanov, A. V., Park, E. J., Birse, R., Kim, T. E., Perkins, G. A., Ocorr, K., Ellisman, M. H., Bodmer, R., Bier, E., & Karin, M. (2010). Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5970), 1223–1228. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1182228>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*, 176(1–2), 11–42. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.09.048>
- Levine, B., Sinha, S., & Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5), 600–606. <https://doi.org/10.4161/AUTO.6260>
- Li, C., Jiang, P., Wei, S., Xu, X., & Wang, J. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-020-01234-1>
- Li, Y., Hahn, T., Garrison, K., Cui, Z. H., Thorburn, A., Thorburn, J., Hu, H. M., & Akporiaye, E. T. (2012). The vitamin E analogue α -TEA stimulates tumor autophagy and enhances antigen cross-presentation. *Cancer Research*, 72(14), 3535–3545. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3103>
- Li, Y., Oosting, M., Smeekens, S. P., Jaeger, M., Aguirre-Gamboa, R., Le, K. T. T., Deelen, P., Ricaño-Ponce, I., Schoffelen, T., Jansen, A. F. M., Swertz, M. A., Withoff, S., van

- de Vosse, E., van Deuren, M., van de Veerdonk, F., Zhernakova, A., van der Meer, J. W. M., Xavier, R. J., Franke, L., ... Netea, M. G. (2016). A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in Humans. *Cell*, *167*(4), 1099-1110.e14. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.10.017>
- Liang, C., & Jung, J. U. (2010). Autophagy genes as tumor suppressors. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(2), 226–233. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2009.11.003>
- Lin, W. Y., Fordham, S. E., Sunter, N., Elstob, C., Rahman, T., Willmore, E., Shepherd, C., Strathdee, G., Mainou-Fowler, T., Piddock, R., Mearns, H., Barrow, T., Houlston, R. S., Marr, H., Wallis, J., Summerfield, G., Marshall, S., Pettitt, A., Pepper, C., ... Allan, J. M. (2021). Genome-wide association study identifies risk loci for progressive chronic lymphocytic leukemia. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-20822-9>
- Lin, X., Guan, H., Huang, Z., Liu, J., Li, H., Wei, G., Cao, X., & Li, Y. (2014). Downregulation of Bcl-2 expression by miR-34a mediates palmitate-induced Min6 cells apoptosis. *Journal of Diabetes Research*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/258695>
- Linnet, M. S., Van Natta, M. L., Brookmeyer, R., Khoury, M. J., Mccaffrey, L. D., Humphrey, R. L., & Szklo, M. (1989). Familial cancer history and chronic lymphocytic leukemia. A case-control study. *American Journal of Epidemiology*, *130*(4), 655–664. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A115387>
- Liu, F., Lee, J. Y., Wei, H., Tanabe, O., Engel, J. D., Morrison, S. J., & Guan, J. L. (2010). FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. *Blood*, *116*(23), 4806–4814. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-06-288589>
- Liu, P., Wang, K., Li, J., Ogasawara, M. A., Xia, Z., Wierda, W. G., Keating, M. J., Li, Y., & Huang, P. (2024). Global miRNA profiling reveals key molecules that contribute to different chronic lymphocytic leukemia incidences in Asian and Western populations. *Haematologica*, *109*(2), 479–492. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2023.283181>
- Lortholary, P. , R. M. , B. M. (1964). Richter's syndrome. *Nouvelle Revue Francaise d'hematologie*, *4*, 456–457.

- MacAuda, A., Clay-Gilmour, A., Hielscher, T., Hildebrandt, M. A. T., Kruszewski, M., Orłowski, R. Z., Kumar, S. K., Ziv, E., Orciuolo, E., Brown, E. E., Försti, A., Waller, R. G., MacHiela, M. J., Chanock, S. J., Camp, N. J., Rymko, M., Rażny, M., Cozen, W., Várkonyi, J., ... Canzian, F. (2022). Does a Multiple Myeloma Polygenic Risk Score Predict Overall Survival of Patients with Myeloma? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *31*(9), 1863–1866. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-22-0043>
- MacFarlane, M., Harper, N., Snowden, R. T., Dyer, M. J. S., Barnett, G. A., Pringle, J. H., & Cohen, G. M. (2002). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene*, *21*(44), 6809–6818. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1205853>
- MacFarlane, M., Inoue, S., Kohlhaas, S. L., Majid, A., Harper, N., Kennedy, D. B. J., Dyer, M. J. S., & Cohen, G. M. (2005). Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. *Cell Death and Differentiation*, *12*(7), 773–782. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4401649>
- Maddocks, K., Wei, L., Rozewski, D., Jiang, Y., Zhao, Y., Adusumilli, M., Pierceall, W. E., Doykin, C., Cardone, M. H., Jones, J. A., Flynn, J., Andritsos, L. A., Grever, M. R., Byrd, J. C., Johnson, A. J., Phelps, M. A., & Blum, K. A. (2015). Reduced occurrence of tumor flare with flavopiridol followed by combined flavopiridol and lenalidomide in patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL). *American Journal of Hematology*, *90*(4), 327–333. <https://doi.org/10.1002/AJH.23946>
- Maffei, R., Bulgarelli, J., Fiorcari, S., Bertoncelli, L., Martinelli, S., Guarnotta, C., Castelli, I., Deaglio, S., Debbia, G., De Biasi, S., Bonacorsi, G., Zucchini, P., Narni, F., Tripodo, C., Luppi, M., Cossarizza, A., & Marasca, R. (2013). The monocytic population in chronic lymphocytic leukemia shows altered composition and deregulation of genes involved in phagocytosis and inflammation. *Haematologica*, *98*(7), 1115–1123. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2012.073080>

- Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S. A., & Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 181–185. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2009.12.001>
- Maiuri, M. C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., & Kroemer, G. (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 87–93. <https://doi.org/10.1038/CDD.2008.131>
- Makishima, H., Visconte, V., Sakaguchi, H., Jankowska, A. M., Kar, S. A., Jerez, A., Przychodzen, B., Bupathi, M., Guinta, K., Afable, M. G., Sekeres, M. A., Padgett, R. A., Tiu, R. V., & Maciejewski, J. P. (2012). Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*, 119(14), 3203–3210. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-12-399774>
- Mansouri, L., Cahill, N., Gunnarsson, R., Smedby, K. E., Tjönnefjord, E., Hjalgrim, H., Juliusson, G., Geisler, C., & Rosenquist, R. (2013). NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 27(2), 512–514. <https://doi.org/10.1038/LEU.2012.307>
- Mao, Z., Quintanilla-Martinez, L., Raffeld, M., Richter, M., Krugmann, J., Burek, C., Hartmann, E., Rudiger, T., Jaffe, E. S., Müller-Hermelink, H. K., Ott, G., Fend, F., & Rosenwald, A. (2007). IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution. *The American Journal of Surgical Pathology*, 31(10), 1605–1614. <https://doi.org/10.1097/PAS.0B013E31804BDAF8>
- Marín-Béjar, O., Mas, A. M., González, J., Martínez, D., Athie, A., Morales, X., Galduroz, M., Raimondi, I., Grossi, E., Guo, S., Rouzaut, A., Ulitsky, I., & Huarte, M. (2017). The human lncRNA LINC-PINT inhibits tumor cell invasion through a highly conserved sequence element. *Genome Biology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-017-1331-Y>
- Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Garcia Marco, J., Houlihan, A., Que, T. H., & Catovsky, D. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, 8(10), 1640–1645.

- Mayr, C., Speicher, M. R., Kofler, D. M., Buhmann, R., Strehl, J., Busch, R., Hallek, M., & Wendtner, C. M. (2006). Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *107*(2), 742–751. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-05-2093>
- McCarthy, M. I., Abecasis, G. R., Cardon, L. R., Goldstein, D. B., Little, J., Ioannidis, J. P. A., & Hirschhorn, J. N. (2008). Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature Reviews. Genetics*, *9*(5), 356–369. <https://doi.org/10.1038/NRG2344>
- McEwan, D. G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F. P., MirandadeStegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., Kirchof, A., Gatti, E., Helfrich, M. H., Wakatsuki, S., Behrends, C., Pierre, P., & Dikic, I. (2015). PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Molecular Cell*, *57*(1), 39–54. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.11.006>
- Melo, J. V, Catovsky, D., & Galton, D. A. (1986). The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization of an intermediate group. *British Journal of Haematology*, *63*(2), 377–387. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3487341>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/NRG2626>
- Meyerson, M., Gabriel, S., & Getz, G. (2010). Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(10), 685–696. <https://doi.org/10.1038/NRG2841>
- Migliorini, G., Fiege, B., Hosking, F. J., Ma, Y., Kumar, R., Sherborne, A. L., Da Silva Filho, M. I., Vijaykrishnan, J., Koehler, R., Thomsen, H., Irving, J. A., Allan, J. M., Lightfoot, T., Roman, E., Kinsey, S. E., Sheridan, E., Thompson, P., Hoffmann, P., Nöthen, M. M., ... Houlston, R. S. (2013). Variation at 10p12.2 and 10p14 influences risk of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia and phenotype. *Blood*, *122*(19), 3298–3307. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-03-491316>

- Mitchell, J. S., Li, N., Weinhold, N., Försti, A., Ali, M., Van Duin, M., Thorleifsson, G., Johnson, D. C., Chen, B., Halvarsson, B. M., Gudbjartsson, D. F., Kuiper, R., Stephens, O. W., Bertsch, U., Broderick, P., Campo, C., Einsele, H., Gregory, W. A., Gullberg, U., ... Houlston, R. S. (2016). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS12050>
- Miyagawa, F., Zhang, H., Terunuma, A., Ozato, K., Tagaya, Y., & Katz, S. I. (2012). Interferon regulatory factor 8 integrates T-cell receptor and cytokine-signaling pathways and drives effector differentiation of CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(30), 12123–12128. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1201453109/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201201453SI.PDF>
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Development*, 21(22), 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/GAD.1599207>
- Molica, S., Giannarelli, D., Levato, L., Mirabelli, R., Gentile, M., & Morabito, F. (2017). Assessing time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia (CLL): a comparative performance analysis of five prognostic models with inclusion of CLL-international prognostic index (CLL-IPI). *Leukemia & Lymphoma*, 58(7), 1736–1739. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1257791>
- Molica, S., Giannarelli, D., Mirabelli, R., Levato, L., Kay, N. E., & Shanafelt, T. D. (2018). Chronic lymphocytic leukemia international prognostic index: a systematic review and meta-analysis. *Blood*, 131(3), 365–368. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-09-806034>
- Montague, A. M., & Pathak, S. (2023). Chronic Lymphocytic Leukemia With Variant Genetics. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585059/>
- Moreau, E. J., Matutes, E., A'Hern, R. P., Morilla, A. M., Morilla, R. M., Owusu-Ankomah, K. A., Seon, B. K., & Catovsky, D. (1997). Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American Journal of Clinical Pathology*, 108(4), 378–382. <https://doi.org/10.1093/AJCP/108.4.378>

- Morice, W. G., Kurtin, P. J., Hodnefield, J. M., Shanafelt, T. D., Hoyer, J. D., Remstein, E. D., & Hanson, C. A. (2008). Predictive value of blood and bone marrow flow cytometry in B-cell lymphoma classification: comparative analysis of flow cytometry and tissue biopsy in 252 patients. *Mayo Clinic Proceedings*, *83*(7), 776–785. <https://doi.org/10.4065/83.7.776>
- Morrison, W. H., Hoppe, R. T., Weiss, L. M., Picozzi, V. J., & Horning, S. J. (1989). Small lymphocytic lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *7*(5), 598–606. <https://doi.org/10.1200/JCO.1989.7.5.598>
- Mortensen, M., Soilleux, E. J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A. J., Glanville, J., Knight, S., Jacobsen, S. E. W., Kranc, K. R., & Simon, A. K. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(3), 455–467. <https://doi.org/10.1084/JEM.20101145>
- Müller, A. J., & Proikas-Cezanne, T. (2015). Function of human WIPI proteins in autophagosomal rejuvenation of endomembranes? *FEBS Letters*, *589*(14), 1546–1551. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2015.05.008>
- Mulligan, C. S., Thomas, M. E., & Mulligan, S. P. (2009). Lymphocytes, B lymphocytes, and clonal CLL cells: Observations on the impact of the new diagnostic criteria in the 2008 Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood*, *113*(25), 6496–6497. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-166710>
- Nadeu, F., Delgado, J., Royo, C., Baumann, T., Stankovic, T., Pinyol, M., Jares, P., Navarro, A., Martín-García, D., Beà, S., Salaverria, I., Oldreive, C., Aymerich, M., Suárez-Cisneros, H., Rozman, M., Villamor, N., Colomer, D., López-Guillermo, A., González, M., ... Campo, E. (2016). Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *127*(17), 2122–2130. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-07-659144>
- National Comprehensive Cancer Network. (2024). NCCN Guidelines for Patients®: Chronic lymphocytic leukemia (Version 1.2024). *National Comprehensive Cancer Network*.

- Navarrete-Meneses, M. del P., & Pérez-Vera, P. (2017). [Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia]. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, *74*(4), 243–264. <https://doi.org/10.1016/J.BMHIMX.2017.02.005>
- Naylor, M., & Capra, J. D. (1999). Mutational status of Ig V(H) genes provides clinically valuable information in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *94*(6), 1837–1839. <https://doi.org/10.1182/blood.v94.6.1837>
- Nazio, F., Bordi, M., Cianfanelli, V., Locatelli, F., & Cecconi, F. (2019). Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Death and Differentiation*, *26*(4), 690–702. <https://doi.org/10.1038/S41418-019-0292-Y>
- Nencioni, A., Cea, M., Montecucco, F., Longo, V. D., Patrone, F., Carella, A. M., Holyoake, T. L., & Vignir Helgason, G. (2013). Autophagy in blood cancers: biological role and therapeutic implications. *Haematologica*, *98*(9), 1335–1343. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2012.079061>
- Niemann, C. U., Munir, T., Moreno, C., Owen, C., Follows, G. A., Benjamini, O., Janssens, A., Levin, M. D., Robak, T., Simkovic, M., Voloshin, S., Vorobyev, V., Yagci, M., Ysebaert, L., Qi, K., Qi, Q., Sinet, P., Parisi, L., Srinivasan, S., ... Kater, A. P. (2023). Fixed-duration ibrutinib-venetoclax versus chlorambucil-obinutuzumab in previously untreated chronic lymphocytic leukaemia (GLOW): 4-year follow-up from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *24*(12), 1423–1433. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(23\)00452-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00452-7)
- Noda, T. (2017). Regulation of Autophagy through TORC1 and mTORC1. *Biomolecules*, *7*(3). <https://doi.org/10.3390/BIOM7030052>
- Noone, A. M. , H. N. , K. M. , M. D. , B. A. , Y. M. , R. J. , T. Z. , M. A. , L. D. R. , C. H. S. , F. E. J. , & C. K. A. (2018). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015. *National Cancer Institute* .
- Nüchel, H., Frey, U. H., Bau, M., Sellmann, L., Stanelle, J., Dürig, J., Jöckel, K. H., Dührsen, U., & Siffert, W. (2007). Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *109*(1), 290–297. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-03-007567>

- Onorati, A. V., Dyczynski, M., Ojha, R., & Amaravadi, R. K. (2018). Targeting autophagy in cancer. *Cancer*, *124*(16), 3307–3318. <https://doi.org/10.1002/CNCR.31335>
- Osler, W. (1909). Leukaemia. *The Principles and Practice of Medicine*, 7th. ed., 731.
- Otake, Y., Soundararajan, S., Sengupta, T. K., Kio, E. A., Smith, J. C., Pineda-Roman, M., Stuart, R. K., Spicer, E. K., & Fernandes, D. J. (2007). Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood*, *109*(7), 3069–3075. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-08-043257>
- Ott, C. J., Federation, A. J., Schwartz, L. S., Kasar, S., Klitgaard, J. L., Lenci, R., Li, Q., Lawlor, M., Fernandes, S. M., Souza, A., Polaski, D., Gadi, D., Freedman, M. L., Brown, J. R., & Bradner, J. E. (2018). Enhancer Architecture and Essential Core Regulatory Circuitry of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*, *34*(6), 982–995.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2018.11.001>
- Ouillet, P., Li, J., Shaknovich, R., Li, Y., Melnick, A., Shedden, K., & Malek, S. N. (2012). Incidence and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *51*(12), 1125–1132. <https://doi.org/10.1002/GCC.21997>
- Palma, M., Gentilcore, G., Heimersson, K., Mozaffari, F., Näsman-Glaser, B., Young, E., Rosenquist, R., Hansson, L., Österborg, A., & Mellstedt, H. (2017). T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica*, *102*(3), 562–572. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2016.151100>
- Papaemmanuil, E., Cazzola, M., Boulwood, J., Malcovati, L., Vyas, P., Bowen, D., Pellagatti, A., Wainscoat, J. S., Hellstrom-Lindberg, E., Gambacorti-Passerini, C., Godfrey, A. L., Rapado, I., Cvejic, A., Rance, R., McGee, C., Ellis, P., Mudie, L. J., Stephens, P. J., McLaren, S., ... Campbell, P. J. (2011). Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *The New England Journal of Medicine*, *365*(15), 1384–1395. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1103283>
- Papakonstantinou, N., Ntoufa, S., Chartomatsidou, E., Kotta, K., Agathangelidis, A., Giassafaki, L., Karamanli, T., Bele, P., Moysiadis, T., Baliakas, P., Sutton, L. A., Stavroyianni, N., Anagnostopoulos, A., Makris, A. M., Ghia, P., Rosenquist, R., &

- Stamatopoulos, K. (2016). The histone methyltransferase EZH2 as a novel prosurvival factor in clinically aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 7(24), 35946–35959. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9371>
- Parikh, S. A., Rabe, K. G., Call, T. G., Zent, C. S., Habermann, T. M., Ding, W., Leis, J. F., Schwager, S. M., Hanson, C. A., Macon, W. R., Kay, N. E., Slager, S. L., & Shanafelt, T. D. (2013). Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *British Journal of Haematology*, 162(6), 774–782. <https://doi.org/10.1111/BJH.12458>
- Parikh, S. A., Rabe, K. G., Kay, N. E., Call, T. G., Ding, W., Schwager, S. M., Bowen, D. A., Conte, M., Jelinek, D. F., Slager, S. L., & Shanafelt, T. D. (2014). Chronic lymphocytic leukemia in young (≤ 55 years) patients: a comprehensive analysis of prognostic factors and outcomes. *Haematologica*, 99(1), 140–147. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2013.086066>
- Parker, H., Rose-Zerilli, M. J. J., Larrayoz, M., Clifford, R., Edelmann, J., Blakemore, S., Gibson, J., Wang, J., Ljungström, V., Wojdacz, T. K., Chaplin, T., Roghanian, A., Davis, Z., Parker, A., Tausch, E., Ntoufa, S., Ramos, S., Robbe, P., Alsolami, R., ... Strefford, J. C. (2016). Genomic disruption of the histone methyltransferase SETD2 in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 30(11), 2179–2186. <https://doi.org/10.1038/LEU.2016.134>
- Pastore, A., Gaiti, F., Lu, S. X., Brand, R. M., Kulm, S., Chaligne, R., Gu, H., Huang, K. Y., Stamenova, E. K., Béguelin, W., Jiang, Y., Schulman, R. C., Kim, K. T., Alonso, A., Allan, J. N., Furman, R. R., Gnirke, A., Wu, C. J., Melnick, A. M., ... Landau, D. A. (2019). Corrupted coordination of epigenetic modifications leads to diverging chromatin states and transcriptional heterogeneity in CLL. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-09645-5>
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Xiao, H. L., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., & Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927–939. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.07.002>

- Pavan, S., Delvento, C., Ricciardi, L., Lotti, C., Ciani, E., & D'Agostino, N. (2020). Recommendations for Choosing the Genotyping Method and Best Practices for Quality Control in Crop Genome-Wide Association Studies. *Frontiers in Genetics*, *11*, 506075. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.00447/BIBTEX>
- Pegliasco, J., Hirsch, P., Marzac, C., Isnard, F., Meniane, J. C., Deswarte, C., Pellet, P., Lemaitre, C., Leroy, G., Rabadan Moraes, G., Guermouche, H., Schmaltz-Panneau, B., Pasquier, F., Colas, C., Benusiglio, P. R., Bera, O., Bourhis, J. H., Brissot, E., Caron, O., ... Bellanné-Chantelot, C. (2022). Germline ATG2B/GSKIP-containing 14q32 duplication predisposes to early clonal hematopoiesis leading to myeloid neoplasms. *Leukemia*, *36*(1), 126–137. <https://doi.org/10.1038/S41375-021-01319-W>
- Pekarsky, Y., Balatti, V., & Croce, C. M. (2018). BCL2 and miR-15/16: from gene discovery to treatment. *Cell Death and Differentiation*, *25*(1), 21–26. <https://doi.org/10.1038/CDD.2017.159>
- Peller, S., & Kaufman, S. (1991). Decreased CD45RA T Cells in B-Cell Chronic Lymphatic Leukemia Patients: Correlation With Disease Stage. *Blood*, *78*(6), 1569–1573. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V78.6.1569.1569>
- Pflug, N., Bahlo, J., Shanafelt, T. D., Eichhorst, B. F., Bergmann, M. A., Elter, T., Bauer, K., Malchau, G., Rabe, K. G., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Jäger, U., Eckart, M. J., Hopfinger, G., Busch, R., Fink, A.-M., Wendtner, C.-M., Fischer, K., Kay, N. E., & Hallek, M. (2014). Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *124*(1), 49–62. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-556399>
- Phadwal, K., Watson, A. S., & Simon, A. K. (2013). Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *70*(1), 89–103. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-1032-3>
- Phipps, A. I., Passarelli, M. N., Chan, A. T., Harrison, T. A., Jeon, J., Hutter, C. M., Berndt, S. I., Brenner, H., Caan, B. J., Campbell, P. T., Chang-Claude, J., Chanock, S. J., Cheadle, J. P., Curtis, K. R., Duggan, D., Fisher, D., Fuchs, C. S., Gala, M., Giovannucci, E. L., ... Newcomb, P. A. (2016). Common genetic variation and

- survival after colorectal cancer diagnosis: a genome-wide analysis. *Carcinogenesis*, 37(1), 87–95. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGV161>
- Pitini, V. V. (2011). The role of p53 and autophagy in Dasatinib resistance of CLL lymphocytes. *Leukemia Research*, 35(1), 32–33. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2010.07.007>
- Porpaczy, E., & Jäger, U. (2022). How I manage autoimmune cytopenias in patients with lymphoid cancer. *Blood*, 139(10), 1479–1488. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2019003686>
- Pospisilova, S., Gonzalez, D., Malcikova, J., Trbusek, M., Rossi, D., Kater, A. P., Cymbalista, F., Eichhorst, B., Hallek, M., Döhner, H., Hillmen, P., Van Oers, M., Gribben, J., Ghia, P., Montserrat, E., Stilgenbauer, S., & Zenz, T. (2012). ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 26(7), 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/LEU.2012.25>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/155.2.945>
- Pua, H. H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N., & He, Y. W. (2007). A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(1), 25–31. <https://doi.org/10.1084/JEM.20061303>
- Puente, X. S., Beà, S., Valdés-Mas, R., Villamor, N., Gutiérrez-Abril, J., Martín-Subero, J. I., Munar, M., Rubio-Pérez, C., Jares, P., Aymerich, M., Baumann, T., Beekman, R., Belver, L., Carrio, A., Castellano, G., Clot, G., Colado, E., Colomer, D., Costa, D., ... Campo, E. (2015). Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 526(7574), 519–524. <https://doi.org/10.1038/NATURE14666>
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G. R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Beá, S., González-Díaz, M., Bassaganyas, L., Baumann, T., Juan, M., López-Guerra, M., Colomer, D., Tubío, J. M. C., López, C., Navarro, A., Tornador, C., ... Campo, E. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475(7354), 101–105. <https://doi.org/10.1038/NATURE10113>

- Puiggros, A., Blanco, G., & Espinet, B. (2014). Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/435983>
- Qian, G. X. , F. S. M. , S. D. L. , & R. K. R. (1984). Circulating monoclonal IgM proteins in B cell chronic lymphocytic leukemia: their identification, characterization and relationship to membrane IgM. *Journal of Immunology*, 133(6), 3396–3400.
- Qian, Y., Shi, L., & Luo, Z. (2020). Long Non-coding RNAs in Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Frontiers in Medicine*, 7. <https://doi.org/10.3389/FMED.2020.612393>
- Queirós, A. C., Villamor, N., Clot, G., Martínez-Trillos, A., Kulis, M., Navarro, A., Penas, E. M. M., Jayne, S., Majid, A., Richter, J., Bergmann, A. K., Kolarova, J., Royo, C., Russiñol, N., Castellano, G., Pinyol, M., Bea, S., Salaverria, I., López-Guerra, M., ... Martín-Subero, J. I. (2015). A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia*, 29(3), 598–605. <https://doi.org/10.1038/LEU.2014.252>
- Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordóñez, G. R., Jares, P., Bassaganyas, L., Ramsay, A. J., Beà, S., Pinyol, M., Martínez-Trillos, A., López-Guerra, M., Colomer, D., Navarro, A., Baumann, T., Aymerich, M., Rozman, M., Delgado, J., Giné, E., Hernández, J. M., ... López-Otín, C. (2011). Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, 44(1), 47–52. <https://doi.org/10.1038/NG.1032>
- Quesada, V., Ramsay, A. J., Rodríguez, D., Puente, X. S., Campo, E., & López-Otín, C. (2013). *The genomic landscape of chronic lymphocytic leukemia: clinical implications*. <http://cancergenome.nih.gov/>
- Rai, K. R. (1987). A critical analysis of staging in CLL. *Chronic Lymphocytic Leukemia, Recent Progress and Future Directions*, 253–264. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570291226083218048>
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46(2), 219–234.

- Ramsay, A. G., Johnson, A. J., Lee, A. M., Gorgün, G., Le Dieu, R., Blum, W., Byrd, J. C., & Gribben, J. G. (2008a). Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(7). <https://doi.org/10.1172/JCI35017>
- Ramsay, A. G., Johnson, A. J., Lee, A. M., Gorgün, G., Le Dieu, R., Blum, W., Byrd, J. C., & Gribben, J. G. (2008b). Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(7). <https://doi.org/10.1172/JCI35017>
- Ramsay, A. J., Rodríguez, D., Villamor, N., Kwarciak, A., Tejedor, J. R., Valcárcel, J., López-Guillermo, A., Martínez-Trillos, A., Puente, X. S., Campo, E., López-Otín, C., & Quesada, V. (2013). Frequent somatic mutations in components of the RNA processing machinery in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *27*(7), 1600–1603. <https://doi.org/10.1038/LEU.2012.344>
- Rashkin, S. R., Graff, R. E., Kachuri, L., Thai, K. K., Alexeeff, S. E., Blatchins, M. A., Cavazos, T. B., Corley, D. A., Emami, N. C., Hoffman, J. D., Jorgenson, E., Kushi, L. H., Meyers, T. J., Van Den Eeden, S. K., Ziv, E., Habel, L. A., Hoffmann, T. J., Sakoda, L. C., & Witte, J. S. (2020). Pan-cancer study detects genetic risk variants and shared genetic basis in two large cohorts. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-18246-6>
- Ratterman, M., Kruczek, K., Sulo, S., Shanafelt, T. D., Kay, N. E., & Nabhan, C. (2014). Extramedullary chronic lymphocytic leukemia: systematic analysis of cases reported between 1975 and 2012. *Leukemia Research*, *38*(3), 299–303. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2013.08.009>
- Ravanan, P., Srikumar, I. F., & Talwar, P. (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sciences*, *188*, 53–67. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2017.08.029>
- Rawstron, A. C., Bennett, F. L., O'Connor, S. J. M., Kwok, M., Fenton, J. A. L., Plummer, M., de Tute, R., Owen, R. G., Richards, S. J., Jack, A. S., & Hillmen, P. (2008). Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *The New*

England Journal of Medicine, 359(6), 575–583.
<https://doi.org/10.1056/NEJMOA075290>

Rawstron, A. C., Kreuzer, K. A., Soosapilla, A., Spacek, M., Stehlikova, O., Gambell, P., McIver-Brown, N., Villamor, N., Psarra, K., Arroz, M., Milani, R., de la Serna, J., Cedena, M. T., Jaksic, O., Nomdedeu, J., Moreno, C., Rigolin, G. M., Cuneo, A., Johansen, P., ... Montserrat, E. (2018). Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 94(1), 121–128.
<https://doi.org/10.1002/CYTO.B.21595>

Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). (2022). *Informe de estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2023*.
<https://redecn.org/storage/documents/09a96a55-6939-419d-ba3e-202d7ae76e1d.pdf>

Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J., & Kircher, M. (2019). CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D886–D894. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1016>

Riffelmacher, T., & Simon, A. K. (2017). Mechanistic roles of autophagy in hematopoietic differentiation. *The FEBS Journal*, 284(7), 1008–1020.
<https://doi.org/10.1111/FEBS.13962>

Rigolin, G. M., Cavallari, M., Quaglia, F. M., Formigaro, L., Lista, E., Urso, A., Guardalben, E., Liberatore, C., Faraci, D., Saccenti, E., Bassi, C., Lupini, L., Bardi, M. A., Volta, E., Tammiso, E., Melandri, A., Negrini, M., Cavazzini, F., & Cuneo, A. (2017). In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood*, 129(26), 3495–3498.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-03-772285>

Ringelstein-Harlev, S., Avivi, I., Fanadka, M., Horowitz, N. A., & Katz, T. (2018). Chronic lymphocytic leukemia cells acquire regulatory B-cell properties in response to TLR9 and CD40 activation. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 67(5), 739–748. <https://doi.org/10.1007/S00262-018-2128-X>

- Rizzo, D., Chauzeix, J., Trimoreau, F., Woillard, J. B., Genevieve, F., Bouvier, A., Labrousse, J., Poli, C., Guerin, E., Dmytruk, N., Remenieras, L., Feuillard, J., & Gachard, N. (2015). IgM peak independently predicts treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia and correlates with accumulation of adverse oncogenetic events. *Leukemia*, *29*(2), 337–345. <https://doi.org/10.1038/LEU.2014.198>
- Robak, T., Krawczyńska, A., Cebula-Obrzut, B., Urbaniak, M., Iskierka-Jażdżewska, E., & Robak, P. (2023). Atypical Chronic Lymphocytic Leukemia-The Current Status. *Cancers*, *15*(18). <https://doi.org/10.3390/CANCERS15184427>
- Robbe, P., Ridout, K. E., Vavoulis, D. V., Dréau, H., Kinnersley, B., Denny, N., Chubb, D., Appleby, N., Cutts, A., Cornish, A. J., Lopez-Pascua, L., Clifford, R., Burns, A., Stamatopoulos, B., Cebes, M., Alsolami, R., Antoniou, P., Oates, M., Cavalieri, D., ... Schuh, A. (2022). Whole-genome sequencing of chronic lymphocytic leukemia identifies subgroups with distinct biological and clinical features. *Nature Genetics*, *54*(11), 1675–1689. <https://doi.org/10.1038/S41588-022-01211-Y>
- Robertson, L. E., Plunkett, W., McConnell, K., Keating, M. J., & McDonnell, T. J. (1996a). Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*, *10*(3), 456–459.
- Robertson, L. E., Plunkett, W., McConnell, K., Keating, M. J., & McDonnell, T. J. (1996b). Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*, *10*(3), 456–459. <https://europepmc.org/article/med/8642861>
- Rodríguez, A. E., Robledo, C., García, J. L., González, M., Gutiérrez, N. C., Hernández, J. A., Sandoval, V., García de Coca, A., Recio, I., Risueño, A., Martín-Núñez, G., García, E., Fisac, R., Conde, J., De las Rivas, J., & Hernández, J. M. (2012). Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *23*(8), 2138–2146. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDR579>
- Rodríguez, D., Bretones, G., Quesada, V., Villamor, N., Arango, J. R., López-Guillermo, A., Ramsay, A. J., Baumann, T., Quirós, P. M., Navarro, A., Royo, C., Martín-

- Subero, J. I., Campo, E., & López-Otín, C. (2015). Mutations in CHD2 cause defective association with active chromatin in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *126*(2), 195–202. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-10-604959>
- Rodríguez-Vicente, A. E., Díaz, M. G., & Hernández-Rivas, J. M. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease. *Cancer Genetics*, *206*(3), 49–62. <https://doi.org/10.1016/J.CANCERGEN.2013.01.003>
- Roeker, L. E., Dreger, P., Brown, J. R., Lahoud, O. B., Eyre, T. A., Brander, D. M., Skarbnik, A., Coombs, C. C., Kim, H. T., Davids, M., Manchini, S. T., George, G., Shah, N., Voorhees, T. J., Orchard, K. H., Walter, H. S., Arumainathan, A. K., Sitlinger, A., Park, J. H., ... Mato, A. R. (2020). Allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia in the era of novel agents. *Blood Advances*, *4*(16), 3977–3989. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020001956>
- Romero-Macías, J. R., Pascual-Serra, R., Roche, O., Ruiz-Marcos, F., Serrano-Martínez, A., González-Aguado, P., Belandia, B., Ruiz-Hidalgo, M. J., & Sánchez-Prieto, R. (2019). Blockage of autophagic flux is associated with lymphocytosis and higher percentage of tumoral cells in chronic lymphocytic leukemia of B cells. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *21*(9), 1280–1285. <https://doi.org/10.1007/S12094-019-02041-X>
- Rosati, E., Sabatini, R., De Falco, F., Del Papa, B., Falzetti, F., Di Ianni, M., Cavalli, L., Fettucciari, K., Bartoli, A., Screpanti, I., & Marconi, P. (2013). γ -Secretase inhibitor I induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress increase and notch down-regulation. *International Journal of Cancer*, *132*(8), 1940–1953. <https://doi.org/10.1002/IJC.27863>
- Rossi, D., Brusca, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., Fangazio, M., Vaisitti, T., Monti, S., Chiaretti, S., Guarini, A., Del Giudice, I., Cerri, M., Cresta, S., Deambrogi, C., Gargiulo, E., Gattei, V., Forconi, F., Bertoni, F., ... Gaidano, G. (2011). Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*, *118*(26), 6904–6908. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-08-373159>

- Rossi, D., Cerri, M., Capello, D., Deambrogi, C., Rossi, F. M., Zucchetto, A., De Paoli, L., Cresta, S., Rasi, S., Spina, V., Franceschetti, S., Lunghi, M., Vendramin, C., Bomben, R., Ramponi, A., Monga, G., Conconi, A., Magnani, C., Gattei, V., & Gaidano, G. (2008). Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *British Journal of Haematology*, *142*(2), 202–215. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2008.07166.X>
- Rossi, D., Fangazio, M., & Gaidano, G. (2012). The spectrum of genetic defects in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *4*(1). <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.076>
- Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., Del Giudice, I., Fabbri, G., Bruscaggin, A., Spina, V., Deambrogi, C., Marinelli, M., Famà, R., Greco, M., Daniele, G., Forconi, F., Gattei, V., Bertoni, F., ... Gaidano, G. (2012). Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *119*(12), 2854–2862. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-12-395673>
- Rossi, D., Khiabani, H., Spina, V., Ciardullo, C., Bruscaggin, A., Famà, R., Rasi, S., Monti, S., Deambrogi, C., De Paoli, L., Wang, J., Gattei, V., Guarini, A., Foà, R., Rabadan, R., & Gaidano, G. (2014). Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *123*(14), 2139–2147. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-11-539726>
- Rossi, D., Rasi, S., Fabbri, G., Spina, V., Fangazio, M., Forconi, F., Marasca, R., Laurenti, L., Bruscaggin, A., Cerri, M., Monti, S., Cresta, S., Famà, R., De Paoli, L., Bulian, P., Gattei, V., Guarini, A., Deaglio, S., Capello, D., ... Gaidano, G. (2012). Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *119*(2), 521–529. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-09-379966>
- Rossi, D., Spina, V., Cerri, M., Rasi, S., Deambrogi, C., De Paoli, L., Laurenti, L., Maffei, R., Forconi, F., Bertoni, F., Zucca, E., Agostinelli, C., Cabras, A., Lucioni, M., Martini, M., Magni, M., Deaglio, S., Ladetto, M., Nomdedeu, J. F., ... Gaidano, G. (2009). Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clinical Cancer*

- Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(13), 4415–4422. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3266>
- Rossi, D., Spina, V., & Gaidano, G. (2018). Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood*, 131(25), 2761–2772. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-01-791376>
- Rothe, K., Porter, V., & Jiang, X. (2019). Current Outlook on Autophagy in Human Leukemia: Foe in Cancer Stem Cells and Drug Resistance, Friend in New Therapeutic Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS20030461>
- Ruiz, O. G., Sánchez-Maldonado, J. M., López-Nevot, M. Á., García, P., Macaudo, A., Hernández-Mohedo, F., González-Sierra, P. A., Martínez-Bueno, M., Pérez, E., Reyes-Zurita, F. J., Campa, D., Canzian, F., Jurado, M., Rodríguez-Sevilla, J. J., & Sainz, J. (2022). Autophagy in Hematological Malignancies. *Cancers*, 14(20). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14205072>
- Saliba, J., Saint-Martin, C., Di Stefano, A., Lenglet, G., Marty, C., Keren, B., Pasquier, F., Della Valle, V., Secardin, L., Leroy, G., Mahfoudhi, E., Grosjean, S., Droin, N., Diop, M., Dessen, P., Charrier, S., Palazzo, A., Merlevede, J., Meniane, J. rme, ... Plo, I. (2015). Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nature Genetics*, 47(10), 1131–1140. <https://doi.org/10.1038/NG.3380>
- Santos, F. P. S., & O'Brien, S. (2012). Small lymphocytic lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: are they the same disease? *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 18(5), 396–403. <https://doi.org/10.1097/PPO.0B013E31826CDA2D>
- Scarfò, L., Ferreri, A. J. M., & Ghia, P. (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 104, 169–182. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2016.06.003>
- Schmidt, A., Oberle, N., & Krammer, P. H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in Immunology*, 3(MAR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00051>
- Schuh, A., Becq, J., Humphray, S., Alexa, A., Burns, A., Clifford, R., Feller, S. M., Grocock, R., Henderson, S., Khrebtukova, I., Kingsbury, Z., Luo, S., McBride, D.,

- Murray, L., Menju, T., Timbs, A., Ross, M., Taylor, J., & Bentley, D. (2012). Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*, *120*(20), 4191–4196. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-05-433540>
- Scrivener, S., Goddard, R. V., Kaminski, E. R., & Prentice, A. G. (2003). Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia & Lymphoma*, *44*(3), 383–389. <https://doi.org/10.1080/1042819021000029993>
- Secchiero, P., Tiribelli, M., Barbarotto, E., Celeghini, C., Michelutti, A., Masolini, P., Fanin, R., & Zauli, G. (2005). Aberrant expression of TRAIL in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Journal of Cellular Physiology*, *205*(2), 246–252. <https://doi.org/10.1002/JCP.20392>
- Seiffert, M., Dietrich, S., Jethwa, A., Glimm, H., Lichter, P., & Zenz, T. (2012). Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *53*(6), 1023–1031. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.631638>
- Sellick, G. S., Goldin, L. R., Wild, R. W., Slager, S. L., Ressenti, L., Strom, S. S., Dyer, M. J. S., Mauro, F. R., Marti, G. E., Fuller, S., Lyttelton, M., Kipps, T. J., Keating, M. J., Call, T. G., Catovsky, D., Caporaso, N., & Houlston, R. S. (2007). A high-density SNP genome-wide linkage search of 206 families identifies susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *110*(9), 3326–3333. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-05-091561>
- Sellick, G. S., Webb, E. L., Allinson, R., Matutes, E., Dyer, M. J. S., Jønsson, V., Langerak, A. W., Mauro, F. R., Fuller, S., Wiley, J., Lyttelton, M., Callea, V., Yuille, M., Catovsky, D., & Houlston, R. S. (2005). A high-density SNP genomewide linkage scan for chronic lymphocytic leukemia-susceptibility loci. *American Journal of Human Genetics*, *77*(3), 420–429. <https://doi.org/10.1086/444472>
- Shaffer, A. L., Tolga Emre, N. C., Romesser, P. B., & Staudt, L. M. (2009). IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(9), 2954–2961. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1845>

- Shahrabi, S., Paridar, M., Zeinvand-Lorestani, M., Jalili, A., Zibara, K., Abdollahi, M., & Khosravi, A. (2019). Autophagy regulation and its role in normal and malignant hematopoiesis. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(12), 21746–21757. <https://doi.org/10.1002/JCP.28903>
- Shanafelt, T. D., Jenkins, G., Call, T. G., Zent, C. S., Slager, S., Bowen, D. A., Schwager, S., Hanson, C. A., Jelinek, D. F., & Kay, N. E. (2009). Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, *115*(2), 363–372. <https://doi.org/10.1002/cncr.24004>
- Shanafelt, T. D., Kay, N. E., Parikh, S. A., Achenbach, S. J., Lesnick, C. E., Hanson, C. A., Kleinstern, G., Olson, J. E., Norman, A. D., Rabe, K. G., Schwager, S. M., Call, T. G., & Slager, S. L. (2021). Risk of serious infection among individuals with and without low count monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL). *Leukemia*, *35*(1), 239. <https://doi.org/10.1038/S41375-020-0799-8>
- Shanafelt, T. D., Witzig, T. E., Fink, S. R., Jenkins, R. B., Paternoster, S. F., Smoley, S. A., Stockero, K. J., Nast, D. M., Flynn, H. C., Tschumper, R. C., Geyer, S., Zent, C. S., Call, T. G., Jelinek, D. F., Kay, N. E., & Dewald, G. W. (2006). Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *24*(28), 4634–4641. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.9492>
- Shanesazzade, Z., Peymani, M., Ghaedi, K., & Nasr Esfahani, M. H. (2018). miR-34a/BCL-2 signaling axis contributes to apoptosis in MPP+ -induced SH-SY5Y cells. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *6*(6), 975–981. <https://doi.org/10.1002/MGG3.469>
- Shao, X., Meng, X., Yang, H., Wang, X., Qin, L., Shen, G., Xi, X., Zhao, H., Macip, S., & Chen, Y. (2023). IFN- γ enhances CLL cell resistance to ABT-199 by regulating MCL-1 and BCL-2 expression via the JAK-STAT3 signaling pathway. *Leukemia & Lymphoma*, *64*(1), 71–78. <https://doi.org/10.1080/10428194.2022.2131408>
- Sharma, A., Singh, K., Mazumder, S., Hill, B. T., Kalaycio, M., & Almasan, A. (2013). BECN1 and BIM interactions with MCL-1 determine fludarabine resistance in

- leukemic B cells. *Cell Death & Disease*, 4(5).
<https://doi.org/10.1038/CDDIS.2013.155>
- Sharma, K., Le, N., Alotaibi, M., & Gewirtz, D. A. (2014). Cytotoxic autophagy in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 10034–10051.
<https://doi.org/10.3390/IJMS150610034>
- Shenhe, J. I. N., Juying, W. E. I., Liangshun, Y. O. U., Hui, L. I. U., & Qian, W. (2018). Autophagy regulation and its dual role in blood cancers: A novel target for therapeutic development (Review). *Oncology Reports*, 39(6), 2473–2481.
<https://doi.org/10.3892/OR.2018.6370>
- Sherborne, A. L., Hosking, F. J., Prasad, R. B., Kumar, R., Koehler, R., Vijayakrishnan, J., Papaemmanuil, E., Bartram, C. R., Stanulla, M., Schrappe, M., Gast, A., Dobbins, S. E., Ma, Y., Sheridan, E., Taylor, M., Kinsey, S. E., Lightfoot, T., Roman, E., Irving, J. A. E., ... Houlston, R. S. (2010). Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nature Genetics*, 42(6), 492–494.
<https://doi.org/10.1038/NG.585>
- Shukla, V., Ma, S., Hardy, R. R., Joshi, S. S., & Lu, R. (2013). A role for IRF4 in the development of CLL. *Blood*, 122(16), 2848–2855. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-03-492769>
- Siddiqi, T., Maloney, D. G., Kenderian, S. S., Brander, D. M., Dorritie, K., Soumerai, J., Riedell, P. A., Shah, N. N., Nath, R., Fakhri, B., Stephens, D. M., Ma, S., Feldman, T., Solomon, S. R., Schuster, S. J., Perna, S. K., Tuazon, S. A., Ou, S. S., Papp, E., ... Wierda, W. G. (2023). Lisocabtagene maraleucel in chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma (TRANSCEND CLL 004): a multicentre, open-label, single-arm, phase 1-2 study. *Lancet (London, England)*, 402(10402), 641–654. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01052-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01052-8)
- Siddiqi, T., Soumerai, J. D., Dorritie, K. A., Stephens, D. M., Riedell, P. A., Arnason, J. E., Kipps, T. J., Gillenwater, H. H., Gong, L., Yang, L., Ogasawara, K., & Wierda, W. G. (2020). Updated Follow-up of Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma Treated with Lisocabtagene Maraleucel in the Phase 1 Monotherapy Cohort of Transcend CLL 004, Including

- High-Risk and Ibrutinib-Treated Patients. *Blood*, 136(Supplement 1), 40–41.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2020-140491>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48.
<https://doi.org/10.3322/CAAC.21763>
- Sillé, F. C. M., Thomas, R., Smith, M. T., Conde, L., & Skibola, C. F. (2012). Post-GWAS functional characterization of susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia. *PloS One*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0029632>
- Silva, V. R., Neves, S. P., Santos, L. de S., Dias, R. B., & Bezerra, D. P. (2020). Challenges and Therapeutic Opportunities of Autophagy in Cancer Therapy. *Cancers*, 12(11), 1–36. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12113461>
- Simonetti, G., Carette, A., Silva, K., Wang, H., De Silva, N. S., Heise, N., Siebel, C. W., Shlomchik, M. J., & Klein, U. (2013). IRF4 controls the positioning of mature B cells in the lymphoid microenvironments by regulating NOTCH2 expression and activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(13), 2887–2902.
<https://doi.org/10.1084/JEM.20131026>
- Slager, S. L., Lanasa, M. C., Marti, G. E., Achenbach, S. J., Camp, N. J., Abbasi, F., Kay, N. E., Vachon, C. M., Cerhan, J. R., Johnston, J. B., Call, T. G., Rabe, K. G., Kleinstern, G., Boddicker, N. J., Norman, A. D., Parikh, S. A., Leis, J. F., Banerji, V., Brander, D. M., ... Caporaso, N. E. (2021). Natural history of monoclonal B-cell lymphocytosis among relatives in CLL families. *Blood*, 137(15), 2046–2056.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD.2020006322>
- Slager, S. L., Rabe, K. G., Achenbach, S. J., Vachon, C. M., Goldin, L. R., Strom, S. S., Lanasa, M. C., Spector, L. G., Rassenti, L. Z., Leis, J. F., Camp, N. J., Glenn, M., Kay, N. E., Cunningham, J. M., Hanson, C. A., Marti, G. E., Weinberg, J. B., Morrison, V. A., Link, B. K., ... Cerhan, J. R. (2011). Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood*, 117(6), 1911–1916. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-09-308205>
- Slager, S. L., Skibola, C. F., Di Bernardo, M. C., Conde, L., Broderick, P., McDonnell, S. K., Goldin, L. R., Croft, N., Holroyd, A., Harris, S., Riby, J., Serie, D. J., Kay, N. E., Call, T. G., Bracci, P. M., Halperin, E., Lanasa, M. C., Cunningham, J. M., Leis, J.

- F., ... Houlston, R. S. (2012). Common variation at 6p21.31 (BAK1) influences the risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *120*(4), 843–846. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-03-413591>
- Slatkin, M. (2008). Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews. Genetics*, *9*(6), 477–485. <https://doi.org/10.1038/NRG2361>
- Smith, S. M., & Maughan, P. J. (2015). SNP genotyping using KASPar assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1245*, 243–256. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_18
- Son, H. J., Mo, H. Y., Yoo, N. J., & Lee, S. H. (2020). Somatic mutations of cancer-related genes PELP1 and BDP1 in colorectal cancers. *Pathology, Research and Practice*, *216*(10). <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2020.153107>
- Sotthibundhu, A., Promjuntuek, W., Liu, M., Shen, S., & Noisa, P. (2018). Roles of autophagy in controlling stem cell identity: a perspective of self-renewal and differentiation. *Cell and Tissue Research*, *374*(2), 205–216. <https://doi.org/10.1007/S00441-018-2829-7>
- Speedy, H. E., Beekman, R., Chapaprieta, V., Orlando, G., Law, P. J., Martín-García, D., Gutiérrez-Abril, J., Catovsky, D., Beà, S., Clot, G., Puiggròs, M., Torrents, D., Puente, X. S., Allan, J. M., López-Otín, C., Campo, E., Houlston, R. S., & Martín-Subero, J. I. (2019). Insight into genetic predisposition to chronic lymphocytic leukemia from integrative epigenomics. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11582-2>
- Speedy, H. E., Di Bernardo, M. C., Sava, G. P., Dyer, M. J. S., Holroyd, A., Wang, Y., Sunter, N. J., Mansouri, L., Juliusson, G., Smedby, K. E., Roos, G., Jayne, S., Majid, A., Dearden, C., Hall, A. G., Mainou-Fowler, T., Jackson, G. H., Summerfield, G., Harris, R. J., ... Houlston, R. S. (2013). A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics* *2013* *46:1*, *46*(1), 56–60. <https://doi.org/10.1038/ng.2843>
- Speedy, H. E., Di Bernardo, M. C., Sava, G. P., Dyer, M. J. S., Holroyd, A., Wang, Y., Sunter, N. J., Mansouri, L., Juliusson, G., Smedby, K. E., Roos, G., Jayne, S., Majid, A., Dearden, C., Hall, A. G., Mainou-Fowler, T., Jackson, G. H., Summerfield, G.,

- Harris, R. J., ... Houlston, R. S. (2014a). A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, 46(1), 56–60. <https://doi.org/10.1038/NG.2843>
- Speedy, H. E., Di Bernardo, M. C., Sava, G. P., Dyer, M. J. S., Holroyd, A., Wang, Y., Sunter, N. J., Mansouri, L., Juliusson, G., Smedby, K. E., Roos, G., Jayne, S., Majid, A., Dearden, C., Hall, A. G., Mainou-Fowler, T., Jackson, G. H., Summerfield, G., Harris, R. J., ... Houlston, R. S. (2014b). A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, 46(1), 56–60. <https://doi.org/10.1038/NG.2843>
- Speedy, H. E., Kinnersley, B., Chubb, D., Broderick, P., Law, P. J., Litchfield, K., Jayne, S., Dyer, M. J. S., Dearden, C., Follows, G. A., Catovsky, D., & Houlston, R. S. (2016). Germ line mutations in shelterin complex genes are associated with familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 128(19), 2319–2326. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-01-695692>
- Spier, C. M., Kjeldsberg, C. R., Head, D. R., DiFiore, K. C., & Tudor, B. (1985). Chronic lymphocytic leukemia in young adults. *American Journal of Clinical Pathology*, 84(5), 675–678. <https://doi.org/10.1093/AJCP/84.5.675>
- Sportoletti, P., Baldoni, S., Cavalli, L., Del Papa, B., Bonifacio, E., Ciurnelli, R., Bell, A. S., Di Tommaso, A., Rosati, E., Crescenzi, B., Mecucci, C., Screpanti, I., Marconi, P., Martelli, M. F., Di Ianni, M., & Falzetti, F. (2010). NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *British Journal of Haematology*, 151(4), 404–406. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2010.08368.X>
- Stephens, D. M., Ruppert, A. S., Maddocks, K., Andritsos, L., Baiocchi, R., Jones, J., Johnson, A. J., Smith, L. L., Zhao, Y., Ling, Y., Li, J., Phelps, M. A., Grever, M. R., Byrd, J. C., & Flynn, J. M. (2013). Cyclophosphamide, alvocidib (flavopiridol), and rituximab, a novel feasible chemoimmunotherapy regimen for patients with high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 37(10), 1195–1199. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2013.06.006>
- Stephenson, L. M., Miller, B. C., Ng, A., Eisenberg, J., Zhao, Z., Cadwell, K., Graham, D. B., Mizushima, N. N., Xavier, R., Virgin, H. W., & Swat, W. (2009). Identification of Atg5-dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in

- Atg5-deficient T lymphocytes. *Autophagy*, 5(5), 625–635.
<https://doi.org/10.4161/AUTO.5.5.8133>
- Stilgenbauer, S., Bullinger, L., Banner, A., Wildenberger, K., Bentz, M., Döhner, K., Ho, A. D., Lichter, P., & Döhner, H. (1999). Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 13(9), 1331–1334.
<https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2401499>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/NATURE07943>
- Strickler, J. G., Amsden, T. W., & Kurtin, P. J. (1992). Small B-cell lymphoid neoplasms with coexisting T-cell lymphomas. *American Journal of Clinical Pathology*, 98(4), 424–429. <https://doi.org/10.1093/AJCP/98.4.424>
- Sud, A., Chattopadhyay, S., Thomsen, H., Sundquist, K., Sundquist, J., Houlston, R. S., & Hemminki, K. (2019). Analysis of 153 115 patients with hematological malignancies refines the spectrum of familial risk. *Blood*, 134(12), 960–969.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD.2019001362>
- Sud, A., Kinnersley, B., & Houlston, R. S. (2017). Genome-wide association studies of cancer: current insights and future perspectives. *Nature Reviews. Cancer*, 17(11), 692–704. <https://doi.org/10.1038/NRC.2017.82>
- Swerdlow S.H., Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, & Thiele J. (2017). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised 4th Edition. In *WHO Classification of Tumours, Revised 4th Edition, Volume 2* (Revised 4th, Vol. 2).
- Swerdlow S.H., Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, & Vardiman JW. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th Edition. In *Lyon: IARC press: Vol. 4th Edition* (4th Edition, Issue Volume 2).
- Tam, C. S., Allan, J. N., Siddiqi, T., Kipps, T. J., Jacobs, R., Opat, S., Barr, P. M., Tedeschi, A., Trentin, L., Bannerji, R., Jackson, S., Kuss, B. J., Moreno, C., Szafer-Glusman, E., Russell, K., Zhou, C., Ninomoto, J., Dean, J. P., Wierda, W. G., & Ghia, P. (2022). Fixed-duration ibrutinib plus venetoclax for first-line treatment of CLL: primary

- analysis of the CAPTIVATE FD cohort. *Blood*, *139*(22), 3278–3289. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2021014488>
- Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Morselli, E., Criollo, A., D'Amelio, M., Djavaheri-Mergny, M., Cecconi, F., Tavernarakis, N., & Kroemer, G. (2008). A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy*, *4*(6), 810–814. <https://doi.org/10.4161/AUTO.6486>
- Taylor, J., Xiao, W., & Abdel-Wahab, O. (2017a). Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*, *130*(4), 410–423. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-02-734541>
- Taylor, J., Xiao, W., & Abdel-Wahab, O. (2017b). Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*, *130*(4), 410. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-02-734541>
- Tiao, G., Improgo, M. R., Tausch, E., Fernandes, S. M., Bahlo, J., Robrecht, S., Fischer, K., Hallek, M., Stilgenbauer, S., Kiezun, A., Getz, G., & Brown, J. R. (2017). Analysis of ITGB2 rare germ line variants in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *130*(22), 2443–2444. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-08-800128>
- Tournilhac, O., van Gelder, M., Eikema, D. J., Zinger, N., Dreger, P., Bornhäuser, M., Vucinic, V., Scheid, C., Cornelissen, J. J., Schroeder, T., Jindra, P., Sengeloev, H., Nguyen Quoc, S., Stelljes, M., Blau, I. W., Mayer, J., Paneesha, S., Chevallier, P., Forcade, E., ... Yakoub-Agha, I. (2023). The European landscape on allogeneic haematopoietic cell transplantation in Chronic Lymphocytic Leukaemia between 2009 and 2019: a perspective from the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplantation*, *58*(6), 621–624. <https://doi.org/10.1038/S41409-023-01955-Z>
- Tsagiopoulou, M., Papakonstantinou, N., Moysiadis, T., Mansouri, L., Ljungström, V., Duran-Ferrer, M., Malousi, A., Queirós, A. C., Plevova, K., Bhoi, S., Kollia, P., Oscier, D., Anagnostopoulos, A., Trentin, L., Ritgen, M., Pospisilova, S., Stavroyianni, N., Ghia, P., Martin-Subero, J. I., ... Stamatopoulos, K. (2019). DNA methylation profiles in chronic lymphocytic leukemia patients treated with chemoimmunotherapy. *Clinical Epigenetics*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/S13148-019-0783-1>

- Tsuchihara, K., Fujii, S., & Esumi, H. (2009). Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Letters*, *278*(2), 130–138. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2008.09.040>
- Turk, W. (1903). Ein System der Lymphomatosen. *Wien Klin Wochenschr*.
- Turner, S., Armstrong, L. L., Bradford, Y., Carlsony, C. S., Crawford, D. C., Crenshaw, A. T., de Andrade, M., Doheny, K. F., Haines, J. L., Hayes, G., Jarvik, G., Jiang, L., Kullo, I. J., Li, R., Ling, H., Manolio, T. A., Matsumoto, M. M., McCarty, C. A., McDavid, A. N., ... Ritchie, M. D. (2011). Quality Control Procedures for Genome Wide Association Studies. *Current Protocols in Human Genetics / Editorial Board, Jonathan L. Haines ... [et Al.]*, CHAPTER(SUPPL.68), Unit1.19. <https://doi.org/10.1002/0471142905.HG0119S68>
- Turtle, C. J., Hay, K. A., Hanafi, L. A., Li, D., Cherian, S., Chen, X., Wood, B., Lozanski, A., Byrd, J. C., Heimfeld, S., Riddell, S. R., & Maloney, D. G. (2017). Durable molecular remissions in chronic lymphocytic leukemia treated with CD19-Specific chimeric antigen Receptor-modified T cells after failure of ibrutinib. *Journal of Clinical Oncology*, *35*(26), 3010–3020. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.8519/ASSET/E3DEF1D7-B079-4FC7-8D85-FF24CCA39F19/ASSETS/IMAGES/LARGE/JCO.2017.72.8519APP1.JPG>
- Urbańska, K., & Orzechowski, A. (2021). The Secrets of Alternative Autophagy. *Cells*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/CELLS10113241>
- Valvano, L., Nozza, F., D’Arena, G., D’Auria, F., De Luca, L., Pietrantuono, G., Mansueto, G., Villani, O., D’Agostino, S., Lamorte, D., Calice, G., & Statuto, T. (2023). Preliminary analysis of double-negative T, double-positive T, and natural killer T-like cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Medicine*, *12*(12), 13241–13255. <https://doi.org/10.1002/CAM4.6015>
- Van Damme, M., Crompton, E., Meuleman, N., Mineur, P., Bron, D., Lagneaux, L., & Stamatopoulos, B. (2012). HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. *Epigenetics*, *7*(12), 1403–1412. <https://doi.org/10.4161/EPI.22674>
- Van Den Neste, E., Robin, V., Francart, J., Hagemeyer, A., Stul, M., Vandenberghe, P., Delannoy, A., Sonet, A., Deneys, V., Costantini, S., Ferrant, A., Robert, A., &

- Michaux, L. (2007). Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia*, *21*(8), 1715–1722. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2404764>
- van der Vos, K. E., Gomez-Puerto, C., & Coffey, P. J. (2012). Regulation of autophagy by Forkhead box (FOX) O transcription factors. *Advances in Biological Regulation*, *52*(1), 122–136. <https://doi.org/10.1016/J.ADVENZREG.2011.10.002>
- Van Haaften, G., Dalglish, G. L., Davies, H., Chen, L., Bignell, G., Greenman, C., Edkins, S., Hardy, C., O'Meara, S., Teague, J., Butler, A., Hinton, J., Latimer, C., Andrews, J., Barthorpe, S., Beare, D., Buck, G., Campbell, P. J., Cole, J., ... Futreal, P. A. (2009). Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nature Genetics*, *41*(5), 521–523. <https://doi.org/10.1038/NG.349>
- Vannini, N., Girotra, M., Naveiras, O., Nikitin, G., Campos, V., Giger, S., Roch, A., Auwerx, J., & Lutolf, M. P. (2016). Specification of haematopoietic stem cell fate via modulation of mitochondrial activity. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS13125>
- Vasyutina, E., Boucas, J. M., Bloehdorn, J., Aszyk, C., Crispatzu, G., Stiefelhagen, M., Breuer, A., Mayer, P., Lengerke, C., Döhner, H., Beutner, D., Rosenwald, A., Stilgenbauer, S., Hallek, M., Benner, A., & Herling, M. (2015). The regulatory interaction of EVI1 with the TCL1A oncogene impacts cell survival and clinical outcome in CLL. *Leukemia*, *29*(10), 2003–2014. <https://doi.org/10.1038/LEU.2015.114>
- Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, *335*(6189), 440–442. <https://doi.org/10.1038/335440A0>
- Vigorito, E., Perks, K. L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., Das, P. P., Miska, E. A., Rodriguez, A., Bradley, A., Smith, K. G. C., Rada, C., Enright, A. J., Toellner, K. M., MacLennan, I. C. M., & Turner, M. (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*, *27*(6), 847–859. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2007.10.009>

- Vijayakrishnan, J., Qian, M., Studd, J. B., Yang, W., Kinnersley, B., Law, P. J., Broderick, P., Raetz, E. A., Allan, J., Pui, C. H., Vora, A., Evans, W. E., Moorman, A., Yeoh, A., Yang, W., Li, C., Bartram, C. R., Mullighan, C. G., Zimmerman, M., ... Yang, J. J. (2019). Identification of four novel associations for B-cell acute lymphoblastic leukaemia risk. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-13069-6>
- Vijayakumar, K., & Cho, G. W. (2019). Autophagy: An evolutionarily conserved process in the maintenance of stem cells and aging. *Cell Biochemistry and Function*, *37*(6), 452–458. <https://doi.org/10.1002/CBF.3427>
- Villamor, N., Conde, L., Martínez-Trillos, A., Cazorla, M., Navarro, A., Beà, S., López, C., Colomer, D., Pinyol, M., Aymerich, M., Rozman, M., Abrisqueta, P., Baumann, T., Delgado, J., Giné, E., González-Díaz, M., Hernández, J. M., Colado, E., Payer, A. R., ... López-Guillermo, A. (2013). NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*, *27*(5), 1100–1106. <https://doi.org/10.1038/LEU.2012.357>
- Virchow, R. (1845). Weisses blut. *Froiep Notizen*, *36*, 151–156.
- Visconte, V., Makishima, H., MacIejewski, J. P., & Tiu, R. V. (2012). Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia*, *26*(12), 2447–2454. <https://doi.org/10.1038/LEU.2012.130>
- Visscher, P. M., Brown, M. A., McCarthy, M. I., & Yang, J. (2012). Five years of GWAS discovery. *American Journal of Human Genetics*, *90*(1), 7–24. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2011.11.029>
- Visscher, P. M., Wray, N. R., Zhang, Q., Sklar, P., McCarthy, M. I., Brown, M. A., & Yang, J. (2017). 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *American Journal of Human Genetics*, *101*(1), 5–22. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2017.06.005>
- Wan Mohamad Zamri, W. N., Mohd Yunus, N., Abdul Aziz, A. A., Zulkipli, N. N., & Sulong, S. (2023). Perspectives on the Application of Cytogenomic Approaches in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Diagnostics*, *13*(5). <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS13050964>

- Wang, L., Lawrence, M. S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D. S., Zhang, L., Zhang, W., Vartanov, A. R., Fernandes, S. M., Goldstein, N. R., Folco, E. G., Cibulskis, K., Tesar, B., Sievers, Q. L., Shefler, E., ... Wu, C. J. (2011). SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *365*(26), 2497–2506. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1109016>
- Wang, L., Shalek, A. K., Lawrence, M., Ding, R., Gaublot, J. T., Pochet, N., Stojanov, P., Sougnez, C., Shukla, S. A., Stevenson, K. E., Zhang, W., Wong, J., Sievers, Q. L., MacDonald, B. T., Vartanov, A. R., Goldstein, N. R., Neuberg, D., He, X., Lander, E., ... Wu, C. J. (2014). Somatic mutation as a mechanism of Wnt/ β -catenin pathway activation in CLL. *Blood*, *124*(7), 1089–1098. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-01-552067>
- Ward, L. D., & Kellis, M. (2012). HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), D930–D934. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR917>
- Warr, M. R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., & Passegué, E. (2013). FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature*, *494*(7437), 323–327. <https://doi.org/10.1038/NATURE11895>
- Watanabe, T., Ichikawa, A., Saito, H., & Hotta, T. (1996). Overexpression of the MDM2 oncogene in leukemia and lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*, *21*(5–6), 391–397. <https://doi.org/10.3109/10428199609093436>
- Went, M., Sud, A., Försti, A., Halvarsson, B. M., Weinhold, N., Kimber, S., van Duin, M., Thorleifsson, G., Holroyd, A., Johnson, D. C., Li, N., Orlando, G., Law, P. J., Ali, M., Chen, B., Mitchell, J. S., Gudbjartsson, D. F., Kuiper, R., Stephens, O. W., ... Thibodeau, S. N. (2018). Identification of multiple risk loci and regulatory mechanisms influencing susceptibility to multiple myeloma. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-04989-W>
- Wierda, W. G., Dorritie, K. A., Munoz, J., Stephens, D. M., Solomon, S. R., Gillenwater, H. H., Gong, L., Yang, L., Ogasawara, K., Thorpe, J., & Siddiqi, T. (2020).

- Transcend CLL 004: Phase 1 Cohort of Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel) in Combination with Ibrutinib for Patients with Relapsed/Refractory (R/R) Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma (CLL/SLL). *Blood*, 136(Supplement 1), 39–40. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2020-140622>
- Wierda, W. G., O'Brien, S., Wang, X., Faderl, S., Ferrajoli, A., Do, K. A., Cortes, J., Thomas, D., Garcia-Manero, G., Koller, C., Beran, M., Giles, F., Ravandi, F., Lerner, S., Kantarjian, H., & Keating, M. (2007). Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 109(11), 4679–4685. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-12-051458>
- Willer, C. J., Li, Y., & Abecasis, G. R. (2010). METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics*, 26(17), 2190. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ340>
- Wojdacz, T. K., Amarasinghe, H. E., Kadalayil, L., Beattie, A., Forster, J., Blakemore, S. J., Parker, H., Bryant, D., Larrayoz, M., Clifford, R., Robbe, P., Davis, Z. A., Else, M., Howard, D. R., Stamatopoulos, B., Steele, A. J., Rosenquist, R., Collins, A., Pettitt, A. R., ... Strefford, J. C. (2019). Clinical significance of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients: results from 3 UK clinical trials. *Blood Advances*, 3(16), 2474–2481. <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2019000237>
- Wu, J., Chai, H., Li, F., Ren, Q., & Gu, Y. (2020). SETD1A augments sorafenib primary resistance via activating YAP in hepatocellular carcinoma. *Life Sciences*, 260. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118406>
- Wu, M., Fan, B., Guo, Q., Li, Y., Chen, R., Lv, N., Diao, Y., & Luo, Y. (2018). Knockdown of SETDB1 inhibits breast cancer progression by miR-381-3p-related regulation. *Biological Research*, 51(1). <https://doi.org/10.1186/S40659-018-0189-0>
- Yan, H., Tian, S., Kleinstern, G., Wang, Z., Lee, J. H., Boddicker, N. J., Cerhan, J. R., Kay, N. E., Braggio, E., & Slager, S. L. (2020). Chronic lymphocytic leukemia (CLL) risk is mediated by multiple enhancer variants within CLL risk loci. *Human Molecular Genetics*, 29(16), 2761–2774. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDAA165>

- Yao, Z., Song, P., & Jiao, W. (2024). Pathogenic role of super-enhancers as potential therapeutic targets in lung cancer. *Frontiers in Pharmacology*, *15*.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2024.1383580>
- Yoo, K. H., & Hennighausen, L. (2012). EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(1), 59–65.
<https://doi.org/10.7150/IJBS.8.59>
- Yoon, S. O., Suh, C., Lee, D. H., Chi, H. S., Park, C. J., Jang, S. S., Shin, H. R., Park, B. H., & Huh, J. (2010). Distribution of lymphoid neoplasms in the Republic of Korea: analysis of 5318 cases according to the World Health Organization classification. *American Journal of Hematology*, *85*(10), 760–764.
<https://doi.org/10.1002/AJH.21824>
- Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., Chalkidis, G., Suzuki, Y., Shiosaka, M., Kawahata, R., Yamaguchi, T., Otsu, M., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Ishiyama, K., ... Ogawa, S. (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, *478*(7367), 64–69.
<https://doi.org/10.1038/NATURE10496>
- Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, *14*(2), 207–215.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838>
- Zenz, T., Benner, A., Dharsen, U., Drig, J., Dhner, H., Siffert, W., Stilgenbauer, S., & Nckel, H. (2009). BCL2-938C>A polymorphism and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *50*(11), 1837–1842.
<https://doi.org/10.3109/10428190903207530>
- Zenz, T., Eichhorst, B., Busch, R., Denzel, T., Häbe, S., Winkler, D., Bühler, A., Edelmann, J., Bergmann, M., Hopfinger, G., Hensel, M., Hallek, M., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(29), 4473–4479.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.8762>

- Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews. Cancer*, *10*(1), 37–50. <https://doi.org/10.1038/NRC2764>
- Zenz, T., Vollmer, D., Trbusek, M., Smardova, J., Benner, A., Soussi, T., Helfrich, H., Heuberger, M., Hoth, P., Fuge, M., Denzel, T., Häbe, S., Malcikova, J., Kuglik, P., Truong, S., Patten, N., Wu, L., Oscier, D., Ibbotson, R., ... Stilgenbauer, S. (2010). TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*, *24*(12), 2072–2079. <https://doi.org/10.1038/LEU.2010.208>
- Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., & Chen, M. (2019). Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *Journal of Integrative Bioinformatics*, *16*(3). <https://doi.org/10.1515/JIB-2019-0027>
- Zhao, Y., Zhao, H., Sun, Y., Hao, J., Qi, X., Zhou, X., Wu, Z., Wang, P., Kaech, S. M., Weaver, C. T., Flavell, R. A., Zhao, L., Yao, Z., & Yin, Z. (2013). IL-4 induces a suppressive IL-10-producing CD8⁺ T cell population via a Cdkn2a-dependent mechanism. *Journal of Leukocyte Biology*, *94*(6), 1103–1112. <https://doi.org/10.1189/JLB.0213064>
- Zheng, Z., Huang, D., Wang, J., Zhao, K., Zhou, Y., Guo, Z., Zhai, S., Xu, H., Cui, H., Yao, H., Wang, Z., Yi, X., Zhang, S., Sham, P. C., & Li, M. J. (2020). QTLbase: an integrative resource for quantitative trait loci across multiple human molecular phenotypes. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D983–D991. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ888>
- Zhu, Z., Song, H., & Xu, J. (2021). CDKN2A Deletion in Melanoma Excludes T Cell Infiltration by Repressing Chemokine Expression in a Cell Cycle-Dependent Manner. *Frontiers in Oncology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.641077>

8. ANEXO I

International Journal of
Molecular Sciences**Do GWAS-Identified Risk Variants for Chronic Lymphocytic Leukemia Influence Overall Patient Survival and Disease Progression?**

Antonio José Cabrera-Serrano ^{1,2} , José Manuel Sánchez-Maldonado ^{1,2} , Rob ter Horst ³, Angelica Macauda ⁴, Paloma García-Martín ⁵, Yolanda Benavente ^{6,7,8} , Stefano Landi ⁹ , Alyssa Clay-Gilmour ¹⁰, Yasmeen Niazi ^{11,12}, Blanca Espinet ^{13,14} , Juan José Rodríguez-Sevilla ¹⁵ , Eva María Pérez ⁵, Rossana Maffei ¹⁶ , Gonzalo Blanco ^{13,14} , Matteo Giaccherini ⁹ , James R. Cerhan ¹⁷, Roberto Marasca ¹⁶ , Miguel Ángel López-Nevot ¹⁸ , Tzu Chen-Liang ¹⁹, Hauke Thomsen ²⁰ , Irene Gámez ¹⁹, Daniele Campa ⁹, Víctor Moreno ^{6,21,22} , Silvia de Sanjosé ^{6,7}, Rafael Marcos-Gragera ^{7,23,24,25} , María García-Álvarez ²⁶, Trinidad Dierssen-Sotos ^{7,27} , Andrés Jerez ²⁸ , Aleksandra Butrym ²⁹ , Aaron D. Norman ¹⁷, Mario Luppi ¹⁶, Susan L. Slager ^{30,31}, Kari Hemminki ^{32,33} , Yang Li ^{34,35} , Sonja I. Berndt ³⁶, Delphine Casabonne ^{6,7}, Miguel Alcoceba ²⁶ , Anna Puiggros ^{13,14} , Mihai G. Netea ^{34,37}, Asta Försti ^{11,12} , Federico Canzian ⁴ and Juan Sainz ^{1,2,7,38,*}



Citation: Cabrera-Serrano, A.J.; Sánchez-Maldonado, J.M.; ter Horst, R.; Macauda, A.; García-Martín, P.; Benavente, Y.; Landi, S.; Clay-Gilmour, A.; Niazi, Y.; Espinet, B.; et al. Do GWAS-Identified Risk Variants for Chronic Lymphocytic Leukemia Influence Overall Patient Survival and Disease Progression? *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8005. <https://doi.org/10.3390/ijms24098005>

Academic Editors: Yasuharu Sato and Yoshito Nishimura

Received: 12 March 2023

Revised: 14 April 2023

Accepted: 23 April 2023

Published: 28 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Genomic Oncology Area, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS, 18016 Granada, Spain; antonio.cabrera@genyo.es (A.J.C.-S.); josemanuel.sanchez@genyo.es (J.M.S.-M.)
- ² Instituto de Investigación Biosanitaria IBS.Granada, 18012 Granada, Spain
- ³ CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, 1090 Vienna, Austria; rob.terhorst@radboudumc.nl
- ⁴ Genomic Epidemiology Group, German Cancer Research Center (DKFZ), 69120 Heidelberg, Germany; angelicamacauda@gmail.com (A.M.); f.canzian@dkfz.de (F.C.)
- ⁵ Hospital Campus de la Salud, PTS, 18016 Granada, Spain; palomagrm@hotmail.com (P.G.-M.); evam.perez.sspa@juntadeandalucia.es (E.M.P.)
- ⁶ Catalan Institute of Oncology, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), 08908 Barcelona, Spain; ybenavente@iconcologia.net (Y.B.); v.moreno@iconcologia.net (V.M.); s.sanjose@iconcologia.net (S.D.S.); dcasabonne@iconcologia.net (D.C.)
- ⁷ Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), University of Barcelona, 08908 Barcelona, Spain; rmarcos@iconcologia.net (R.M.-G.); trinidad.dierssen@unican.es (T.D.-S.)
- ⁸ CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain
- ⁹ Department of Biology, University of Pisa, 56126 Pisa, Italy; stefano.landi@unipi.it (S.L.); matteo.giaccherini@phd.unipi.it (M.G.); daniele.campa@unipi.it (D.C.)
- ¹⁰ Department of Epidemiology & Biostatistics, Arnold School of Public Health, University of South Carolina, Greenville, SC 29208, USA; claygila@mailbox.sc.edu
- ¹¹ Division of Pediatric Neurooncology, German Cancer Research Center (DKFZ), German Cancer Consortium (DKTK), 69120 Heidelberg, Germany; y.niazi@dkfz.de (Y.N.); a.foersti@kitz-heidelberg.de (A.F.)
- ¹² Hopp Children's Cancer Center (KiTZ), 69120 Heidelberg, Germany
- ¹³ Molecular Cytogenetics Laboratory, Pathology Department, Hospital del Mar, 08003 Barcelona, Spain; bespinet@parcdesalutmar.cat (B.E.); gblancoares@northwell.edu (G.B.); apuiggros@psmar.cat (A.P.)
- ¹⁴ Translational Research on Hematological Neoplasms Group, Cancer Research Program, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), 08003 Barcelona, Spain
- ¹⁵ Department of Leukemia, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA; jrodsevilla@gmail.com
- ¹⁶ Department of Medical and Surgical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, AOU Policlinico, 41124 Modena, Italy; maffei.rossana@aou.mo.it (R.M.); roberto.marasca@unimore.it (R.M.); mario.luppi@unimore.it (M.L.)
- ¹⁷ Department of Quantitative Health Sciences, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA; buehler@mayo.edu (J.R.C.); aarondeannorman@gmail.com (A.D.N.)
- ¹⁸ Immunology Department, Virgen de las Nieves University Hospital, 18014 Granada, Spain; manevot@ugr.es
- ¹⁹ Hematology Department, Morales Meseguer University Hospital, 30008 Murcia, Spain; tzuchen82@gmail.com (T.C.-L.); igamez50@gmail.com (I.G.)
- ²⁰ MSB Medical School Berlin, D-14197 Berlin, Germany; hauke.thomsen@medicalschooll-berlin.de
- ²¹ Cancer Prevention and Control Program, Unit of Biomarkers and Susceptibility, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Catalan Institute of Oncology, 08907 Barcelona, Spain

- ²² Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08907 Barcelona, Spain
- ²³ Epidemiology Unit and Girona Cancer Registry, Oncology Coordination Plan, Department of Health, Autonomous Government of Catalonia, Catalan Institute of Oncology, Girona Biomedical Research Institute (IdiBGi), 17190 Girona, Spain
- ²⁴ Department of Nursing, Universitat de Girona, 17007 Girona, Spain
- ²⁵ Josep Carreras Leukemia Research Institute, 08916 Girona, Spain
- ²⁶ Department of Hematology, University Hospital of Salamanca (HUS/IBSAL), CIBERONC and Cancer Research Institute of Salamanca-IBMCC (USAL-CSIC), 37007 Salamanca, Spain; mgarca1991@gmail.com (M.G.-Á.); migalcoceba@gmail.com (M.A.)
- ²⁷ Faculty of Medicine, University of Cantabria, 39011 Santander, Spain
- ²⁸ Department of Hematology, Experimental Hematology Unit, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), University Hospital Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain; anjecayu@gmail.com
- ²⁹ Department of Cancer Prevention and Therapy, Medical University of Wrocław, 50-556 Wrocław, Poland; aleksandra.butrym@gmail.com
- ³⁰ Division of Computational Genomics, Mayo Clinic, Rochester, MN 85054, USA; slager.susan@mayo.edu
- ³¹ Division of Hematology, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA
- ³² Division of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Germany; k.hemminki@dkfz-heidelberg.de
- ³³ Faculty of Medicine and Biomedical Center in Pilsen, Charles University in Prague, 30605 Pilsen, Czech Republic
- ³⁴ Department of Internal Medicine and Radboud Center for Infectious Diseases, Radboud University Medical Center, 6525 GA Nijmegen, The Netherlands; yang.li@helmholtz-hzi.de (Y.L.); mihai.netea@radboudumc.nl (M.G.N.)
- ³⁵ Centre for Individualised Infection Medicine (CiiM) & TWINCORE, Joint Ventures between the Helmholtz-Centre for Infection Research (HZI) and the Hannover Medical School (MHH), 30625 Hannover, Germany
- ³⁶ Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20814, USA; berndts@mail.nih.gov
- ³⁷ Department for Immunology & Metabolism, Life and Medical Sciences Institute (LIMES), University of Bonn, 53115 Bonn, Germany
- ³⁸ Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Sciences, University of Granada (UGR), 18012 Granada, Spain
- * Correspondence: juan.sainz@genyo.es; Tel: +34-95871-5500 (ext. 126); Fax: +34-9-5863-7071

Abstract: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia among adults world-wide. Although genome-wide association studies (GWAS) have uncovered the germline genetic component underlying CLL susceptibility, the potential use of GWAS-identified risk variants to predict disease progression and patient survival remains unexplored. Here, we evaluated whether 41 GWAS-identified risk variants for CLL could influence overall survival (OS) and disease progression, defined as time to first treatment (TTFT) in a cohort of 1039 CLL cases ascertained through the CRuCIAL consortium. Although this is the largest study assessing the effect of GWAS-identified susceptibility variants for CLL on OS, we only found a weak association of ten single nucleotide polymorphisms (SNPs) with OS ($p < 0.05$) that did not remain significant after correction for multiple testing. In line with these results, polygenic risk scores (PRSs) built with these SNPs in the CRuCIAL cohort showed a modest association with OS and a low capacity to predict patient survival, with an area under the receiver operating characteristic curve

(AUROC) of 0.57. Similarly, seven SNPs were associated with TTFT ($p < 0.05$); however, these did not reach the multiple testing significance threshold, and the meta-analysis with previous published data did not confirm any of the associations. As expected, PRSs built with these SNPs showed reduced accuracy in prediction of disease progression (AUROC = 0.62). These results suggest that susceptibility variants for CLL do not impact overall survival and disease progression in CLL patients.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; overall survival; TTFT; genetic variants; susceptibility; polygenic risk score.

1. Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common form of leukemia among adults worldwide [1], and its global health burden has risen substantially over the past 30 years [2]. CLL remains an incurable disease [3] with a heterogeneous clinical course and a 10-year survival rate ranging from 47.3% to 72.5% in males and 58.2% to 78.7% in females [4]. Traditional clinical prognostic factors include Rai and Binet staging systems, lymphocyte doubling time, cytogenetic alterations, and point mutations, which are used for patient risk stratification and clinical management [5]. Although age, sex, exposure to chemicals, race/ethnicity, and family history of hematological cancers influence the risk of CLL, recent studies have suggested that the combination of these classical factors with genetic markers might help in predicting disease onset and clinical outcome [6]. However, despite the overall success of genome-wide association studies (GWAS) in identifying susceptibility loci for CLL [7–10], there remains an unmet need to characterize genetic markers associated with disease progression and overall patient survival. Considering this background, we investigated whether GWAS-

identified susceptibility variants for CLL could influence the overall survival (OS) of CLL patients and their disease progression, defined as time to first treatment (TTFT). Finally, we explored whether the effect of selected variants on OS and TTFT could be mediated by immune-related processes through a comprehensive battery of functional experiments developed in the 500FG cohort recruited in the context of the Human Functional Project (HFGP).

2. Results

CLL patients from the CRuCIAL cohort had a mean age of 65.87 and a male/female ratio of 1.57, which is in line with the worldwide median age of diagnosis and gender distributions (Table 1) [11]. Median follow-up time was 76.77 months without variation of follow-up statistics for censored patients, and the total number of deceased patients was 287. The OS did not differ significantly by country, ruling out the possibility of any deviation due to multicenter randomized patient recruitment. On the other hand, CLL patients with TTFT data in the CRuCIAL cohort had a mean age of 65.03 and a male/female ratio of 1.62. The median time to first treatment was 759.49 days and the number of deceased patients was 111 (Table 1).

Table 1. Patient characteristics of the CRuCIAL cohort used for OS and TTFT analyses.

CRuCIAL cohort (1039 CLL cases for OS analysis)		CRuCIAL cohort (354 CLL cases for TTFT analysis)	
Age (years)	65.87 ± 11.05	Age (years)	65.03 ± 10.94
Sex ratio (male/female)	1.57 (636/403)	Sex ratio (male/female)	1.62 (219/135)
Country of origin (alive/deceased)		Country of origin	
Spain	754 (536/218)	Spain	227 (174/73)
Italy	285 (216/69)	Italy	127 (86/41)
Median follow-up time (months)	76.77 (50-123)	Median TTFT (days)	759.49 (31-1148.74)
Alive	76 (52.1-123)	Alive	830.81 (44.13- 1308.93)
Deceased	77 (44-123)	Deceased	564.83 (13.10-800)
Status at follow-up		Status at follow-up	
Alive	752 (72.38)	Alive	239 (68.29)
Deceased	287 (27.62)	Deceased	111 (31.71)
Binet Stage		Binet stage	
A	647 (81.48)	A	201 (64.84)
B	99 (12.46)	B	68 (21.94)

C	48 (06.04)	C	41 (13.23)
Rai Stage		Rai stage	
0	597 (65.67)	0	124 (37.35)
I	152 (16.72)	I	105 (31.63)
II	114 (12.57)	II	63 (18.98)
III	12 (01.31)	III	16 (04.82)
IV	34 (03.73)	IV	24 (07.23)

Data are mean \pm standard deviation, n (%), or percentiles (25th–75th percentiles).

Cox regression analyses showed that ten genetic variants within the *CAMK2D*, *CASP8*, *CFLAR*, *CXXC1*, *GPR37*, *IRF8*, *LEF1*, *MYNN*, *PRKD2*, and *TERC* loci were associated with OS at $p < 0.05$ level (Table 2). Although potentially interesting, none of these associations remained significant after correction for multiple testing, which suggested a weak effect (if any) of these genes in determining patient survival. The lack of previous studies assessing the impact of GWAS-identified risk variants on OS hampered the performance of eventual meta-analyses.

Table 2. Association of GWAS-identified risk variants for CLL and OS.

SNP	Chr.	Nearby gene	Risk allele	HR (95%CI) δ	p	HR (95%CI) \uparrow	p	HR (95%CI) \yen	p
rs4368253	18	<i>AC107990.1 NFE2L3P1</i>	C	0.94 (0.78-1.14)	0.539	0.93 (0.59-1.45)	0.746	0.93 (0.73-1.18)	0.545
rs1439287	2	<i>ACOXL</i>	T	1.03 (0.88-1.21)	0.700	0.99 (0.76-1.29)	0.957	1.10 (0.84-1.44)	0.481
rs58055674	2	<i>ACOXL</i>	C	1.08 (0.90-1.30)	0.424	1.12 (0.89-1.42)	0.335	1.02 (0.64-1.61)	0.936
rs7944004	11	<i>ASCL2 C11orf21</i>	T	0.97 (0.82-1.15)	0.735	1.06 (0.79-1.43)	0.699	0.89 (0.69-1.16)	0.394
rs4987855	18	<i>BCL2</i>	G	0.97 (0.71-1.32)	0.848	0.68 (0.10-4.87)	0.701	0.98 (0.71-1.34)	0.886
rs2651823	11	<i>C11orf21 TSPAN32</i>	A	0.95 (0.81-1.12)	0.523	1.03 (0.78-1.36)	0.857	0.85 (0.65-1.11)	0.233
rs1476569	4	<i>CAMK2D</i>	G	1.12 (0.95-1.32)	0.176	1.31 (1.03-1.67)	0.028	0.92 (0.64-1.32)	0.643
rs3769825	2	<i>CASP8</i>	T	1.20 (1.02-1.43)	0.033	1.23 (0.93-1.63)	0.150	1.32 (1.01-1.73)	0.041
rs7558911	2	<i>CFLAR</i>	A	1.19 (1.01-1.41)	0.040	1.22 (0.91-1.63)	0.175	1.30 (1.00-1.67)	0.046
rs1036935	18	<i>CXXC1</i>	A	1.27 (1.07-1.51)	0.008	1.34 (1.06-1.70)	0.015	1.43 (0.98-2.10)	0.066
rs1359742	9	<i>DMRTA1</i>	G	1.05 (0.89-1.23)	0.575	1.02 (0.78-1.34)	0.875	1.11 (0.85-1.45)	0.441
rs6546149	2	<i>DTNB</i>	G	1.09 (0.91-1.31)	0.356	1.06 (0.84-1.35)	0.607	1.29 (0.86-1.93)	0.222
rs9880772	3	<i>EOMES LINC01980</i>	T	0.98 (0.84-1.14)	0.787	1.04 (0.80-1.34)	0.787	0.90 (0.69-1.18)	0.455
rs13015798	2	<i>FAM126B</i>	A	1.06 (0.88-1.28)	0.548	1.00 (0.64-1.54)	0.989	1.10 (0.87-1.39)	0.444
rs6586163	10	<i>FAS</i>	A	0.99 (0.84-1.17)	0.916	1.08 (0.80-1.45)	0.631	0.92 (0.71-1.20)	0.554
rs2267708	7	<i>GPR37</i>	T	0.86 (0.72-1.02)	0.081	0.91 (0.70-1.19)	0.504	0.70 (0.51-0.97)	0.030
rs2953196	11	<i>GRAMD1B</i>	G	0.85 (0.70-1.04)	0.123	0.70 (0.42-1.17)	0.176	0.85 (0.67-1.09)	0.203
rs35923643	11	<i>GRAMD1B</i>	G	0.88 (0.72-1.07)	0.192	0.80 (0.63-1.02)	0.068	1.12 (0.71-1.78)	0.631
rs3800461	6	<i>ILRUN</i>	C	0.92 (0.67-1.27)	0.620	0.91 (0.65-1.27)	0.562	1.20 (0.30-4.86)	0.795
rs9392504	6	<i>IRF4</i>	A	0.88 (0.74-1.04)	0.143	0.80 (0.60-1.08)	0.145	0.88 (0.68-1.13)	0.322
rs391855	16	<i>IRF8</i>	A	0.87 (0.74-1.03)	0.104	0.99 (0.72-1.36)	0.946	0.74 (0.58-0.96)	0.021

rs898518	4	<i>LEF1</i>	A	1.12 (0.94-1.33)	0.215	1.50 (1.00-2.26)	0.049	1.04 (0.82-1.33)	0.721
rs34676223	1	<i>MDS2</i>	C	0.99 (0.83-1.18)	0.899	0.88 (0.61-1.27)	0.491	1.03 (0.81-1.30)	0.803
rs57214277	4	<i>MYL12BP2 LINC02363</i>	T	1.02 (0.86-1.21)	0.805	1.01 (0.79-1.29)	0.926	1.06 (0.77-1.46)	0.729
rs10936599	3	<i>MYNN</i>	C	0.91 (0.74-1.11)	0.344	0.57 (0.36-0.90)	0.016	0.99 (0.77-1.26)	0.922
rs11715604	3	<i>NCK1</i>	T	0.98 (0.80-1.20)	0.831	1.06 (0.61-1.85)	0.842	0.96 (0.74-1.23)	0.723
rs6489882	12	<i>OAS3</i>	G	1.09 (0.92-1.29)	0.309	1.16 (0.90-1.50)	0.240	1.06 (0.78-1.45)	0.696
rs140522	22	<i>ODF3B</i>	T	1.02 (0.86-1.20)	0.854	1.11 (0.87-1.41)	0.410	0.87 (0.61-1.24)	0.431
rs2236256	6	<i>OPRM1 IPCEF1</i>	C	1.03 (0.87-1.21)	0.752	0.96 (0.74-1.23)	0.729	1.14 (0.86-1.51)	0.348
rs11637565	15	<i>PCAT29 LOC107984788</i>	G	0.97 (0.82-1.16)	0.753	0.96 (0.74-1.25)	0.753	0.97 (0.71-1.33)	0.842
rs17246404	7	<i>POT1</i>	C	0.95 (0.79-1.14)	0.572	0.95 (0.61-1.47)	0.818	0.93 (0.74-1.18)	0.557
rs2511714	8	<i>POU5F1P2 ODF1</i>	G	0.91 (0.77-1.08)	0.268	0.92 (0.72-1.17)	0.485	0.82 (0.59-1.14)	0.240
rs11083846	19	<i>PRKD2</i>	A	1.20 (0.99-1.45)	0.061	1.16 (0.92-1.47)	0.209	1.62 (1.06-2.50)	0.027
rs888096	2	<i>QPCT RNU6-1116P</i>	A	0.95 (0.81-1.13)	0.590	0.97 (0.76-1.24)	0.837	0.88 (0.63-1.23)	0.454
rs41271473	1	<i>RHOU</i>	G	0.96 (0.74-1.25)	0.770	1.46 (0.64-3.32)	0.366	0.88 (0.64-1.21)	0.432
rs73718779	6	<i>SERPINB6</i>	A	1.03 (0.78-1.37)	0.823	1.04 (0.77-1.40)	0.806	0.97 (0.24-3.94)	0.970
rs12638862	3	<i>TERC</i>	A	0.89 (0.73-1.08)	0.229	0.62 (0.40-0.97)	0.037	0.94 (0.74-1.19)	0.602
rs7705526	5	<i>TERT</i>	A	1.07 (0.90-1.27)	0.468	1.00 (0.78-1.28)	0.997	1.25 (0.91-1.70)	0.163
rs61904987	11	<i>TMPRSS5 DRD2</i>	T	0.94 (0.71-1.23)	0.632	0.94 (0.70-1.28)	0.712	0.73 (0.23-2.30)	0.588
rs926070	6	<i>TSBP1-AS1</i>	A	1.11 (0.92-1.33)	0.285	1.19 (0.77-1.82)	0.433	1.12 (0.88-1.42)	0.343
rs7254272	19	<i>ZBTB7A MAP2K2</i>	A	0.82 (0.66-1.02)	0.078	0.78 (0.61-1.00)	0.051	0.92 (0.50-1.69)	0.794

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; HR, hazards ratio. Significant results in bold ($p < 0.05$). ^δ Cox regression analysis assuming a log-additive model of inheritance. [†] Cox regression analysis assuming a dominant model. [‡] Cox regression analysis assuming a recessive model.

As expected, we found a weak association between the weighted and unweighted PRSs and OS of CLL patients (HR = 1.22, $p = 1.80 \times 10^{-5}$ and HR_{Scaled_80%} = 1.19, $p = 7.61 \times 10^{-5}$). Weighted and unweighted PRSs increased the capacity to predict OS by only 6–7%, with an area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) for the unweighted and weighted PRS of 0.56 and 0.57, respectively (Table 3).

In agreement with these findings, we found that none of these SNPs were correlated with host immune parameters (cQTL data, absolute numbers of 91 blood-derived cell populations, 106 serum immunological proteins, or 7 steroid hormones), which reinforced the hypothesis of a null effect of these markers in determining overall patient survival.

On the other hand, Cox regression analyses adjusted for age, sex, and country of origin revealed that seven genetic variants within the *ACOXL*, *CASP8*, *GRAMD1B*, *MYNN*, *PRKD2*, *TERC*, and *ZBTB7A|MAP2K2* loci were

associated with TTFT at $p < 0.05$ level (Table 4). However, none of the associations with TTFT remained significant after correction for multiple testing, suggesting that these susceptibility variants for CLL do not have a relevant role in determining disease progression.

Table 3. Associations between unweighted and weighted PRSs and OS.

Polygenic risk scores (n=891)				AUROC
	Quintiles	HR 95%CI ^a	<i>p</i>	AUROC (95%CI)
Unweighted, subjects with 100% call rate	1	1.00	-	0.56 (0.52-0.60)
	2	1.06 (0.70-1.60)	0.787	
	3	1.67 (1.15-2.43)	0.007	
	4	1.42 (0.99-2.03)	0.053	
	5	2.36 (1.56-3.58)	5.30·10⁻⁰⁵	
	Continuos ^b	1.20 (1.09-1.31)	8.70·10⁻⁰⁵	
Weighted, subjects with 100% call rate	1	1.00	-	0.57 (0.53-0.61)
	2	1.33 (0.85-2.09)	0.206	
	3	2.05 (1.34-3.15)	0.001	
	4	1.68 (1.08-2.59)	0.020	
	5	2.50 (1.63-3.83)	2.40·10⁻⁰⁵	
	Continuos ^b	1.22 (1.11-1.33)	1.80·10⁻⁰⁵	
Polygenic risk scores (n=1003)				AUROC
	Quintiles	HR 95%CI ^a	<i>p</i>	AUROC (95%CI)
Unweighted, subjects with 80% call rate	1	1.00	-	0.55 (0.51-0.59)
	2	0.99 (0.66-1.46)	0.948	
	3	1.48 (1.05-2.11)	0.027	
	4	1.36 (0.98-1.90)	0.066	
	5	2.08 (1.41-3.07)	2.41·10⁻⁰⁴	
	Continuos ^b	1.17 (1.08-1.28)	2.32·10⁻⁰⁴	
Weighted, subjects with 80% call rate	1	1.00	-	0.56 (0.52-0.60)
	2	1.29 (0.85-1.95)	0.224	
	3	1.78 (1.19-2.67)	0.005	
	4	1.57 (1.05-2.35)	0.028	
	5	2.19 (1.48-3.26)	9.80·10⁻⁰⁵	
	Continuos ^b	1.19 (1.09-1.29)	7.61·10⁻⁰⁵	

^a HR, hazards ratio; CI, confidence interval. All analyses were adjusted for age, sex, and country of origin; ^b The unit for the analysis with the continuous variable was the increment of one quintile.

Table 4. Association of GWAS-identified risk variants for CLL and TTFT.

SNP	Chr.	Nearby gene	Risk allele	HR (95%CI) δ	<i>p</i>	HR (95%CI) †	<i>p</i>	HR (95%CI) ¥	<i>p</i>
rs4368253	18	AC107990.1 NF2L3P1	C	1.03 (0.74-1.42)	0.871	0.62 (0.31-1.25)	0.184	1.18 (0.80-1.74)	0.413
rs1439287	2	ACOXL	T	1.05 (0.81-1.37)	0.708	0.98 (0.65-1.50)	0.943	1.18 (0.76-1.83)	0.469
rs58055674	2	ACOXL	C	1.39 (1.02-1.90)	0.036	1.60 (1.08-2.38)	0.019	1.18 (0.51-2.73)	0.696

rs7944004	11	ASCL2 C11orf21	T	1.04 (0.78-1.39)	0.769	1.01 (0.61-1.67)	0.967	1.09 (0.71-1.68)	0.684
rs4987855	18	BCL2	G	0.75 (0.44-1.27)	0.281	NA	NA	0.73 (0.43-1.25)	0.256
rs2651823	11	C11orf21 TSPAN32	A	1.12 (0.85-1.46)	0.418	1.13 (0.73-1.76)	0.591	1.20 (0.77-1.85)	0.423
rs1476569	4	CAMK2D	G	1.01 (0.76-1.35)	0.951	1.02 (0.69-1.51)	0.915	0.99 (0.54-1.82)	0.971
rs3769825	2	CASP8	T	1.41 (1.06-1.87)	0.017	1.56 (0.98-2.47)	0.059	1.58 (1.00-2.48)	0.048
rs7558911	2	CFLAR	A	1.21 (0.93-1.58)	0.163	1.23 (0.78-1.95)	0.375	1.35 (0.89-2.05)	0.155
rs1036935	18	CXXC1	A	1.13 (0.83-1.53)	0.446	1.14 (0.77-1.69)	0.503	1.24 (0.59-2.61)	0.568
rs1359742	9	DMRTA1	G	0.98 (0.74-1.30)	0.884	0.85 (0.54-1.32)	0.468	1.11 (0.72-1.73)	0.636
rs6546149	2	DTNB	G	0.95 (0.69-1.31)	0.769	0.90 (0.61-1.33)	0.587	1.14 (0.55-2.36)	0.723
rs9880772	3	EOMES LINC01980	T	0.96 (0.73-1.24)	0.735	0.96 (0.64-1.43)	0.831	0.91 (0.56-1.48)	0.717
rs13015798	2	FAM126B	A	0.92 (0.68-1.23)	0.567	0.88 (0.45-1.70)	0.695	0.90 (0.61-1.33)	0.605
rs6586163	10	FAS	A	0.81 (0.62-1.07)	0.139	0.80 (0.51-1.26)	0.339	0.72 (0.45-1.13)	0.150
rs2267708	7	GPR37	T	0.76 (0.58-1.00)	0.052	0.69 (0.46-1.03)	0.069	0.71 (0.43-1.16)	0.172
rs2953196	11	GRAMD1B	G	0.82 (0.59-1.14)	0.240	0.85 (0.34-2.10)	0.724	0.76 (0.50-1.16)	0.202
rs35923643	11	GRAMD1B	G	0.71 (0.52-0.98)	0.040	0.68 (0.46-1.02)	0.061	0.54 (0.23-1.28)	0.164
rs3800461	6	ILRUN	C	0.97 (0.61-1.54)	0.881	0.94 (0.55-1.60)	0.808	1.17 (0.27-5.08)	0.832
rs9392504	6	IRF4	A	0.94 (0.72-1.23)	0.648	1.07 (0.63-1.81)	0.800	0.83 (0.55-1.26)	0.380
rs391855	16	IRF8	A	1.14 (0.87-1.49)	0.336	1.28 (0.77-2.14)	0.341	1.15 (0.77-1.72)	0.503
rs898518	4	LEF1	A	1.16 (0.87-1.54)	0.310	1.58 (0.82-3.04)	0.172	1.09 (0.74-1.62)	0.650
rs34676223	1	MDS2	C	1.28 (0.96-1.71)	0.098	1.96 (0.94-4.07)	0.073	1.24 (0.84-1.82)	0.280
rs57214277	4	MYL12BP2 LINC02363	T	1.10 (0.85-1.43)	0.456	1.28 (0.86-1.91)	0.225	0.97 (0.58-1.61)	0.897
rs10936599	3	MYNN	C	1.03 (0.73-1.46)	0.866	0.42 (0.21-0.83)	0.013	1.30 (0.85-1.98)	0.222
rs11715604	3	NCK1	T	0.78 (0.55-1.10)	0.158	0.59 (0.24-1.48)	0.263	0.77 (0.51-1.17)	0.225
rs6489882	12	OAS3	G	1.01 (0.76-1.34)	0.929	1.06 (0.70-1.59)	0.797	0.96 (0.56-1.63)	0.868
rs140522	22	ODF3B	T	0.88 (0.66-1.18)	0.391	0.86 (0.58-1.28)	0.452	0.81 (0.43-1.53)	0.523
rs2236256	6	OPRM1 IPCEF1	C	1.06 (0.79-1.41)	0.704	0.79 (0.52-1.21)	0.279	1.50 (0.97-2.33)	0.070
rs11637565	15	PCAT29 LOC107984788	G	0.90 (0.68-1.20)	0.482	1.04 (0.67-1.61)	0.874	0.67 (0.38-1.16)	0.155
rs17246404	7	POT1	C	1.14 (0.83-1.56)	0.425	1.63 (0.70-3.79)	0.257	1.08 (0.72-1.61)	0.702
rs2511714	8	POU5F1P2 ODF1	G	0.97 (0.72-1.31)	0.838	0.93 (0.61-1.40)	0.721	1.03 (0.57-1.86)	0.914
rs11083846	19	PRKD2	A	1.34 (1.00-1.80)	0.050	1.21 (0.82-1.78)	0.331	2.31 (1.31-4.08)	0.004
rs888096	2	QPCT RNU6-1116P	A	1.02 (0.76-1.35)	0.912	0.96 (0.64-1.44)	0.851	1.14 (0.66-1.96)	0.631
rs41271473	1	RHOU	G	0.76 (0.50-1.13)	0.176	0.85 (0.26-2.76)	0.786	0.69 (0.42-1.13)	0.139
rs73718779	6	SERPIN6	A	1.15 (0.74-1.78)	0.536	1.09 (0.68-1.74)	0.734	2.86 (0.69-11.9)	0.148
rs12638862	3	TERC	A	0.94 (0.66-1.33)	0.715	0.40 (0.19-0.84)	0.015	1.12 (0.74-1.69)	0.601
rs7705526	5	TERT	A	0.92 (0.70-1.23)	0.589	0.79 (0.53-1.17)	0.240	1.13 (0.69-1.86)	0.633
rs61904987	11	TMPRSS5 DRD2	T	1.28 (0.86-1.92)	0.228	1.35 (0.85-2.16)	0.203	1.23 (0.30-5.10)	0.776
rs926070	6	TSBP1-AS1	A	1.00 (0.74-1.35)	0.987	0.87 (0.45-1.69)	0.684	1.04 (0.71-1.54)	0.835
rs7254272	19	ZBTB7A MAP2K2	A	0.74 (0.51-1.07)	0.110	0.62 (0.41-0.96)	0.030	1.34 (0.58-3.09)	0.497

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; HR, hazards ratio. Significant results in bold ($p < 0.05$). ^δ Cox regression analysis assuming a log-additive model of inheritance. [†] Cox regression analysis assuming a dominant model of inheritance. [‡] Cox regression analysis assuming a recessive model of inheritance.

In line with these data, a meta-analysis of our data including data from a previous GWAS confirmed that none of these loci have a significant impact on

TTFT (Table 5). These findings support the notion of a null effect of susceptibility variants on disease progression in CLL.

Table 5. Meta-analysis of association estimates of GWAS-identified risk variants for CLL and disease progression in the CRuCIAL cohorts with a previous GWAS.

SNP	Chr.	Nearby gene	Risk allele	CRuCIAL consortium (354 CLL cases)		Lin et al. (2021) [12] (755 CLL cases)		Meta-analysis (1109 CLL cases)		
				HR (95%CI) δ	<i>p</i>	HR (95%CI) δ	<i>p</i>	HR (95%CI) δ	<i>p</i>	<i>p</i> _{net}
rs4368253	18	AC107990.1 NFE2L3P1	C	1.03 (0.74-1.42)	0.871	1.03 (0.87-1.17)	0.684	1.03 (0.85-1.19)	0.726	0.985
rs1439287	2	ACOXL	T	1.05 (0.81-1.37)	0.708	1.00 (0.86-1.12)	0.990	1.01 (1.16-0.88)	0.858	0.765
rs58055674	2	ACOXL	C	1.39 (1.02-1.90)	0.036	0.98 (0.84-1.15)	0.837	1.08 (0.89-1.23)	0.398	0.096
rs7944004	11	ASCL2 C11orf21	T	1.04 (0.78-1.39)	0.769	-	-	1.04 (1.35-0.80)	0.783	1.000
rs4987855	18	BCL2	G	0.75 (0.44-1.27)	0.281	0.82 (0.45-1.10)	0.230	0.78 (0.33-1.10)	0.205	0.734
rs2651823	11	C11orf21 TSPAN32	A	1.12 (0.85-1.46)	0.418	0.93 (0.80-1.07)	0.302	0.98 (1.14-0.84)	0.796	0.303
rs1476569	4	CAMK2D	G	1.01 (0.76-1.35)	0.951	0.99 (0.85-1.15)	0.898	1.00 (0.83-1.14)	0.955	0.917
rs3769825	2	CASP8	T	1.41 (1.06-1.87)	0.017	1.10 (0.96-1.22)	0.149	1.01 (1.18-0.87)	0.870	0.018
rs7558911	2	CFLAR	A	1.21 (0.93-1.58)	0.163	0.81 (0.63-0.97)	0.019	0.94 (1.10-0.80)	0.421	0.048
rs1036935	18	CXXC1	A	1.13 (0.83-1.53)	0.446	0.96 (0.83-1.13)	0.660	1.01 (1.19-0.85)	0.949	0.444
rs1359742	9	DMRTA1	G	0.98 (0.74-1.30)	0.884	0.93 (0.76-1.07)	0.344	0.94 (0.77-1.10)	0.506	0.778
rs6546149	2	DTNB	G	0.95 (0.69-1.31)	0.769	0.86 (0.73-1.01)	0.067	0.87 (0.64-1.06)	0.192	0.652
rs9880772	3	EOMES LINC01980	T	0.96 (0.73-1.24)	0.735	1.00 (0.87-1.12)	0.954	0.98 (1.13-0.86)	0.828	0.815
rs13015798	2	FAM126B	A	0.92 (0.68-1.23)	0.567	0.78 (0.57-0.96)	0.015	0.85 (1.02-0.71)	0.076	0.556
rs6586163	10	FAS	A	0.81 (0.62-1.07)	0.139	1.00 (0.86-1.13)	0.972	0.95 (1.11-0.82)	0.527	0.249
rs2267708	7	GPR37	T	0.76 (0.58-1.00)	0.052	0.98 (0.85-1.12)	0.743	0.91 (1.07-0.78)	0.273	0.176
rs2953196	11	GRAMD1B	G	0.82 (0.59-1.14)	0.240	1.16 (0.99-1.31)	0.065	1.06 (0.84-1.23)	0.596	0.102
rs35923643	11	GRAMD1B	G	0.71 (0.52-0.98)	0.040	1.18 (1.00-1.39)	0.049	1.03 (0.84-1.19)	0.760	0.021
rs3800461	6	ILRUN	C	0.97 (0.61-1.54)	0.881	1.19 (0.96-1.47)	0.105	1.12 (1.41-0.88)	0.363	0.426
rs9392504	6	IRF4	A	0.94 (0.72-1.23)	0.648	1.03 (0.88-1.16)	0.678	1.00 (1.16-0.87)	0.970	0.597
rs391855	16	IRF8	A	1.14 (0.87-1.49)	0.336	1.00 (0.85-1.13)	0.967	1.04 (1.21-0.89)	0.624	0.477
rs898518	4	LEF1	A	1.16 (0.87-1.54)	0.310	0.92 (0.76-1.06)	0.282	0.98 (1.14-0.84)	0.818	0.234
rs34676223	1	MDS2	C	1.28 (0.96-1.71)	0.098	1.06 (0.90-1.19)	0.467	1.11 (0.93-1.25)	0.210	0.347
rs57214277	4	MYL12BP2 LINC02363	T	1.10 (0.85-1.43)	0.456	0.92 (0.79-1.06)	0.228	0.97 (1.13-0.84)	0.728	0.286
rs10936599	3	MYNN	C	1.03 (0.73-1.46)	0.866	0.91 (0.70-1.08)	0.314	0.94 (0.72-1.13)	0.586	0.587
rs11715604	3	NCK1	T	0.78 (0.55-1.10)	0.158	1.05 (0.87-1.27) η	0.614	0.96 (0.73-1.15)	0.719	0.207
rs6489882	12	OAS3	G	1.01 (0.76-1.34)	0.929	1.10 (0.95-1.27)	0.213	1.06 (0.91-1.18)	0.450	0.588
rs140522	22	ODF3B	T	0.88 (0.66-1.18)	0.391	1.04 (0.90-1.20)	0.641	0.99 (1.16-0.85)	0.927	0.397
rs2236256	6	OPRM1 IPCEF1	C	1.06 (0.79-1.41)	0.704	1.04 (0.91-1.20)	0.568	1.04 (0.88-1.18)	0.580	0.930
rs11637565	15	PCAT29 LOC107984788	G	0.90 (0.68-1.20)	0.482	0.89 (0.77-1.03)	0.112	0.88 (0.68-1.05)	0.182	0.958
rs17246404	7	POT1	C	1.14 (0.83-1.56)	0.425	1.01 (0.85-1.15)	0.872	1.04 (0.86-1.19)	0.636	0.577
rs2511714	8	POU5F1P2 ODF1	G	0.97 (0.72-1.31)	0.838	1.00 (0.87-1.14)	0.962	0.99 (0.83-1.13)	0.895	0.883
rs11083846	19	PRKD2	A	1.34 (1.00-1.80)	0.050	1.11 (0.94-1.30)	0.228	1.17 (1.41-0.98)	0.088	0.342
rs888096	2	QPCT RNU6-1116P	A	1.02 (0.76-1.35)	0.912	1.08 (0.93-1.24)	0.324	1.06 (1.26-0.90)	0.484	0.801
rs41271473	1	RHOU	G	0.76 (0.50-1.13)	0.176	0.92 (0.71-1.09)	0.368	0.87 (0.61-1.08)	0.247	0.453
rs73718779	6	SERPINB6	A	1.15 (0.74-1.78)	0.536	0.74 (0.42-0.99)	0.040	1.23 (1.59-0.95)	0.113	0.750
rs12638862	3	TERC	A	0.94 (0.66-1.33)	0.715	0.95 (0.76-1.11)	0.567	0.95 (1.14-0.79)	0.582	0.958

rs7705526	5	<i>TERT</i>	A	0.92 (0.70-1.23)	0.589	-	-	0.92 (1.27-0.67)	0.621	1.000
rs61904987	11	<i>TMPRSS5 DRD2</i>	T	1.28 (0.86-1.92)	0.228	1.06 (0.87-1.29)	0.570	1.11 (1.40-0.89)	0.357	0.481
rs926070	6	<i>TSBP1-AS1</i>	A	1.00 (0.74-1.35)	0.987	1.07 (0.91-1.19)	0.382	1.05 (1.25-0.89)	0.570	0.742
rs7254272	19	<i>ZBTB7A MAP2K2</i>	A	0.74 (0.51-1.07)	0.110	1.12 (0.93-1.35)	0.242	1.00 (1.22-0.82)	0.991	0.096

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; HR, hazards ratio. CI, confidence interval; Meta-analysis was performed assuming a fixed-effect model. Significant results in bold ($p < 0.05$). [¶] Authors report the effect found for the rs62410363 (a SNP in strong linkage disequilibrium with the rs11715604, $r^2 = 0.97$). ^δ Cox regression analyses were adjusted for age, sex, and country of origin and were calculated according to log-additive model of inheritance.

As expected, the association of weighted and unweighted PRSs built with those variants associated with TTFT in the CRuCIAL cohort was very modest ($HR_{Unweighted} = 1.26$, $p = 6.20 \times 10^{-4}$ and $HR_{Weighted} = 1.32$, $p = 5.17 \times 10^{-4}$ and $HR_{Unweighted_Scaled_80\%} = 1.29$, $p = 4.40 \times 10^{-5}$ and $HR_{Weighted_Scaled_80\%} = 1.34$, $p = 6.60 \times 10^{-5}$). Therefore, we were able to confirm that these PRSs were not useful in accurately predicting disease progression ($AUROC_{Unweighted} = 0.59$, $AUROC_{Weighted} = 0.60$, $AUROC_{Unweighted_Scaled_80\%} = 0.61$ and $AUROC_{Weighted_Scaled_80\%} = 0.61$; Table 6).

Table 6. Associations between unweighted and weighted PRSs and disease progression.

Polygenic risk scores (n=290)				AUROC
	Quintiles	HR 95%CI ^a	<i>p</i>	AUROC (95%CI)
Unweighted, subjects with 100% call rate	1	1.00	-	
	2	1.23 (0.68-2.22)	0.487	
	3	-	-	
	4	1.89 (1.08-3.31)	0.026	
	5	2.66 (1.45-4.88)	1.50·10 ⁻⁰³	
	Continuos ^b	1.26 (1.11-1.45)	6.20·10⁻⁰⁴	0.59 (0.52-0.66)
Weighted, subjects with 100% call rate	1	1.00	-	
	2	2.22 (1.05-4.71)	0.037	
	3	1.45 (0.66-3.16)	0.353	
	4	2.34 (1.14-4.79)	0.020	
	5	3.87 (1.89-7.94)	2.10·10⁻⁰⁴	
	Continuos ^b	1.32 (1.13-1.54)	5.17·10⁻⁰⁴	0.60 (0.53-0.67)
Polygenic risk scores (n=323)				AUROC
	Quintiles	HR 95%CI ^a	<i>p</i>	AUROC (95%CI)
Unweighted, subjects with 80% call rate	1	1.00	-	
	2	1.27 (0.73-2.21)	0.392	
	3	-	-	
	4	1.85 (1.07-3.19)	0.027	
	5	3.00 (1.75-5.12)	5.90·10⁻⁰⁵	

	Continuos ^b	1.29 (1.14-1.46)	4.40·10⁻⁰⁵	0.61 (0.54-0.67)
Weighted, subjects with 80% call rate	1	1.00		
	2	1.89 (0.93-3.85)	0.080	
	3	1.64 (0.81-3.32)	0.172	
	4	2.64 (1.37-5.10)	3.80·10 ⁻⁰³	
	5	3.58 (1.85-6.93)	1.50·10⁻⁰⁴	
	Continuos ^b	1.34 (1.16-1.54)	6.60·10⁻⁰⁵	0.61 (0.55-0.67)

a HR, hazards ratio; CI, confidence interval. All analyses were adjusted for age, sex and geographic region of origin. b The unit for the analysis with the continuous variable was the increment of one quintile.

3. Discussion

This is the largest study evaluating the association of GWAS-identified susceptibility variants for CLL with OS, and one of the first studies assessing the effect of GWAS-identified susceptibility variants for CLL in disease progression. Even though we found potentially interesting associations between ten SNPs within the *CAMK2D*, *CASP8*, *CFLAR*, *CXXC1*, *GPR37*, *IRF8*, *LEF1*, *MYNN*, *PRKD2*, and *TERC* loci and the OS of CLL patients, none of these associations remained significant after correction for multiple testing. As expected, we found a modest association between weighted and unweighted PRSs and OS, which increased the prediction capacity by only 7%. These findings suggest that susceptibility variants for CLL do not have a large influence on OS, which is in agreement with a previous study that, using a similar approach, demonstrated that susceptibility variants do not influence the OS of patients diagnosed with multiple myeloma, another B cell malignancy [13].

This study failed to find a statistically significant association between GWAS-identified risk variants for CLL and TTFT. We found that only seven SNPs within the *ACOXL*, *CASP8*, *GRAMD1B*, *MYNN*, *PRKD2*, *TERC*, and *ZBTB7A* | *MAP2K2* loci showed an association with TTFT at $p < 0.05$ level. None of these associations remained significant after

correction for multiple testing, and a meta-analysis of our data with those from a previous GWAS on TTFT confirmed the null effect of these variants on disease progression. In agreement with these results, we found that weighted and unweighted PRSs did not have the capacity to predict TTFT. Nonetheless, in light of the relatively low power of our study (80% of power to detect an HR of 1.45 for a SNP with a frequency of 0.25) and the sparse number of studies assessing the impact of GWAS-identified risk variants for CLL on OS and TTFT, we cannot rule out the possibility that some of these SNPs might have a stronger effect on the modulation of OS and disease progression. In fact, we found it interesting that carriers of the *CXXC1*_{rs1036935A} allele had poorer OS, as our team has previously reported that the presence of this allele is associated with decreased numbers of CD19+CD20+ B cells [14], a subtype of cells poorly expressed in CLL patients. The *CXXC1* locus encodes for a protein of the SETD1 complex, which acts as an epigenetic transcriptional activator; if deregulated, it can lead to tumor progression and poorer survival [15].

This study has both strengths and weaknesses. The major strengths of this study are the large number of genetic markers analyzed and the relatively large size of the study population. Another strength is the comprehensive functional analysis conducted in the HFGP cohort, which included cQTL data after stimulation of whole blood, PBMCs, and MDMs with LPS, PHA, Pam3Cys, CpG, and *B. burgdorferi* and *E. coli*, as well as data on serological and plasmatic inflammatory proteins, serum steroid hormones, and blood-derived immune cell types. A limitation of this study is its multicentric nature, with inevitable drawbacks such as the impossibility of uniformly collecting medication history and Rai-Binet status for a significant proportion of the patients analyzed. In addition, considering that all study

participants included in this study were of European ancestry, we could not determine the impact of GWAS-identified variants on patient survival and TTFT in other ethnic or ancestral populations.

3. Materials and Methods

3.1. Study Participants

This study included 1039 CLL patients ascertained through the CRuCIAL consortium. CLL patients were diagnosed following the updated international criteria [5]. Study participants were of European ancestry, and provided their written informed consent to participate in the study, which was approved by the ethical review committee of participant institutions: Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain, 0760-N-18); University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain, PI90/07/2018); Hospital del Mar (Barcelona, Spain); Catalan Institute of Oncology (Barcelona, Spain); Morales Meseguer University Hospital (Murcia, Spain); Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP) group (Spain); University of Modena and Reggio Emilia, AOU Policlinico (Modena, Italy); University of Pisa (Pisa, Italy), Wroclaw Medical University (Wroclaw, Poland); and the Radboud University Medical Center (Nijmegen, The Netherlands, 2011/299). A detailed description of the study cohort has been reported elsewhere [14]. The main characteristics of the patients are included in Table 1. This study followed the Declaration of Helsinki.

3.2. SNP Selection and Genotyping

A total of 41 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected based on published GWAS, functionality data, and linkage disequilibrium between the SNPs (Supplementary Table S1) [14].

Genotyping of selected SNPs was carried out at GENYO (Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, Granada, Spain) using KASPar[®] assays (LGC Genomics, Hoddesdon, UK) according to previously reported protocols. For internal quality control, ~5% of samples were randomly selected and included as duplicates. Concordance between the original and the duplicate samples for the selected SNPs was $\geq 99.0\%$. Call rate was higher than 90%.

3.3. Statistical Analysis and Meta-Analysis

The Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) test was performed in the control group using a standard observed–expected chi-square (χ^2) test. The primary outcome was OS and the endpoint was defined as death from any cause. Survival time was calculated as the time from CLL diagnosis until the occurrence of the study endpoint, censoring at the date of death or the last observed follow-up time. The second outcome was time to first treatment (TTFT), defined as the interval between CLL diagnosis and date of the first treatment or last follow-up, while the endpoint was defined as death from any cause. Association with OS and TTFT, defined as hazard ratio (HR), was calculated for each SNP using Cox regression analysis adjusted for age, sex, and country of origin. Considering the number of SNPs and the number of inheritance models tested (log-additive, dominant, and recessive), we set a significance threshold to 0.00041 (0.05/41/3) using the Bonferroni correction. Association analyses were performed using STATA (v12.1; Stata Corp, College Station, TX, USA) and power calculations were estimated using the survSNP package in R (v4.1.1; R Core Team, 2018).

In order to confirm potentially interesting associations with disease progression, we conducted a meta-analysis of the CRuCIAL data with

those from a previous GWAS [12] using METAL and assuming a fixed-effect model; the I^2 statistic was used to assess statistical heterogeneity between cohorts. Next, in order to confirm whether susceptibility variants could predict OS and disease progression, we computed weighted and unweighted polygenic risk scores (PRSs) considering those SNPs associated with OS and TTFT at a threshold of $p < 0.05$. We built PRSs considering either subjects with a call rate of 100% ($n = 891$ and 290) or 80% ($n = 1003$ and 323) for OS and TTFT, respectively. PRS is an approach that estimates the individual risk to a phenotype or disease, which is calculated as a sum of their genotypes weighted by corresponding genotype effect sizes from summary statistic data. A detailed explanation of how the PRS scores were generated has been published in [16].

3.4. Functional Effect of the GWAS-Identified Risk Variants on Immune Responses

Mechanistically, we investigated whether selected SNPs were correlated with production of nine cytokines after *in vitro* stimulation of peripheral mononuclear cells (PBMCs) from 408 healthy subjects from the Human Functional Genomic Project (HFGP) cohort with LPS (100 ng/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), PHA (10 μ g/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Pam3Cys (10 μ g/mL, EMC microcollections, Tuebingen, Germany), CpG (100 ng/mL, InvivoGen, San Diego, CA, USA), and *B. burgdorferi* (ATCC strain 35210) and *E. coli* (ATCC 25922). In addition, we investigated the correlation between SNPs and circulating concentrations of 103 serum and plasmatic inflammatory proteins, absolute numbers of 91 blood-derived immune cell populations (Supplementary Tables S2 and S3) and 7 plasma steroid hormones. Experimental protocols for the functional experiments have

been previously described in detail [17,18]. Functional results for selected SNPs have been previously published by our team as part of a study in the context of the CRuCIAL consortium that aimed at validating the associations of GWAS-identified risk variants for CLL [14].

4. Conclusions

This study suggests that susceptibility variants for CLL do not substantially impact the overall survival of CLL patients, and confirms previous results suggesting the null effect of these variants on TTFT.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24098005/s1>.

Author Contributions: J.S. designed and coordinated the study. A.J.C.-S., J.M.S.-M. and P.G.-M. were involved in the generation of genetic data from the CRuCIAL cohort. A.J.C.-S. and J.S. performed genetic association analyses, computed PRSs and drafted the manuscript. J.S. obtained funding and performed data quality control. M.G.N., R.t.H. and Y.L. provided the functional raw data from the HFGP cohort and J.S. performed the statistical analysis of functional data. A.M., Y.B., S.L., A.C.-G., Y.N., B.E., J.J.R.-S., E.M.P., R.M. (Rossana Maffei), G.B., M.G., J.R.C., R.M. (Roberto Marasca), M.Á.L.-N., T.C.-L., H.T., I.G., D.C. (Daniele Campa), V.M., S.d.S., R.M.-G., M.G.-Á., T.D.-S., A.J., A.B., A.D.N., M.L., S.L.S., K.H., Y.L., S.I.B., D.C. (Delphine Casabonne), M.A., A.P., M.G.N., A.F. and F.C. provided samples and data from CLL patients. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program, N° 856620 and by grants from the Instituto de Salud Carlos III and FEDER (Madrid, Spain; PI17/02256 and PI20/01845) and from the Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades y FEDER (PY20/01282). "The Mayo studies in

InterLymph were supported in part by the US National Cancer Institute grants P50 CA97274 and R01 CA92153.”

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Boards of all institutions participating in the recruitment of CLL patients and/or healthy donors (Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain, 0760-N-18); University Hospital of Salamanca (Salamanca, Spain, PI90/07/2018); Hospital del Mar (Barcelona, Spain); Catalan Institute of Oncology (Barcelona, Spain); Morales Meseguer University Hospital (Murcia, Spain); Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP) group (Spain); University of Modena and Reggio Emilia, AOU Policlinico (Modena, Italy); University of Pisa (Pisa, Italy), Wrocław Medical University (Wrocław, Poland) and by the Radboud University Medical Center (Nijmegen, The Netherlands, 2011/299)).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Genetic data from the CRuCIAL population can be accessed at <https://ftp.genyo.es/> (accessed on 28 February 2023) and are available upon reasonable request. Functional data used in this study are available at BBMRI-NL data infrastructure (<https://hfgp.bbMRI.nl/>, accessed on 28 February 2023), where they have been meticulously catalogued and archived using the MOLGENIS open-source platform for scientific data. This allows flexible data querying and download, including sufficiently rich metadata and interfaces for machine processing (R statistics, REST API) using FAIR principles to optimize Findability, Accessibility, Interoperability, and Reusability. These datasets are not publicly available because they contain information that could compromise the research participants’ privacy.

Acknowledgments: We kindly thank all individuals who agreed to participate in the study, as well as all cooperating physicians and students.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

5. References

1. Alaggio, R.; Amador, C.; Anagnostopoulos, I.; Attygalle, A.D.; Araujo, I.B.O.; Berti, E.; Bhagat, G.; Borges, A.M.; Boyer, D.; Calaminici, M.; et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* **2022**, *36*, 1720–1748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Yao, Y.; Lin, X.; Li, F.; Jin, J.; Wang, H. The global burden and attributable risk factors of chronic lymphocytic leukemia in 204 countries and territories from 1990 to 2019: Analysis based on the global burden of disease study 2019. *Biomed. Eng. Online* **2022**, *21*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Parikh, S.A.; Rabe, K.G.; Kay, N.E.; Call, T.G.; Ding, W.; Schwager, S.M.; Bowen, D.A.; Conte, M.; Jelinek, D.F.; Slager, S.L.; et al. Chronic lymphocytic leukemia in young (≤ 55 years) patients: A comprehensive analysis of prognostic factors and outcomes. *Haematologica* **2014**, *99*, 140–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Alrawashdh, N.; Sweasy, J.; Erstad, B.; McBride, A.; Persky, D.O.; Abraham, I. Survival trends in chronic lymphocytic leukemia across treatment eras: US SEER database analysis (1985–2017). *Ann. Hematol.* **2021**, *100*, 2501–2512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hallek, M.; Al-Sawaf, O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am. J. Hematol.* **2021**, *96*, 1679–1705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Rossi, D.; Rasi, S.; Spina, V.; Brusca, A.; Monti, S.; Ciardullo, C.; Deambrogi, C.; Khiabani, H.; Serra, R.; Bertoni, F.; et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2013**, *121*, 1403–1412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Berndt, S.I.; Camp, N.J.; Skibola, C.F.; Vijai, J.; Wang, Z.; Gu, J.; Nieters, A.; Kelly, R.S.; Smedby, K.E.; Monnereau, A.; et al. Meta-analysis of genome-wide association studies discovers multiple loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Law, P.J.; Berndt, S.I.; Speedy, H.E.; Camp, N.J.; Sava, G.P.; Skibola, C.F.; Holroyd, A.; Joseph, V.; Sunter, N.J.; Nieters, A.; et al. Genome-wide association analysis implicates dysregulation of immunity genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Slager, S.L.; Rabe, K.G.; Achenbach, S.J.; Vachon, C.M.; Goldin, L.R.; Strom, S.S.; Lanasa, M.C.; Spector, L.G.; Rassenti, L.Z.; Leis, J.F.; et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood* **2011**, *117*, 1911–1916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Di Bernardo, M.C.; Crowther-Swanepoel, D.; Broderick, P.; Webb, E.; Sellick, G.; Wild, R.; Sullivan, K.; Vijaykrishnan, J.; Wang, Y.; Pittman, A.M.; et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 1204–

1210. [CrossRef] [PubMed]
11. Call, T.G.; Phylly, R.L.; Noel, P.; Habermann, T.M.; Beard, C.M.; O'Fallon, W.M.; Kurland, L.T. Incidence of chronic lymphocytic leukemia in Olmsted County, Minnesota, 1935 through 1989, with emphasis on changes in initial stage at diagnosis. *Mayo Clin. Proc.* 1994, 69, 323–328. [CrossRef] [PubMed]
12. Lin, W.Y.; Fordham, S.E.; Sunter, N.; Elstob, C.; Rahman, T.; Willmore, E.; Shepherd, C.; Strathdee, G.; Mainou-Fowler, T.; Piddock, R.; et al. Genome-wide association study identifies risk loci for progressive chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Commun.* 2021, 12, 665. [CrossRef] [PubMed]
13. Macaudo, A.; Clay-Gilmour, A.; Hielscher, T.; Hildebrandt, M.A.T.; Kruszewski, M.; Orłowski, R.Z.; Kumar, S.K.; Ziv, E.; Orciuolo, E.; Brown, E.E.; et al. Does a Multiple Myeloma Polygenic Risk Score Predict Overall Survival of Patients with Myeloma? *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2022, 31, 1863–1866. [CrossRef] [PubMed]
14. Garcia-Martin, P.; Diez, A.M.; Maldonado, J.M.S.; Serrano, A.J.C.; Ter Horst, R.; Benavente, Y.; Landi, S.; Macaudo, A.; Clay-Gilmour, A.; Hernandez-Mohedo, F.; et al. Validation and functional characterization of GWAS-identified variants for chronic lymphocytic leukemia: A CRuCIAL study. *Blood Cancer J.* 2022, 12, 79. [CrossRef] [PubMed]
15. Wu, M.; Fan, B.; Guo, Q.; Li, Y.; Chen, R.; Lv, N.; Diao, Y.; Luo, Y. Knockdown of SETDB1 inhibits breast cancer progression by miR-381-3p-related regulation. *Biol. Res.* 2018, 51, 39. [CrossRef] [PubMed]
16. Canzian, F.; Piredda, C.; Macaudo, A.; Zawirska, D.; Andersen, N.F.; Nagler, A.; Zaucha, J.M.; Mazur, G.; Dumontet, C.; Watek, M.; et al. A polygenic risk score for multiple myeloma risk prediction. *Eur. J. Hum. Genet.* 2022, 30, 474–479. [CrossRef] [PubMed]
17. Li, Y.; Oosting, M.; Smeekens, S.P.; Jaeger, M.; Aguirre-Gamboa, R.; Le, K.T.T.; Deelen, P.; Ricano-Ponce, I.; Schoffelen, T.; Jansen, A.F.M.; et al. A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in Humans. *Cell* 2016, 167, 1099–1110.e14. [CrossRef] [PubMed]
18. Orru, V.; Steri, M.; Sole, G.; Sidore, C.; Viridis, F.; Dei, M.; Lai, S.; Zoledziewska, M.; Busonero, F.; Mulas, A.; et al. Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease. *Cell* 2013, 155, 242–256. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

9, ANEXO II

9.1. Tabla suplementaria 1

Tabla suplementaria 1. Lista de genes asociados con la autofagia seleccionados.

GeneId	Name	Symbol
55626	autophagy/beclin-1 regulator 1	<i>AMBRA1</i>
8542	apolipoprotein L, 1	<i>APOL1</i>
405	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	<i>ARNT</i>
410	arylsulfatase A	<i>ARSA</i>
411	arylsulfatase B	<i>ARSB</i>
468	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	<i>ATF4</i>
22926	activating transcription factor 6	<i>ATF6</i>
83734	ATG10 autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG10</i>
9140	ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG12</i>
55054	ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)	<i>ATG16L1</i>
89849	ATG16 autophagy related 16-like 2 (S. cerevisiae)	<i>ATG16L2</i>
23130	ATG2 autophagy related 2 homolog A (S. cerevisiae)	<i>ATG2A</i>
55102	ATG2 autophagy related 2 homolog B (S. cerevisiae)	<i>ATG2B</i>
64422	ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG3</i>
115201	ATG4 autophagy related 4 homolog A (S. cerevisiae)	<i>ATG4A</i>
23192	ATG4 autophagy related 4 homolog B (S. cerevisiae)	<i>ATG4B</i>
84938	ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)	<i>ATG4C</i>
84971	ATG4 autophagy related 4 homolog D (S. cerevisiae)	<i>ATG4D</i>
9474	ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG5</i>
10533	ATG7 autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG7</i>
79065	ATG9 autophagy related 9 homolog A (S. cerevisiae)	<i>ATG9A</i>
285973	ATG9 autophagy related 9 homolog B (S. cerevisiae)	<i>ATG9B</i>
471	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	<i>ATIC</i>
573	BCL2-associated athanogene	<i>BAG1</i>
9531	BCL2-associated athanogene 3	<i>BAG3</i>
578	BCL2-antagonist/killer 1	<i>BAK1</i>
581	BCL2-associated X protein	<i>BAX</i>
596	B-cell CLL/lymphoma 2	<i>BCL2</i>
598	BCL2-like 1	<i>BCL2L1</i>
8678	beclin 1, autophagy related	<i>BECN1</i>
637	BH3 interacting domain death agonist	<i>BID</i>
332	baculoviral IAP repeat-containing 5	<i>BIRC5</i>
57448	baculoviral IAP repeat-containing 6	<i>BIRC6</i>
662	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	<i>BNIP1</i>
664	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	<i>BNIP3</i>
665	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	<i>BNIP3L</i>
60673	chromosome 12 open reading frame 44	<i>C12orf44</i>
23591	chromosome 17 open reading frame 88	<i>C17orf88</i>
10241	calcium binding and coiled-coil domain 2	<i>CALCOCO2</i>
10645	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	<i>CAMKK2</i>

821	calnexin	<i>CANX</i>
823	calpain 1, (mu/I) large subunit	<i>CAPN1</i>
11132	calpain 10	<i>CAPN10</i>
824	calpain 2, (m/II) large subunit	<i>CAPN2</i>
826	calpain, small subunit 1	<i>CAPNS1</i>
834	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	<i>CASP1</i>
836	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>CASP3</i>
837	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>CASP4</i>
841	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>CASP8</i>
6347	chemokine (C-C motif) ligand 2	<i>CCL2</i>
729230	chemokine (C-C motif) receptor 2	<i>CCR2</i>
4179	CD46 molecule, complement regulatory protein	<i>CD46</i>
1026	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	<i>CDKN1A</i>
1027	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	<i>CDKN1B</i>
1029	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	<i>CDKN2A</i>
8837	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	<i>CFLAR</i>
25978	chromatin modifying protein 2B	<i>CHMP2B</i>
128866	chromatin modifying protein 4B	<i>CHMP4B</i>
1201	ceroid-lipofuscinosis. neuronal 3	<i>CLN3</i>
1508	cathepsin B	<i>CTSB</i>
1509	cathepsin D	<i>CTSD</i>
1514	cathepsin L1	<i>CTSL1</i>
6376	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	<i>CX3CL1</i>
7852	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	<i>CXCR4</i>
1612	death-associated protein kinase 1	<i>DAPK1</i>
23604	death-associated protein kinase 2	<i>DAPK2</i>
1649	DNA-damage-inducible transcript 3	<i>DDIT3</i>
9077	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	<i>DIRAS3</i>
10395	deleted in liver cancer 1	<i>DLC1</i>
3337	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	<i>DNAJB1</i>
4189	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	<i>DNAJB9</i>
55332	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	<i>DRAM1</i>
9695	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	<i>EDEM1</i>
1938	eukaryotic translation elongation factor 2	<i>EEF2</i>
29904	eukaryotic elongation factor-2 kinase	<i>EEF2K</i>
1956	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	<i>EGFR</i>
5610	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	<i>EIF2AK2</i>
9451	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	<i>EIF2AK3</i>
1965	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa	<i>EIF2S1</i>
1978	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	<i>EIF4EBP1</i>
1981	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1	<i>EIF4G1</i>
2064	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	<i>ERBB2</i>
2081	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	<i>ERN1</i>
30001	ERO1-like (S. cerevisiae)	<i>ERO1L</i>
8772	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	<i>FADD</i>
55578	family with sequence similarity 48, member A	<i>FAM48A</i>

355	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	<i>FAS</i>
2280	FK506 binding protein 1A, 12kDa	<i>FKBP1A</i>
2281	FK506 binding protein 1B, 12,6 kDa	<i>FKBP1B</i>
2353	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	<i>FOS</i>
2308	forkhead box O1	<i>FOXO1</i>
2309	forkhead box O3	<i>FOXO3</i>
2548	glucosidase, alpha; acid	<i>GAA</i>
11337	GABA(A) receptor-associated protein	<i>GABARAP</i>
23710	GABA(A) receptor-associated protein like 1	<i>GABARAPL1</i>
11345	GABA(A) receptor-associated protein-like 2	<i>GABARAPL2</i>
2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>
2773	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	<i>GNAI3</i>
10399	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	<i>GNB2L1</i>
57120	golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing	<i>GOPC</i>
2894	glutamate receptor, ionotropic, delta 1	<i>GRID1</i>
2895	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	<i>GRID2</i>
3065	histone deacetylase 1	<i>HDAC1</i>
10013	histone deacetylase 6	<i>HDAC6</i>
9146	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	<i>HGS</i>
3091	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	<i>HIF1A</i>
3326	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	<i>HSP90AB1</i>
3309	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	<i>HSPA5</i>
3312	heat shock 70kDa protein 8	<i>HSPA8</i>
26353	heat shock 22kDa protein 8	<i>HSPB8</i>
3458	interferon, gamma	<i>IFNG</i>
3551	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells. kinase beta	<i>IKBKB</i>
9641	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells. kinase epsilon	<i>IKBKE</i>
11009	interleukin 24	<i>IL24</i>
345611	immunity-related GTPase family, M	<i>IRGM</i>
3675	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	<i>ITGA3</i>
3655	integrin, alpha 6	<i>ITGA6</i>
3688	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	<i>ITGB1</i>
3691	integrin, beta 4	<i>ITGB4</i>
3708	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	<i>ITPR1</i>
2548	glucosidase, alpha; acid	<i>GAA</i>
11337	GABA(A) receptor-associated protein	<i>GABARAP</i>
23710	GABA(A) receptor-associated protein like 1	<i>GABARAPL1</i>
11345	GABA(A) receptor-associated protein-like 2	<i>GABARAPL2</i>
2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>
2773	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	<i>GNAI3</i>
10399	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	<i>GNB2L1</i>
57120	golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing	<i>GOPC</i>
2894	glutamate receptor, ionotropic, delta 1	<i>GRID1</i>
2895	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	<i>GRID2</i>
9711	KIAA0226	<i>KIAA0226</i>
9776	KIAA0652	<i>KIAA0652</i>
22863	KIAA0831	<i>KIAA0831</i>

3799	kinesin family member 5B	<i>KIF5B</i>
54800	kelch-like 24 (Drosophila)	<i>KLHL24</i>
3916	lysosomal-associated membrane protein 1	<i>LAMP1</i>
3920	lysosomal-associated membrane protein 2	<i>LAMP2</i>
84557	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha	<i>MAP1LC3A</i>
81631	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	<i>MAP1LC3B</i>
440738	microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma	<i>MAP1LC3C</i>
5609	mitogen-activated protein kinase kinase 7	<i>MAP2K7</i>
5594	mitogen-activated protein kinase 1	<i>MAPK1</i>
5595	mitogen-activated protein kinase 3	<i>MAPK3</i>
5599	mitogen-activated protein kinase 8	<i>MAPK8</i>
9479	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	<i>MAPK8IP1</i>
5601	mitogen-activated protein kinase 9	<i>MAPK9</i>
51360	membrane-bound transcription factor peptidase, site 2	<i>MBTPS2</i>
64223	MTOR associated protein, LST8 homolog (S. cerevisiae)	<i>MLST8</i>
64419	myotubularin related protein 14	<i>MTMR14</i>
2475	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	<i>MTOR</i>
4609	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	<i>MYC</i>
92345	nuclear assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae)	<i>NAF1</i>
10135	nicotinamide phosphoribosyltransferase	<i>NAMPT</i>
4077	neighbor of BRCA1 gene 1	<i>NBR1</i>
10787	NCK-associated protein 1	<i>NCKAPI</i>
4780	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	<i>NFE2L2</i>
4790	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	<i>NFKB1</i>
159296	NK2 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)	<i>NKX2-3</i>
58484	NLR family, CARD domain containing 4	<i>NLRC4</i>
4864	Niemann-Pick disease, type C1	<i>NPC1</i>
3084	neuregulin 1	<i>NRG1</i>
9542	neuregulin 2	<i>NRG2</i>
10718	neuregulin 3	<i>NRG3</i>
5034	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	<i>P4HB</i>
5071	Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2, parkin	<i>PARK2</i>
142	poly (ADP-ribose) polymerase 1	<i>PARP1</i>
8682	phosphoprotein enriched in astrocytes 15	<i>PEA15</i>
27043	proline, glutamate and leucine rich protein 1	<i>PELP1</i>
5195	peroxisomal biogenesis factor 14	<i>PEX14</i>
8504	peroxisomal biogenesis factor 3	<i>PEX3</i>
5289	phosphoinositide-3-kinase, class 3	<i>PIK3C3</i>
30849	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4	<i>PIK3R4</i>
65018	PTEN induced putative kinase 1	<i>PINK1</i>
23645	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	<i>PPP1R15A</i>
5564	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit	<i>PRKAB1</i>
5573	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)	<i>PRKARIA</i>
5580	protein kinase C, delta	<i>PRKCD</i>
5588	protein kinase C, theta	<i>PRKCQ</i>
5728	phosphatase and tensin homolog	<i>PTEN</i>
5753	PTK6 protein tyrosine kinase 6	<i>PTK6</i>
8766	RAB11A, member RAS oncogene family	<i>RAB11A</i>

5861	RAB1A, member RAS oncogene family	<i>RAB1A</i>
53917	RAB24, member RAS oncogene family	<i>RAB24</i>
83452	RAB33B, member RAS oncogene family	<i>RAB33B</i>
5868	RAB5A, member RAS oncogene family	<i>RAB5A</i>
7879	RAB7A, member RAS oncogene family	<i>RAB7A</i>
5879	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	<i>RAC1</i>
5894	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	<i>RAF1</i>
5925	retinoblastoma 1	<i>RB1</i>
9821	RB1-inducible coiled-coil 1	<i>RB1CC1</i>
5970	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	<i>RELA</i>
10287	regulator of G-protein signaling 19	<i>RGS19</i>
6009	Ras homolog enriched in brain	<i>RHEB</i>
6198	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1	<i>RPS6KB1</i>
57521	regulatory associated protein of MTOR, complex 1	<i>RPTOR</i>
56681	SAR1 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>SARIA</i>
5265	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1	<i>SERPINA1</i>
83667	sestrin 2	<i>SESN2</i>
51100	SH3-domain GRB2-like endophilin B1	<i>SH3GLB1</i>
23411	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>SIRT1</i>
22933	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>SIRT2</i>
8877	sphingosine kinase 1	<i>SPHK1</i>
83985	spinster homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	<i>SPNS1</i>
8878	sequestosome 1	<i>SQSTM1</i>
6767	suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)	<i>ST13</i>
6794	serine/threonine kinase 11	<i>STK11</i>
29110	TANK-binding kinase 1	<i>TBK1</i>
<i>Not included</i>	transcription factor EB	<i>TFEB</i>
10548	transmembrane 9 superfamily member 1	<i>TM9SF1</i>
81671	transmembrane protein 49	<i>TMEM49</i>
157753	transmembrane protein 74	<i>TMEM74</i>
8743	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	<i>TNFSF10</i>
7157	tumor protein p53	<i>TP53</i>
58476	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	<i>TP53INP2</i>
8626	tumor protein p63	<i>TP63</i>
7161	tumor protein p73	<i>TP73</i>
7248	tuberous sclerosis 1	<i>TSC1</i>
7249	tuberous sclerosis 2	<i>TSC2</i>
286319	tumor suppressor candidate 1	<i>TUSC1</i>
8408	unc-51-like kinase 1 (<i>C. elegans</i>)	<i>ULK1</i>
9706	unc-51-like kinase 2 (<i>C. elegans</i>)	<i>ULK2</i>
25989	unc-51-like kinase 3 (<i>C. elegans</i>)	<i>ULK3</i>
	unc-51 like kinase 4	<i>ULK4</i>
9100	ubiquitin specific peptidase 10	<i>USP10</i>
7405	UV radiation resistance associated gene	<i>UVRAG</i>
9341	vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)	<i>VAMP3</i>
6845	vesicle-associated membrane protein 7	<i>VAMP7</i>
7422	vascular endothelial growth factor A	<i>VEGFA</i>

23001	WD repeat and FYVE domain containing 3	<i>WDFY3</i>
11152	WD repeat domain 45	<i>WDR45</i>
56270	WDR45-like	<i>WDR45L</i>
55062	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	<i>WIP11</i>
26100	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	<i>WIP12</i>
53349	zinc finger, FYVE domain containing 1	<i>ZFYVE1</i>

9.2. Tabla suplementaria 2

Tabla suplementaria 2. Tipos de células analizadas en sangre total o en células sanguíneas mononucleares periféricas.

Name	Parent	Grandparent
Leukocytes_CD45P_LMI1	None	None
Neutrophils_LMI1	1	None
Monocytes_CD14P_LMI1	1	None
Classical_monocytes_CD14PPCD16N_LMI1	3	1
Intermediate_monocytes_CD14PPCD16P_LMI1	3	1
NonClassical_monocytes_CD14PCD16P_LMI1	3	1
Lymphocytes_LMI1	1	None
T_cells_CD3P_CD56N_LMI1	7	1
NK_cells_CD3N_CD56P_LMI1	7	1
NKT_cells_CD3P_CD56P_LMI1	7	1
B_cells_CD19P_LMI1	7	1
CD4P_T_cells_LMI1	8	7
CD8P_T_cells_LMI1	8	7
DP_CD4P_CD8P_LMI1	8	7
DN_CD4N_CD8N_LMI1	8	7
CD4P_CD25high_Treg_LMI1	12	8
NK_dim_CD56P_CD16P_LMI1	9	7
NK_bright_CD56PP_CD16N_LMI1	9	7
NK_CD56P_CD16N_LMI1	9	7
Leukocytes_CD45P_LMI2	justRef	justRef
T_cells_CD3P_CD56N_LMI2	justRef	justRef
CD4P_T_cells_LMI2	justRef	justRef
CD8P_T_cells_LMI2	justRef	justRef
CD45RON_CD45RAP_T_cells_LMI2	21	20
CD45ROP_CD45RAP_T_cells_LMI2	21	20
CD45ROP_CD45RAN_T_cells_LMI2	21	20
CD45RON_CD45RAN_T_cells_LMI2	21	20
CD4P_CD25P_CD127low_Treg_LMI2	22	21
CD4P_Naive_CD45RAP_CD27P_LMI2	22	21
CD4P_Eff_CD45RAP_CD27N_LMI2	22	21

CD4P_EM_CD45RAN_CD27N_LMI2	22	21
CD4P_CM_CD45RAN_CD27P_LMI2	22	21
CD4P_Naive_CD45RON_CD27P_LMI2	22	21
CD4P_Eff_CD45RON_CD27N_LMI2	22	21
CD4P_EM_CD45ROP_CD27N_LMI2	22	21
CD4P_CM_CD45ROP_CD27P_LMI2	22	21
CD8P_Naive_CD45RAP_CD27P_LMI2	23	21
CD8P_Eff_CD45RAP_CD27N_LMI2	23	21
CD8P_EM_CD45RAN_CD27N_LMI2	23	21
CD8P_CM_CD45RAN_CD27P_LMI2	23	21
CD8P_Naive_CD45RON_CD27P_LMI2	23	21
CD8P_Eff_CD45RON_CD27N_LMI2	23	21
CD8P_EM_CD45ROP_CD27N_LMI2	23	21
CD8P_CM_CD45ROP_CD27P_LMI2	23	21
Lymphocytes_LMI3	justRef	justRef
B_cells_CD3N_CD19P_LMI3	justRef	justRef
CD27N_IgMP_LMI3	justRef	justRef
CD19P_CD20N_Plasma_blasts_LMI3	47	46
CD19P_CD20P_B_cells_LMI3	47	46
IgDN_CD5PP_LMI3	47	46
IgDP_CD5PP_LMI3	47	46
IgDN_CD5P_LMI3	47	46
IgDP_CD5P_LMI3	47	46
CD24P_CD38P_LMI3	47	46
Transitional_B_cells_CD24PP_CD38PP_LMI3	47	46
IgDN_IgMP_LMI3	47	46
IgDP_IgMP_LMI3	47	46
IgDP_IgMN_LMI3	47	46
IgDN_IgMN_LMI3	47	46
Transitional_B_cell_CD27N_IgMP_CD24P_CD38high_LMI3	48	47
Mature_naive_CD24P_CD38P_LMI3	48	47
IgMN_LMI3	55	47
CD24P_CD38P_CD27P_IgMP_LMI3	55	47
Natural_effector_CD24P_CD38P_IgDP_IgMP_LMI3	55	47
Plasmablast_IgDN_IgMN_CD38PP_LMI3	60	47
Class_switched_memory_IgDN_IgMN_CD38P_CD27P_LMI3	60	47
IgDN_IgMN_CD27N_LMI3	60	47
Naive_B_cells_IgDP_IgMP_CD27N_LMI3	58	47
Memory_B_cells_IgDP_IgMP_CD27P_LMI3	58	47
IgDN_IgMP_CD27N_LMI3	57	47
IgM_only_memory_IgDN_IgMP_CD27_LMI3	57	47
IgMP_CD38PP_CD27P_LMI3	57+58	47
Class_non_switched_memory_IgMP_CD38P_CD27P_LMI3	57+58	47
IgMP_CD27N_LMI3	57+58	47
Lymphocytes_PBMC_LMI4	justRef	justRef
CD4P_T_cells_PBMC_LMI4	justRef	justRef

DP_CD4P_CD8P_PBMC_LMI4	justRef	justRef
DN_CD4N_CD8N_PBMC_LMI4	justRef	justRef
CD8P_T_cells_PBMC_LMI4	justRef	justRef
CD25N_CD127P_Tconv_PBMC_LMI4	justRef	justRef
CD4P_CD25P_CD127low_Treg_PBMC_LMI4	justRef	justRef
Prol_DN_CD4NCD8N_PBMC_LMI4	80	77
Prol_DP_CD4PCD8P_PBMC_LMI4	79	77
Prol_CD4P_Tconv_PBMC_LMI4	82	78
Prol_CD4P_Treg_PBMC_LMI4	83	78
Prol_CD8_PBMC_LMI4	81	77
Treg_FOXP3P_HeliosP_PBMC_LMI4	83	78
Treg_FOXP3P_HeliosN_PBMC_LMI4	83	78
Treg_CD45RAP_PBMC_LMI4	83	78
Treg_CD45RAN_PBMC_LMI4	83	78
Treg_HLANDRP_PBMC_LMI4	83	78

Las células incluidas en LMI1-3 se midieron en sangre completa y las incluidas en LIM4 en PBMCs.

9.3. Tabla suplementaria 3

Tabla suplementaria 3. Metabolitos séricos y plasmáticos medidos en la cohorte HFGP.

Panel	Marcadores	Localización
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	4E-BP1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	ADA	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	ARTN	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	AXIN1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	Beta-NGF	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CASP-8	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL11	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL19	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL20	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL23	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL25	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL28	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL3	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL4	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD244	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD40	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD5	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD6	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD8A	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CDCP1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CSF-1	Suero

9.4. Tabla suplementaria 4

Tabla suplementaria 4. Resumen de la anotación funcional y regulatoria de los SNP más significativos.

SNP	Chr	Alelo riesgo	PHM ^{a,b}	EHM ^{a,b}	DNase	eQTL ^c	Regulatory Motifs Changed ^d	Proteins Bound ^d	Rank ^e	Score ^e	FORGEdb score	CADD score	
<i>ARSB</i> _{rs59952010}	5	C					CDP_4 DMRT3 DMRT4		7	0.51392	6	5.3	
<i>BAK1</i> _{rs210143}	6	T	BLD.CD14.PC	BLD.CD14.PC		BAK1		GM12864 CTCF					
			BLD.CD15.PC	BLD.CD15.PC		2.49·10 ⁻⁴⁷		GM12865 CTCF					
			BLD.CD19.CPC	BLD.CD19.CPC		ITPR3		GM12873 CTCF					
			BLD.CD19.PPC	BLD.CD19.PPC		2.49·10 ⁻⁶		GM12874 CTCF					
			BLD.CD34.PC	BLD.CD34.PC		BAK1		GM12875 CTCF					
			BLD.CD34.CC	BLD.CD34.CC		1.54·10 ⁻⁵⁹				1f	0.55436	8	7.5
			BLD.CD56.PC	BLD.CD56.PC		BAK1							
			BLD.MOB.CD3 4.PC.F	BLD.MOB.CD3 4.PC.F		5.67·10 ⁻¹⁸							
			BLD.MOB.CD3 4.PC.M	BLD.MOB.CD3 4.PC.M		BAK1							
BLD.CD14.MO NO	BLD.CD14.MO NO		2.25·10 ⁻¹³										
BLD.K562.CNC R	BLD.K562.CNC R		BAK1		3.64·10 ⁻¹²								

BAK1
 $7.34 \cdot 10^{-8}$
 BAK1
 $3.97 \cdot 10^{-17}$
 BAK1
 $4.54 \cdot 10^{-27}$
 BAK1
 $4.13 \cdot 10^{-9}$

			BLD.CD34.PC	BCL_disc5					
			BLD.CD34.CC	CCNT2_disc1					
			BLD.MOB.CD3	Evi-1_2					
			4.PC.F	GATA_know					
			BLD.MOB.CD3	n14					
			4.PC.M	Ik-1_2					
<i>BCL2</i> _{rs4987852}	18	T		SETDB1_disc1	2b	0.60075	10	11.3	
				STAT_disc1					
				STAT_know					
				n12					
				STAT_know					
				n4					
				STAT_know					
				n7					
				TAL1_disc1					
<i>BCL2</i> _{rs4987856}	18	C	BLD.CD14.MO NO	BLD.CD34.PC BLD.CD34.CC	Pax- 5_known3	4	0.60906	5	0.859

				GM15510 NFKB					
				BLD.CD14.PC					
				BLD.CD15.PC					
				BLD.CD19.CPC					
				BLD.CD34.PC					
				BLD.CD34.CC					
<i>BCL2</i> _{rs11152374}	18	G	BLD.CD14.MO NO	BLD.MOB.CD3 4.PC.F	Rad21_disc3	4	0.60906	6	1.44
				BLD.MOB.CD3 4.PC.M					
				BLD.CD14.MO NO					
				BLD.K562.CNC R					
			BLD.CD14.MO NO	BLD.CD14.PC	ITM2B				
			BLD.MOB.CD3 4.PC.F	BLD.CD15.PC	9.08·10 ⁻⁶				
			BLD.MOB.CD3 4.PC.M	BLD.CD19.CPC	ITM2B				
				BLD.CD19.PPC	7.78·10 ⁻¹³				
<i>LPAR6/RBI</i> _{rs11839271}	13	C		BLD.CD56.PC	ITM2B	1f	0.66703	8	0.936
				BLD.CD34.PC	8.85·10 ⁻¹⁴				
				BLD.CD34.CC	ITM2B.				
				BLD.K562.CNC R	5.02·10 ⁻¹⁴				
				BLD.CD14.MO NO	ITM2B				
				BLD.MOB.CD3 4.PC.F	3.70·10 ⁻¹⁴				

BLD.MOB.CD3
4.PC.M

ITM2B
6.01·10⁻¹²
CYSLTR2
3.44·10⁻¹¹
LINC00462
2.61·10⁻¹⁰

CYSLTR2
9.25·10⁻¹¹
LINC00462
2.13·10⁻¹⁰

			BLD.CD14.PC BLD.CD15.PC	GR_known4 NRSF_known2					
	18	C	BLD.CD14.MO NO	BLD.CD19.CPC BLD.CD19.PPC BLD.MOB.CD3 4.PC.F	Osr	1b	0.36991	7	0.84
<i>PRKCD</i> _{rs143052840}	3	G		BLD.CD14.PC BLD.CD19.PPC BLD.CD14.MO NO	LUN-1 LXR_2 Pitx2	1f	0.31067	5	1.7
<i>CDKN2A</i> _{rs3731204}	9	T	BLD.CD14.PC BLD.CD15.PC	BLD.MOB.CD3 4.PC.F BLD.CD14.MO NO	DMRT1 DMRT2	1f	0.55436	9	2.63

	BLD.CD34.CC	ACTA2-AS1 2.40·10 ⁻¹⁴	GATA_know n1
BLD.MOB.CD3 4.PC.F	BLD.CD56.PC	FAS	
	BLD.MOB.CD3 4.PC.F	7.18·10 ⁻⁴¹	
	BLD.CD14.MO NO	STAMBPL1 8.5·10 ⁻⁴ STAMBPL1 A L157394.15 A CTA2 9.81·10 ⁻¹⁹⁸	

<i>ITGA6</i> _{rs7584971}	2	C			OTX	1f	0.75983	5	0.53
					Foxk1 Mef2_known 5 Pou2f2_know n2 Sox_2 TATA_know n1	1f	0.55324	4	2.79
<i>NAFI</i> _{rs6829366}	4	G			FAC1 Foxp1 HMG-IY_2 RREB-1_1 RREB-1_2	6	0.26833	5	0.076
<i>TFEB</i> _{rs6910366}	6	C	BLD.CD15.PC BLD.CD19.PPC BLD.CD56.PC	BLD.CD14.PC BLD.CD15.PC BLD.CD19.CPC	ELF1_disc3 Myc_disc10 NRSF_disc9	2b	0.56896	9	2.39

			BLD.CD14.MO NO	BLD.CD19.PPC BLD.CD56.PC BLD.MOB.CD3 4.PC.F BLD.MOB.CD3 4.PC.M BLD.CD14.MO NO		Zfx				
<i>BCL2</i> _{rs7236090}	18	T		BLD.CD19.PPC		Brachyury_1 Nkx3_2	7	0.18412	3	0.62
				BLD.CD14.PC	RNFT1	Evi-1_4				
				BLD.CD15.PC	1.2·10 ⁻⁶	Foxa_known 2				
				BLD.CD19.CPC	RNFT1	Foxj2_1				
				BLD.CD19.PPC	2.88·10 ⁻⁶	HNF4_disc5				
				BLD.CD34.PC	RNFT1	Sox_13				
<i>VMP1</i> _{rs2645488}	17	T	BLD.CD34.CC	BLD.CD34.CC	4.08·10 ⁻⁷		1f	0.45483	6	9.41
				BLD.CD56.PC	RNFT1					
				BLD.MOB.CD3 4.PC.F	9.23·10 ⁻⁹					
					RNFT1					
				BLD.MOB.CD3 4.PC.M	1.84·10 ⁻⁷					
				BLD.CD14.MO NO						
<i>WRAP53 / TP53</i> _{rs17885803}	17	C	BLD.CD14.PC	BLD.CD14.PC			1f	0.55436	8	7.73
			BLD.CD15.PC	BLD.CD15.PC						

BLD.CD19.CPC	BLD.CD19.CPC
BLD.CD19.PPC	BLD.CD19.PPC
BLD.CD34.PC	BLD.CD34.PC
BLD.CD34.CC	BLD.CD34.CC
BLD.CD56.PC	BLD.CD56.PC
BLD.MOB.CD3	BLD.MOB.CD3
4.PC.F	4.PC.F
BLD.MOB.CD3	BLD.MOB.CD3
4.PC.M	4.PC.M
BLD.CD14.MO	BLD.CD14.MO
NO	NO
BLD.K562.CNC	BLD.K562.CNC
R	R

Abreviaturas: PHM, marcas de histonas protómero; EHM, marcas de histonas potenciadoras; Ref, referencia, a Cambios epigenómicos basados en HaploReg v4, b CHc15sm, ChromHMM (modelo central de 15 estados); CHc25sm, ChromHMM (modelo central de 25 estados que utiliza 12 marcas imputadas); picos H3K4me1/H3K4me3, H3K4me1 y H3K4me3; picos H3K27ac/H3K9ac, H3K27ac y H3K9ac, c Datos eQTL de Haploreg v4 (sangre completa, tejido linfoblástico), d Anotación funcional de la herramienta basada en ENCODE HaploReg v4 (sitio web http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg_v4.php), y Anotación funcional de RegulomeDB (<https://regulomedb.org/regulome-search>).

10. ANEXO III

10.1. Lista de publicaciones incluidas en esta Tesis

Un artículo científico ha sido publicado en esta Tesis en la siguiente revista:

- **Cabrera-Serrano, A. J.**, Sánchez-Maldonado, J. M., Ter Horst, R., Macaуда, A., García-Martín, P., Benavente, Y., Landi, S., Clay-Gilmour, A., Niazi, Y., Espinet, B., Rodríguez-Sevilla, J. J., Pérez, E. M., Maffei, R., Blanco, G., Giaccherini, M., Cerhan, J. R., Marasca, R., López-Nevot, M. Á., Chen-Liang, T., Thomsen, H., ... Sainz, J. (2023). Do GWAS-Identified Risk Variants for Chronic Lymphocytic Leukemia Influence Overall Patient Survival and Disease Progression?. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 8005. <https://doi.org/10.3390/ijms24098005>. Factor de impacto de año de publicación (IF): 5.6 (Q1).

Un artículo científico ha sido enviado para su publicación en esta Tesis:

Cabrera-Serrano, A. J., Sánchez Maldonado, J., Rodríguez-Sevilla, J., Reyes-Zurita, F., Collado, R., Puiggross, A., Cornejo-Calvo, E., García-Martín, P., ter Horst, R., Benavente, Y., Jerez Cayuela, A., Landi, S., Espinet, B., Maffei, R., López-Nevot, M., Ramos-Campoy, S., González-Olmedo, C., Chen-Liang, T. H., Moreno, V., ... Sainz, J. Identification and functional characterization of genetic variants within the CDKN2A and Bcl2 genes as new susceptibility biomarkers for chronic lymphocytic leukemia. . Factor de impacto de año de publicación (IF): Q.

10.2. Lista de publicaciones no incluidas en esta Tesis

Artículos como primer autor:

- Sánchez-Maldonado, J. M. *, **Cabrera-Serrano, A. J. ***, Chattopadhyay, S., Campa, D., Garrido, M. D. P., Macaуда, A., Ter Horst, R., Jerez, A., Netea, M. G., Li, Y., Hemminki, K., Canzian, F., Försti, A., & Sainz, J. (2023). GWAS-Identified Variants for Obesity Do Not Influence the Risk of Developing Multiple Myeloma:

A Population-Based Study and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6029. <https://doi.org/10.3390/ijms24076029>. Factor de impacto de año de publicación (IF): 5.6 (Q1).

- Sánchez-Maldonado, J. M.*, Collado, R. *, **Cabrera-Serrano, A. J. ***, Ter Horst, R., Gálvez-Montosa, F., Robles-Fernández, I., Arenas-Rodríguez, V., Cano-Gutiérrez, B., Bakker, O., Bravo-Fernández, M. I., García-Verdejo, F. J., López, J. A. L., Olivares-Ruiz, J., López-Nevot, M. Á., Fernández-Puerta, L., Cózar-Olmo, J. M., Li, Y., Netea, M. G., Jurado, M., Lorente, J. A., ... Sainz, J. (2022). Type 2 Diabetes-Related Variants Influence the Risk of Developing Prostate Cancer: A Population-Based Case-Control Study and Meta-Analysis. *Cancers*, 14(10), 2376. <https://doi.org/10.3390/cancers14102376>. Factor de impacto de año de publicación (IF): 5.2 (Q1).

*Contributed equally

Artículos como co-autor:

- Gálvez-Montosa, F., Peduzzi, G., Sanchez-Maldonado, J. M., Horst, R. ter, **Cabrera-Serrano, A. J.**, Gentiluomo, M., Macaуда, A., Luque, N., Ünal, P., García-Verdejo, F. J., Li, Y., López, J. A. L., Stein, A., Bueno-de-Mesquita, H. B., Arcidiacono, P. G., Zanette, D. L., Kahlert, C., Perri, F., Soucek, P., ... Sainz, J. (2024). Polymorphisms within autophagy-related genes as susceptibility biomarkers for pancreatic cancer: A meta-analysis of three large European cohorts and functional characterization. *International Journal of Cancer*, 21, 52. <https://doi.org/10.1002/IJC.35196>. Factor de impacto de año de publicación (IF): 5.2 (Q1).
- García-Martín, P. *, Díez, A. M. *, Maldonado, J. M. S. *, **Serrano, A. J. C.**, Ter Horst, R., Benavente, Y., Landi, S., Macaуда, A., Clay-Gilmour, A., Hernández-Mohedo, F., Niazi, Y., González-Sierra, P., Espinet, B., Rodríguez-Sevilla, J. J., Maffei, R., Blanco, G., Giaccherini, M., Puiggros, A., Cerhan, J., Marasca, R., ... Sainz, J. (2022). Validation and functional characterization of GWAS-identified variants for chronic lymphocytic leukemia: a CRuCIAL study. *Blood cancer journal*, 12(5), 79. <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00676-8>. Factor de impacto de año de publicación (IF): 12.8 (Q1).

- Sánchez-Maldonado, J. M., Cáliz, R., López-Nevot, M. Á., **Cabrera-Serrano, A. J.**, Moñiz-Díez, A., Canhão, H., Ter Horst, R., Quartuccio, L., Sorensen, S. B., Glintborg, B., Hetland, M. L., Filipescu, I., Pérez-Pampin, E., Conesa-Zamora, P., Swierkot, J., den Broeder, A. A., De Vita, S., Petersen, E. R. B., Li, Y., Ferrer, M. A., ... Sainz, J. (2021). Validation of GWAS-Identified Variants for Anti-TNF Drug Response in Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis of Two Large Cohorts. *Frontiers in immunology*, 12, 672255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672255>. Factor de impacto de año de publicación (IF): 8.787 (Q1).
- Sánchez-Maldonado, J. M. *, Moñiz-Díez, A. *, Ter Horst, R., Campa, D., **Cabrera-Serrano, A. J.**, Martínez-Bueno, M., Garrido-Collado, M. D. P., Hernández-Mohedo, F., Fernández-Puerta, L., López-Nevot, M. Á., Cunha, C., González-Sierra, P. A., Springer, J., Lackner, M., Alcazar-Fuoli, L., Fianchi, L., Aguado, J. M., Pagano, L., López-Fernández, E., Clavero, E., ... Sainz, J. (2020). Polymorphisms within the *TNFSF4* and *MAPKAPK2* Loci Influence the Risk of Developing Invasive Aspergillosis: A Two-Stage Case Control Study in the Context of the aspBIOmics Consortium. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.3390/jof7010004>. Factor de impacto de año de publicación (IF): 5.816 (Q1).

10.3. Presentaciones en eventos científicos

Presentaciones orales:

- Polymorphisms within autophagy-related genes influence the risk of developing colorectal cancer: a meta-analysis of four large cohorts. *VIII Jornadas de Medicina Genómica y Oncología de GENYO (Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica)*. Granada, Andalucía, España, 10/12/2020-11/12/2020.
- Validation of GWAS-Identified variants for Chronic Lymphocytic Leukemia: A study in the context of the CRUCIAL Consortium. *47th European Bone Marrow Transplantation Annual Meeting*. Online, 14/03/2021-17/03/2021.

- Type 2 diabetes-related variants influence the risk of developing Prostate Cancer: a population-based case-control study and meta-analysis. *III Congreso Nacional-V Jornadas de Investigadores/as en Formación: Fomentando la interdisciplinariedad*. Escuela Internacional de Posgrado de la Universidad de Granada, 22/06/2022-24/06/2022.
- Validation and functional characterization of GWAS-identified variants for chronic lymphocytic leukemia: a CRuCIAL study. *12ª Reunión Anual del grupo español de la investigación básica al tratamiento de la Leucemia Linfocítica Crónica (GELLC)*. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Madrid, España, 17/02/2022-18/02/2022.
- ¿Las variantes de riesgo identificadas por GWAS para la leucemia linfocítica crónica influyen en la supervivencia general del paciente y la progresión de la enfermedad?. *III Congreso Nacional-V Jornadas de Investigadores/as en Formación: Fomentando la interdisciplinariedad*. Escuela Internacional de Posgrado de la Universidad de Granada, 21/06/2022-23/06/2022.
- Polymorphisms in the CDKN2A, BCL2 and EGFR genes influence the risk of developing chronic lymphocytic leukemia, but do not determine the survival of patients. *XI Jornadas de Medicina Genómica y Oncología de GENYO (Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica)*. Granada, Andalucía, España, 13/12/2023-15/12/2023.

Presentaciones de posters:

- Do susceptibility variants identified through GWAS influence patient survival in chronic lymphocytic leukaemia?. *48th European Bone Marrow Transplantation Annual Meeting*. Online, 19/03/2021-23/03/2021.
- Do GWAS-Identified Risk Variants for Chronic Lymphocytic Leukemia Influence Disease Progression?. *4th Annual International Society of Liquid Biopsy Congress*. Miami, Florida, EEUU, 20/10/2022-22/10/2022.
- Polymorphisms within autophagy-related genes as susceptibility biomarkers for Multiple Myeloma: A Meta-Analysis of three large cohorts. *49th Annual Meeting of the European Society for Bone and Marrow Transplantation*. Paris, Île de France, France, 23/04/2023-26/04/2023.

- Do GWAS-Identified risk variants for Chronic Lymphocytic Leukemia influence overall patient survival and disease progression?. *49th Annual Meeting of the European Society for Bone and Marrow Transplantation*. Paris, Île de France, France, 23/04/2023-26/04/2023.
- Polimorfismos en los genes CDKN2A, BCL2 y EGFR influyen sobre el riesgo a desarrollar leucemia linfocítica crónica, pero no determinan la supervivencia de los pacientes. *IV Congreso Interdisciplinar en Genética Humana*. Málaga, Andalucía, España, 15/11/2023-17/11/2023.
- Identification of new overlapping and disease-specific genetic risk factors for rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: a meta-analysis of three large European populations and functional characterization in healthy and obese subjects. *Jornada Científica Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP) 2024*. Madrid, España, 11/03/2024-12/03/2024.

10.4. Otros méritos

- Estancia Internacional en el departamento de Biología de la Universidad de Pisa, Pisa, Italia. Fecha inicio: 01/04/2024. Fecha fin: 31/04/2024.
- Co-IP del proyecto de Investigación Precompetitivo para Jóvenes Investigadores de la Universidad de Granada titulado “Ejercicio, Genómica y Biomarcadores: avances en la predicción de enfermedades neurodegenerativas (EGB)”. Código: PPJIB2023-126. Duración 01/01/2024-31/12/2024. 1.250 €.
- Mentorización de cuatro alumnos de trabajo fin de grado (TFG) en el grado de biología de la Universidad de Granada.
- Ganador del segundo premio de investigación del Departamento de Medicina 2022 de la Universidad de Granada, por el trabajo titulado “Validation and functional characterization of GWAS-identified variants for chronic lymphocytic leukemia: a CRuCIAL study”.
- Ponencia en la Charla-Taller: “¿Puede la genética ayudarnos a predecir enfermedades?” Del Centro Público Integrado de Formación Profesional (CPIFP) Aynadamar, Granada, España.