



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

MUTACIÓN MYD88 L265P EN LINFOMAS B DE LA ZONA MARGINAL

Azahara Martínez López

Directores de Tesis:

Miguel Ángel Piris Pinilla

Manuela Mollejo Villanueva

Tutor de Tesis:

Carmen Bellas Menéndez

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y CIRUGÍA

Tesis presentada en la Universidad Autónoma de Madrid

para optar al grado de Doctor

Madrid 2019

El trabajo presentado en esta memoria para optar al grado de doctor en la Universidad Autónoma de Madrid ha sido realizado en Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL (Santander) y Hospital Virgen de la Salud (Toledo) bajo la dirección del Dr. Miguel Angel Piris Pinilla y de la Dra. Manuela Mollejo Villanueva. La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de Instituto de Salud Carlos III (CM11/0022, FIS12/1682, INT13/046 y RD09/0076/00074) Asociación Española Contra el Cáncer, Red Temática de Investigación Contra el Cáncer y Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2013-47416R).

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis el Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla y la Dra. Manuela Mollejo Villanueva por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación y aceptarme para realizar la tesis doctoral bajo su dirección. Su capacidad para guiarme, su generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento y su confianza han sido claves en el desarrollo de este trabajo, así como en mi formación como investigadora. Tenéis toda mi admiración.

También quisiera agradecer a mi tutora de tesis Carmen Bellas Menéndez y a Paloma Martín Acosta, su apoyo, que ha sido fundamental en la etapa final de la tesis.

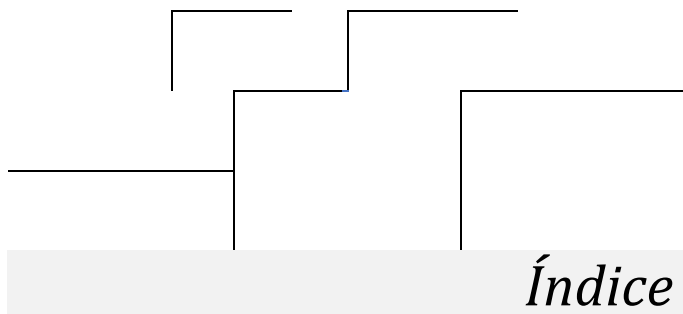
Igualmente, quisiera dar las gracias a todos mis compañeros y compañeras del antiguo grupo de investigación Genómica del Cáncer del IFIMAV (actualmente IDIVAL), por mostrarme la fuerza del trabajo en equipo, por acercarme la visión de un laboratorio de investigación translacional e integrarme en el día a día en este, por transmitirme sus conocimientos y por enseñarme valores que aún hoy me acompañan. Sin vosotros este trabajo no habría sido posible.

Mi agradecimiento al Hospital Marqués del Valdecilla de Santander y al Hospital Virgen de la Salud de Toledo, así como a la Red Nacional de Biobancos por la colaboración prestada.

Por último, aunque no menos importante, quisiera dar las gracias a todos los que me animaron, me aconsejaron y me dieron impulso, no dejando que me perdiera en el camino.

A mi familia,

A aquellos que me enseñaron

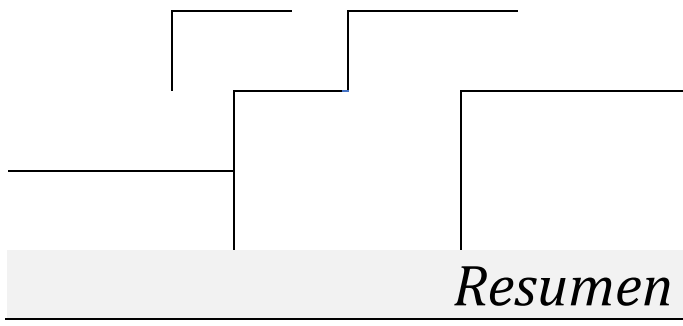


ÍNDICE	9
RESUMEN	13
RESUMEN	15
ABREVIATURAS Y SIGLAS	17
ABREVIATURAS Y SIGLAS	19
INTRODUCCIÓN	23
1. NEOPLASIAS LINFOIDES. CLASIFICACIÓN	25
2. LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL	29
2.1. CONCEPTO DE ZONA MARGINAL. LOCALIZACIÓN Y CELULARIDAD DE LA ZONA MARGINAL.	30
2.2. PATOGÉNESIS DE LOS LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL	31
2.3. DIAGNÓSTICO DE LOS LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL	32
3. LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL ESPLÉNICOS	32
3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	33
3.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	33
3.3. CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS	34
3.4. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	35
4. LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL GANGLIONARES	36
4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	36
4.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	36
4.3. CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS	37
4.4. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	37
5. LINFOMAS MARGINALES EXTRAGANGLIONARES DEL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSAS	38
5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	38
5.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	38
5.3. CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS	39
5.4. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	39
6. DIFICULTADES EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS LINFOMAS MARGINALES. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	40
6.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE LOS LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL	40
6.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL CON OTROS LINFOMAS B DE BAJO GRADO	41
6.2.1. LINFOMA LINFOPLASMÁCÍTICO	42
6.2.1.1. Diagnóstico de LPL	44
6.2.1.1. Secreción de IgM en otros desórdenes linfoproliferativos	45
6.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL CON PROCESOS REACTIVOS	46

7. MYD88. VÍA DE SEÑALIZACIÓN TOLL LIKE RECEPTORS (TLR)	47
7.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN TOLL LIKE RECEPTORS (TLR)	47
7.2. MYD88 Y VÍA DEPENDIENTE DE ESTA PROTEÍNA. ESTRUCTURA. FUNCIONES	48
8. MYD88 EN NEOPLASIAS LINFOIDES	50
8.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUTACIÓN MYD88 L265P EN NEOPLASIAS LINFOIDES	50
8.2. MUTACIÓN MYD88 L265P EN LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL	51
8.3. DIAGNÓSTICO DE LINFOMAS MYD88 L265P POSITIVOS	52
8.4. TRATAMIENTO DE LOS LINFOMAS MYD88 L265P POSITIVOS	53
OBJETIVOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	59
1. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE ESTUDIADA	61
2. ESTUDIO MUTACIONAL MYD88 L265P	62
2.1. LÍNEAS CELULARES	62
2.2. EXTRACCIÓN DE ADN	63
2.3. DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN MYD88 L265P MEDIANTE QPCR ALELO-ESPECÍFICA	63
2.4. SECUENCIACIÓN POR MÉTODO SANGER	65
3. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	66
4. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E INMUNOFENOTÍPICAS	66
4.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO	66
4.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	66
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
RESULTADOS	69
1. ESTADO MUTACIONAL MYD88 L265P EN LINFOMAS B DE BAJO GRADO	71
1.1. RECLASIFICACIÓN DIAGNÓSTICA DE CASOS	73
2. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	76
2.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO. VARIABLES CUANTITATIVAS	76
2.1.1. Edad en el momento del diagnóstico	76
2.1.2. ECOG en el momento del diagnóstico	77
2.1.3. Niveles de leucocitos	77
2.1.4. Niveles de neutrófilos	78
2.1.5. Niveles de linfocitos	79
2.1.6. Niveles de hemoglobina	79
2.1.7. Niveles de plaquetas	80
2.1.8. Niveles de LDH	80
2.1.9. Niveles de albúmina	81
2.1.10. Niveles de Beta2-Microglobulina	81

2.1.11. Niveles de paraproteína sérica. IgM. IgG. IgA.	82
2.2. ESTUDIO DESCRIPTIVO. VARIABLES CUALITATIVAS	83
2.2.1. Sexo	83
2.2.3. Infección por virus. VHB, VHC, VIH y VEB	84
2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS LINFOMAS B DE BAJO GRADO POSITIVOS PARA LA MUTACIÓN MYD88 L265P	84
2.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL POSITIVOS PARA LA MUTACIÓN MYD88 L265P	85
2.5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN LINFOMAS LINFOPLASMÁCICOS POSITIVOS PARA LA MUTACIÓN MYD88 L265P	87
3. HALLAZGOS MORFOLÓGICOS EN SMZL Y LPL CON MUTACIÓN MYD88 L265P	88
3.1. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE SMZL CON MUTACIÓN MYD88 L265P	88
3.2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LPL CON MUTACIÓN MYD88 L265P	92
3.3. PARAPROTEÍNA IGM, DIFERENCIACIÓN PLASMÁCICA Y MUTACIÓN DE MYD88 L265P	94
3.3.1. Paraproteína IgM	94
3.3.2. Paraproteína IgM en SMZL	97
3.3.3. Paraproteína IgM en LPL	98
3.4. ESTRATIFICACIÓN DE NIVELES DE PARAPROTEÍNA IGM	100
3.4.1. Estratificación de niveles de paraproteína IgM en SMZL	101
3.4.2. Estratificación de niveles de paraproteína IgM en LPL	102
3.5. DIFERENCIACIÓN PLASMÁCICA	103
4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA Y MUTACIÓN MYD88 L265P	106
4.1. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LA SERIE ESTUDIADA	106
4.2. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL ESPLÉNICOS	106
4.3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN LINFOMAS LINFOPLASMÁCICOS	107
DISCUSIÓN	109
1. MYD88 L265P. IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN Y SU RELEVANCIA EN NEOPLASIAS LINFOIDES.	111
2. IMPORTANCIA DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN MYD88 L265P. IMPLICACIONES DIAGNÓSTICAS.	111
2.1. MYD88 L265P EN LINFOMAS DE LA ZONA MARGINAL.	111
2.2. MYD88 L265P EN OTRAS NEOPLASIAS LINFOIDES.	112
3. IMPORTANCIA DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN MYD88 L265P. IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS	113
4. MYD88 L265P EN NUESTRO ESTUDIO	114
4.1. TÉCNICA DE DETECCIÓN DE MUTACIÓN	114
4.2. FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN MYD88 L265P	116
4.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	119
4.4. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS	122
4.5. SUPERVIVENCIA Y FACTOR DE PROGRESIÓN	124

5. MYD88 L265P EN EL DIAGNÓSTICO DE LINFOMAS	126
CONCLUSIONES	131
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
ANEXOS	153
ANEXO I	155
ÍNDICE DE TABLAS	157
ÍNDICE DE FIGURAS	158
ÍNDICE DE GRÁFICAS	160
ANEXO II	161
PUBLICACIÓN	161



RESUMEN

La mutación somática MYD88 L265P muestra un papel importante en la linfomagénesis, formando parte de la vía de señalización Toll-like receptor (TLR), la cual regula la activación de NF κ B. Tras su identificación en el año 2011 se ha descrito en varios subtipos de linfomas B, siendo la Macroglobulinemia de Waldeström/Linfoma Linfoplasmacítico (MW/LPL) el que la presenta más frecuentemente (hasta un 90%) y habiendo sido observada de forma minoritaria en linfomas marginales.

En el año 2013 tras el desarrollo y comercialización de fármacos inhibidores de la vía en la que participa, MYD88 L265P se muestra no solo como biomarcador con fines diagnósticos sino también predictivos de terapia.

Los linfomas de la zona marginal son un subgrupo de linfomas que pueden plantear problemas en el diagnóstico diferencial con MW/LPL, especialmente cuando presentan diferenciación plasmacítica. Con el fin de establecer la utilidad diagnóstica de MYD88 L265P en linfomas de la zona marginal, caracterizar clínica e histológicamente a aquellos que la presentan y abrir la posibilidad hacia una terapia dirigida en estos linfomas, realizamos un estudio de una serie de 128 linfomas, que incluyen 89 linfomas de la zona marginal esplénicos (SMZL), 6 linfomas de la zona marginal ganglionar (NMZL), 6 linfomas marginales extraganglionares del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y 27 linfomas linfoplasmacíticos (LPL), por encontrarse en el diagnóstico diferencial. Para ello, hemos puesto a punto un método sensible y específico, como es la PCR Taqman alelo específica, para su detección en tejidos parafinados con posterior validación a través del método Sanger.

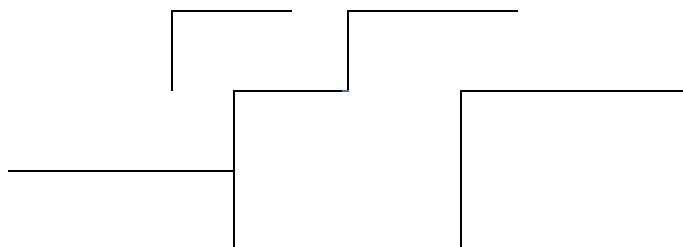
En nuestra serie, detectamos la mutación MYD88 L265P en un 70% de LPL, mientras que en linfomas marginales se detectó en un 14 % de los casos, correspondientes a SMZL, encontrándose ausente en NMZL y linfomas MALT.

Estudiamos las características clínicas de la serie por grupos, mutados y nativos, y observamos una asociación entre presencia de mutación y sexo masculino ($p=0,013$), leucocitosis ($p=0,048$) y paraproteína IgM ($p=0,018$). De forma aislada,

en los linfomas de la zona marginal con mutación de MYD88 L265P, se encontró una fuerte asociación entre esta y la presencia de paraproteinemia IgM ($p=0,033$) así como con los niveles de leucocitosis ($p=0,004$) y linfocitosis ($p=0,034$) en sangre.

Con respecto a las características histológicas, fue examinada la morfología en muestras procedentes de piezas de esplenectomía, sin identificarse diferencias importantes en los linfomas marginales con y sin mutación, siendo la única, la diferenciación plasmacítica, que estuvo presente algo más frecuentemente en los casos mutados.

Por último, encontramos asociación entre ECOG elevados y presencia de mutación y una relación entre mayor supervivencia y MYD88 L265P.



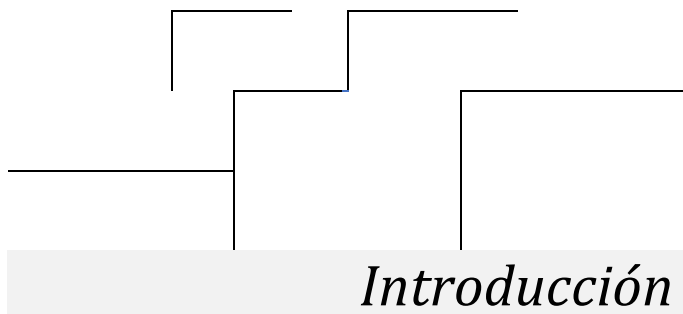
Abreviaturas y Siglas

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABC-DLBCL	Activated B Cell Diffuse Large B Cell Lymphoma (Linfoma B Difuso de Célula Grande subtipo Activado)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
ARID	AT-Rich interactive domain (Dominio interactivo rico en AT)
ARN	Ácido ribonucleico
BAFFR	B-cell activating factor receptor (Receptor de los factores activadores de célula B)
BCL-NOS	B-cell lymphoma (Linfoma de célula B no especificado)
BCR	B-cell receptor (Receptor de célula B)
BIRC	Baculoviral IAP recept containing (Receptor que contiene IAP baculoviral)
BTK	Bruton's Tyrosine Kinase (Tirosin Quinasa de Bruton)
CARD11	Caspase recruitment domain containing protein 11 (dominio de reclutamiento del dominio de caspasa que contiene proteína 11)
CGH	Comparative genomic hybridization (Hibridación por genómica comparativa)
CLL/SLL	Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma (Leucemia Linfocítica Crónica/Linfoma Linfocítico de Células Pequeñas)
CSR	Class Switch Recombination (recombinación/conmutación de clase)
CT	Threshold Cycle (ciclo umbral)
DLBCL	Diffuse large B cell Lymphoma (Linfoma B Difuso de Célula Grande)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (medio Dulbecco modificado del medio Eagle)
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium (medio mínimo esencial Eagle)
FBS	Fetal Bovine Serum (suero fetal bovino)
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Fármacos)
FISH	Fluorescence in situ hybridization (Hibridación in situ mediante Fluorescencia)
GL	Ganglio linfático
GCB-DLBCL	Germinal Center B Cell Diffuse Large B Cell Lymphoma (Linfoma B difuso de célula grande subtipo germinal)
Hb	Hemoglobina
HCK	Hematopoietic Cell Kinase (Quinasa de células hematopoyéticas)
HE	Hematoxilina-Eosina
Heterocig	Heterocigota
Homocig	Homocigota
HUMV	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
IFIMAV	Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla
IFN-B	Interferón B
Ig	Inmunoglobulina
IGVH	Inmunoglobulin Variable Region Heavy Chain (región variable de cadenas pesadas de inmunoglobulinas)
IHQ	Inmunohistoquímica
IKBKB	Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase subunit Beta (inhibidor del factor nuclear Kappa, subunidad beta)
IL	Interleuquina
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (medio Iscove modificado de Dulbecco)
IRAK	Interleukin Receptor Associated Kinase (Quinasa asociada al receptor de interleukina)

IRTA	Immunoglobulin Receptor Translocation associated gene (receptor de la inmunoglobulina d los genes asociados a la traslocación)
JAK-STAT	Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription (Transductor y activador de la señal quinasa Janus)
KLF2	Kruppel Like Factor (Factor Kruppel Like)
KMT/MLL	Histone-lysine Methyltransferasa / Mixed Lineage Leukaemia (metil transferada Histona-Lisina/leucemia de linea mixta)
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPL/WM	Lymphoplasmacytic Lymphoma/ Waldeströms Macroglobulinemia (linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldeström)
MO	Médula ósea
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (Tejido linfoide asociado a mucosa)
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases (proteínas quinasas activadas por mitógenos)
MGUS	Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (gammapatía monoclonal de significado incierto)
MM	Mieloma múltiple
Mu/Mut	Mutante/mutado
MYD	Myeloid Differentiation (diferenciación mieloide)
Neg	Negativo
NFKB	Nuclear Factor Kappa light chain enhancer of activated B-cells (factor nuclear de cadenas ligeras kappa potenciador de células B activadas)
NFKBIE	Nuclear Factor Kappa light chain enhancer in B cells inhibitor epsilon (inhibidor épsilon del potenciador del factor nuclear de cadenas ligeras kappa)
NMZL	Nodal Marginal Zone Lymphoma (Linfoma de la zona marginal ganglionar)
NOS	Not otherwise specified (no especificado)
NOTCH2	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 2 (proteína 2 homóloga del locus neurogénico Notch)
Nº	Número
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PI3K	Phospoinositidil 3 Kinase (Quinasa 3 fosoinositidil)
Pos	Positivo
PTPDR	Protein Tyrosin Phosphatase Receptor type Delta (receptor de la proteína tiroin fosfatasa tipo delta)
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
REAL	Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasm (clasificación revisada Europea Americana de las neoplasias linfoides)
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium (medio Roswell Park Memorial Institute)
SMZL	Splenic Marginal Zone Lymphoma (Linfoma de la zona marginal esplénico)
SNC	Sistema Nervioso Central
TAK	Tat Associated Kinase (Quinasa asociada a Tat)
TCR	T cell Receptor (receptor de células T)
TIR	Toll-Interleukin Receptor (receptor interleuquina Toll)
TIRAP	Toll Interleukin Receptor Adaptor Protein (adaptador de proteína del receptor Toll interleuquina)
TLR	Toll Like Receptor (receptor Toll like)
TMA	Tissue MicroArray (microarray de tejidos)

TNFAIP	Tumor Necrosis Factor Alpha Induced Protein (proteína inductora del factor alpha de necrosis tumoral)
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor (receptor del factor de necrosis tumoral)
TP53	Tumor Protein 53 (proteína tumoral 53)
TRAF	TRIF Adaptor Factor (TRIF factor adaptador)
TRAM	TRIF Adaptor Molecule (TRIF molécula adaptadora)
TRIF	TIRAP Inducing IFNB (TIRAP inductor de IFNB)
VEB	Virus de Epstein Barr
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
Wt	Wild type (tipo nativo)



1. Neoplasias linfoides. Clasificación

Los linfomas son un grupo heterogéneo de neoplasias derivadas de los linfocitos, que se desarrollan fundamentalmente en órganos linfoides(1).

Suponen una de las causas de morbilidad y mortalidad significativa en el mundo, con 450.000 casos nuevos diagnosticados al año y una mortalidad anual de 225.000(2). Es el 4º cancer más frecuente en el Norte de América, con más del 90% de estos pacientes diagnosticados de linfomas de origen en célula B(1). En España, los linfomas no Hodgkin suponen el 8º cancer más frecuente, con una incidencia estimada de 9.082 casos para el año 2019(3)(4).

Las neoplasias linfoides muestran una heterogeneidad y complejidad importante a nivel clínico, morfológico y biológico(5). El diagnóstico de las neoplasias linfoides ha cambiado drásticamente durante las últimas tres décadas(6). El avance en los últimos años en el conocimiento de la biología celular y molecular del cáncer, ha permitido identificar los mecanismos de transformación maligna(7). Dicho conocimiento ha facilitado la comprensión general del funcionamiento de la célula linfoide en procesos neoplásicos, sirviendo de base para el diagnóstico(8)(9). Como consecuencia, ha habido una transición a través de los años, desde el diagnóstico puramente morfológico hacia un sistema que integra las características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas(10)(11). Actualmente, existen descritos más de 50 tipos de linfomas en la clasificación actual de los tumores hematopoyéticos de la organización mundial de la salud(5)(12).

Debido a esta heterogeneidad, los pronósticos también pueden variar enormemente. Los linfomas indolentes o de bajo grado como los linfomas foliculares o los linfomas marginales, representan aproximadamente un tercio de los linfomas B no Hodgkin. A pesar de que los pacientes con estos linfomas muestran una tasa de supervivencia relativamente buena, la morbimortalidad es significativa ya que permanecen como enfermedades crónicas incurables, que requieren de la exposición repetida a tratamientos con notable toxicidad. En los linfomas agresivos, la posibilidad de curación es más alta, pero incluso en aquellos en los que se consigue la curación, la combinación de quimioterapia, a veces usada de forma conjunta con radiación, pueden resultar en toxicidades a largo plazo que perjudican la salud, predisponen a neoplasias secundarias y afectan de forma negativa a su calidad de vida(2).

Gracias a los avances de las nuevas tecnologías, se han descrito numerosos marcadores moleculares que permiten estudiar la enfermedad desde el mecanismo de linfomagenesis, que además de facilitar la comprensión general del funcionamiento de la célula en procesos neoplásicos y servir de base para el diagnóstico, nos permiten intentar modificar, revertir o limitar estas alteraciones moleculares(13)(14).

Los tratamientos antitumorales, son la base de la medicina personalizada, también llamada medicina de precisión, y se caracterizan por dirigirse contra marcadores específicos de las células neoplásicas, respetando las células normales. Dada la mayor selectividad de la terapia antitumoral en comparación con la quimioterapia citotóxica, esta presenta, a priori al menos, dos ventajas: menos efectos secundarios y, en muchos casos, selección de tratamiento en función de biomarcadores predictivos de eficacia, que suelen ser en la mayoría de los casos la expresión de la propia diana(15)(16)(17)(18)(19).

En la mayoría de los linfomas B es muy frecuente que la enfermedad esté diseminada, lo cual viene a ser un reflejo del comportamiento de la célula de origen y su capacidad de recirculación. En forma y función, las células de los linfomas B de bajo grado asemejan a su contrapartida normal y se comportan de forma dependiente del medio ambiente. Esta dependencia del medio ambiente se pone en evidencia por la dificultad de generar líneas celulares o cultivos estables, lo que indica que las células no pueden proliferar de forma autónoma y requieren señales estimuladoras externas. La célula del linfoma de la zona marginal tiene una apariencia morfológica y un inmunofenotipo que es reminescente de las células B de la zona marginal(20). A pesar de esto, conceptualmente, el origen de la célula no indica que la llave de los eventos oncogénicos sea necesariamente adquirida únicamente en el estadio de desarrollo de célula B. Los mecanismos responsables de su desarrollo son múltiples y a distintos niveles e incluyen alteraciones genéticas, anomalías en la regulación epigenética, activación de vías aberrantes, interacciones entre el tumor y el medio ambiente, etc(1)(14).

En la última década, los avances en estudios moleculares de alta complejidad han mostrado que muchos de los linfomas bien definidos histológicamente son heterogéneos a nivel molecular. Así los estudios de secuenciación muestran que cada linfoma parece poseer una única combinación de alteraciones genómicas. Por tanto, la respuesta de estos pacientes a terapia específica puede variar notablemente. También es importante determinar qué mutaciones son conductoras

en la patogénesis del linfoma, convirtiéndolos en dianas terapéuticas potenciales (21). En estudios de secuenciación, la frecuencia en que se observa una mutación nos puede dar idea de cómo de conductora pueda ser en el proceso de linfomagénesis de esa entidad. En la mayoría de los casos, solo algunos genes están mutados de forma consistente en una larga proporción de alelos, observándose que la mayoría de las mutaciones demostradas son subclonales (9)(13).

Por tanto, es importante el conocimiento y comprensión de la patogénesis de los linfomas, ya que ha servido para refinar el diagnóstico y la clasificación, así como para permitir la estratificación por pronóstico y también para abrir la posibilidad de la terapia personalizada en dichos paciente y por consiguiente, el desarrollo de nuevos tratamientos con eficacia mejorada y menor toxicidad(22)(23)(24)(25).

En la tabla de clasificación diagnóstica de linfomas B (Tabla 1.) que sigue a continuación, se puede observar los distintos tipos de neoplasias B de células maduras, según la actualización 2016 a la clasificación de la OMS 2008, entre los que se encuentran los linfomas B de bajo grado, a los que pertenecen los linfomas de la zona marginal.

Tabla 1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los linfomas B maduros.

Neoplasias de linfocitos B maduros
Leucemia Linfocítica Crónica/Linfoma linfocítico de células pequeñas
Linfocitosis de Células B Monoclonales
Leucemia prolinfocítica de células B
<i>Linfoma de la zona marginal esplénico (SMZL)</i>
Tricoleucemia
Linfoma/leukemia esplénico/a, inclasificable
Linfoma B difuso de células pequeñas de la pulpa roja esplénico
Variante tricoleucémica
Linfoma linfoplasmacítico
Macroglobulinemia de Waldeström
Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (MGUS)
Enfermedades de cadenas pesadas
Enfermedad de cadenas pesadas Alpha
Enfermedad de cadenas pesadas Gamma
Enfermedad de cadenas pesadas Mu
Mieloma
Plasmocitoma solitario del hueso
Plasmocitoma extraóseo
Enfermedad por depósito de inmunoglobulina monoclonal
<i>Linfoma de la zona marginal extraganglionar del tejido linfoide asociado a mucosas (Linfoma MALT)</i>
<i>Linfoma de la zona marginal ganglionar (NMZL)</i>
Linfoma de la zona marginal ganglionar pediátrico
Linfoma Folicular
Neoplasia folicular in situ
Linfoma folicular de tipo duodenal
Linfoma Folicular de tipo pediátrico
Linfoma B de células grandes con reordenamiento IRF4
Linfoma primario cutáneo foliculocéntrico
Linfoma de células del manto
Neoplasia de células del manto in situ
Linfoma B difuso de células grandes (DLBCL)
Tipo centrogerminal
Tipo células B activadas
Linfoma B de células grandes rico en histiocitos/células T
Linfoma B difuso de células grandes primario del Sistema Nervioso Central
Linfoma B difuso de células grandes primario cutáneo, tipo pierna
Linfoma B difuso de célula grandes, EBV+ del anciano
Úlcera mucocutánea EBV+
Linfoma B difuso de células grandes asociado a inflamación crónica
Granulomatosis linfomatoide
Linfoma B de células grandes primario mediastínico (tímico)
Linfoma B de células grandes intravascular
Linfoma B de células grandes ALK+
Linfoma plasmablástico

Neoplasias de linfocitos B maduros

Linfoma primario de cavidades

Linfoma B difuso de células grandes primario HHV8+

Linfoma de Burkitt

Linfoma de Burkitt like con aberración 11 q

Linfoma B de alto grado, con reordenamiento de MYC y BCL2 y/o BCL6

Linfoma B de alto grado

Linfoma B, inclasificable, con características intermedias entre LBDCG y linfoma de Hodgkin clásico

2. Linfomas de la zona marginal

La designación actual de linfoma de la zona marginal (MZL) fue propuesta a principio de los años 90 en la clasificación REAL para agrupar subtipos de linfomas aparentemente similares. Inicialmente denominados como “reticuloendoteliosis simuladora de linfoma”, “inmunocitoma esplenomegálico con células peludas circulantes”, “desorden proliferativo de células B CD11+ de características intermedias entre leucemia linfática crónica y leucemia de células peludas” así como “linfoma esplénico con linfocitos vellosos”, “linfoma de células B monocitoides” o “linfoma parafolicular”, todos ellos exhibían una apariencia histológica similar a pesar de las diferencias en la terminología (26)(27)(28).

La categorización de dicho grupo de linfomas se ha beneficiado de numerosos estudios que van desde los apoyados fundamentalmente en morfología e inmunofenotipo, pasando por estudios citogenéticos convencionales y moleculares (FISH y CGH) hasta los más recientes basados en técnicas de genética molecular (hibridación, microarrays, secuenciación, etc.)(29)(28). Así, en años posteriores, se hicieron evidentes las diferencias entre los distintos tipos de linfomas de la zona marginal y actualmente la organización mundial de la salud (OMS) los reconoce como(5)(30):

- Linfoma de la zona marginal ganglionar (NMZL)
- Linfoma marginal extraganglionar del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)
- Linfoma de la zona marginal esplénico (SMZL).

Por tanto, los linfomas de la zona marginal son un grupo heterogéneo de linfomas y toman su nombre por la característica presencia de una diferenciación de zona marginal apreciable mediante estudio histológico en todos ellos.

2.1. Concepto de zona marginal. Localización y celularidad de la zona marginal

La celularidad de la zona marginal en condiciones normales se encuentra ampliamente estudiada en seres humanos y ratones. En los ratones, las células B de la zona marginal se encuentran confinadas en la zona marginal del bazo. Por el contrario, en humanos, se ha descrito además de en el bazo, en la pared interna del seno subcapsular de ganglios linfáticos, en el epitelio de las criptas amigdalares y en el área subepitelial del tejido linfoide asociado a mucosas, incluyendo las placas de Peyer(31)(32). Estas áreas equivalentes de zona marginal tienen una composición celular similar a la zona marginal esplénica y pueden constituir nichos funcionales provisionales de células B marginales, particularmente en individuos esplenectomizados. Células B marginales idénticas pueden ser vistas en la sangre periférica, lo que sugiere que dichas células tienen capacidad para recircular (33)(32).

En el bazo, se distinguen dos compartimentos linfoides bien caracterizados: la pulpa roja y la pulpa blanca. La pulpa roja constituye el entramado de arteriolas y vasos sinusoidales venosos. La pulpa blanca constituye el tejido linfoide especializado, organizado en folículos. En los folículos se lleva a cabo la mayor parte de la respuesta inmune especializada, distinguiéndose claramente distintas zonas anatómicas cuando se produce una estimulación antigénica. Estas zonas que se disponen de forma concéntrica son: centro germinal, zona del manto y en su porción más externa la zona marginal. La zona marginal esplénica, interpuesta estratégicamente entre el tejido linfoide de la pulpa blanca y la circulación sanguínea, contiene células B entremezcladas con macrófagos, células dendríticas y granulocitos apoyados en una red de células reticulares estromales(32). En el bazo humano, debido a la carencia de un seno de la zona marginal bien definido, la sangre de las arterias peniciladas drena directamente en capilares de la pulpa roja y de la zona perifolicular. Tanto la zona perifolicular como la pulpa roja consisten en un sistema circulatorio abierto de espacios llenos de sangre conocidos como cordones esplénicos, los cuales no tienen delimitación endotelial bien definida y están en íntimo contacto con los vasos sinusoidales venosos de la pulpa roja(32)(34)(35).

Los linfocitos reconocen epítomos antigénicos de manera específica, a través de los receptores de célula T (TCR) o los receptores de célula B (BCR)(36). Algunas subpoblaciones de linfocitos expresan BCR o TCR de baja especificidad, codificados por genes *V(D)J* que reconocen múltiples determinantes microbianos. Estos linfocitos (similares a la celularidad de inmunidad innata) están estratégicamente

colocados en primera línea de defensa de áreas que están constantemente expuestas a antígenos microbianos, incluyendo la piel y las mucosas. Una parte significativa de esta celularidad linfoide está compuesta por células B de la zona marginal del bazo(32).

Las células B de la zona marginal expresan BCR poli reactivos que se pueden unir a agentes microbianos siguiendo múltiples patrones. En algunos casos el perfil de reconocimiento de estos BCR polireactivos es ampliamente similar a aquellos de TLR. Además, dichas células expresan altos niveles de TLR (de forma similar a macrófagos y granulocitos). Tras interactuar con antígenos expuestos en macrófagos, células dendríticas o neutrófilos, rápidamente se diferencian a plasmablastos que producen grandes cantidades de IgM(32). Además, producen IgG e IgA vía class switch recombination (CSR) y se someten a la hipermutación somática. A pesar de que las células de la zona marginal comparten muchas características con las células B de memoria (IgM+, IgD+, CD21, CD23-, CD27+) , lo que sugiere que pudieran tratarse de células equivalentes que han retenido expresión de IgM tras dejar el centro germinal antes de la inducción de CSR, se ha demostrado que no lo son necesariamente(32)(37). Las células B de la zona marginal expresan débilmente IgD y también tienen un mecanismo distinto de diversificación durante la ontogenia, un patrón diferente de uso de genes *IgV*, menos mutaciones *IgV* con baja tasa de acumulación de mutaciones y menos divisiones celulares comparadas con las células B de memoria(32). Además, estudios adicionales indican que las células B de la zona marginal pueden desarrollarse durante la vida fetal en ausencia de centros germinales. Comparadas con las células B de memoria, la población de células B marginales, también muestran una menor dependencia de las señales de CD40 y una mayor dependencia de las señales TLR. En este sentido, pacientes que tienen deficiencias en moléculas de señalización de TLR (MYD88, TIRAP, IRAK4) tienen pérdida selectiva de células B de la zona marginal(32)(34)(38).

2.2. Patogénesis de los linfomas de la zona marginal

Se postula que los linfomas de la zona marginal derivan de la célula B de la zona marginal que se halla normalmente presente en folículos linfoides secundarios de bazo, ganglios linfáticos y en tejido linfoide extraganglionar. Los métodos de secuenciación y análisis mutacional de los genes variables de las cadenas pesadas de Ig (*VH*), revelan un origen post centrogerminal y demuestran que los linfomas de la zona marginal reordenan la familia de los genes *VH4*, *VH3* y *VH1*, con preferencia

de los linfomas B de la zona marginal esplénicos a favor del uso de *VH1.2*. Esto significa que los linfomas de la zona marginal pueden derivar de distintos tipos de células B de la zona marginal(39)(40).

A pesar de que la etiología de estos linfomas B es desconocida, se ha sugerido que la estimulación antigénica persistente desencadenada por infecciones crónicas y fenómenos autoinmunes, puede jugar un papel importante como evento iniciador en el desarrollo de la enfermedad. Así, es bien conocida su asociación a virus de la hepatitis C e igualmente se han descrito casos esporádicos de asociación a virus de la hepatitis B. Estos hallazgos son consistentes con la observación de que el tratamiento de estos linfomas con antivirales hasta dejar la carga viral indetectable puede resultar en la remisión del linfoma(41). La asociación de estos procesos linfoproliferativos con el virus del Epstein-Barr y Citomegalovirus no ha sido establecida.

2.3. Importancia del diagnóstico de los linfomas de la zona marginal

Para el manejo de los pacientes con diagnóstico de linfoma de la zona marginal, hay dos aspectos que son cruciales:

- Establecer un diagnóstico correcto y evaluar el pronóstico de la enfermedad.
- Distinguir entre estadio localizado y diseminado.

Las bases de un diagnóstico correcto vienen determinadas por el adecuado estudio del paciente, integrando datos clínicos, histológicos y moleculares, como ya se ha comentado anteriormente. Igualmente, es esencial determinar si la enfermedad se encuentra localizada o diseminada, con fines de estadiaje y de elección de tratamiento correcto (42)(43). En los linfomas de la zona marginal, el linfoma MALT suele ser localizado (ya que tan sólo el 25% progresan) mientras que los linfomas NMZL y SMZL suelen ser diseminados(44)(45)(46).

3. Linfomas de la zona marginal esplénicos

Se define como linfoma de la zona marginal esplénico a una neoplasia de células B compuesta por linfocitos pequeños que rodean y reemplazan los centros germinales de la pulpa blanca esplénica, borran la zona del manto y se unen a una zona periférica de células de mayor tamaño que incluyen blastos transformados(5).

3.1. Características clínicas

Las principales características clínicas de los pacientes con SMZL, son las derivadas de la esplenomegalia con dolor abdominal y/o citopenias relacionadas con hiperesplenismo o fenómenos autoinmunes, más que por infiltración de médula ósea. Los síntomas B sistémicos y los ganglios linfáticos palpables son raros, pudiendo verse ocasionalmente afectadas localizaciones extraganglionares. Algunos pacientes pueden estar asintomáticos y el diagnóstico puede ser descubierto de forma incidental, durante un estudio de linfocitosis(47)(48)(49)(50).

3.2. Características morfológicas

La afectación de sangre periférica es común en los SMZL y puede ser detectada morfológicamente en el frotis o por citometría de flujo en casos de linfocitosis mínima. Se caracteriza por la presencia de linfocitos circulantes de núcleos redondos con cromatina condensada y citoplasma basófilo con vellosidades cortas, que pueden estar distribuidas al azar o concentradas en uno o dos de los polos de la célula. También se acompañan de células pequeñas linfoides sin características específicas, células linfoplasmocitoides, linfocitos de núcleos hendidos o linfocitos que se asemejan a células monocitoides(47)(51).

La histología del bazo en estos casos se caracteriza por un infiltrado linfoide micronodular en pulpa blanca, centrado sobre folículos preexistentes. Hacia la periferia se identifica una zona interna de linfocitos pequeños con núcleos redondos o ligeramente irregulares sustituyendo la zona del manto, los cuales reemplazan parcial o completamente el centro folicular reactivo. Se observa una zona externa de células de mediano tamaño con citoplasma claro, similares a las que se ven en la zona marginal esplénica, con algunos blastos intercalados. Todo ello configura un patrón bifásico. Pueden observarse algunos folículos reactivos. La infiltración de la pulpa roja está presente en distintos grados en casi todos los casos. La mayoría de las células de la pulpa roja la conforman linfocitos de pequeño tamaño que infiltran difusamente, sin formar nódulos. Tanto cordones como sinusoides se ven afectados(52)(53)(54)(55)(56).

En algunos casos se observa diferenciación plasmacítica, que histológicamente, se caracteriza por la presencia de células linfoplasmocitoides o células plasmáticas que expresan el mismo tipo de Ig que los linfocitos tumorales. Las células linfoplasmocitoides se distinguen por no tener un aparato de Golgi

prominente y su citoplasma es menos basófilo y menos abundante que el de las células plasmáticas. Estas células linfoplasmocitoides o las células plasmáticas se encuentran localizadas en la zona marginal, en la pulpa roja y ocupando los centros germinales característicamente, cuando están presentes. Esta característica morfológica es más fácilmente reconocible cuando el análisis inmunohistoquímico muestra monotipia de cadenas ligeras. También pueden verse agregados de histiocitos epitelioides, dentro de los folículos o rodeándolos(57)(58).

Los ganglios linfáticos hiliares presentan unas características similares. La arquitectura ganglionar muestra un infiltrado de linfocitos con patrón micronodular y senos dilatados pero preservados. De nuevo, este patrón nodular se establece sobre folículos linfoides preexistentes. A diferencia del bazo, la zona periférica de diferenciación marginal no es característica(59).

El aspirado de médula ósea muestra un grado variable de infiltración linfoide pero usualmente es leve. La morfología, descrita anteriormente, se aprecia mejor en extendidos de sangre periférica que en el aspirado. La diferenciación plasmacítica es más frecuente en médula ósea que en sangre periférica y cuando ésta se encuentra presente, puede dificultar el diagnóstico al parecerse a MW/LPL(47).

El aspirado de médula ósea es insuficiente para el diagnóstico, siendo necesaria la biopsia. La médula ósea puede estar afectada variablemente y muestra típicamente un infiltrado intrasinudoidal, que con la evolución de la enfermedad y especialmente tras la esplenectomía, puede dar paso a otro de tipo nodular. En los casos avanzados esta combinación de patrones intrasinudoidal y nodular es característica aunque no específica(47). La morfología de las células es monomorfa, con tamaño pequeño-mediano y núcleo redondo u oval con contorno regular y un pequeño anillo de citoplasma. Se pueden observar mediante tinciones para células dendríticas foliculares, centros germinales residuales reemplazados por células neoplásicas (60). En un pequeño porcentaje de casos puede observarse diferenciación plasmacítica(53).

3.3. Características inmunofenotípicas

Las células neoplásicas expresan Ig de superficie (más frecuentemente IgM, a menudo acompañados de IgD), CD20, Pax5, BCL2 y pueden ser positivas para DBA44 y CD38. En la mayoría de los casos negativas para CD3, CD5, CD10, CD23 y CD43, Ciclina D1, Anexina A1 y BCL6. La tasa de proliferación determinada por el índice Ki67 es usualmente baja pero nos sirve para identificar un anillo de células

proliferantes de la zona marginal, con un patrón anular o en diana. Se encuentra descrito que algunos casos expresan CD5 o CD23 o CD43 pero la coexpresión de CD5 y/o CD43 con CD23 es rara. Si la diferenciación plasmacítica está presente, las células plasmáticas habitualmente presentan expresión de CD38 y/o CD138(47).

Los folículos colonizados se identifican por una trama de células dendríticas foliculares CD23 positivas y células CD10 y BCL6 negativas, entre las cuales se adivinan algunas residuales pertenecientes al folículo, que son CD10 y BCL6 positivas. Igualmente se pone de manifiesto la presencia de células BCL2 y MNDA positivas sobre un centro germinal residual negativo(5).

No existe marcador propio de esta neoplasia, por lo que es necesario descartar otros linfomas de células pequeñas con marcadores relativamente específicos de otras entidades, como Ciclina D1 (linfoma del manto) o BCL6 y CD10 (linfoma folicular). En el diagnóstico diferencial con linfoma folicular, la expresión de MNDA por parte de los SMZL puede ser, no obstante, útil.

3.4. Características moleculares

Las complejas características moleculares del SMZL están siendo definidas con precisión.

Los cromosomas que con mayor frecuencia se ven involucrados en cambios en número de copias son 1, 3, 6, 7, 8, 12 y 14. Son frecuentes las deleciones de 7q31-32 y ganancias del 3q y 12(61)(62)(63)(64)(65)(66)(67).

Entre los genes mutados y vías más frecuentemente dereguladas en SMZL están *TP53* (aprox 15% de los casos) y algunos genes de la vía NF- κ B(29)(68)(69)(70). Además de la vía NF κ B, BCR y la de diferenciación en zona marginal, se han hallado otras en menor frecuencia, como la de remodelamiento de cromatina y la de citoesqueleto(71)(72)(73). Por secuenciación masiva de DNA se ha visto recientemente la presencia de mutaciones de *NOTCH2* en un 20-25% de los casos. El gen de *NOTCH2* es conocido por jugar un papel en la diferenciación de la zona marginal y es por ello que puede estar implicado en la patogénesis del SMZL(74). Recientemente se ha identificado una mutación somática de *KLF2* que se encuentra presente en aproximadamente un 40% de los SMZL y raramente en otros linfomas B(75)(76). Los ensayos funcionales demostraron que las mutaciones inactivan la capacidad de KLF2 de suprimir la activación de NF κ B a través de la señalización de TLR, BCR, BAFFR y TNFR. Esta alteración supone la mutación

genética más frecuente observada en SMZL(77). Las mutaciones en *NOTCH2*, *TRAF3*, *TNFAIP3* y *CARD 11* fueron observadas en SMZL con y sin mutación en *KLF2*(78). Otras mutaciones recurrentes que se han descrito, aunque en baja proporción, son *MAP3K14*, *BIRC3*, *IKBKB*, *ARID1A* y *KTM2D/MLL2*(70)(79). De forma más reciente aún y en relación con cambios epigenéticos, se han descrito a través de estudios de metilación, dos grupos de SMZL con distinto pronóstico, estando asociado el que presenta peor pronóstico al uso de *IGHV1-2*, mutaciones de *NOTCH2* y pérdida de 7q31-32(75)(80)(81).

4. Linfomas de la zona marginal ganglionares

Se define como una neoplasia ganglionar primaria de células B que asemeja morfológicamente a los ganglios linfáticos afectados por linfoma de la zona marginal de tipo extraganglionar o esplénico, sin evidencia de enfermedad extraganglionar ni esplénica(5).

4.1. Características clínicas

Por definición la enfermedad se encuentra inicialmente localizada en ganglios linfáticos. La mayoría de los pacientes están asintomáticos presentando solo linfadenopatía periférica y solo una pequeña minoría de ellos muestra inicialmente linfadenopatía central. La zona de cabeza y cuello son las regiones anatómicas más frecuentemente afectadas(82).

En el momento del diagnóstico, el tumor tipo bulky se observa en 11-31% de los casos y aproximadamente, la mitad de los pacientes están en estadio III o IV de enfermedad. El 10-20% de los pacientes debutan con síntomas B. La afectación de sangre periférica está descrita en un 10-24% de los pacientes, con anemia en 11-36% de los pacientes y trombocitopenia en uno de cada diez, mientras que la afectación de médula ósea se suele dar desde el 0% a 30% de los pacientes. Por otra parte, la elevación de LDH sucede en 12-48% de los pacientes y de la B2 microglobulina en un 29-45% casos. Se ha descrito la presencia de componente M en 6-33% de los pacientes(82).

4.2. Características morfológicas

La zona marginal no se identifica usualmente en ganglios linfáticos. Tan sólo en el bazo y algunos ganglios linfáticos mesentéricos se puede observar zona marginal en situaciones reactivas.

El linfoma de la zona marginal ganglionar tiene una alta variabilidad en el patrón de crecimiento y en la morfología celular(83)(84).

Generalmente se caracteriza por una proliferación de células linfoides de pequeño tamaño a nivel de zona marginal, que rodea folículos reactivos y se expande hacia zonas interfoliculares. La colonización folicular puede estar presente. Hay casos en los que se observa un patrón difuso; en estos debe reconocerse la presencia de folículos linfoides residuales con técnicas inmunohistoquímicas(5).

La celularidad del linfoma de la zona marginal ganglionar muestra una composición polimorfa y variable, que incluye desde células centrocito-like, células monocitoides y células plasmáticas con número variable de centroblastos e inmunoblastos intercalados. La diferenciación plasmacítica ha sido descrita en 22-47% y puede ser prominente. La eosinofilia extensa también puede estar presente(5).

4.3. Características inmunofenotípicas

El inmunofenotipo que presentan los NMZL es el siguiente: CD20+, CD5-, CD10-, BCL2+, CD23-, CD43+, Ciclina D1-, IgD- (siendo una pequeña proporción positivos para esta última, en concreto aquellos en los que se asemejan en morfología a los linfomas marginales esplénicos)(83)(5).

Aunque no existe ningún marcador inmunofenotípico específico, se han descrito algunos que pueden ayudar en el diagnóstico, como el MNDA, expresado en células de línea mielomonocítica y también en una subpoblación de células B que se localiza alrededor de centro germinal y en regiones interfoliculares. MNDA es positivo en el 75% de los NMZL(85). Igualmente, existe otro marcador, IRTA1, que se expresa en la zona marginal y en células B monocitoides. IRTA1 es positivo en el 73% de los NMZL(86)(87)(88).

4.4. Características moleculares

Se ha detectado la trisomía 3 en el 50% de los linfomas ganglionares marginales, del(6q23) en el 70% y aproximadamente un 14-25% presentan genes de inmunoglobulina *VH* no mutados(82)(89).

Asimismo, estudios de expresión genética demuestran relación con la vía NFκB.

Se han descrito mutaciones en *NOTCH2* (20%), *KLF2*(10%), *PTPDR* (14%) y *KTM2D/MLL2* (34%)(90)(70)(91).

5. Linfomas marginales extraganglionares del tejido linfoide asociado a mucosas

Se define como un linfoma extraganglionar compuesto por células B pequeñas de morfología heterogénea que se localizan en la zona marginal de los folículos reactivos y se extienden hacia la región interfolicular, hacia los folículos y hacia el tejido epitelial formando lesiones linfoepiteliales(5).

5.1. Características clínicas

Se desarrolla habitualmente sobre tejido linfoide asociado a mucosas, que ha estado sometido a un proceso inflamatorio crónico durante un cierto tiempo. Los agentes etiológicos varían según el órgano afectado y la clínica observada dependerá a su vez de la localización de estos. Así, tendríamos asociación entre *H.Pylori* y Linfoma MALT gástrico o *C. psittaci* y linfoma MALT ocular, etc(29)(92).

La mayoría de los pacientes se encuentran en estadios localizados de enfermedad pero aproximadamente un 30% tiene afectación ganglionar múltiple. Aproximadamente un 2-20% tienen infiltración de médula ósea, que suele ser más frecuente, cuando el origen no es gástrico. La afectación ganglionar generalizada es rara. Se encuentra paraproteína sérica en un tercio de los pacientes(93)(94)(95).

5.2. Características morfológicas

El linfoma MALT tiene una composición polimorfa que incluye células de la zona marginal, células monocitoides, linfocitos pequeños, blastos salpicados y células plasmáticas, que se disponen alrededor de folículos reactivos con distribución de zona marginal, dejando remanentes de centros germinales colonizados. La composición histológica de estos tumores frecuentemente incluye un componente de célula de morfología blástica que asemejan centroblastos o inmunoblastos que bien puede ser intra o extrafolicular. Un hallazgo característico de este linfoma es la presencia de lesiones linfoepiteliales, consistentes en agregados de 3 o más células marginales infiltrando glándulas, con distorsión y destrucción del epitelio, manifestada por degeneración eosinofílica de las células epiteliales(5).

Se observa diferenciación plasmácica en aproximadamente un tercio de los casos. Las células plasmáticas pueden ser predominantes en algunos casos asemejando a neoplasias de células plasmáticas. Muchas veces pueden encontrarse localizadas justamente encima del epitelio superficial. Ocasionalmente se puede ver depósito de amiloide(5).

5.3. Características inmunofenotípicas

El inmunofenotipo del linfoma MALT es CD20+, CD5-, CD23-, CD43-/+, CD10-, BCL6-, Ciclina D1-, BCL2+ MNDA+. Se han descrito algunos casos raros con expresión de CD5 (94).

5.4. Características moleculares

Son características de esta neoplasia las translocaciones que afectan a los genes que regulan factores de activación de célula B, seguidos de receptores de señalización de células B (MALT1, API2, BCL10). Las traslocaciones descritas con mayor frecuencia son t(11;18), t(14;18), t(1;14), t(3;14). Todas ellas son sitio específicas. Su incidencia es muy variable en las distintas localizaciones de neoplasia, pero son mutuamente excluyentes. De todas ellas la t (11; 18) es la más frecuente. Por otra parte, aquellos linfomas que portan dicha traslocación raramente se transforman en linfomas de alto grado, a pesar de que esta se asocia a enfermedad avanzada y ausencia de respuesta a la erradicación de *H. Pylori*(29).

Además, recientes estudios han demostrado que la regulación negativa de NFkB está perdida por delección genética y mutaciones inactivadoras en linfoma MALT, preferentemente, en aquellos que muestran ausencia de translocaciones cromosómicas. Así, en los casos de linfomas MALT con ausencia de alguna de las traslocaciones, se halla frecuentemente la delección o mutación del gen *A20*, un regulador negativo de NFkB(29).

Se han descrito mutaciones en los genes *BIRC3* y *TRAF3*, así como en *KMT2D/MLL2* (22%), *NFKBIE* (17%), *BCL10*(14%), *NOTCH1* y *NOTCH2* (8%)(70).

Las células neoplásicas presentan un alto nivel de mutación somática *IgH*, lo cual apoya la idea de que el desarrollo del linfoma MALT sea facilitado por múltiples antígenos, que indujeran la estimulación del crecimiento de las células vía receptor de células B.

6. Dificultades en el diagnóstico de los linfomas marginales. Diagnóstico diferencial

6.1. Diagnóstico diferencial entre los linfomas de la zona marginal

El diagnóstico diferencial entre los linfomas de la zona marginal no siempre es fácil, ya que como hemos visto anteriormente, presentan características histológicas e inmunofenotípicas similares, pudiendo presentar, además, afectación de órganos similares. Tampoco existe un marcador específico por lo que requiere correlación entre todos los datos disponibles.

En los SMZL, la clave distintiva diagnóstica se encuentra en el estudio histológico del bazo. El diagnóstico puede ser difícil en aquellos casos en los que no se disponga de pieza de esplenectomía. En estos casos es importante reunir los resultados de morfología de linfocitos circulantes, inmunofenotipo, histología de médula ósea y citogenética molecular para establecer el diagnóstico. A pesar de que el SMZL no tenga una anomalía cromosómica recurrente, la trisomía 3 o iso3q y deleciones afectando al cromosoma 7q22-34 pueden llegar a estar presentes hasta en un 20-45% de los casos(96).

Es recomendable para el diagnóstico de SMZL que se cumpla al menos uno de los dos criterios siguientes(47):

- 1) Histología del bazo característica junto con inmunofenotipo compatible.
- 2) Morfología típica en sangre periférica y médula ósea junto con inmunofenotipo más infiltración intrasinusoidal por células CD20+ (si la histología del bazo no está disponible). En pacientes con esplenomegalia clínica, sin esplenectomía, los hallazgos típicos de sangre periférica y de médula ósea serían suficientes para establecer el diagnóstico.

Para distinguir SMZL de linfomas tipo MALT, podemos apoyarnos en la afectación de órganos, ya que el linfoma MALT raramente afecta al bazo. También es útil la citogenética molecular. Por una parte las translocaciones que se encuentran en los linfomas MALT no son usuales en SMZL y por otra, la presencia de anomalías en el cromosoma 7q, características del SMZL, no se observan en el linfoma MALT. Además SMZL suele mostrar expresión de IgD, algo que no suele suceder en los linfomas MALT.

La distinción de SMZL de NMZL puede llegar a ser más complicada. El diagnóstico del NMZL sigue siendo controvertido porque no hay descritos criterios claramente reproducibles. El NMZL se define como neoplasia de células B primariamente ganglionar, que morfológicamente asemeja a ganglios linfáticos afectados por linfoma de la zona marginal de tipo extraganglionar, es decir, con un patrón arquitectural de células B pequeñas que reemplazan y expanden la zona marginal de los folículos linfoides, pero sin evidencia clínica o histológica de enfermedad extraganglionar. Esto implica seguir un diagnóstico de exclusión y por tanto, para establecerlo, se requiere la integración de la clínica. Para distinguirlo del SMZL, deberíamos conocer si existe afectación de otros órganos, como el bazo o la médula ósea, ya que en el SMZL son frecuentes. Por otra parte, en el SMZL la linfadenopatía periférica no es tan llamativa como en el NMZL.

El diagnóstico diferencial del NMZL con el linfoma MALT, puede darse en aquellas situaciones en las que el linfoma MALT tuviera además afectación de ganglios linfáticos. Para ello, es importante el estudio de los datos clínicos. Por otra parte, los ganglios de linfoma MALT suelen casi siempre negativos para IgD, mientras que los ganglios que muestran afectación primaria por NMZL podrían ser positivos para IgD.

6.2. Diagnóstico diferencial con otros linfomas B de bajo grado

Establecer el diagnóstico de MZL y descartar otros linfomas B de bajo grado es importante por la diferencia en la respuesta al tratamiento y el pronóstico de estos linfomas.

El SMZL, puede presentar similitudes con la tricoleucemia y la leucemia linfocítica crónica, ya que todos pueden mostrar afectación esplénica y afectación de sangre periférica, a veces con linfocitos vellosos como es el caso de la tricoleucemia. El inmunofenotipo nos ayuda a distinguirlas del SMZL, ya que muestra positividad para Anexina A1, la leucemia de células peludas y para CD5, CD23 y LEF1, la leucemia linfocítica crónica. Por otra parte la afectación en pulpa roja es más prominente que en el SMZL(5).

Otro diagnóstico diferencial a establecer con el SMZL sería el linfoma B de células pequeñas esplénico difuso de la pulpa roja. Este presenta afectación extensa de cordones y sinusoides de la pulpa roja, pero a diferencia de SMZL no muestra infiltración de la pulpa blanca. La inmunohistoquímica también es de utilidad para su distinción, ya que el linfoma B de células pequeñas esplénico difuso de la pulpa

roja suele mostrar negatividad para IgD y positividad para IgG. Por otra parte, estudios recientes describen la expresión inmunohistoquímica de Ciclina D3 y mutaciones en *CCND3* en este último, hallazgos infrecuentes en SMZL (97). El linfoma folicular y el linfoma de células del manto podrían asemejar al SMZL, en cuanto a la afectación de sangre periférica con presencia de linfocitos vellosos, pero el inmunofenotipo positivo para BCL6 y CD10 en el primero y para Ciclina D1 en el segundo nos serviría de apoyo(98). Igualmente, ambos presentan translocaciones características, t 11;14 en el linfoma del manto y t14;18 en el linfoma folicular, que no están descritas en el SMZL(5).

El NMZL presenta fundamentalmente diagnóstico diferencial con el linfoma folicular con diferenciación marginal y con la leucemia linfocítica crónica con patrón parafolicular, por su semejanza histológica en el patrón de afectación de ganglios. En ambos casos el estudio inmunohistoquímico sería de utilidad en la distinción ya que el primero muestra expresión de BCL2, CD10 y BCL6 y el segundo expresión de CD5, CD23 y LEF1. Además, las alteraciones citogenéticas serían un apoyo adicional en el diagnóstico diferencial (5).

El linfoma MALT, igualmente puede presentar características histológicas similares a los linfomas foliculares, linfomas de células del manto y leucemia linfocítica crónica. Para distinguirlos nos servirá de ayuda, el estudio inmunofenotípico y las alteraciones citogenéticas moleculares, que ya se han visto anteriormente(5).

Por último, la otra entidad con la que habría que hacer diagnóstico diferencial de forma constante en los tres subtipos de linfoma marginal, sería con el linfoma linfoplasmacítico. El linfoma de la zona marginal y el linfoma linfoplasmacítico son ambos linfomas B de bajo grado, con una morfología que va de linfocitos a células plasmáticas, siendo problemática la distinción entre estas entidades en algunos casos. En ganglios linfáticos, la diferenciación puede ser especialmente difícil o imposible, como se verá a continuación.

6.2.1. Linfoma Linfoplasmacítico

Como se ha descrito anteriormente, la diferenciación plasmacítica, presente en el 20-40 % de los linfomas marginales, supone un problema en el diagnóstico diferencial con otro linfoma B de bajo grado, el linfoma linfoplasmacítico(99).

El LPL se define como una neoplasia de linfocitos B pequeños, linfocitos plasmocitoides y células plasmáticas que afectan a la médula y a veces ganglios linfáticos y bazo, que no cumple con todos los criterios para el diagnóstico de otra neoplasia B linfocítica de células pequeñas que también pueda tener diferenciación plasmacítica. Por lo tanto, al igual que los linfomas de la zona marginal en muchas ocasiones, se trata de un diagnóstico de exclusión(5). La distinción entre LPL y linfomas de la zona marginal no tiene unos límites bien definidos, siendo a veces necesario recurrir al impreciso término de “Linfoma B de células pequeñas con diferenciación plasmacítica ”(5).

El LPL, afecta fundamentalmente a la médula ósea, pero al igual que los linfomas de la zona marginal pueden tener infiltración de bazo, hígado y/ ganglios linfáticos (15-30% de los pacientes cursan con esplenomegalia, hepatomegalia y adenopatías). La sangre periférica, aunque en menor proporción, también puede estar afectada. Frecuentemente asociado a paraproteína, usualmente de tipo IgM, su presencia no es requerida para el diagnóstico.

La macroglobulinemia de Waldeström, que se encuentra presente en un subgrupo de pacientes con LPL, es un síndrome clínico definido como LPL con infiltración de médula ósea y gammapatía monoclonal sérica IgM en cualquier concentración(100)(101)(102)(103).

El LPL presenta dos características importantes, de las cuales deriva la clínica:

a) La primera es la acumulación de células linfoplasmáticas en la médula ósea. Así, la clínica que presenten estos pacientes (y en consecuencia su morbilidad asociada a esta enfermedad) será secundaria al grado de infiltración de médula ósea, causando citopenias.

b) La segunda es que la mayoría de los pacientes tiene secreción de paraproteína monoclonal en suero. La más frecuente es IgM y en menor proporción, secretan paraproteína de otra clase (IgG y/o IgA) aunque algunos pueden no llegar a secretar ninguna. Por tanto, la clínica deriva de las propiedades y efecto fisiológico de la paraproteína sérica, con afectación de órganos por acumulación de esta. La paraproteinemia monoclonal puede producir manifestaciones clínicas a través de distintos mecanismos relacionados con sus propiedades fisicoquímicas, con la interacción no específica con otras proteínas, con la actividad anticuerpo y con su

tendencia a depositarse en los tejidos. Por ejemplo, las moléculas de IgM monoclonal tienden a formar pentámeros que provocan hiperviscosidad en suero, a través de su unión con el agua y la agregación de eritrocitos. Los síntomas de hiperviscosidad son notorios cuando la concentración de Ig monoclonal supera los 5 g/dL(5)(104)(105)(106).

6.2.1.1. Diagnóstico de LPL

En el estudio morfológico de médula ósea se observa un patrón de infiltración neoplásico que puede ser nodular, difuso y/o intersticial compuesto por linfocitos pequeños mezclados con número variable de células plasmáticas y linfocitos plasmocitoides. Pueden estar presentes los agregados paratrabeculares. Igualmente, se ven frecuentemente grupos de mastocitos, aunque no es un hallazgo específico(5)(107).

La morfología de los ganglios linfáticos y bazo infiltrados por LPL ha sido objeto de diversos estudios. En los casos clásicos asociados a Macroglobulinemia de Waldeström, los ganglios linfáticos muestran arquitectura conservada con senos dilatados y depósitos de material PAS+ y a veces centros germinales residuales. Se observa una proliferación monótona de linfocitos pequeños, células plasmáticas y células linfoplasmocitoides. Otras características son los cuerpos de Dutcher, el incremento de mastocitos y los depósitos de hemosiderina. Se puede observar depósito de Ig, histiocitos con depósitos de cristales o amiloide(5)(108)(109).

Aun así, no siempre se hallan estas características. En otros casos, la distorsión arquitectural es mayor, pudiendo tener un patrón de crecimiento vagamente nodular-difuso, con prominentes centros germinales residuales, acúmulos de histiocitos epitelioides y a veces mucha más proporción de células plasmáticas o una apariencia mucho más polimorfa con numerosas células transformadas/inmunoblastos. En el caso de que estos últimos sean muy numerosos se debería pensar en una transformación hacia Linfoma B Difuso de célula Grande (DLBCL). Los centros de proliferación que se ven en Leucemia Linfática Crónica/Linfoma Linfocítico (CLL/SLL) deben estar ausentes y la presencia de una zona más pálida de tipo diferenciación de zona marginal debe sugerir el diagnóstico de linfoma de la zona marginal.

La morfología de estos linfomas en el bazo está escasamente descrita. En este se muestra un infiltrado linfoplasmacítico que puede formar pequeños nódulos en

la pulpa roja o crecer más difusamente, en un patrón similar a las neoplasias leucémicas(5).

El estudio inmunohistoquímico del linfoma linfoplasmacítico, con un perfil similar al de los linfomas marginales, demuestra positividad para marcadores B (CD19, CD20, CD79, Pax5) y negatividad para CD5, CD23, CD10. La expresión de CD23 ha sido puntualmente descrita. La mayoría de las células muestran Ig de superficie, normalmente IgM, a veces IgG y raramente IgA. Son típicamente IgD negativas. El componente de células plasmáticas es CD138 positivo(5)(110)(111).

El estudio molecular muestra frecuentemente deleciones en el cromosoma 6, en la región 6q21-22. Se identifican ganancias en los cromosomas 3,4,5,12 y 18 así como pérdidas en los cromosomas 8,16,18 a 22, X e Y(112).

6.2.1.1. Secreción de IgM en otros desórdenes linfoproliferativos

La secreción de paraproteína M no es exclusiva de los LPL y habitualmente se relaciona con neoplasias linfoides con extenso componente de células plasmáticas o con linfocitos con diferenciación plasmocitoide(113)(114). Dentro de los distintos desórdenes proliferativos secretores de Ig M, encontramos:

- Macroglobulinemia de Waldenström. Es un proceso linfoproliferativo que se caracteriza por la infiltración de médula ósea por linfoma linfoplasmacítico y por la presencia de componente monoclonal IgM en suero en cualquier concentración. Suele tener un curso crónico, pudiendo permanecer asintomática durante años. Se considera un síndrome clínico cuyo correlato histológico puede corresponder con linfoma linfoplasmacítico o gammapatía monoclonal de significado indeterminado.
- Gammapatía monoclonal de significado incierto. Se define como paraproteína sérica IgM en concentraciones inferiores a 30 g/L e infiltración de médula ósea por células linfoplasmáticas (<10%), en ausencia de sintomatología (anemia, síndrome constitucional, hiperviscosidad, hepatoesplenomegalia, etc). Se trata de una condición precursora, de diagnóstico incidental, que puede progresar a LPL o MW(115), siendo la concentración inicial de proteína M monoclonal sérica el principal factor de predicción de progresión(116).

- Mieloma de células plasmáticas. Se trata de una proliferación de células plasmáticas, usualmente asociadas a proteína M en suero y/o orina y la evidencia de afectación de órganos relacionada con la proliferación de células plasmáticas(5).
- Trastornos asociados al depósito de Ig en tejidos (amiloidosis primaria y depósito de cadenas pesadas)(5)

6.3. Diagnóstico diferencial con procesos reactivos

No solo los linfomas deben tenerse en cuenta en el momento de establecer el diagnóstico de linfoma de la zona marginal, ya que hay numerosos procesos reactivos benignos que pueden parecerse y que se deben tener en consideración.

En los SMZL, habría que considerar la linfocitosis B policlonal persistente, un desorden linfoproliferativo benigno, caracterizado por linfocitosis policlonal y ocasional incremento en suero de IgM policlonal, que puede cursar con afectación esplénica (Figura 1). Dicha afectación muestra cambios en pulpa roja y pulpa blanca con hiperplasia de la zona marginal, similares a los encontrados en el SMZL(117)(118)(119)(120)(121).

En los NMZL se debe establecer diagnóstico con diferentes patologías infecciosas y reactivas del ganglio como la toxoplasmosis o la linfadenopatía asociada a VIH. Éstos pueden inducir patrones morfológicos en el ganglio similares al linfoma de la zona marginal, como la hiperplasia de la zona marginal o la hiperplasia de células B monocitoides(122).

En el caso de los linfomas MALT, el principal diagnóstico diferencial se establece con procesos inflamatorios reactivos que típicamente preceden al linfoma(122).

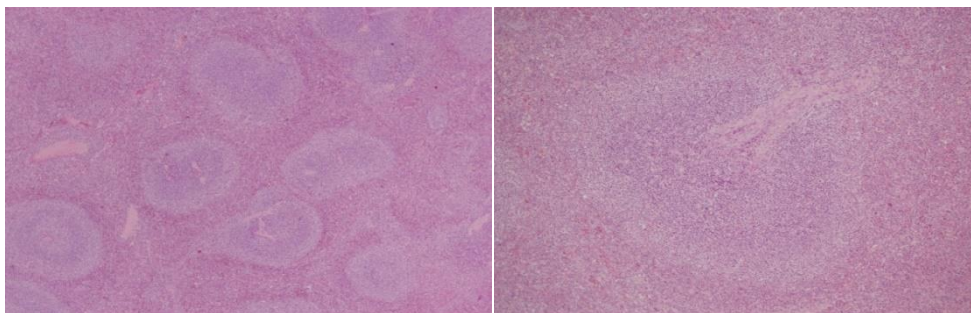


Figura 1. Patrón morfológico de la linfocitosis B policlonal persistente similar a SMZL.

7. MYD88. Vías de señalización desde Toll Like Receptors (TLR)

7.1. Vías de señalización desde Toll Like Receptors (TLR)

Los Toll Like Receptors (TLR) son una familia de receptores de membrana muy conservados evolutivamente. Son glucoproteínas transmembrana de tipo I, que constan de un dominio N-terminal extracelular formado por repeticiones ricas en leucina y un dominio C-terminal citoplásmico que es homólogo al receptor de la interleucina 1 (IL1). Este dominio localizado en el citoplasma, llamado TIR (Toll/IL1 Receptor) inicia diversas vías de señalización, tras la unión de un ligando al dominio extracelular del receptor. El dominio TIR de un TLR se une a otros dominios TIR presentes en proteínas adaptadoras, como MYD88, desencadenando los procesos de transducción de señales(123).

Un total de 10 TLRs han sido identificados en humanos y 12 en ratones. Sus ligandos son muy variados, incluyendo lipopolisacáridos, lipopéptidos y ácidos nucleicos (ADN y ARN tanto de cadena simple como doble). Los TLR son componentes esenciales de la respuesta inmune innata y juegan un papel fundamental en la discriminación entre lo extraño y lo propio, previniendo así la autoinmunidad. La inactivación inapropiada de esta vía es responsable de producir enfermedades inflamatorias y/o procesos neoplásicos(123).

Todos los TLRs excepto TLR3, señalizan a través de la proteína adaptadora de MYD88. La mayoría de los TLR se encuentran en la membrana plasmática. Tras la unión del ligando al dominio extracelular dimerizan formando homo o heterodímeros, colocando los dominios TIR citoplásmicos lo suficientemente próximos como para iniciar la cascada de señalización a través de moléculas adaptadoras (MYD88, MAL, TRIF y TRAM) que, a su vez, desencadenan vías de señalización corriente abajo. Estas vías regulan la expresión de citoquinas inflamatorias, varias proteínas antivirales y antipatógenas y controlan el inicio de la respuesta inmune(124).

Las cuatro principales moléculas adaptadoras de la vía TLR son:

- Myeloid differentiation response protein 88 (MYD88)
- Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein (TIRAP; también conocida como MAL)
- TIRAP inducing IFN- β (TRIF)

- TRIF related adaptor molecule (TRAM).

Estos adaptadores son usados en diferentes combinaciones por distintos TLRs, pero de forma amplia, las vías se consideran como MYD88 dependientes o MYD88 independientes(125)(123)(126)(127).

7.2. MYD88 y vía dependiente de esta proteína. Estructura. Funciones

El gen de la diferenciación mieloide *MYD88* es responsable de sintetizar una proteína pivotadora de señalización, que forma parte de la vía de TLR durante la respuesta del huésped a la infección. Pacientes que presentan una mutación con pérdida de función en dicho gen, sufren una susceptibilidad severa de padecer infecciones por microorganismos bacterianos piogénicos durante la infancia y sólo llegan a la edad adulta con una estricta terapia antibiótica. De forma contraria, cuando se desarrollan mutaciones de ganancia de función en dicho gen, se produce sobreactividad de la vía lo cual se asocia a enfermedades autoinmunes y además se estimula la oncogénesis de las células linfoides(128).

MYD88 transduce señales hacia el factor NFκB que regula la producción de citoquinas y moléculas antiapoptóticas, influyendo en la linfomagénesis(129).

La mayor parte de los TLRs inician cascada de señalización a través de MYD88. Esta proteína adaptadora contiene dos dominios proteicos principales: C-terminal TIR y N-terminal DD. Tras la activación de los TLRs, MYD88 es reclutada y asociada al dímero de TLRs a través del dominio TIR, formándose una interacción TIR-TIR. En este momento, la quinasa asociada al receptor IL1 (IRAK4), siguiente componente de la cascada de señalización, es entonces reclutada hacia MYD88 a través de la interacción con los dominios DD de esta. IRAK4 fosforila a IRAK1 e IRAK2 para formar la estructura llamada Myddosoma. La fosforilación de IRAK1 e IRAK2 les permite interactuar con la E3 ubiquitin ligasa, TRAF6, vía dominio TRAF. TRAF6 ubiquitina y activa TAK1, la cual tiene la habilidad dual de activar dos vías de señalización NFκB y MAPK (mitogen activated protein kinasa). En células en reposo, los dímeros NFκB permanecen secuestrados en el citoplasma en una forma inactiva, por la proteína IκB. Durante la fase de activación de NFκB, TAK1 fosforila y activa la proteína IκB kinasa B, que provoca su degradación por el proteasoma. La degradación de IκB permite a NFκB ser liberada y entrar en el núcleo, donde podrá unirse a secuencias de ADN conocidas como sitios κB y activar la transcripción génica. TAK1 también activa la vía MAPK, permitiendo la activación de c-Jun N

terminal kinasa, la cual activa la familia Jun de factores de transcripción (Figura 2)(130).

La vía dependiente de MYD88 puede ser iniciada por TLR5 y TLR7-9 usando únicamente el adaptador MYD88, mientras que la proteína adaptadora TIRAP es requerida junto con MYD88 para iniciar la señal descendente desde TLR2 y TLR4. En este subgrupo de TLRs, TIRAP actúa como molécula de clasificación, necesaria para el reclutamiento eficiente de MYD88, tras la activación de TLRs, para iniciar la señal de transducción, para activar NFκB y producir citoquinas inflamatorias. Durante la activación de TLR7 y TLR9, MYD88 también recluta TRAF3 para activar TBK1 y IKK, lo cual fosforila el factor de transcripción interferón regulatorio 7 (IRF7) y permite la producción de interferón alpha (IFN-α). La producción de este y otros interferones es particularmente importante para las respuestas antivirales(130)(123).

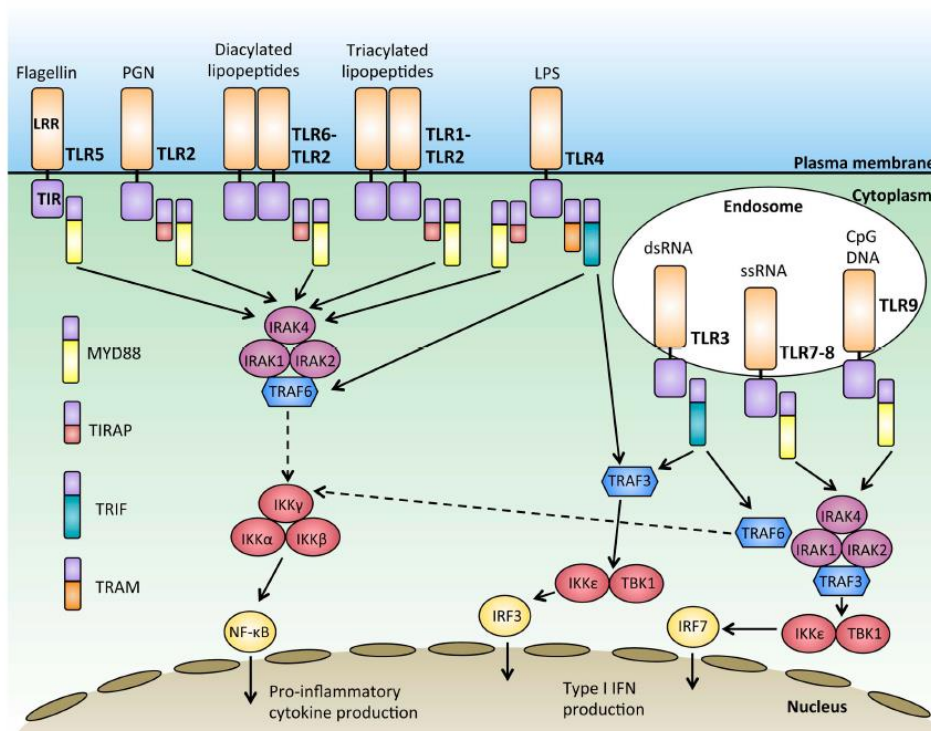


Figura 2. Vías de señalización desde TLRs, MYD88 dependientes y MYD88 independientes Tomado de Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL et al (2014).

8. MYD88 en neoplasias linfoides

8.1. Descripción de la mutación MYD88 L265P en neoplasias linfoides

El análisis funcional de diferentes vías oncogénicas ha sido posible a través del uso de screenings basados en ARN de interferencia, el cual ha facilitado la identificación de genes específicos requeridos para el crecimiento y supervivencia de los linfocitos neoplásicos. De forma específica, el ABC-DLBCL exhibe dependencia de activación constitutiva de receptor de célula B (BCR) y/o de las vías de señalización de NFκB, teniendo frecuentes mutaciones somáticas en los genes de dichas vías, que incluyen *CD79A/B*, *CARD11*, *MYD88* y *TNFA1P3*, como se demuestra por secuenciación de genes dianas de las células de ABC-DLBCL(131).

A principios del 2011, estudios de secuenciación y funcionales, determinaron la vía oncogénica por la cual el proceso de linfomagénesis de los ABC-DLBCL es dependiente de MYD88(131). Las mutaciones somáticas adquiridas en *MYD88* en ABC-DLBCL promueven la señalización de NFκB y JAK-STAT3, los cuales inducen la supervivencia celular en este tipo de linfoma. De todas las mutaciones halladas en *MYD88*, la más potente biológicamente es la consistente en un cambio único de nucleótido (T >C) en la posición 38181641 en el cromosoma 3p22.2, resultante en un cambio de aminoácido, leucina por prolina, en la posición 265. Desde el punto de vista terapéutico, el complejo de señalización coordinado por MYD88 representa una diana, ya que aquellos linfomas dependientes de la señalización por MYD88 se pueden beneficiar de terapias que actúen sobre IRAK4 en solitario o en combinación con agentes que actúen sobre los receptores de célula B, NFκB o vía de JAK-STAT.

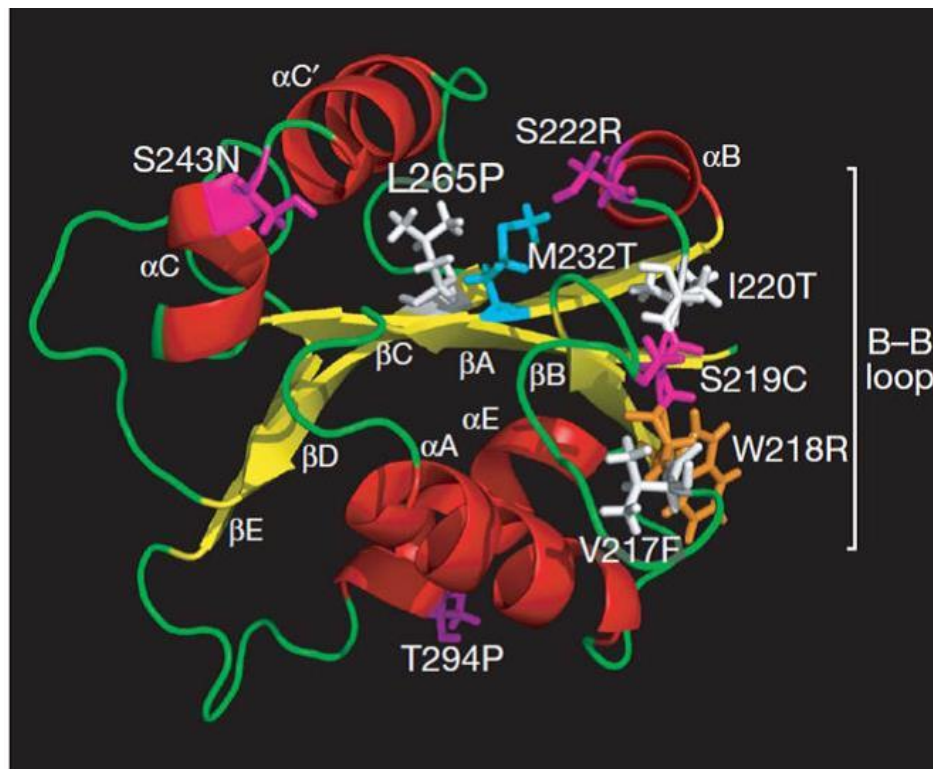


Figura 3. Localización de las mutaciones de *MYD88* en la estructura tridimensional del dominio TIR. La mutación L265P ocurre en un residuo que es invariable, en una región conservada evolutivamente.

Tomado de Ngo VN, Young RM, Schmitz R *et al* (2017).

A finales de 2011 empiezan a ver la luz los resultados de los primeros estudios para la mutación somática *MYD88* L265P en MW/LPL(132). Treon y colaboradores, realizan secuenciación por Sanger sobre 54 muestras de pacientes con diagnóstico de LPL, hallándose presente la mutación en 49 de estos(133). Estudios posteriores realizados con distintos métodos de amplificación de ADN, confirman estos resultados identificándose la mutación en MW/LPL en un porcentaje siempre superior al 90% y en asociación a la secreción en suero de paraproteína IgM(134)(135)(136).

8.2. Mutación *MYD88* L265P en linfomas de la zona marginal

La presencia de mutación *MYD88* L265P ha sido descrita igualmente en los linfomas de la zona marginal, aunque de forma infrecuente.

En el año 2012, Treon y colaboradores describen la presencia de dicha mutación usando secuenciación por Sanger, en 3 de 46 linfomas de la zona marginal estudiados (uno de ellos esplénico de la zona marginal y otros dos, marginal ganglionar y extraganglionar de tejido linfoide asociado a mucosa respectivamente)(133). Empleando un método de detección más sensible, Xu y

colaboradores en el año 2013, describen la presencia de la mutación en 2 de 20 pacientes estudiados, siendo ambos diagnosticados de linfomas de la zona marginal esplénicos(137). Igualmente, en ese mismo año, Poulain y colaboradores describen la presencia de MYD88 L265P mediante secuenciación, en 1 de 16 pacientes con procesos linfoproliferativos B, tratándose este de un linfoma de la zona marginal esplénico(138). Posteriormente se publican dos estudios por Gachard y colaboradores y Jiménez y colaboradores en los cuales usando la PCR como método de detección, encuentran la mutación MYD88 L265P en porcentajes que van entre el 4% y el 21% respectivamente y siempre en casos con diagnóstico de linfoma de la zona marginal esplénico(139)(140). La serie más larga estudiada fue realizada por Varettoni y colaboradores, en la cual se describe la mutación en 5/84 (6%) pacientes con este diagnóstico(141). En los estudios descritos, la mayoría de las series se componen de un tamaño muestral pequeño y ninguno de ellos ha trabajado con las características histológicas, con excepción de este último citado, el cual concluye que no encuentra diferencias entre presencia y ausencia de mutación, y que en los mutados se observa un grado levemente mayor de diferenciación plasmacítica, sin que se aprecie restricción de cadenas ligeras. Igualmente, afirma que son necesarios estudios adicionales en este sentido, para categorizar la histología de estos casos. Por el contrario, en 2015 Hamadeh y colaboradores recogen en su publicación que de 44 pacientes con diagnóstico de linfoma de la zona marginal esplénicos, estudiados mediante muestras procedentes de piezas de esplenectomía usando PCR en tiempo real, no se encontró evidencia de mutación en ninguno de ellos(142).

8.3. Diagnóstico de linfomas MYD88 L265P positivos

El estudio de la mutación de *MYD88* se realiza a través de métodos habituales de detección de mutaciones en ADN. Entre ellos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación del ADN, Análisis de conformación de cadenas sencillas de ADN, Análisis mediante RFLP, Cromatografía líquida desnaturizante de alto rendimiento, etc.; siendo el más usado la PCR.

Existe comercializado un anticuerpo sintético, que se generó contra un péptido de 16 aminoácidos cerca del centro de la isoforma 1 humana de *MYD88*. Sus indicaciones son válidas para Inmunocitoquímica, Inmunofluorescencia, ELISA, Western-Blot e Inmunohistoquímica. A pesar de ello, este último uso no se encuentra muy aceptado, ya que diversos estudios muestran una ausencia de

correlación precisa entre la expresión inmunohistoquímica y la presencia de la mutación(143)(144)(145).

8.4. Tratamiento de los linfomas MYD88 L265P positivos

Las mutaciones en el gen *MYD88* se encuentran de forma recurrente (más del 90%) en patologías neoplásicas como WM/LPL(146)(147)(148). Este descubrimiento ha supuesto que los estudios de investigación estén enfocados en las terapias diana contra MYD88 a través de distintas aproximaciones terapéuticas como BTK, PI3K, IRAK y HCK, como moléculas intermediarias (Figura 4). De todos estos la inhibición de BTK es la más extensamente desarrollada(149)(150)(151).

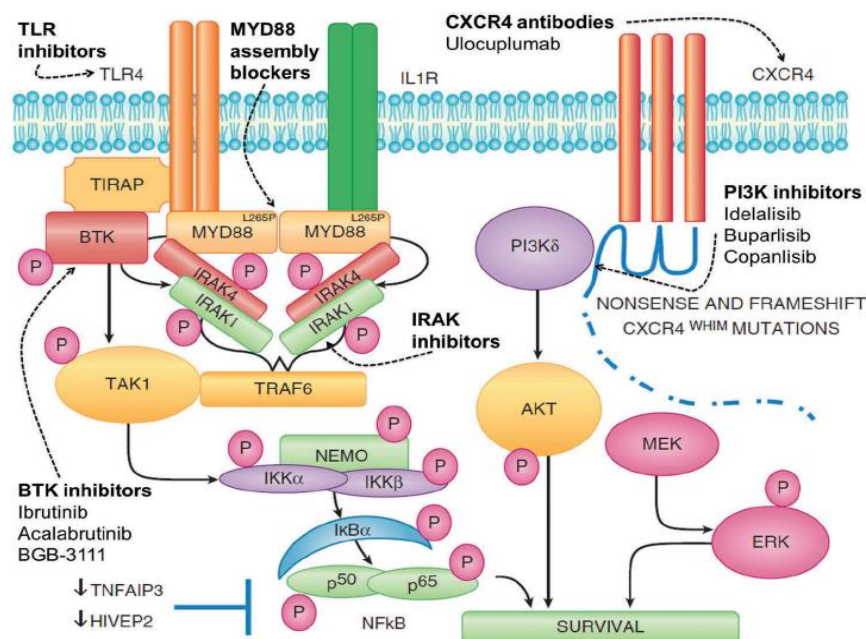
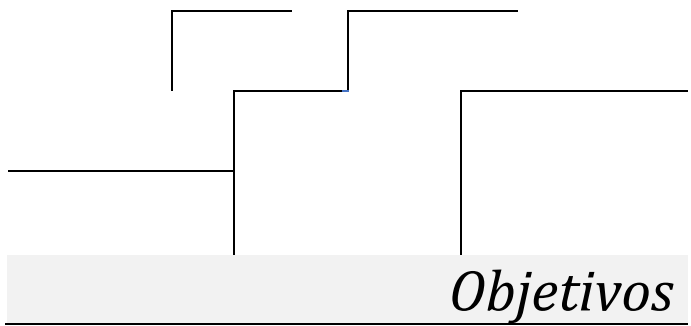


Figura 4. Niveles de actuación de fármacos sobre sus dianas terapéuticas contenidas en la vía de señalización TLR- MYD88 dependiente.

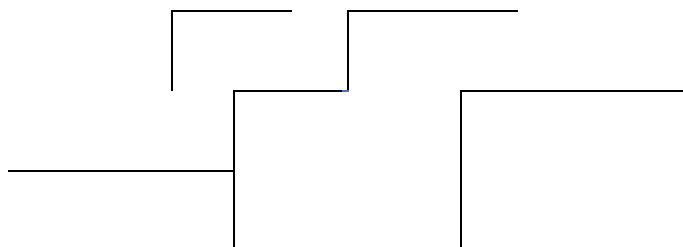
Tomado de Castillo JJ, Hunter ZR, Yang G *et al* (2017).



Los linfomas de la zona marginal presentan dificultades en su terapia. También en su diagnóstico, ya que con frecuencia este ha de establecerse en biopsias de muestras de pequeño tamaño procedentes de la médula ósea, piel o mucosas, por lo que a veces no es posible ofrecer un diagnóstico certero, tratándose de un diagnóstico de exclusión. La búsqueda de marcadores moleculares puede ser de utilidad en dichas circunstancias.

Con el fin de determinar la utilidad diagnóstica de la mutación MYD88 L265P en linfomas B de la zona marginal de características solapadas con el linfoma linfoplasmacítico, y abrir la posibilidad hacia una terapia dirigida en estos linfomas, nos planteamos los siguientes objetivos en nuestro trabajo:

1. Estudiar la frecuencia de la mutación MYD88 L265P en una serie larga de linfomas B de bajo grado, enriquecida en linfomas de la zona marginal así como en linfomas linfoplasmacíticos, por representar su principal diagnóstico diferencial.
2. Describir y analizar las características clínicas de los casos que presentan la mutación MYD88 L265P.
3. Describir y caracterizar morfológicamente los linfomas positivos para la mutación MYD88 L265P, con especial interés en los linfomas de la zona marginal.
4. Estudiar la relevancia del estado mutacional MYD88 L265P en linfomas B de bajo grado.



Material y métodos

1. Descripción de la serie estudiada

Para este trabajo de investigación fueron seleccionados pacientes diagnosticados de linfoma de la zona marginal, linfoma linfoplasmacítico y linfoma B de bajo grado con diferenciación plasmacítica, procedentes de distintos centros de España, entre los años 1990 y 2013. El estudio fue llevado a cabo en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y en el laboratorio de Genómica del Cáncer IFIMAV (Santander), con la colaboración del Red Nacional de Biobancos. El proyecto fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Los criterios de inclusión de los casos para el estudio fueron disponibilidad de datos clínicos, con posibilidad de revisión morfológica por estudio histológico y con material válido (muestra no defectuosa ni insuficiente) para estudio molecular. Quedaron excluidos aquellos que no cumplieron los criterios anteriores.

Se seleccionaron en total 128 casos de linfomas B de célula pequeña, de los cuales, 91 fueron linfomas de la zona marginal esplénicos, 7 fueron linfomas de la zona marginal ganglionar, 6 fueron linfomas de la zona marginal de tejido linfoide asociado a mucosa y 22 fueron casos de pacientes con diagnóstico de linfoma linfoplasmacítico. Además, se incluyeron 2 casos de linfomas B de célula pequeña no clasificables, que por sus características clínicas y su marcada diferenciación plasmacítica se relacionaban con los dos diagnósticos comentados anteriormente.

Con respecto al origen de las muestras, aquellas correspondientes a linfomas esplénicos de la zona marginal, procedían de piezas de esplenectomía; las muestras de linfomas extraganglionares asociadas a mucosa provenían de biopsias o piezas de resección de distintos orígenes (glándula parótida, pulmón, amígdala, órbita y mucosa gástrica); las de linfomas marginales ganglionares de ganglios linfáticos y las de linfomas linfoplasmacíticos, tenían su origen en sangre periférica y/o médula ósea, ganglios linfáticos o bazo. Todas las muestras recogidas tenían en común que procedían de pacientes que aún no habían recibido terapia.

Para los diagnósticos y la posterior reclasificación tras su revisión detallada, se tuvieron en cuenta criterios clínicos, morfológicos y moleculares. Los diagnósticos morfológicos fueron hechos siguiendo los criterios definidos en la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (2001-2008 WHO Classification).

NOTA: La selección de casos varía discretamente con respecto al estudio publicado, no coincidiendo por tanto los porcentajes ni las cifras de forma exacta.

2. Estudio mutacional MYD88 L265P

2.1. Líneas celulares

Seleccionamos una serie de líneas celulares para utilizarlas como controles positivos y negativos para los análisis mutacionales. Todas estas líneas fueron secuenciadas por el método Sanger para comprobar si portaban o no la mutación MYD88 L265P. Aquellas portadoras de la mutación sirvieron como control positivo y aquellas que eran nativas para esta, como control negativo.

Todas las líneas celulares utilizadas como controles fueron comerciales, obtenidas de la compañía DSMZ (Braunschweig, Germany) o de ATCC (Manassas, VA).

Las líneas celulares se manipularon en condiciones asépticas y se mantuvieron a una temperatura de 37° C con una concentración de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%.

La siguiente tabla (Tabla 2) resume las principales características de dichas líneas celulares.

Tabla 2. Principales características de las líneas celulares utilizadas como controles positivos y negativos para nuestro estudio.

Línea celular	Especie	Fuente	Medio de cultivo	Tipo de crecimiento	Compañía	Mutación MYD88
OCI-Ly3	Humana	DLBCL	RPMI+20%FBS	Suspensión	DSMZ	Positiva Homocigota
OCI-Ly10	Humana	DLBCL	IMDM+10%FBS	Suspensión	DSMZ	Positiva Heterocigota
HBL1	Humana	DLBCL	RPMI+10%FBS	Suspensión	ATCC	Positiva Heterocigota
A375	Humana	Melanoma	DMEM+10%FBS	Adherente	ATCC	Negativa
SM28	Humana	Melanoma	EMEM+10%FBS	Adherente	ATCC	Negativa

2.2. Extracción de ADN

Con el fin de aislar el ADN de nuestras muestras para su posterior estudio, se procedió a su extracción mediante lisis celular y posterior purificación eliminando restos de proteínas contaminantes, ARN, sales y otras macromoléculas.

El ADN genómico de las muestras tumorales procedentes de bloques de tejido fijados en formol y procesados en parafina fue obtenido mediante el método de fenol cloroformo.

El ADN genómico de las líneas celulares y de las muestras sin fijación (aspirados de médula ósea y muestras de sangre periférica) fue obtenido igualmente mediante el mismo método de extracción basada en fenolcloroformo, partiendo siempre de un lavado previo con suero salino para eliminar cualquier resto de medio de cultivo o suero que pudiera interferir con los resultados.

Para comprobar que la calidad, la cantidad y la integridad del ADN eran adecuadas, las muestras fueron evaluadas mediante espectrofotometría (Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Germany).

Se tomaron para extracción de ADN y posterior análisis por PCR, todas las muestras disponibles, quedando excluidas aquellas que eran escasas (por agotamiento del bloque o pérdida del material durante el procesamiento), aquellas que presentaban signos de fijador B5 (fijador en desuso actualmente que no preserva las características del ADN, y por tanto, impide el empleo de las muestras para técnicas de Biología Molecular) o aquellas que habían sido sometidas a procesamientos que deterioraban la calidad del ADN (médulas óseas sometidas a procesos de decalcificación con ácido nítrico). En esta última situación, el material correspondiente a biopsia de médula ósea, fue destinado a estudio histológico y el homólogo correspondiente a aspirado de médula ósea, se incluyó para extracción de ADN y posterior estudio por PCR.

2.3. Detección de la mutación MYD88 L265P mediante qPCR alelo-específica

Para realizar este estudio, se diseñaron, en colaboración con la compañía Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), ensayos personalizados compuestos por una sonda TaqMan acompañada de una pareja de oligonucleótidos que actuaban como cebadores de la reacción de PCR. Uno de los oligonucleótidos de cada pareja hibridaba con una zona del ADN genómico que incluía la posición 38182641 del

cromosoma 3p22.2 (posición 265 de la proteína). Este oligonucleótido, podía llevar en dicha posición una Adenina, de manera que tendría una afinidad mayor por la secuencia nativa (la cual lleva una Timina en la posición 38182641), o bien, podía llevar una Guanina, siendo así 100 % complementario a la secuencia mutante (Figura 5). Además, se incluyó en cada ensayo un bloqueador de la amplificación que se unía de manera opuesta al oligo que actuaba como cebador. Es decir, cuando el oligo era complementario de la secuencia nativa, el bloqueador lo era de la secuencia mutante, por lo que si se unía a ella evitaba su amplificación, y viceversa (Figura 5). El cuarto componente de los ensayos era la sonda TaqMan, que constaba de un fluoróforo y un quencher, que quedaban separados al amplificar esa zona de ADN, emitiendo entonces fluorescencia el fluoróforo. La cantidad de fluorescencia emitida era proporcional a la cantidad de ADN amplificado y era detectada en tiempo real por el termociclador (Figura 4).

Por lo tanto, se diseñó un ensayo que amplificaba con una especificidad mayor el alelo mutante y otro que amplificaba con mayor especificidad el alelo nativo.

Assay type	Description
<p>Mutant allele assay</p> <ul style="list-style-type: none"> • Detects specific or multiple mutant alleles: • An allele-specific primer detects the mutant allele • An MGB oligonucleotide blocker suppresses the wild type allele 	<p>ASP - Allele-specific primer ASB - Allele-specific blocker (MGB) LST - Locus-specific TaqMan® probe LSP - Locus-specific primer</p>
<p>Wild type allele assay</p> <ul style="list-style-type: none"> • Detects the wild type allele: • An allele-specific primer detects the wild type allele • An MGB oligonucleotide blocker suppresses the mutant allele 	<p>ASP - Allele-specific primer ASB - Allele-specific blocker (MGB) LST - Locus-specific TaqMan® probe LSP - Locus-specific primer</p>

Figura 5. Esquema del diseño de los ensayos utilizados para determinar la presencia o ausencia de mutación. Ensayo utilizado para detectar el alelo mutante: 4476206 MYD88_85940_mu. Ensayo diseñado para detectar el alelo wt: 4476206 MYD88_85940_wt (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Imagen tomada de “Taqman Mutation Detection Assays Protocol” de Applied Biosystems.

La reacción de PCR fue llevada a cabo en un protocolo de cinco pasos y siguiendo las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C (1 ciclo), 15 segundos a

92°C y 1 minuto a 58 °C (5 ciclos); 15 segundos a 92°C y 1 minuto a 60°C (40 ciclos). El producto de PCR obtenido tenía una longitud de 100 pb. La cantidad de ADN de partida fue de 100 ng, en un volumen final de 10 µl.

Cada muestra fue analizada con ambos tipos de ensayos en pocillos independientes y se realizaron 3 réplicas técnicas para cada uno (3 reacciones de PCR independientes con el ensayo mutante y otras 3 con el ensayo nativo). Como controles de la técnica se utilizó el ADN extraído de líneas celulares (ver apartado 2. 1. Líneas celulares).

La siguiente figura (Figura 6) representa el diagrama de amplificación obtenido de 3 tipos de muestras diferentes: un ADN nativo, un ADN con la mutación MYD88 L265P en homocigosis, y un ADN con dicha mutación en heterocigosis.

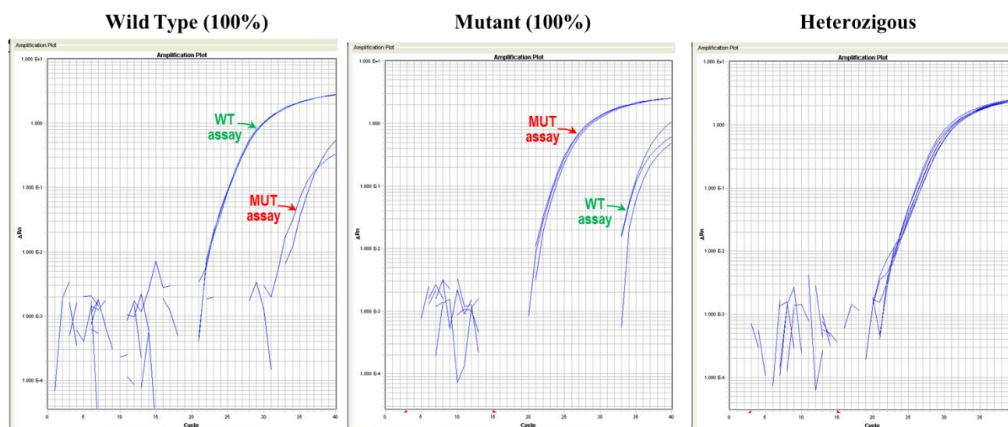


Figura 6. Diagramas de amplificación correspondientes a la utilización de los 2 tipos de ensayos (mutante y nativo). Izquierda: diagrama de amplificación obtenido con el ADN de la línea SM28. Centro: diagrama de amplificación obtenido con el ADN de la línea OCI-Ly3. Derecha: diagrama de amplificación obtenido con el ADN de la línea HBL1.

El análisis de los resultados de cada amplificación se analizó mediante el software Mutation Detector™. Esto requirió una puesta a punto previa mediante experimentos realizados con ADN control de líneas celulares. Una vez obtenidos los valores de Ct con los controles, el software, basándose en el Ct (threshold cycle value) obtenido en cada reacción de PCR, infería la presencia o ausencia de mutación en cada una de nuestras muestras.

2.4. Secuenciación por método Sanger

Para la confirmación de los resultados obtenidos por PCR, se utilizó la secuenciación por método Sanger. Los primers forward y reverse fueron los siguientes: 5' TTGAAGACTGGGCTTGTC 3' Y 5'GGTTGGTGTAGTCGCAGACA 3'

(Sigma Aldrich, St Louis, MO). Se diseñaron para amplificar un fragmento de 167 pares de bases que cubría el exón 5. El exón 5 fue amplificado usando Taqman Go Taq Probe (Promega, Madison, WI). Las condiciones de la PCR fueron: 2 minutos a 94°C (1 ciclo); 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C, 4 minutos a 60 °C (25 ciclos repetidos) y 4-∞. Los datos se leyeron y analizaron usando los programas Run 3130 data collection y Sequencing Analysis v5.4.

3. Estudio de las características clínicas

Las variables clínicas estudiadas fueron edad en el momento del diagnóstico, sexo, ECOG, supervivencia global, leucocitos, neutrófilos y linfocitos en sangre, hemoglobina, plaquetas, LDH, Albúmina sérica, Beta2- microglobulina, VIH, VHB, VHC, VEB, paraproteína IgM, IgA e IgG.

4. Estudio de las características morfológicas e inmunofenotípicas

4.1. Estudio histológico

Para la revisión de la morfología de los casos disponibles se usaron tinciones de HE según procedimiento habitual. Todas las laminillas de HE fueron examinadas en microscopio Olympus Bx41 (Olympus Europe GmbH) y DP controller (Olympus Europe GmbH).

4.2. Estudio Inmunohistoquímico

El estudio inmunohistoquímico se llevó a cabo mediante la construcción de un bloque con una matriz de tejidos, TMA (tissue microarrays). Las micromatrices de tejido (TMAs), permiten agrupar decenas o centenares de muestras en una sola laminilla, facilitando la tinción simultánea de éstas y por tanto el análisis inmunohistoquímico de múltiples tumores a la vez en condiciones que permiten la comparación de los resultados. Se seleccionaron áreas representativas de muestras de tumores sobre láminas de HE, para su posterior extracción de 2 cilindros de tejido del bloque de parafina, de distintas áreas, de forma que cada muestra iba representada por duplicado en el TMA. Se usó para ello el TMA Workstation (Beecher Instruments, Silver Springs, MD).

Las tinciones y los procedimientos fueron los que estaban puestos a punto en el departamento de Inmunohistoquímica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Se utilizó un panel de anticuerpos, enfocado al diagnóstico de linfomas B

de bajo grado con diferenciación plasmácica. Las secciones fueron teñidas usando el método Envision (Dako, Glostrup, Denmark) con paso de recuperación antigénica, calor inducido y detección de avidina-biotina peroxidasa en un inmunoteñidor automatizado (Dako, Glostrup, Denmark). Todas las laminillas de IHQ fueron examinadas en microscopio Olympus Bx41 (Olympus Europe GmbH) y DP controller (Olympus Europe GmbH).

Los anticuerpos usados y las condiciones quedan resumidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los anticuerpos usados en el estudio IHQ.

Anticuerpo	Especie	Clon	Compañía	Dilución
CD20	Monoclonal ratón	L26	Dako	Preparado para usar
CD3	Policlonal conejo	/	Dako	Preparado para usar
CD10	Monoclonal ratón	56C6	Dako	Preparado para usar
CD5	Monoclonal ratón	4C7	Dako	Preparado para usar
BCL2	Monoclonal ratón	124	Dako	Preparado para usar
BCL6	Monoclonal ratón	PG-B6p	Dako	Preparado para usar
CD23	Monoclonal conejo	DAK-CD23	Dako	Preparado para usar
IgM	Policlonal conejo	/	Dako	Preparado para usar
IgD	Policlonal conejo	/	Dako	Preparado para usar
IgG	Policlonal conejo	/	Dako	Preparado para usar
IgA	Policlonal conejo	/	Dako	Preparado para usar
Ki67	Monoclonal ratón	MIB1	Dako	Preparado para usar
Kappa	Policlonal conejo	/	Dako	Preparado para usar
Lambda	Policlonal conejo	/	Dako	Preparado para usar
MUM1	Monoclonal ratón	MUM1p	Dako	Preparado para usar
CD138	Monoclonal ratón	MI15	Dako	Preparado para usar
Ciclina D1	Monoclonal conejo	EP12	Dako	Preparado para usar

5. Análisis estadístico

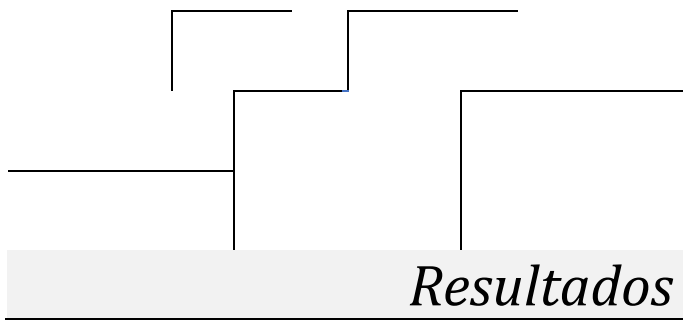
Los resultados fueron analizados estadísticamente de la siguiente forma:

Las variables cuantitativas de distribución normal fueron representadas por la media aritmética y las de distribución no normal por el rango. Para la determinación de la distribución normal /no normal de las variables se realizaron pruebas de normalidad mediante la aplicación de los test de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk. Las variables cualitativas fueron descritas como porcentajes de sujetos en cada categoría. Se estudiaron las diferencias en grupos (mutado *versus* nativo) de forma global y posteriormente clasificadas por diagnóstico.

Las variables cuantitativas fueron analizadas con el test no paramétrico U de Mann-Whitney, en aquellas que seguían una distribución no normal y por el test paramétrico con el T de Student, en aquellas con distribución normal. Las variables cualitativas fueron investigadas con el test de Chi cuadrado o con el test 2- Fisher, en función de la frecuencia de los datos esperada.

Las curvas de supervivencia fueron analizadas a través del método de Kaplan-Meier y los grupos de riesgo fueron comparados por el test log-rank (Mantel-Cox).

El programa usado fue IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM, NY). Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.



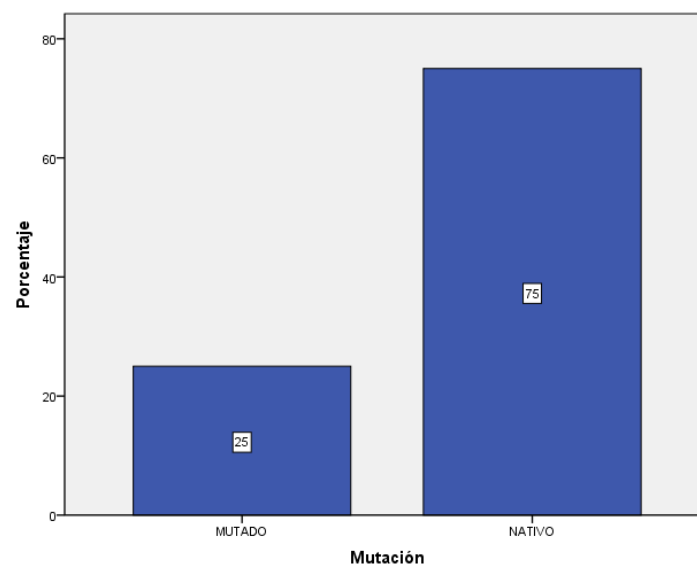
1. Estado mutacional MYD88 L265P en linfomas B de bajo grado

En nuestro estudio, la PCR identificó la mutación somática MYD88 L265P en 32 de 128 casos (25%), de los cuales 19 (14,8%) se correspondían con LPL y 13 (10,2%) tenían diagnóstico de SMZL. No se detectó la mutación en ningún caso con diagnóstico de NMZL. Tampoco se halló en los casos con diagnóstico de linfoma MALT.

Por diagnóstico, MYD88 L265P se halló en 19/27 (70,4%) linfomas linfoplasmacíticos y en 13/89 (14,6%) linfomas de la zona marginal esplénicos.

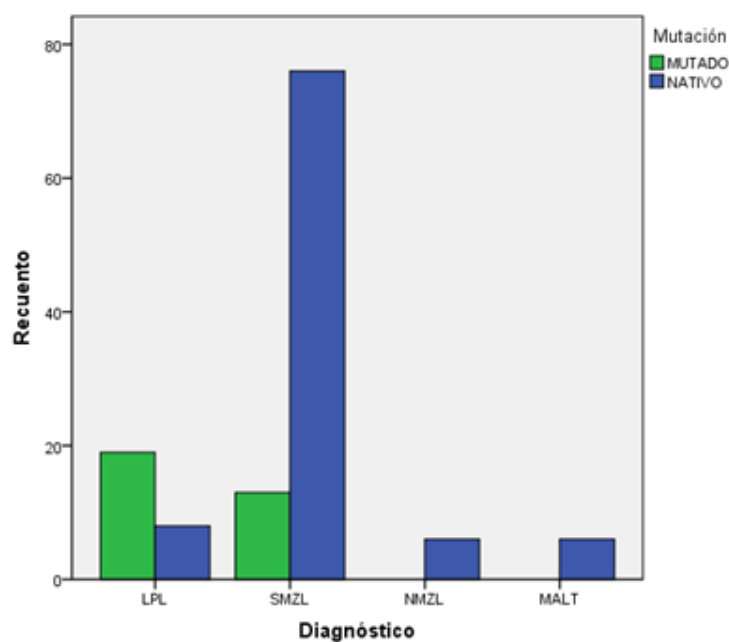
La secuenciación por Sanger confirmó los resultados positivos encontrados en la PCR. Igualmente, fue usada para casos considerados dudosos por PCR, confirmando la presencia de mutaciones MYD88 L265P.

En la gráfica que sigue a continuación (Gráfica 1), se resumen los datos correspondientes a porcentaje de casos con y sin mutación en nuestra serie.



Gráfica 1. Porcentaje de casos mutados y nativos de la serie estudiada

En la gráfica que sigue a continuación (Gráfica 2), se resumen los datos correspondientes a número de casos mutados y nativos, separados por diagnóstico, en nuestra serie.



Gráfica 2. Número de casos de mutados y nativos clasificados por diagnóstico.

En la tabla que sigue a continuación (Tabla 4), se resumen los datos correspondientes a número y porcentaje de casos mutados y nativos, dentro de cada diagnóstico y dentro del total de la serie estudiada.

Tabla 4. Número de casos mutados y nativos y porcentaje dentro del diagnóstico y dentro del total de la serie.

			Mutación MYD88 L265P		Total
			MUTADO	NATIVO	
Diagnóstico	LPL	Recuento	19	8	27
		% dentro del diagnóstico	70,4%	29,6%	100,0%
		% del total	14,8%	6,3%	21,1%
	SMZL	Recuento	13	76	89
		% dentro del diagnóstico	14,6%	85,4%	100,0%
		% del total	10,2%	59,4%	69,5%
	NMZL	Recuento	0	6	6
		% dentro del diagnóstico	,0%	100,0%	100,0%
		% del total	,0%	4,7%	4,7%
	MALT	Recuento	0	6	6
		% dentro del diagnóstico	,0%	100,0%	100,0%
		% del total	,0%	4,7%	4,7%
Total			32	96	128
			% dentro del diagnóstico	75,0%	100,0%
			% del total	25,0%	100,0%

1.1. Reclasificación diagnóstica de casos

Durante el proceso de revisión diagnóstica, fue precisa la reclasificación de algunos casos, teniendo en cuenta las características clínicas, histológicas y el estudio mutacional. Fueron reclasificados cinco casos, inicialmente diagnosticados como linfoma de la zona marginal esplénico, linfoma B de bajo grado no especificado y linfoma marginal ganglionar. Para ello, se tuvo en cuenta fundamentalmente los datos clínicos junto con la morfología linfoplasmocitaria, la restricción de cadenas ligeras, la presencia de paraproteína sérica y el estatus de MYD88 L265P. Las características de los casos reclasificados se resumen en la Tabla 5.

El primero de los casos reclasificados se trataba de un varón de 35 años en el momento del diagnóstico, que era estudiado por adenopatías periféricas. En el estudio de extensión se observaba infiltración de médula ósea por proceso linfoproliferativo B de bajo grado. En sangre mostraba una paraproteína de 24.000 mg/dL. El estudio morfológico del ganglio linfático mostraba una proliferación linfoide constituida por células de pequeño tamaño con focal diferenciación plasmacítica, que presentaba restricción de cadenas ligeras lambda. Se reclasificó el diagnóstico de NMZL a LPL debido a la conjunción de MYD88 L265P junto con los niveles muy elevados de paraproteína, de tipo IgM y a la diferenciación plasmacítica.

El segundo caso reclasificado se trataba de un varón de 43 años en el momento del diagnóstico, que era estudiado por adenopatías cervicales e igualmente mostraba infiltración difusa de médula ósea por una proliferación linfoide B de célula pequeña con diferenciación plasmacítica y con expresión de cadenas ligeras kappa. De la misma forma, se observó paraproteína IgM de 11.000 mg/dL en sangre periférica. Se estudió la biopsia de médula ósea y se propuso el diagnóstico de LPL como más adecuado a la proliferación B, inicialmente catalogada como BCL-NOS.

El tercer caso reclasificado era un varón de 72 años en el momento del diagnóstico, en el que durante el seguimiento por patología gástrica por infección por *H. Pylori*, se detectó una paraproteína IgM de 10.300 mg/dL. En el estudio de médula ósea se observó una infiltración difusa por linfocitos de pequeño tamaño de apariencia plasmocitoide. Las células neoplásicas mostraban restricción de cadenas ligeras Kappa. No se observó esplenomegalia ni afectación de otros órganos. Se estudió la biopsia de médula ósea y se decidió como diagnóstico más apropiado LPL, para una muestra inicialmente clasificada como BCL-NOS.

El cuarto caso reclasificado era una mujer, de 63 años en el momento del diagnóstico, que presentó esplenomegalia así como afectación de médula ósea con notable anemia. En sangre periférica se detectó paraproteína IgM de 7.300 mg/dL. El estudio citogenético mostró delección 18p. El bazo presentaba una proliferación neoplásica linfoide B con patrón vagamente nodular con diferenciación plasmacítica y presencia de células plasmáticas monoclonales kappa. Se decidió su reclasificación de SMZL a LPL debido a los niveles elevados de paraproteína y la morfología encontrada en bazo.

El quinto caso reclasificado era una mujer, de 59 años que en el momento del diagnóstico presentaba afectación de médula ósea, bazo, hígado y adenopatías del hilio esplénico, hepático, mesentéricas y de cadena iliaca derecha. Los niveles de paraproteína en sangre también eran elevados como en casos anteriores, de 5.100 mg/dL. El bazo mostraba proliferación neoplásica linfoide B con presencia frecuente de células plasmáticas y plasmocitoides con restricción e cadenas ligeras lambda. Se estudió la muestra de bazo y se decidió su reclasificación de SMZL a LPL (Figura 14).

Tabla 5. Resumen de las características de los casos reclasificados.

Caso Nº	Diagnóstico inicial	Restricción de cadenas ligeras por células plasmáticas	Diagnóstico revisado	Muestras	Esplenomegalia	Afectación de médula ósea	IgM sérica monoclonal (mg/dL)	Mutación MYD88 L265P
1	NMZL	Lambda	LPL	Ganglio	Ausente	Presente	24.000	Positivo
2	BCL-NOS vs LPL	Kappa	LPL	Médula ósea	Ausente	Presente	11.000	Positivo
3	BCL-NOS	Kappa	LPL	Médula ósea	Ausente	Presente	10.300	Positivo
4	SMZL	Kappa	LPL	Bazo	Presente	Presente	7.300	Positivo
5	SMZL	Lambda	LPL	Bazo	Presente	Presente	5.100	Positivo

Previamente a la reclasificación, contábamos con dos casos con diagnóstico genérico (BCL-NOS) y una distribución de la presencia de mutación ligeramente distinta a la encontrada tras esta. En la Tabla 5A se resumen los datos correspondientes al número de casos y porcentaje de mutación en las distintas categorías diagnósticas.

Tabla 5A. Frecuencia de la mutación MYD88 L265P en linfomas B de bajo grado de célula pequeña antes de la reclasificación.

Diagnóstico inicial	Nº de casos	Nº de casos con mutación <i>MYD88</i> L265P (%)
NMZL	7	1 (14,28%)
SMZL	91	15 (16,48%)
MALT	6	0 (0%)
LPL	22	14 (63,63%)
BCL, NOS	2	2 (100%)
Total de casos	128	32 (25%)

Tras el estudio detallado de las características clínicas y morfológicas, se reclasificaron los casos quedando de la siguiente forma (Tabla 5B):

Tabla 5B. Frecuencia de la mutación MYD88 L265P en linfomas B de bajo grado de célula pequeña tras la reclasificación.

Diagnóstico revisado	Nº de casos	Nº de casos con mutación <i>MYD88</i> L265P (%)
NMZL	6	0 (0%)
SMZL	89	13 (14,6%)
MALT	6	0 (0%)
LPL	27	19 (70,4%)
BCL, NOS	0	0 (0%)
Total de casos	128	32 (25%)

Concluyendo, todos los casos reclasificados se caracterizaron por mostrar un elevado componente monoclonal de IgM en suero, que llegaba a alcanzar los 24.000 mg/dL en alguno, así como evidencia histológica de diferenciación plasmacítica con presencia de células plasmáticas monotípicas. Igualmente, todos mostraban infiltración de médula ósea.

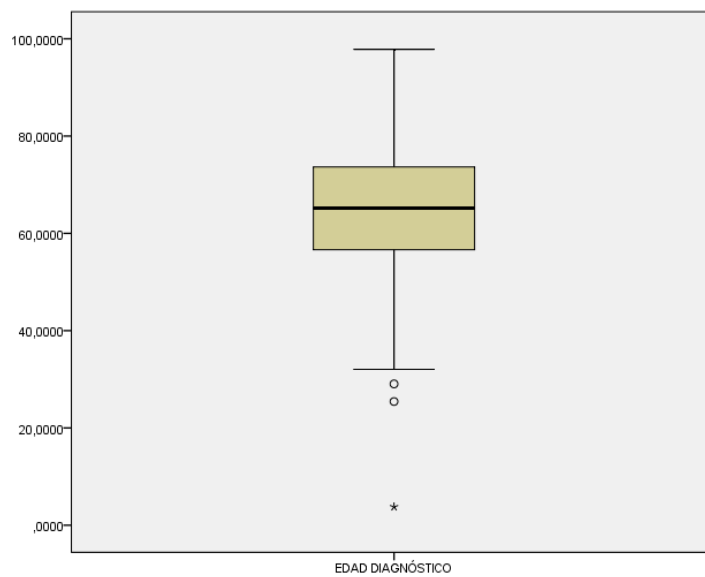
2. Estudio de las características clínicas de los pacientes

Junto con la edad y el sexo, se estudiaron una serie de características clínicas relacionadas con la etiopatogenia y otros parámetros de laboratorio.

2.1. Estudio descriptivo. Variables cuantitativas

2.1.1. Edad en el momento del diagnóstico

La edad media fue de 64 años, la mediana de 65; siendo la mínima de 4 años y la máxima de 97 años.



Gráfica 3. Media de edad en el momento del diagnóstico.

2.1.2. ECOG en el momento del diagnóstico

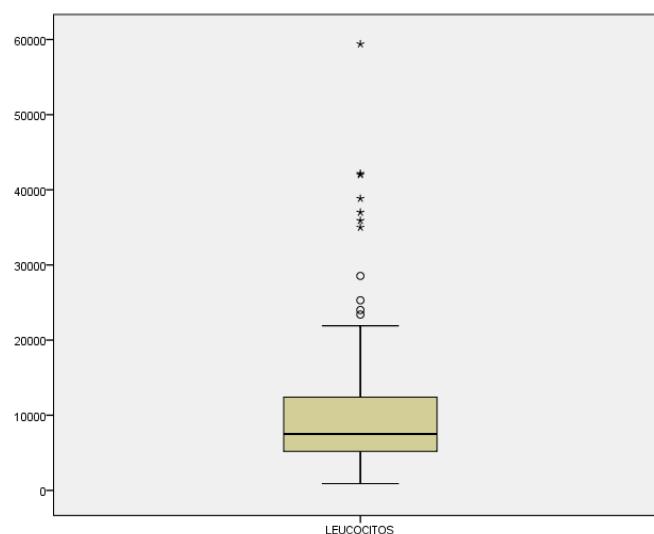
La escala ECOG presentó valores comprendidos entre 0 y 4, siendo los valores más frecuentes el 0 con 27 pacientes y el 1 con 29 pacientes. Con escala ECOG de 2 hubo 10 y con escala 3 y 4 un paciente en cada grupo.



Gráfica 4. Media de escala ECOG en el momento del diagnóstico.

2.1.3. Niveles de leucocitos

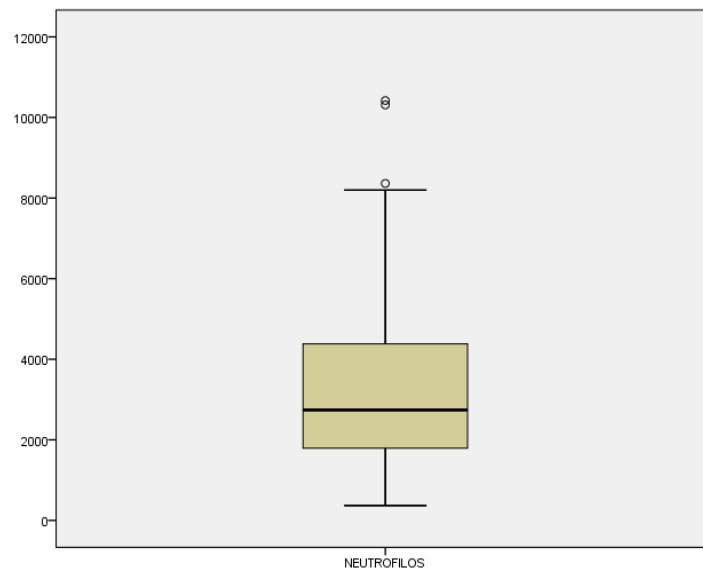
Los valores medios de leucocitos fueron $13,10 \times 10^3$ leucocitos/ mm^3 , la mediana de $7,56 \times 10^3$ leucocitos/ mm^3 ; siendo el valor mínimo de $0,89 \times 10^3$ leucocitos/ mm^3 y el máximo de $284,00 \times 10^3$ leucocitos/ mm^3 .



Gráfica 5. Media de niveles de leucocitos en sangre.

2.1.4. Niveles de neutrófilos

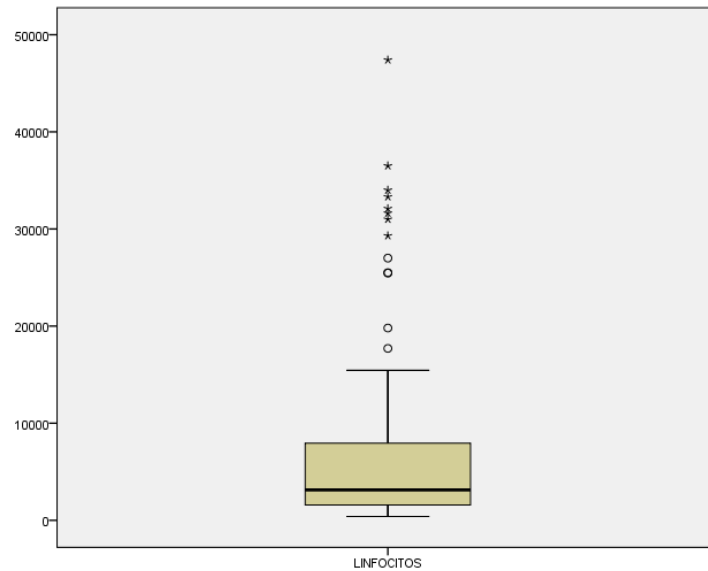
Los valores medios de neutrófilos fueron de $4,21 \times 10^3$ neutrófilos/ mm^3 ; la mediana de $2,81 \times 10^3$ neutrófilos/ mm^3 ; siendo el valor mínimo de $0,36 \times 10^3$ neutrófilos/ mm^3 y el máximo de $69,30 \times 10^3$ neutrófilos/ mm^3 .



Gráfica 6. Niveles medios de neutrófilos en sangre

2.1.5. Niveles de linfocitos

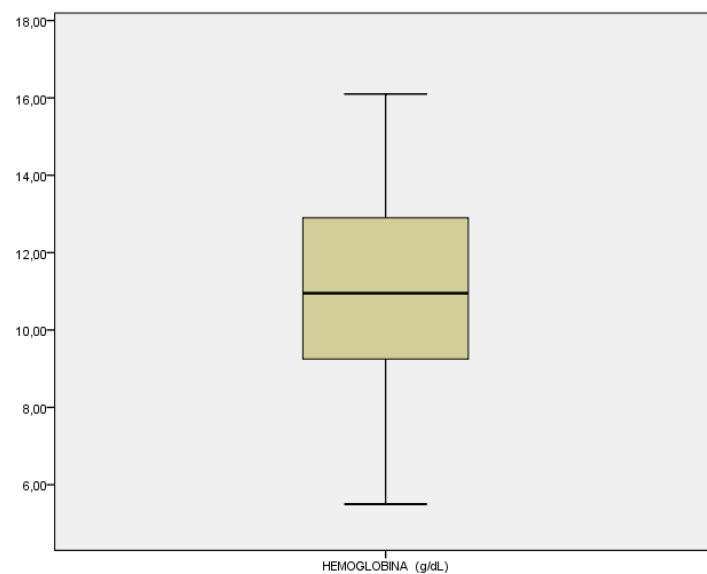
Los valores de linfocitos medios fueron de $7,24 \times 10^3$ linfocitos / mm^3 ; la mediana de $3,14 \times 10^3$ linfocitos/ mm^3 ; siendo el valor mínimo de $0,39 \times 10^3$ linfocitos/ mm^3 y el máximo de $47,40 \times 10^3$ linfocitos/ mm^3 .



Gráfica 7. Niveles medios de linfocitos en sangre

2.1.6. Niveles de hemoglobina

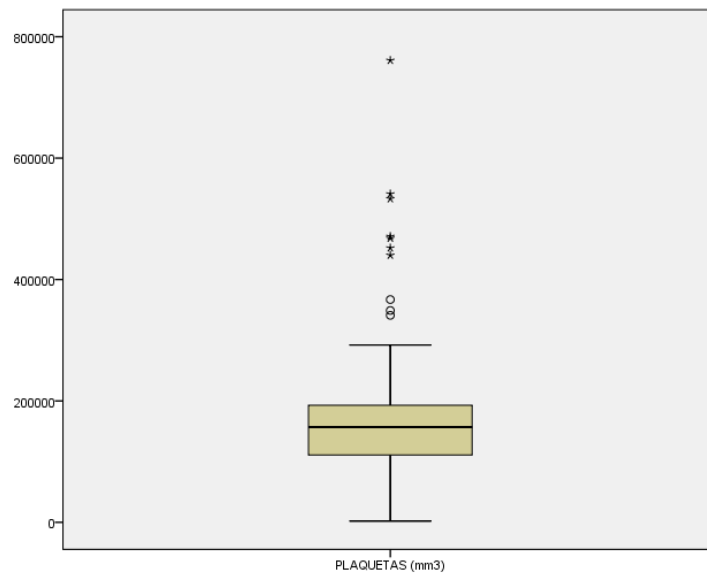
Los niveles de hemoglobina medios fueron de 11,11 g/dl; la mediana de 10,95 g/dl; siendo el valor mínimo de 5,50 g/dl y el máximo de 16,10 g/dl.



Gráfica 8. Niveles medios de hemoglobina en sangre

2.1.7. Niveles de plaquetas

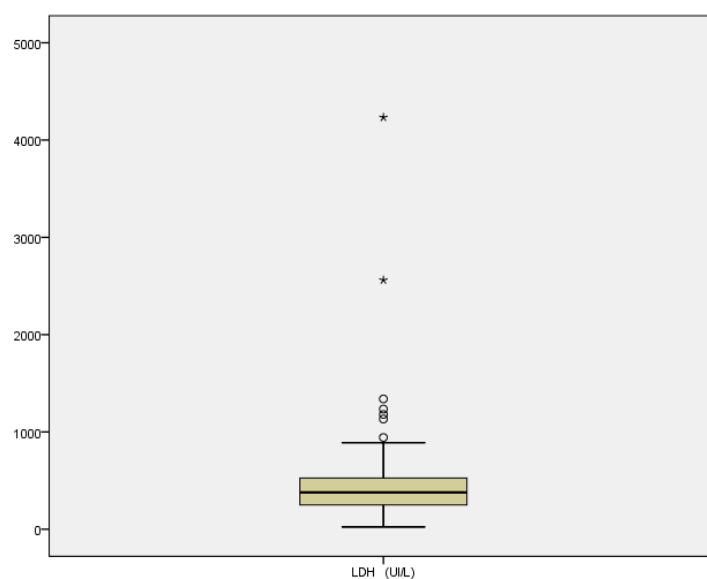
Los valores medios de plaquetas fueron de 174×10^3 plaquetas/mm³; la mediana de 157×10^3 plaquetas/mm³; siendo el valor mínimo de 2×10^3 plaquetas/mm³ y el máximo de 761×10^3 plaquetas/mm³.



Gráfica 9. Niveles medios de plaquetas en sangre

2.1.8. Niveles de LDH

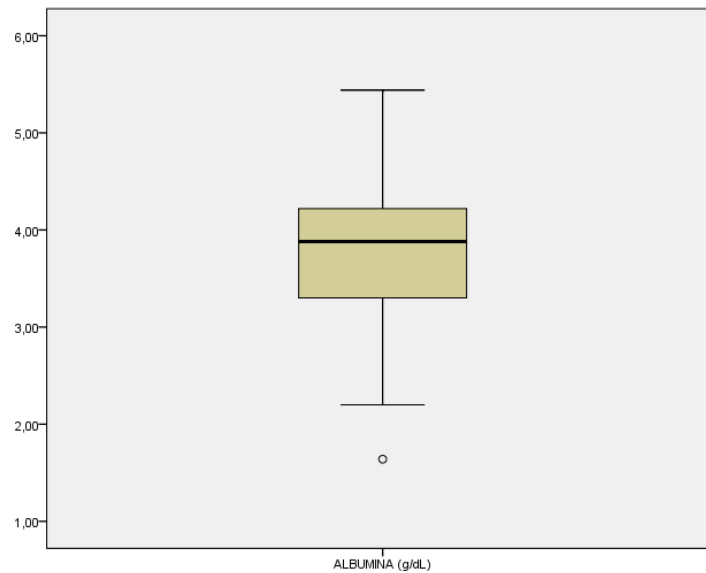
Los niveles de LDH medios fueron de 481,63 UI/L; la mediana de 378,50 UI/L; siendo el valor mínimo de 23 UI/L y el máximo de 4.233 UI/L.



Gráfica 10. Niveles medios de LDH sérica

2.1.9. Niveles de albúmina

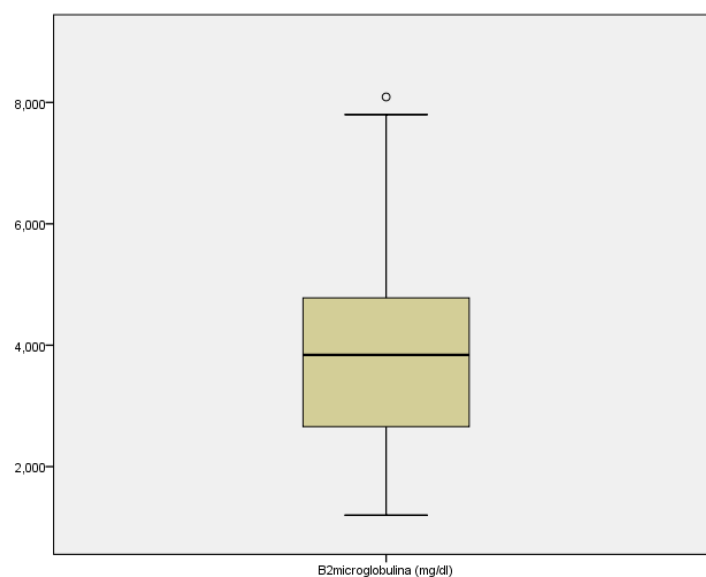
Los niveles medios de albúmina fueron de 3,78 g/dl; la mediana de 3,88 g/dl; siendo el valor mínimo de 1,64 g/dl y el máximo de 5,44 g/dl.



Gráfica 11. Niveles medios de albúmina sérica.

2.1.10. Niveles de Beta2-Microglobulina

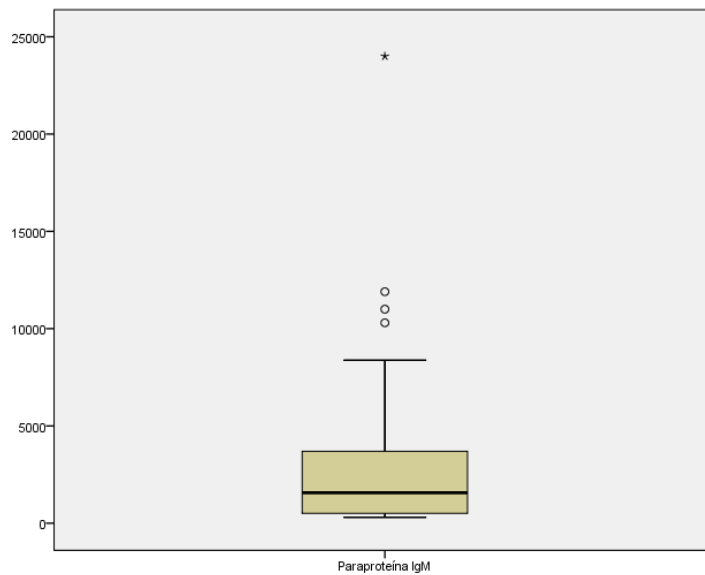
Los valores medios de Beta2-Microglobulina fueron 3,93 mg/dl; la mediana de 3,84 mg/dl; siendo el valor mínimo de 1,2 mg/dl y el máximo de 8,09 mg/dl.



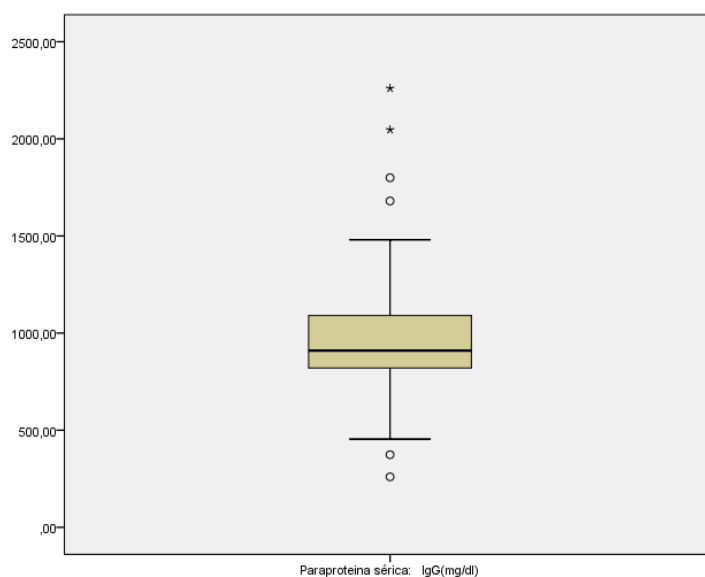
Gráfica 12. Niveles medios de Beta2-Microglobulina.

2.1.11. Niveles de paraproteína sérica. IgM. IgG. IgA

Los valores medios de paraproteína IgM fueron de 3.409 mg/dL, la mediana de 1.563 mg/dL, siendo el mínimo de 300 mg/dL y el máximo de 24.000 mg/dL. Los valores medios de paraproteína IgG fueron de 1.006 mg/dL, la mediana de 910 mg/dL, siendo el mínimo de 260 mg/dL y el máximo de 2.260 mg/dL. Los valores medios de paraproteína IgA fueron de 257mg/dL, la mediana de 122 mg/dL, siendo el mínimo de 22,5 mg/dL y el máximo de 3.100 mg/dL.



Gráfica 13. Niveles medios de Paraproteína IgM en sangre



Gráfica 14. Niveles medios de Paraproteína IgG séricos.

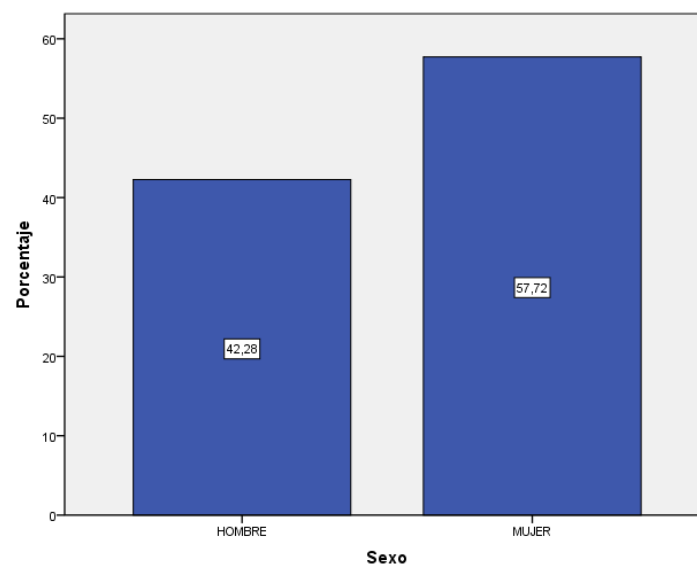


Gráfica 15. Niveles medios de Paraproteína IgA sérica.

2.2. Estudio descriptivo. Variables cualitativas

2.2.1. Sexo

El sexo predominante fue femenino, observándose 71 mujeres frente a 52 varones restantes. De 5 pacientes no se obtuvo información relativa al sexo.



Gráfica 16. Proporción de hombres y mujeres de la serie.

2.2.3. Infección por virus. VHB, VHC, VIH y VEB

La información acerca de la presencia de infección no se obtuvo en una gran mayoría de los casos. De los datos obtenidos, la más frecuente fue la infección por VHC, con 5 positivos, seguida de la infección por VEB, con 6 casos. El VIH estuvo presente en un caso y el VHB en dos de toda la serie.

2.3. Características clínicas de los linfomas B de bajo grado de la serie estudiada, positivos para la mutación MYD88 L265P

Las características clínicas para los casos mutados y no mutados quedan resumidas en la Tabla 6.

Tras analizar estadísticamente los datos clínicos estudiados, se observó que el sexo masculino fue más tendente a presentar la mutación MYD88 L265P en los linfomas que el sexo femenino ($p=0,013$).

Por otra parte, los pacientes con linfomas con la mutación MYD88 L265P, comparados con aquellos negativos, presentaron niveles más elevados de paraproteína IgM ($p=0,018$), oscilando el rango entre 300 y 24.000 mg/dL. Mientras que, en los pacientes con linfomas con MYD88 nativo, IgM fue encontrada en niveles más bajos, variando entre 304 y 6.600 mg/dL.

Por otro lado, la paraproteinemia IgG o IgA, fue mucho menos frecuente tanto en pacientes con la mutación como en pacientes sin ella.

Igualmente se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de leucocitos ($p=0,048$), encontrándose éstos en cifras más elevadas en aquellos casos positivos para la mutación MYD88 L265P.

Por último, la escala ECOG mostró tendencia a presentar unos niveles más altos en el tipo nativo que en el mutado ($p=0,044$).

En el resto de las variables clínicas estudiadas no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6. Características clínicas en linfomas B de la serie estudiada.

Características clínicas	MYD88 L265P mutado (n=32)	MYD88 L265P nativo (n=96)	P valor
Edad (años) media (rango)	62,33 (32-98)	64,36 (4-82)	NS
Sexo, número de pacientes (%)			
Hombre	19/31 (61,29%)	33/92 (35,86%)	0,013
Mujer	12/31 (38,70%)	59/92 (64,13%)	0,013
ECOG	0,50	0,96	0,044
Leucocitos (x10 ³ /mm ³) media (rango)	13,14 (2,10-42,16)	13,09 (0,89-39,80)	0,048
Neutrófilos (x10 ³ /mm ³) media (rango)	3,53 (0,96-8,36)	4,52 (0,36-69,30)	NS
Linfocitos (x10 ³ /mm ³) media (rango)	8,20 (0,93-36,50)	6,89 (0,39-47,40)	NS
Plaquetas (x10 ³ /mm ³) media (rango)	197 (36-533)	165 (2-761)	NS
VHC positivo, número de pacientes (%)	0/6 (0%)	5/20 (25%)	NS
VHB positivo, número de pacientes (%)	1/7 (14,28%)	1/16 (6,25%)	NS
VIH positivo, número de pacientes (%)	1/7 (14,28%)	0/15 (0%)	NS
VEB positivo, número de pacientes (%)	3/9 (33,33%)	3/18 (16,66%)	NS
Hemoglobina (g/dL), media (rango)	11,00 (6,6-15,9)	11,16 (5,5-16,1)	NS
LDH (UI/L) media (rango)	473,41 (112-4.233)	484,44 (23-2.561)	NS
Beta2 microglobulina (mg/L) media (rango)	3,67 (1,2-7,8)	4,03 (1,45-8,09)	NS
Albúmina sérica (g/dL) media (rango)	3,69 (2,7-5,05)	3,82 (1,64-5,44)	NS
Paraproteína			
IgG (mg/dL), media (rango)	1083,50 (454-2.047)	977,19 (260-2.260)	NS
IgA (mg/dL), media (rango)	539,00 (55-3.100)	158,67 (22,5-393)	NS
IgM (mg/dL), media (rango)	4615,19 (300-24.000)	1460,85 (304-6.600)	0,018
Tipo de cadenas ligeras, número de pacientes			
Kappa, número de pacientes (%)	8/9 (88,88%)	4/5 (80%)	NS
Lambda, número de pacientes (%)	1/9 (11,11%)	1/5 (20%)	NS

2.4. Características clínicas de los linfomas de la zona marginal positivos para la mutación MYD88 L265P

Las características clínicas de estos pacientes se recogen en la Tabla 7.

El estudio y la revisión de los casos, con la consecuente reclasificación diagnóstica, reveló que el único subtipo de MZL que presentó la mutación MYD88 L265P fue el SMZL.

Tras el análisis de las variables clínicas se observó que nuevamente los valores de paraproteinemia IgM fueron más elevados en los casos mutados que en

los nativos ($p=0,033$). Los valores de paraproteína M oscilaron entre 708 y 2.530 mg/dL.

Asimismo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los valores de leucocitos ($p=0,004$) y linfocitos ($p=0,034$) en sangre, encontrándose éstos más elevados en los mutados.

Por otra parte, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a ECOG ($p=0,021$) que se presentó en escalas más altas en los nativos que en los mutados.

El resto de las variables clínicas estudiadas no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 7. Características clínicas en linfomas esplénicos de la zona marginal.

Características clínicas	MYD88 L265P mutado (n=13)	MYD88 L265P nativo (n= 76)	P valor
Edad (años) media (rango)	58,35 (32-98)	65,66 (25-82)	NS
Sexo, número de pacientes (%)			
Hombre	8/13 (61,53%)	25/73 (34,24%)	NS
Mujer	5/13 (38,46%)	48/73 (65,75%)	NS
ECOG, media (rango)	0,38 (0-1)	1,10 (0-4)	0,021
Leucocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) media (rango)	19,05 (5,50-42,16)	10,71 (1,20-39,80)	0,004
Neutrófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) media (rango)	3,14 (1,40-5,90)	3,27 (0,52-10,42)	NS
Linfocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) media (rango)	12,49 (2,00-33,31)	7,62 (0,60-47,40)	0,034
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) media (rango)	192 (92-452)	160 (2-761)	NS
VHC positivo, número de pacientes (%)	0/4 (0%)	2/12 (16,66%)	NS
VHB positivo, número de pacientes (%)	0/4 (0%)	0/10 (0%)	NS
VIH positivo, número de pacientes (%)	0/4 (0%)	0/10 (0%)	NS
VEB positivo, número de pacientes (%)	2/6	1/11 (9,09%)	NS
Hemoglobina (g/dL), media (rango)	0,57 (7,4-12,6)	10,95 (5,5-16,1)	NS
LDH (UI/L) media (rango)	404,00 (252-559)	515,89 (23-2.561)	NS
Beta2 microglobulina (mg/L) media (rango)	4,27 (1,2-7,8)	4,32 (1,45-8,09)	NS
Albúmina sérica (g/dL) media (rango)	3,55 (2,7-4,6)	3,70 (1,64-4,8)	NS
Paraproteína			
IgG (mg/dL), media (rango)	1086,80 (577-2.047)	1042,66 (374-2.260)	NS
IgA (mg/dL), media (rango)	131,50 (108-193)	158,58 (22,5-393)	NS
IgM (mg/dL), media (rango)	1842 (708-2.530)	626,5 (371-917)	0,033
Tipo de cadenas ligeras, número de pacientes			
Kappa, número de pacientes (%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	NS
Lambda, número de pacientes (%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)	NS

2.5. Características clínicas en linfomas linfoplasmacíticos positivos para la mutación MYD88 L265P

Aunque los linfomas linfoplasmacíticos no eran objeto de nuestro estudio, se incluyó un pequeño número de casos, ya que este constituye uno de los principales diagnósticos diferenciales del linfoma de la zona marginal.

Al tratarse de un menor número de casos, los resultados fueron menos representativos, encontrándose solamente diferencias en cuanto al ECOG ($p=0,042$), observándose unos estadios ligeramente más elevados en los mutados que en los nativos.

Los resultados de las características clínicas se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Características clínicas en linfomas linfoplasmacíticos.

Características clínicas	MYD88 L265P mutado (n=19)	MYD88 L265P nativo (n= 8)	P valor
Edad (años) media (rango)	65,5 (35-85)	63,88 (29-80)	NS
Sexo, número de pacientes (%)			
Hombre	11/18 (61,11%)	3/7 (42,85%)	NS
Mujer	7/18 (38,88%)	4/7 (57,14%)	NS
ECOG, media (rango)	0,58 (0-2)	0,0 (0-0)	0,042
Leucocitos($\times 10^3/\text{mm}^3$) media (rango)	9,40 (2,10-38,84)	6,50 (3,81-11,70)	NS
Neutrófilos($\times 10^3/\text{mm}^3$) media (rango)	3,70 (0,96-8,36)	3,46 (1,50-7,90)	NS
Linfocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) media (rango)	5,17 (0,93-36,50)	2,33 (1,00-5,85)	NS
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) media (rango)	200 (36-533)	203 (147-341)	NS
VHC positivo, número de pacientes (%)	0/2 (0%)	3/5 (60%)	NS
VHB positivo, número de pacientes (%)	1/3 (33,33%)	1/3 (33,33%)	NS
VIH positivo, número de pacientes (%)	1/3 (33,33%)	0/2 (0%)	NS
VEB positivo, número de pacientes (%)	1/3 (33,33%)	0/2 (0%)	NS
Hemoglobina (g/dL), media (rango)	11,28 (6,6-15,9)	12,70 (6,7-15,7)	NS
LDH (UI/L) media (rango)	521,13 (112-4.233)	219,60 (134-387)	NS
Beta2 microglobulina (mg/L) media (rango)	3,31 (1,6-5,25)	2,64 (1,64-4,1)	NS
Albúmina sérica (g/dL) media (rango)	3,79 (2,9-5,05)	4,13 (2,6-4,95)	NS
Paraproteína			
IgG (mg/dL), media (rango)	1078,00 (454-1.800)	260,00 (260-NS)	
IgA (mg/dL), media (rango)	1082,33 (55-3.100)	NS (NS)	
IgM (mg/dL), media (rango)	5267,7 (300-24.000)	2474,5 (304-6.600)	NS
Tipo de cadenas ligeras, número de pacientes			
Kappa, número de pacientes (%)	5/6 (83,33%)	2/3 (66,66%)	NS
Lambda, número de pacientes (%)	1/6 (16,66%)	1/3 (33,33%)	NS

3. Hallazgos morfológicos en SMZL y LPL con mutación MYD88 L265P

Las muestras estudiadas procedían de distintos centros, sin posibilidad de revisión de las características macroscópicas de las piezas de resección. Aquellas en las que se disponía del material, se revisaron sin observarse particularidades reseñables.

Se detectaron 32 casos con mutación, de los cuales 19 correspondían a linfomas linfoplasmacíticos y 13 a linfomas de la zona marginal esplénicos. Los linfomas de la zona marginal esplénicos fueron los únicos linfomas de la zona marginal que presentaron mutación de MYD88 L265P.

3.1. Características histológicas de SMZL con mutación MYD88 L265P

Los linfomas de la zona marginal esplénicos fueron estudiados todos ellos en muestras procedentes de esplenectomía. Las características histológicas de las secciones de bazo fueron similares en los casos mutados y no mutados (Figura 7).

Las características morfológicas e inmunofenotípicas de los bazos con diagnóstico de linfoma de la zona marginal esplénico y con presencia de mutación MYD88 L265P fueron las siguientes (Figuras 8, 9, 10, 11):

- El patrón de infiltración neoplásico fue micronodular.
- Se observó afectación de pulpa blanca (colonización de folículos linfoides). Muchos de los nódulos neoplásicos presentaban reemplazamiento de la zona del manto y diferenciación marginal anular.
- La citología era polimorfa, se encontraron linfocitos de pequeño tamaño, algunos blastos y células con diferenciación plasmocitoide.
- En algunos casos se hallaron granulomas y/o acúmulos de histiocitos epitelioides, que se localizaban en periferia de los nódulos neoplásicos o en la zona central.
- Por lo que respecta a pulpa roja, se observó infiltración de ésta, frecuentemente con patrón micronodular y focalmente difusa, con sinusoides dilatados.
- El estudio IHQ demostró un perfil inmunofenotípico homogéneo: CD20+, CD3-, CD5-, BCL2+, CD10-, CD23-, BCL6-, Cyclina D1-. El índice proliferativo Ki67 demostró patrón en diana de forma más o menos constante en todos los casos.

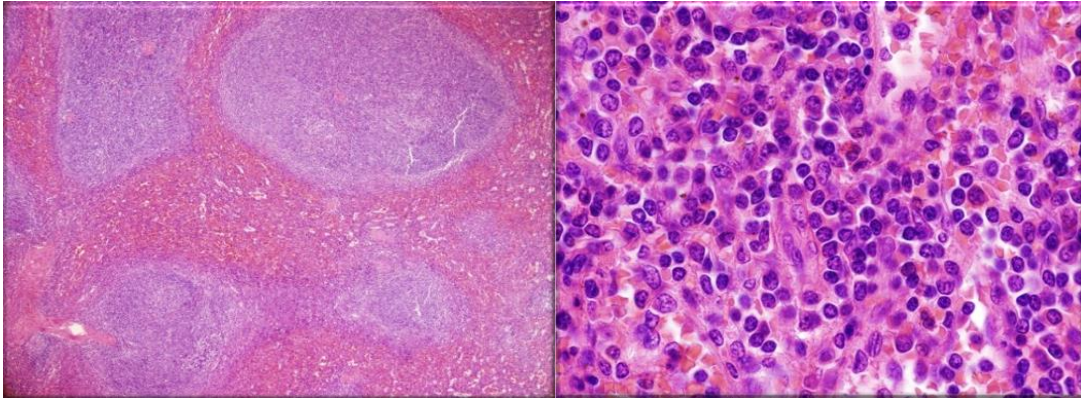


Figura 7. Izquierda. Patrón arquitectural de SMZL. Derecha. Celularidad polimorfa SMZL

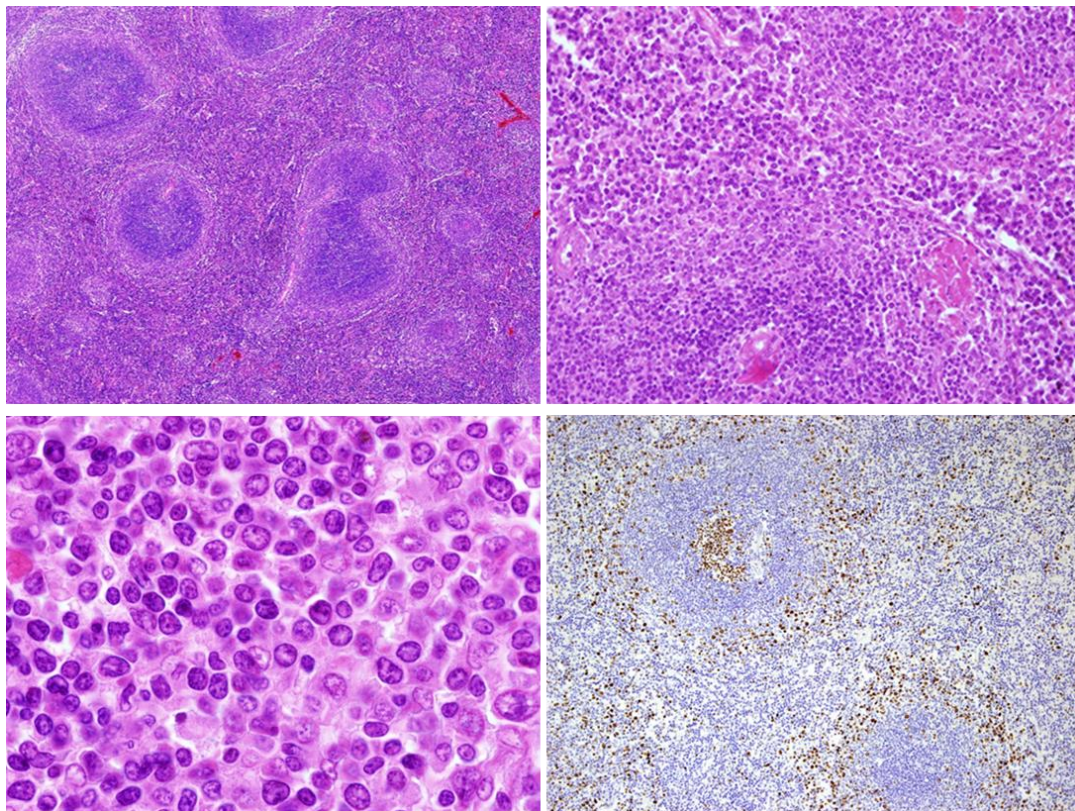


Figura 8. Hallazgos histológicos de un linfoma de la zona marginal esplénico con mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón micronodular. Superior derecha. Diferenciación zona marginal. Inferior izquierda. Detalle de la celularidad. Inferior derecha. Ki67 con patrón targetoide.

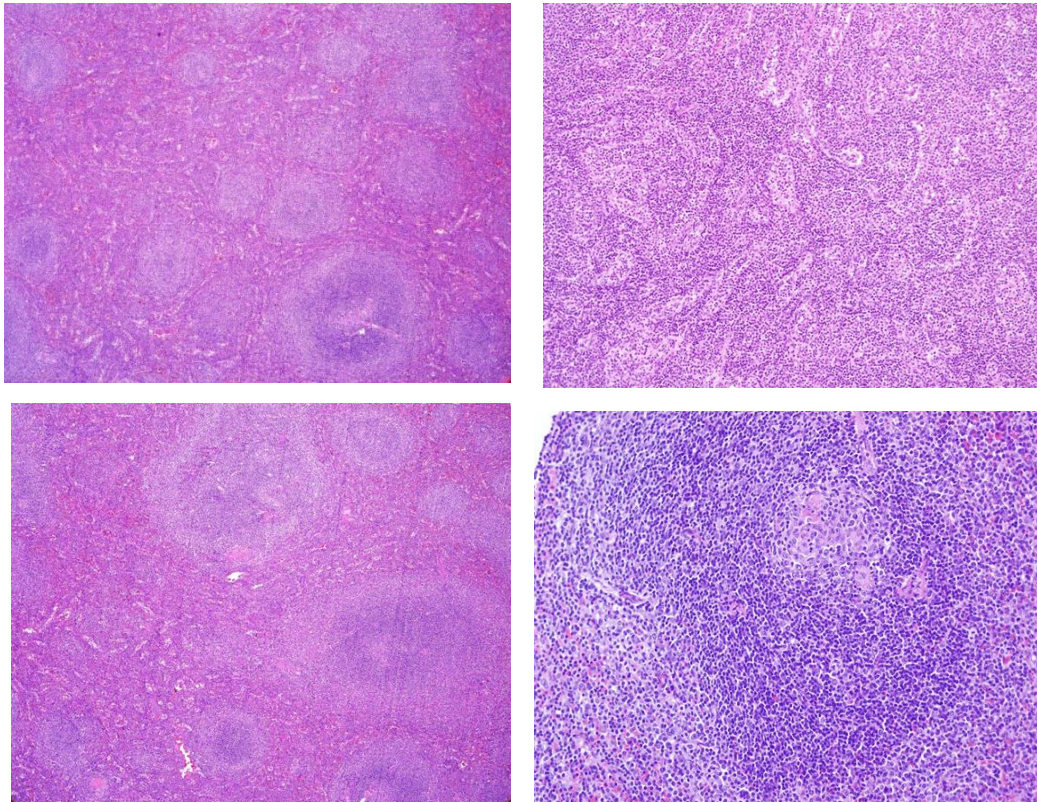


Figura 9. Hallazgos histológicos de un linfoma de la zona marginal esplénico, positivo para mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón de infiltración micronodular. Superior derecha. Infiltración pulpa roja. Inferior izquierda. Diferenciación de zona marginal. Inferior derecha. Detalle diferenciación de zona marginal.

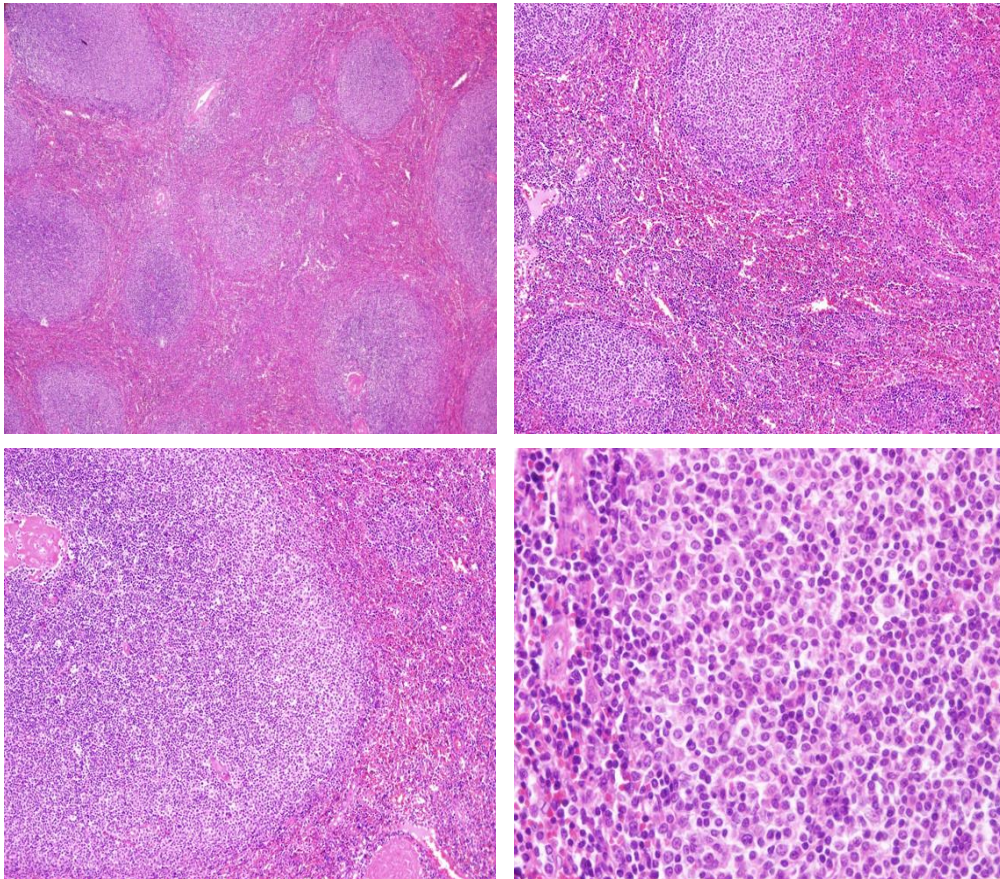


Figura 10. Hallazgos histológicos de un linfoma de la zona marginal esplénico, positivo para mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón micronodular. Superior derecha. Infiltración pulpa roja. Inferior izquierda. Diferenciación de zona marginal. Inferior derecha. Detalle diferenciación de zona marginal.

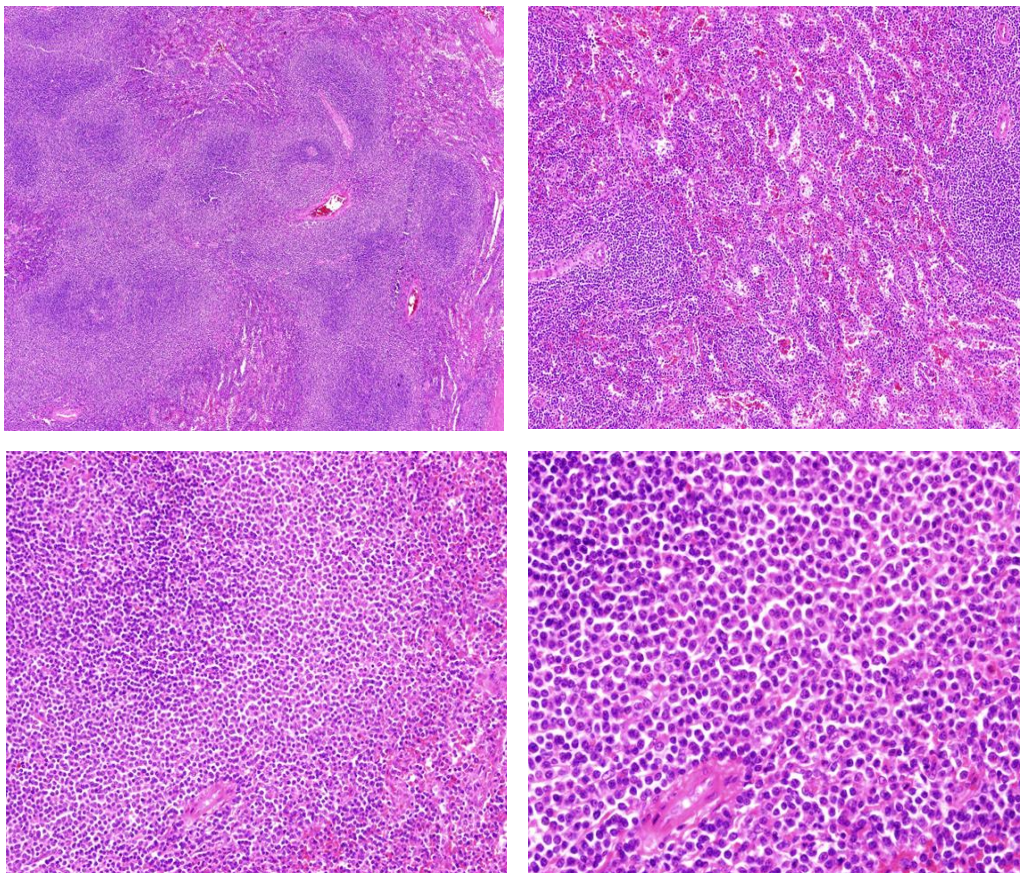


Figura 11. Hallazgos histológicos de un linfoma de la zona marginal esplénico, positivo para la mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón de infiltración micronodular. Superior derecha. Infiltración pulpa roja. Inferior izquierda. Diferenciación zona marginal. Inferior derecha. Detalle diferenciación zona marginal.

3.2. Características histológicas de LPL con mutación MYD88 L265P

Diecinueve casos con mutación MYD88 L265P se correspondieron con LPL (Figura 12). Las características histológicas halladas en las secciones de bazo en estos fueron las siguientes (Figuras 13, 14):

- Patrón de crecimiento vagamente nodular o difuso con cambios predominantemente en pulpa roja, afectando los compartimentos anatómicos de cordones y sinusoides de forma homogénea.
- Regresión del componente linfocitario en pulpa blanca, el cual se encontraba muy disminuido.
- No se observó en ninguno de los casos diferenciación de zona marginal y la celularidad estaba compuesta casi en su totalidad por linfocitos de pequeño tamaño, algunos con diferenciación plasmocitoide y células plasmáticas.

- Se observaron frecuentemente depósitos de hemosiderina en centros germinales residuales esclerosados.
- El estudio IHQ demostró un perfil inmunofenotípico: CD20+, CD3-, CD5-, BCL2+, CD10-, CD23-, BCL6-, Ciclina D1-, con células plasmáticas CD20-, PAX5+ y CD138+. Se observó restricción de cadenas ligeras en la práctica totalidad de los casos.

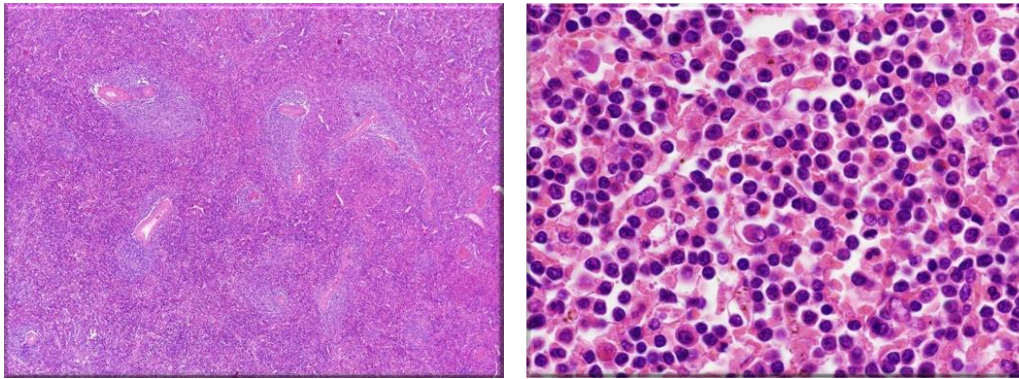


Figura 12. Izquierda. Patrón arquitectural LPL. Derecha. Celularidad monótona LPL

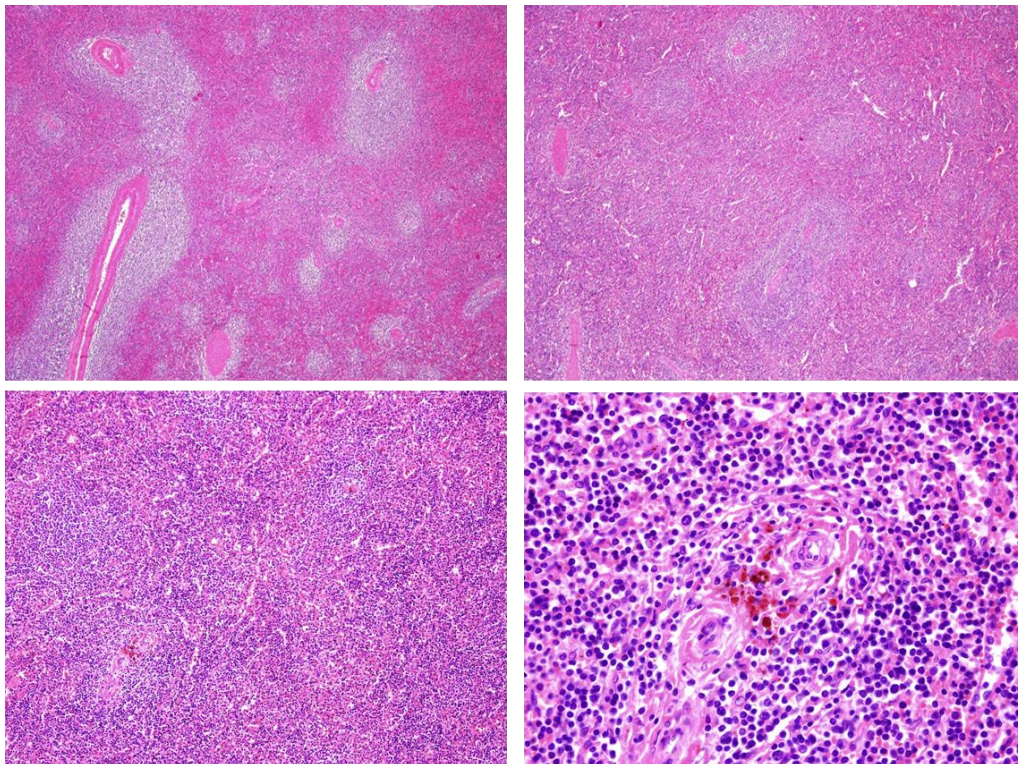


Figura 13. Hallazgos histológicos de un linfoma linfoplasmacítico en bazo, positivo para mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón de infiltración vagamente nodular de localización periarteriolar. Superior derecha. Patrón vagamente nodular. Inferior izquierda. Afectación de pulpa roja. Inferior derecha. Depósitos de hemosiderina.

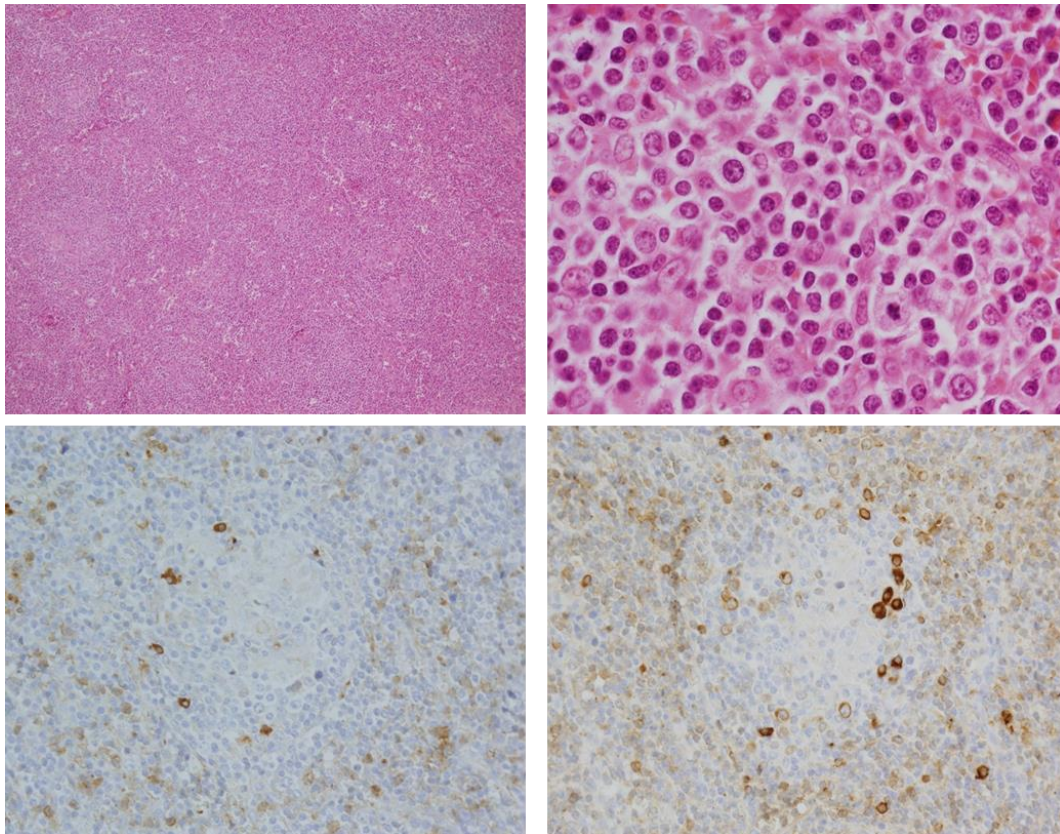


Figura 14. Hallazgos histológicos de un caso con mutación MYD88 L265P, inicialmente diagnosticado como SMZL y posteriormente reclasificado como LPL por la presencia de diferenciación plasmacítica con restricción de cadenas ligeras (caso reclasificado nº 5). Superior derecha e izquierda. Patrón micronodular y diferenciación plasmacítica. Inferior izquierda. Tinción inmunohistoquímica Kappa. Inferior derecha. Tinción inmunohistoquímica Lambda.

3.3. Paraproteína IgM, diferenciación plasmacítica y mutación de MYD88 L265P

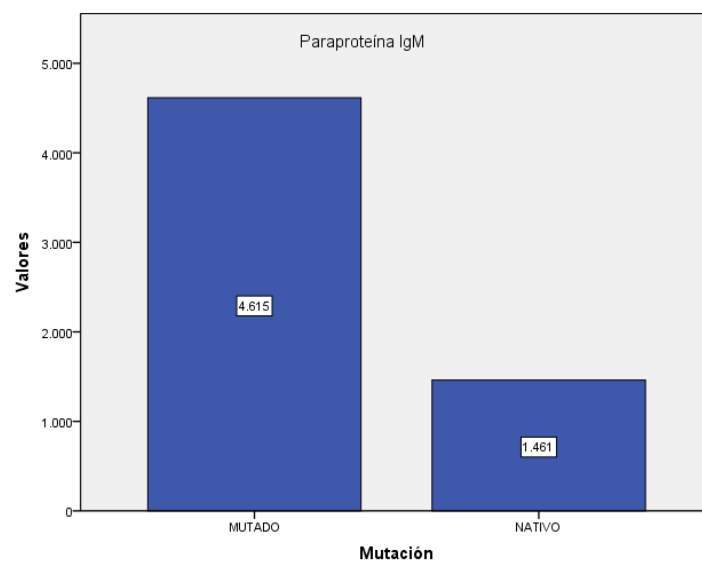
3.3.1. Paraproteína IgM

La paraproteína monoclonal IgM es la responsable de gran parte de la sintomatología y de la morbilidad en estos linfomas. Además, la concentración inicial de paraproteína monoclonal sérica es el principal factor predictor de progresión de enfermedad. Hemos estudiado la presencia de paraproteína en nuestra serie, observando asociación entre la presencia de mutación y secreción de IgM monoclonal. La presencia de IgM monoclonal fue notablemente más frecuente que la IgG o la IgA, en todos los casos, como comentamos anteriormente.

Del total de la serie encontramos que hay 34 pacientes con paraproteína, de los cuales 21 presentaron la mutación MYD88 L265P y 13 fueron nativos para esta.

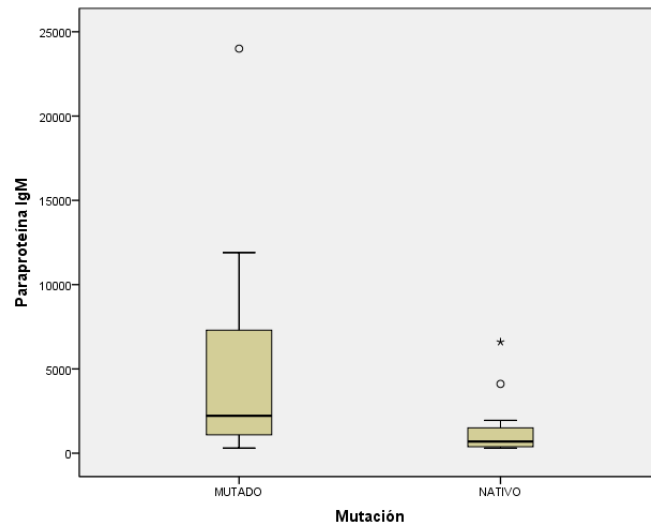
En el análisis realizado entre presencia de mutación y paraproteína M obtuvimos un valor de $p=0,018$, siendo estadísticamente significativa la asociación.

Los valores medios de paraproteína fueron mayores en mutados que en nativos como se puede apreciar a continuación (Gráfica 17).



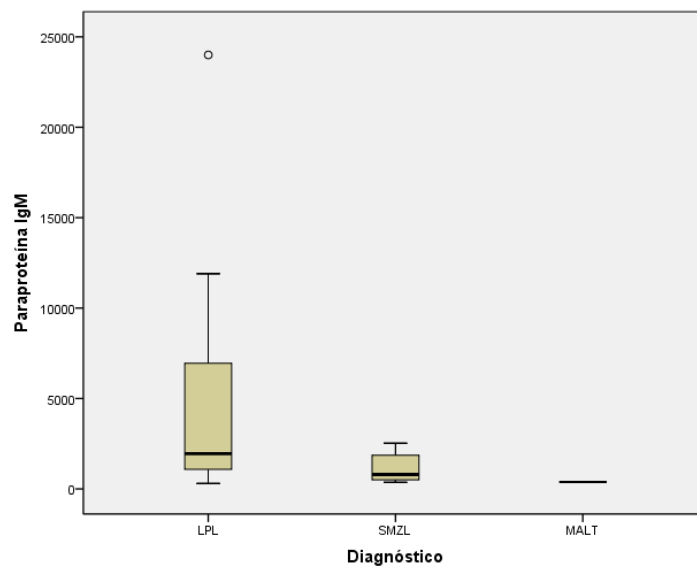
Gráfica 17. Niveles medios de paraproteína IgM en mutados y nativos.

Los valores observados en los linfomas con mutación presentaban un rango más amplio que en aquellos nativos (Gráfica 18).



Gráfica 18. Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos

Los niveles de paraproteína también se mostraron más elevados en los pacientes con diagnóstico de LPL con respecto a los SMZL, como se puede observar en la gráfica siguiente (Gráfica 19).



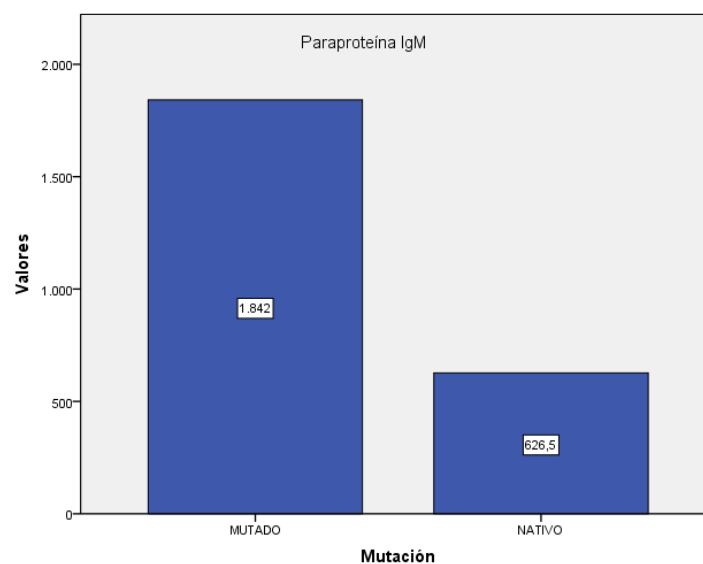
Gráfica 19. Niveles de paraproteína IgM según diagnóstico.

3.3.2. Paraproteína IgM en SMZL

Entre los pacientes con diagnóstico de SMZL, se halló paraproteína IgM en 10 de estos, de los cuales 4 presentaron la mutación MYD88 L265P y 6 fueron nativos para esta.

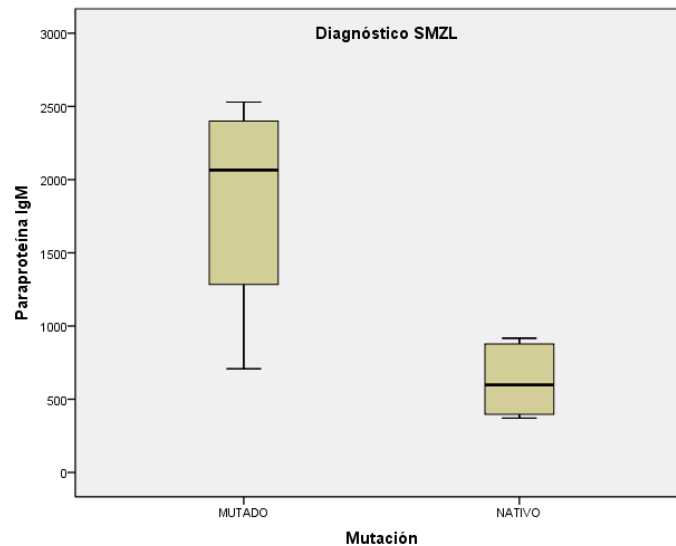
El estudio entre paraproteína M y presencia de mutación fue estadísticamente significativo ($p= 0,033$) observándose asociación entre estas dos variables también en SMZL.

Los valores medios de paraproteína fueron mayores en mutados que en nativos como se puede apreciar a continuación (Gráfica 20).



Gráfica 20. Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos en SMZL.

Los valores observados en los linfomas con mutación MYD88 L265P presentaban un rango más amplio que en aquellos nativos, con cifras más elevadas en límite superior en los mutados que en los nativos (Gráfica 21).



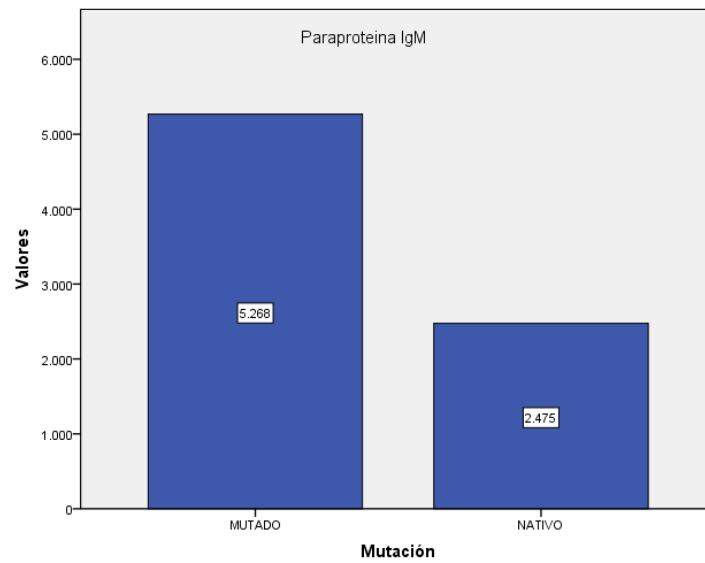
Gráfica 21. Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos en SMZL

3.3.3. Paraproteína IgM en LPL

A diferencia de los linfomas de la zona marginal, los linfomas linfoplasmacíticos no demostraron asociación con paraproteinemia IgM ($p= 0,441$). El estudio de los LPL se limitaba a pocos casos por lo que el tamaño muestral era pequeño.

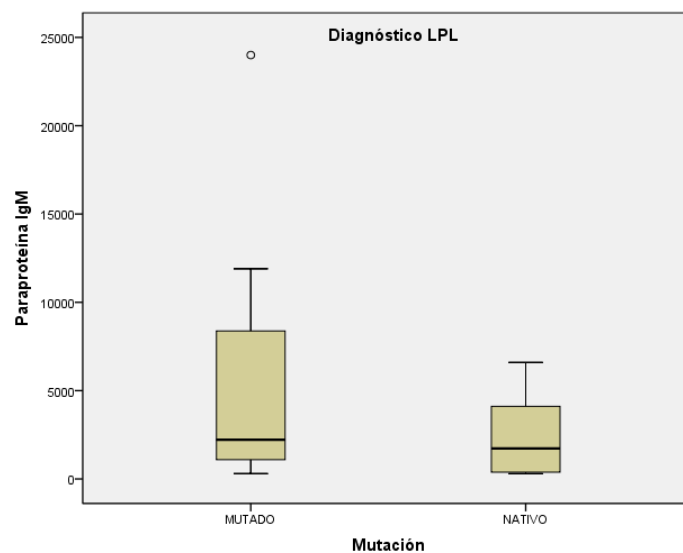
En nuestra serie encontramos 23 pacientes con diagnóstico de LPL y presencia de paraproteína IgM, de los cuales 17 presentaron la mutación y 6 fueron nativos para esta.

Los valores medios de paraproteína fueron mayores en mutados que en nativos como se puede apreciar a continuación (Gráfica 22).



Gráfica 22. Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos en LPL

Los valores observados en los linfomas con mutación presentaban un rango más amplio de paraproteína IgM que aquellos con MYD88 L265P nativo, como se observa en la gráfica siguiente (Gráfica 23).



Gráfica 23. Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos en LPL

3.4. Estratificación de niveles de paraproteína IgM

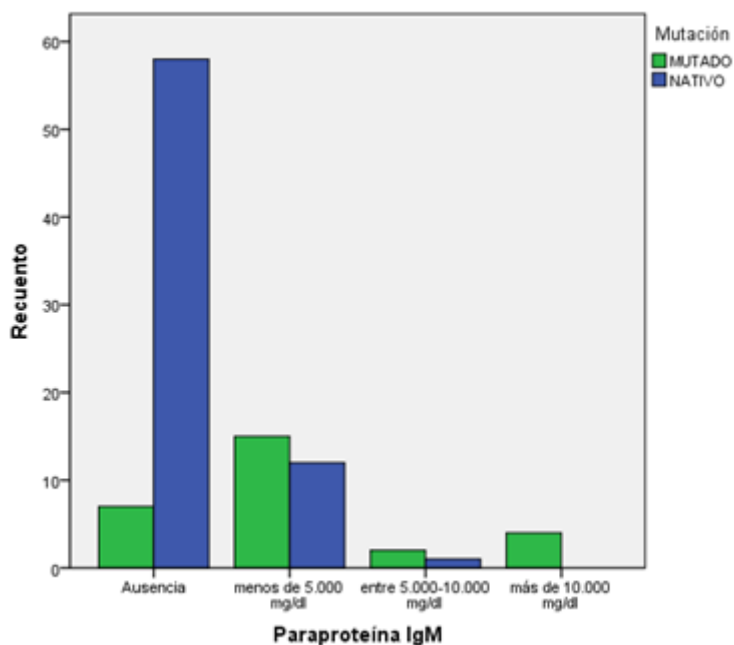
Tanto en mutados como en nativos, los valores de IgM más frecuentes se agrupaban en torno a cifras inferiores a 5.000 mg/dL.

Por otra parte, los niveles de paraproteína presentaban valores mayores en los mutados con respecto a los nativos, de forma que el 21,42 % de los casos mutados presentaron niveles por encima de 5.000 mg/dL de IgM sérica, frente al 1,40 % de los nativos (Tabla 9)

Tabla 9. Estratificación de los niveles de IgM monoclonal en sangre en relación a la mutación.

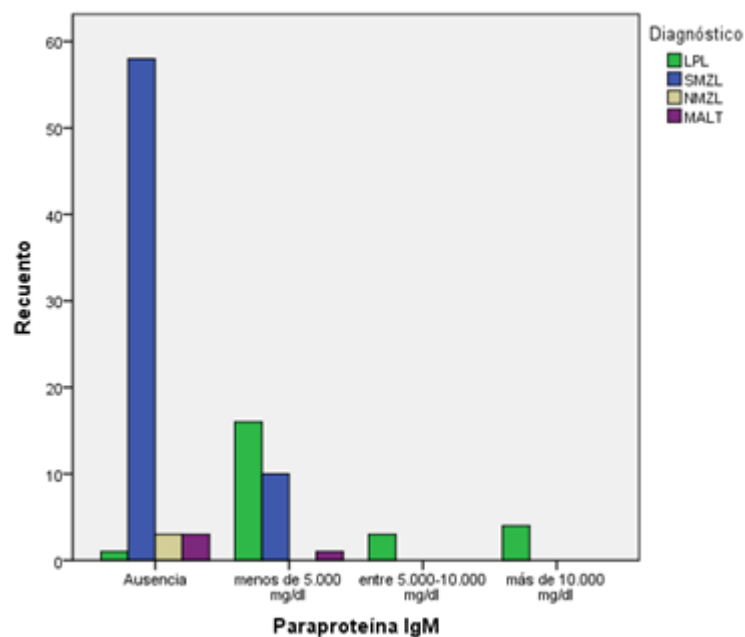
Nivel de paraproteína IgM			
Mutados		Nativos	
<5.000 mg/dL	15/28 (53,57%)	<5.000 mg/dL	12/71 (16,90%)
5.000-10.000 mg/dL	2/28 (7,14%)	5.000-10.000 mg/dL	1/71 (1,40%)
>10.000 mg/dL	4/28 (14,28%)	>10.000 mg/dL	0/71 (0%)

En nativos la ausencia de paraproteína fue la situación más frecuente mientras que en mutados fue más frecuente la presencia de IgM en cifras inferiores a 5.000 mg/dL (Gráfica 24).



Gráfica 24. Niveles de paraproteína IgM estratificados en mutados y nativos.

Separados por categorías diagnósticas se observó que el único linfoma que mostró valores de paraproteína IgM en cifras superiores a 10.000 mg/dL fue el LPL mientras que con cifras inferiores a 5.000 mg/dL se apreciaron en linfomas MALT, SMZL y LPL. Por otra parte, la mayoría de los linfomas MALT y SMZL estudiados no presentaron paraproteína IgM y estuvo completamente ausente en todos aquellos diagnosticados como NMZL (Gráfica 25).



Gráfica 25. Niveles de paraproteína IgM estratificados por diagnóstico.

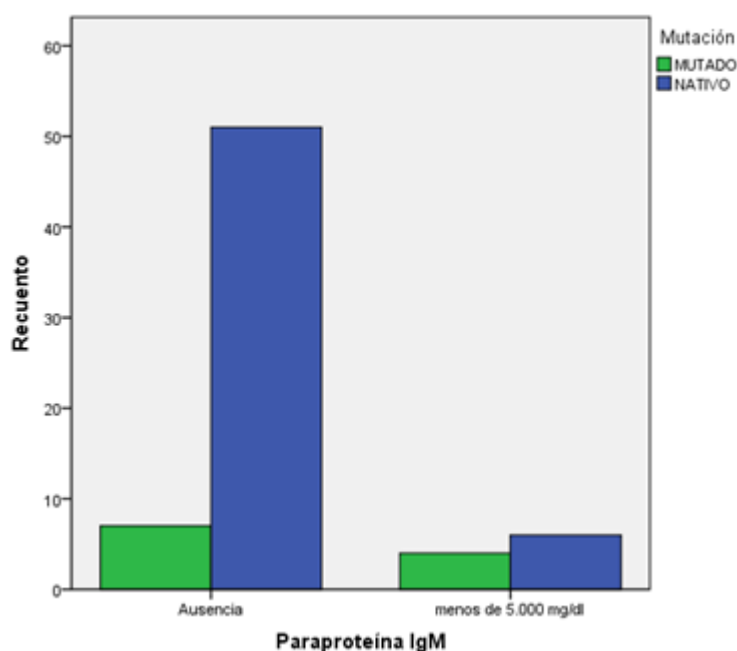
3.4.1. Estratificación de niveles de paraproteína IgM en SMZL

Estudiando por separado los niveles de paraproteína IgM en SMZL, observamos que los valores por encima de 5.000 mg/dL son inexistentes tanto en mutados como en nativos y que en los mutados la frecuencia con la que se presenta la paraproteína IgM con respecto a los nativos, es mayor (36,36% vs 10,52%) (Tabla 10).

Tabla 10. Estratificación de los niveles de IgM monoclonal en sangre en relación a la mutación.

Nivel de paraproteína IgM			
Mutados		Nativos	
<5.000 mg/dL	4/11 (36,36%)	<5.000 mg/dL	6/57 (10,52%)
5.000-10.000 mg/dL	0/11 (0%)	5.000-10.000 mg/dL	0/57 (0%)
>10.000 mg/dL	0/13 (0%)	>10.000 mg/dL	0/57 (0%)

En la gráfica que sigue a continuación, observamos que dentro de los SMZL, la mayoría muestran ausencia de paraproteína, pero esta situación es más frecuente en los nativos (Gráfica 26).



Gráfica 26. Niveles de paraproteína IgM estratificados en mutados y nativos, en SMZL.

3.4.2. Estratificación de niveles de paraproteína IgM en LPL

En los casos con diagnóstico de LPL observamos una frecuencia más elevada de paraproteína IgM que en los SMZL, identificándose además en todos los niveles (menor de 5.000 mg/dL, entre 5.000-10.000 mg/dL y mayor de 10.000 mg/dL).

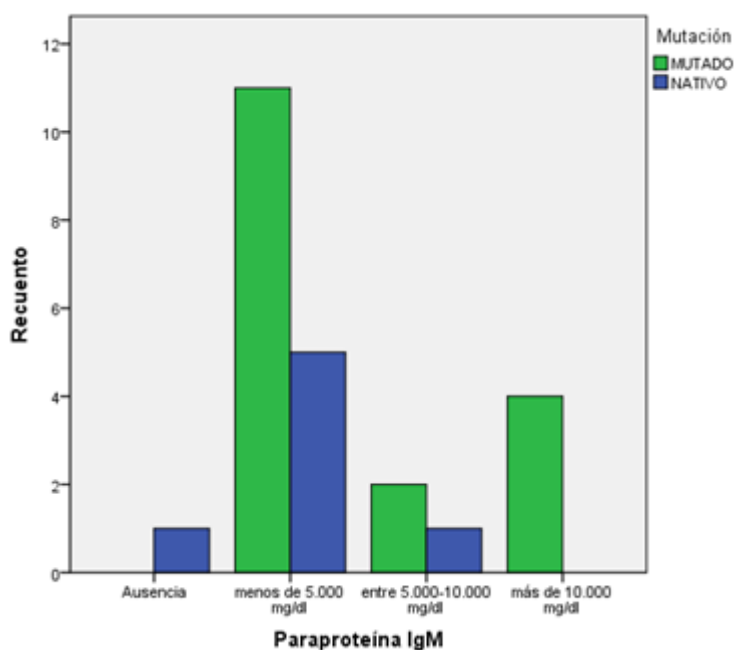
Comparando ambos grupos, mutados y nativos, observamos que hay mayor frecuencia de niveles menores a 5.000 mg/dL en nativos que en mutados (62,5%

frente a 52,63%). Igualmente, los valores superiores a 5.000 mg/dL son mayores en los mutados (36,83% frente a 12,5%)(Tabla 11).

Tabla 11. Estratificación de los niveles de IgM monoclonal en sangre en relación a la mutación.

Nivel de paraproteína IgM			
Mutados		Nativos	
<5.000 mg/dL	10/19 (52,63%)	<5.000 mg/dL	5/8 (62,5%)
5.000-10.000 mg/dL	3/19 (15,78%)	5.000-10.000 mg/dL	1/8 (12,5%)
>10.000 mg/dL	4/19 (21,05%)	>10.000 mg/dL	0/8 (0%)

En la gráfica que sigue a continuación, observamos que dentro de los LPL, las cifras de paraproteína IgM más frecuentes son las menores de 5.000 mg/dL, seguidas de las mayores de 10.000 mg/dL, vinculadas a la presencia de mutación. (Gráfica 27)



Gráfica 27. Niveles de paraproteína IgM estratificados en mutados y nativos, en LPL.

3.5. Diferenciación plasmacítica

Con respecto a la diferenciación plasmacítica (citoplasma excéntrico eosinofílico, Golgi prominente y cromatina agrupada de forma radial) fue observada en 9/13 casos mutados (69%), siendo, por tanto, muy frecuente en este grupo. El

estudio inmunohistoquímico de cadenas ligeras kappa y lambda no identificó restricción en las células plasmáticas.

Hubo una moderada relación entre la morfología plasmática y la presencia de paraproteína monoclonal sérica (5/13 casos; 38%)

El resumen de los datos hallados respecto a la presencia de diferenciación plasmática y el componente monoclonal en suero en los casos mutados se resume a continuación (Tabla 12)

Tabla 12. Diferenciación plasmática en SMZL con presencia de mutación MYD88 L265P.

Características	Casos													Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Morfología plasmática	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	9/13 (69,23%)
Plasmáticas con restricción de cadenas ligeras	Neg	Neg	Neg	ND	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	0/13 (0%)
Presencia de componente monoclonal en suero	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	5/13 (38,46%)
IgM	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	4/5 (80%)
IgG	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1/5 (20%)
IgA	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	0/0 (0%)

A pesar de la frecuencia con la que se encuentra relacionada la diferenciación plasmática con la secreción de paraproteína y la presencia de mutación MYD88 L265P, se demostraron algunos casos en los que esta relación estaba ausente. La figura que sigue a continuación, correspondiente a un paciente con linfoma negativo para la mutación y sin paraproteína constatada, muestra diferenciación plasmática en los cortes histológicos (Figura 15).

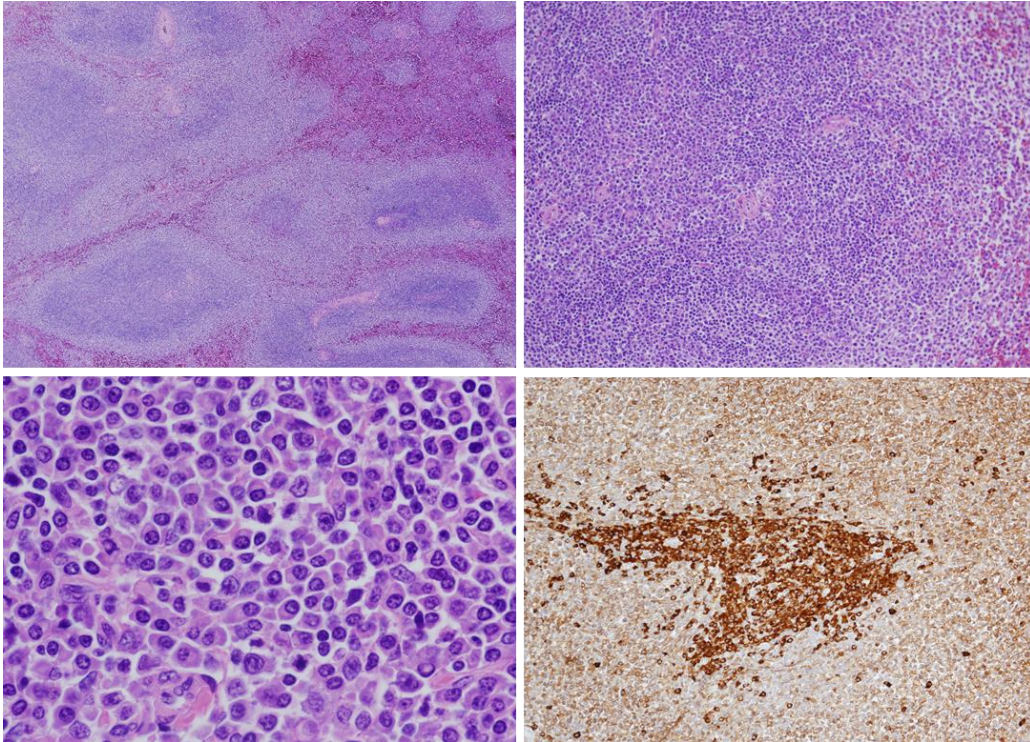
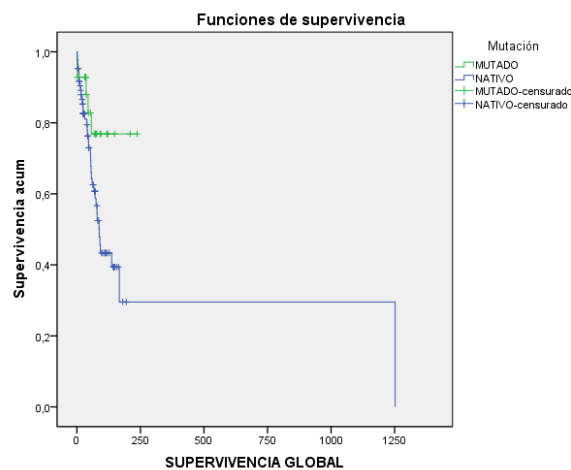


Figura 15. Hallazgos histológicos de un linfoma esplénico de la zona marginal negativo para mutación de MYD88 L265P, con diferenciación plasmacítica y sin paraproteína monoclonal. Superior izquierda. Patrón micronodular con diferenciación de zona marginal. Superior derecha. Diferenciación de zona marginal. Inferior izquierda. Diferenciación plasmacítica. Inferior derecha. Expresión de IgM.

4. Análisis de supervivencia y mutación MYD88 L265P

4.1. Análisis de supervivencia global de la serie estudiada

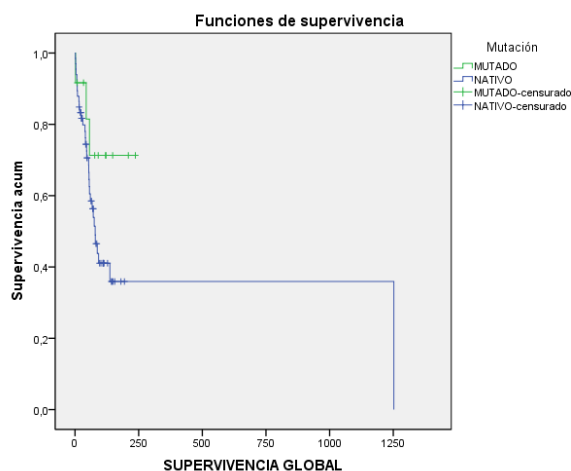
El análisis de supervivencia muestra diferencias estadísticamente significativas ($p=0,041$) entre los grupos mutados y nativos, observándose una mayor supervivencia en el grupo de los mutados (Gráfica 28). El tiempo total de seguimiento fue de 1252,17 meses y el tiempo medio de seguimiento desde el momento del diagnóstico fue de 74,8 meses.



Gráfica 28. Curva de supervivencia de la serie estudiada.

4.2. Análisis de supervivencia global en linfomas de la zona marginal esplénicos

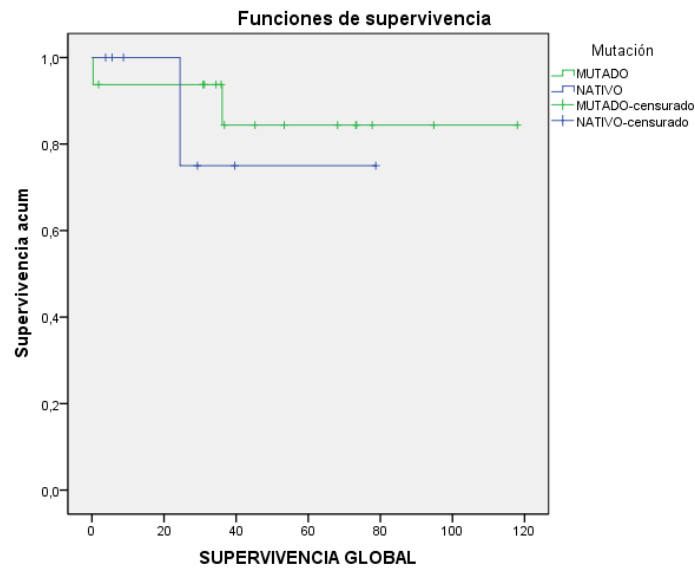
El análisis de supervivencia no mostró diferencias significativas ($p=0,131$) entre el grupo mutado y el grupo nativo (Gráfica 29).



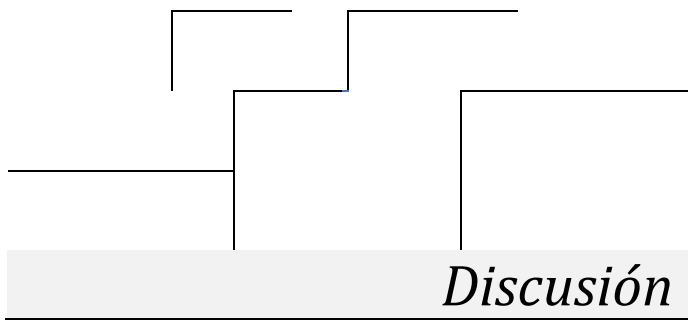
Gráfica 29. Curva de supervivencia en SMZL.

4.3. Análisis de supervivencia global en linfomas linfoplasmacíticos

El análisis de supervivencia no mostró diferencias significativas ($p=0,672$) entre el grupo mutado y el grupo nativo (Gráfica 30).



Gráfica 30. Curva de supervivencia en LPL



1. MYD88 L265P. Identificación de la mutación y su relevancia en neoplasias linfoides

El gen de la diferenciación mielóide *MYD88* desempeña un papel importante en el sistema inmune. En condiciones normales, se encarga de sintetizar una proteína que provoca la activación de una de las vías de señalización del sistema inmune innato, participando así en la respuesta del huésped a la infección. En condiciones anómalas de pérdida de función en dicho gen, la susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas es notable mientras que, si se produce activación excesiva de este, se desarrollan enfermedades autoinmunes y neoplasias linfoides. Por tanto, *MYD88* desempeña un papel muy importante en la génesis de los linfomas(128)(129).

En 2012, mediante secuenciación genética masiva se identificó que la mutación puntual MYD88 L265P, que consiste en un cambio único de nucleótido (T >C) en la posición 38181641 en el cromosoma 3p22.2 que resulta en el cambio de aminoácido leucina por prolina en la posición 265, se hallaba en muestras de médulas óseas de pacientes diagnosticados de LPL/WM(133). Este dato fue verificado por Sanger y se halló en el 91% de los pacientes. MYD88 L265P ha sido encontrada también en aproximadamente el 50% de los pacientes con gammapatía monoclonal IgM de significado incierto(152)(153)(154)(155), lo que sugiere que se trata de un evento oncogénico temprano y demuestra ser un indicador de progresión independiente de la gammapatía monoclonal de significado incierto a macroglobulinemia de Waldenström o hacia otros desórdenes linfoproliferativos(116).

2. Importancia de detección de mutación MYD88 L265P. Implicaciones diagnósticas

2.1. MYD88 L265P en linfomas de la zona marginal

Aunque la mutación es más frecuente en LPL/MW, en menor proporción también ha sido detectada en linfomas de la zona marginal. En los años 2013 y 2014, varios autores (Treon *et al*, Xu *et al*, Poulain *et al*, Gachard *et al*, Jiménez *et al* y Hamadeh *et al*) desarrollaron estudios en los que analizaron la presencia y frecuencia de esta mutación en otros linfomas B que pudieran presentar características similares a los LPL, como los mielomas o los linfomas de la zona

marginal. En todos estos estudios se observó que MYD88 L265P está presente en los linfomas marginales en un porcentaje variable entre el 4-21%.

En la mayor parte de ellos se examinaron las características clínicas y se vio especial asociación entre la mutación y la presencia de paraproteína IgM así como entre esta y la infiltración de médula ósea. Además, algunos de estos estudios revisaron las características histológicas de los casos observándose que eran prácticamente solapables y que la diferenciación plasmacítica era más frecuente en el grupo de los mutados.

2.2. MYD88 L265P en otras neoplasias linfoides

El gen *MYD88* representa uno de los genes más frecuentemente mutados en neoplasias linfoides junto con *NOTCH1*. Su estudio en neoplasias de línea B ha sido muy amplio en los últimos años y se ha encontrado en frecuencias variables que indican que no siempre tiene un papel conductor en la patogénesis del linfoma. No obstante en algunos de ellos la mutación L265P se asocia a determinadas características clínicas o pronósticas que es importante conocer:

- Leucemia Linfocítica Crónica, con una frecuencia en torno al 1.5-4%, se asocia a pronóstico favorable (edad menor de 50 años, asociación a baja expresión de CD38 Y ZAP70 y alta frecuencia de *IGHV* mutado) a pesar de que en el momento del diagnóstico se presente como estadio avanzado (Rai y Binet). No se ha observado incremento de IgM monoclonal en los casos asociados a mutación MYD88 L265P (156)(157)(158).
- Linfoma B Difuso de Célula Grande (NOS), con frecuencia aproximada al 22%, mucho más frecuente en el subtipo ABC (29%) y asociada a pronóstico desfavorable (edad avanzada, IPI elevado, frecuente afectación extraganglionar y estadio avanzado de la enfermedad)(159)(160). Las localizaciones más frecuentes son testículos (71%), tracto genital femenino (50%), próstata(100%), hígado(50%), tiroides(50%), glándula salival(50%), globo ocular y vítreo-retina (80%), ganglios linfáticos (17%) y en menor proporción en tracto gastrointestinal (11%) (161) (162)(163)(164)(165).
- Linfoma B difuso de célula grande primario del SNC (46-76%)(166)(167). La mutación MYD88 L265P se presenta con mayor frecuencia en linfomas de pacientes mayores de 65 años y se asocia de forma significativa estadísticamente a peor supervivencia.
- Linfoma B de célula grande intravascular (40%) (168).

- Linfoma B difuso de célula grande primario cutáneo, tipo pierna (60%)(169). La presencia de MYD88 L265P se encuentra asociada a pacientes de mayor edad y aquellos que muestran mayor afectación en pierna. Igualmente, se observa que los pacientes con linfomas positivos para MYD88 L265P presentan una supervivencia más corta, presentándose esta mutación como factor pronóstico adverso independiente.
- Otros linfomas: en baja proporción se ha hallado en Linfoma de Burkitt (2,38%) (131)(165), Linfoma Folicular (3,53%) (170)(165), desórdenes linfoproliferativos post-trasplante (6,52%) (171)(165), Tricoleucemia (0,92%) (136), Linfoma B de células pequeñas esplénico difuso de la pulpa roja (2,7%) (172)(165).

3. Importancia de detección de MYD88. Implicaciones terapéuticas de la mutación MYD88 L265P

La presencia de mutaciones MYD88 L265P no solo se ha propuesto como un biomarcador diagnóstico útil para diferenciar MW de otros linfoproliferativos B, sino también como biomarcador predictivo ya que los linfomas de los pacientes que portan la mutación responden a Ibrutinib (inhibidores selectivos de la BTK)(173)(174)(175).

Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* confirman la actividad específica de Ibrutinib contra dianas restringidas a BTK. Ibrutinib es un potente inhibidor irreversible de la tirosin kinasa Bruton (BTK), cuya función es bloquear la activación del receptor de células B en sentido descendente(176). Ibrutinib ha demostrado actividad en ensayos clínicos en fase 1 y 2 con remisiones duraderas en gran variedad de neoplasias linfoides B. En los pacientes con diagnóstico de LLC con mutación de *MYD88*, el tratamiento con Ibrutinib induce una respuesta completa con una probabilidad muy alta(177)(178). Por tanto, la presencia de mutación MYD88 L265P permite el uso de inhibidores selectivos de BTK como tratamiento. Dicho fármaco en el momento actual se encuentra aprobado por la FDA para linfomas del manto, leucemia linfocítica crónica, Macroglobulinemia de Waldeström y linfomas de la zona marginal. La Agencia Europea del Medicamento, contempla entre sus indicaciones terapéuticas el linfoma de células del manto, leucemia linfocítica crónica y MW(176).

4. MYD88 L265P en nuestro estudio

En nuestro estudio detectamos la mutación MYD88 L265P en un 14,8 % de linfomas esplénicos de la zona marginal y en un 70,4 % de linfomas linfoplasmacíticos. No es hallada en NMZL ni en linfomas MALT.

Estudiando las características clínicas de los pacientes de nuestra serie encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos mutado y nativo en cuanto a la presencia de paraproteína del tipo IgM, los niveles de leucocitos, el ECOG inicial y el sexo. Se observó que el estado mutado se asocia con más frecuencia al sexo masculino ($p=0,013$), a ECOG más bajo ($p=0,044$), a cifras de leucocitos más elevadas ($p=0,048$) y a niveles de paraproteína más altos ($p=0,018$).

Analizados por diagnóstico, en el grupo de linfomas de la zona marginal esplénicos se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a ECOG, leucocitos, linfocitos y paraproteína IgM. De igual forma, el estado mutado se asoció con ECOG más bajo ($p=0,021$), cifras de leucocitos y de linfocitos más elevadas ($p=0,004$; $p=0,034$) y niveles de paraproteína IgM más elevados ($p=0,033$).

En el grupo de los pacientes con linfoma linfoplasmacítico, se identificaron solo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al ECOG y es más elevado en el grupo de los mutados ($p=0,042$).

Estudiadas las características histológicas de los linfomas con y sin mutación MYD88 L265P, no se apreciaron diferencias.

En cuanto a la supervivencia destacó una mayor supervivencia asociada al estado mutacional ($p=0,041$).

4.1. Técnica de detección de mutación

Para nuestro estudio, empleamos un método de detección fiable como es la PCR en tiempo real con ensayos Taqman de alelo específico, que consiste básicamente en una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro), que se basa en la utilización de moléculas específicas denominadas

quenchers y fluoróforos. Ambos nos permiten monitorizar lo que ocurre en tiempo real en cada muestra y en cada ciclo de amplificación.

La elección del método para realizar la detección de mutación es compleja ya que es un campo en expansión continua en el ámbito experimental, especialmente a partir del desarrollo de técnicas de secuenciación masiva(179). Es preciso tener en cuenta el tipo de muestra con la que vamos a trabajar, ya que la calidad del ADN extraído de la muestra es variable según el procesamiento que haya sufrido. Así, la calidad del ADN obtenido de muestras en fresco o criopreservadas en medio OCT es superior al ADN obtenido de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Por lo tanto, esto obliga a hacer un control de calidad del ADN previo a cualquier determinación molecular, que valore la integridad del mismo (por ejemplo, mediante amplificación de fragmentos de ADN de tamaño conocido). También es esencial tener en cuenta la sensibilidad de detección que tiene el método. Se recomienda un mínimo del 50% de componente invasivo si en la fase analítica se van a utilizar técnicas de baja sensibilidad como en la secuenciación directa o de un 10% si son técnicas de alta sensibilidad, como la PCR en tiempo real(179). En nuestro estudio, la proporción del componente tumoral en las muestras utilizadas era medio-bajo, por lo que resultaba fundamental emplear una técnica de alta sensibilidad, como es la PCR cuantitativa. Otros factores importantes en la elección del método son la disponibilidad y accesibilidad a este y el tiempo de análisis.

Por tanto, la PCR cuantitativa alelo específica Taqman, que demostró ser válida para su uso en muestras fijadas en formol y embebidas en parafina con una sensibilidad del 0,01%, fue la elegida para nuestro estudio.

Para validar los resultados positivos y confirmar aquellos que eran dudosos, el método empleado fue la secuenciación por Sanger. Tras su desarrollo en la década de los 70, el método Sanger de secuenciación de ADN se convirtió en pieza clave para el avance de la biología molecular. No obstante, con el paso del tiempo, este método ha sido progresivamente reemplazado por técnicas de secuenciación masiva, capaces de analizar con un mayor rendimiento y en menor tiempo. Actualmente la técnica de Sanger ha quedado prácticamente limitada a proyectos en los que se necesita obtener la secuencia de fragmentos concretos o como técnica de validación de resultados. En este sentido, la secuenciación Sanger es considerada por los laboratorios de secuenciación clínica como una de las opciones más apropiadas para validar los resultados(180).

4.2. Frecuencia de la mutación MYD88 L265P

La frecuencia de la mutación MYD88 L265P en linfomas marginales es variable según la serie revisada en la literatura, con notables variaciones según el método utilizado y el tipo de muestra empleada.

En 2012, Treon y colaboradores, estudian mediante secuenciación genómica completa las médulas óseas de 30 pacientes con diagnóstico de LPL/MW, de las cuales 10 habían sido analizadas por secuenciación con tejido normal pareado y posterior validación por Sanger(133). La serie fue ampliada, incluyéndose LPL y otros desórdenes linfoproliferativos B de características similares a LPL, entre los que se encontraban linfomas de la zona marginal así como algunos procedentes de donantes sanos. El método de análisis empleado para estos últimos casos fue el de secuenciación por Sanger. En este estudio, todas las muestras provenían de médula ósea y sangre periférica y tanto en una como en otra, la celularidad fue seleccionada, de forma que la pureza de estas células aisladas fuera mayor del 90% y la media de población B monoclonal estimada por análisis de restricción de cadenas ligeras, fuera del 96%. El resultado del estudio fue la presencia de la mutación en 26 de 30 casos estudiados. La secuenciación por Sanger confirmó la mutación en estos 26 casos. De los 46 pacientes con diagnóstico de MZL sólo se identificó la mutación en 3 de ellos (7%): 1 SMZL, 1 NMZL y 1 MALT.

En 2013, Xu y colaboradores, publican un estudio en el que usan por primera vez un método más sensible y eficiente para la detección y cuantificación de la mutación MYD88 L265P, para que pudiera ser fácilmente implementada en la mayoría de los laboratorios clínicos, como es la PCR convencional cuantitativa(137). Analizaron en total 237 casos con diagnóstico de WM y otros desórdenes linfoproliferativos B entre los que incluían 104 pacientes de WM y 20 pacientes con SMZL. Según el diagnóstico, la muestra tumoral se tomó de distinta procedencia, de forma que para MW y MGUS se usó celularidad seleccionada de médula ósea y para SMZL, se tomaron células de sangre periférica o de médula ósea. Los resultados requirieron posterior confirmación por secuenciación Sanger. En consonancia con estudios previos, la frecuencia de la mutación fue más alta en WM, pues se halló en 97 de 104 WM y finalmente en 2 de los 20 SMZL estudiados (10%).

El siguiente estudio, fue llevado a cabo en el mismo año por Poulain y colaboradores en el cual analizan el exón 5 y la mutación MYD88 L265P en los pacientes con diagnóstico de WM, y se encontró que la mutación es adquirida en el

79% de los casos(138). En este estudio, se revisan una serie de 67 pacientes con diagnóstico MW y, junto a estos, otros procesos B linfoproliferativos entre los que se hallaron 16 pacientes con MZL. Se sirvieron de PCR como método para el análisis. Para MW se tomaron muestras de médula ósea de pacientes no tratados y los criterios diagnósticos que se tuvieron en cuenta fueron los siguientes: a) infiltración de médula ósea por LPL b) cualquier nivel de paraproteína IgM c) exclusión de otros linfomas B de bajo grado. Para el resto de los diagnósticos no se comentan criterios ni tipo de muestra usada. La frecuencia de la mutación fue de 53 pacientes (79%) para MW. Igualmente se observó mutación en 1 de 2 casos de IgM MGUS y en un caso de no-IgM LPL. En este estudio se analizaron por PCR 16 muestras de MZL de las cuales sólo una es positiva para la mutación. Sin embargo, no se comenta de donde proceden las muestras o los criterios que se usaron para el diagnóstico de MZL.

Posteriormente Gachard y colaboradores con la idea de estudiar una posible relación entre el origen celular de MZL y MW/LPL mediante análisis de IGHV, examinan la presencia de MYD88 L265P, describiendo igualmente características clínicas e histopatológicas asociadas a esta(139). En un estudio retrospectivo de 118 casos, se halló la mutación en 2/53 (4%) SMZL, 0/11 (0%) NMZL, 2/28 (7%) MALT y 18/27 (67%) MW/LPL. Las muestras usadas fueron bazo, ganglio linfático, tejido linfoide asociado a mucosas y médula ósea y la técnica empleada para informar del estatus de MYD88 L265P fue amplificación del exón 5 del gen MYD88 y la posterior secuenciación directa.

De nuevo en 2013, Jiménez C y colaboradores estudian mediante PCR una serie de desórdenes linfoproliferativos B, incluyendo MW con el fin de analizar la especificidad de la mutación de MYD88 L265P en MW(140). De forma similar a otros estudios, junto a 117 WM estudiaron 273 procesos B linfoproliferativos, entre los que se encontraban 14 SMZL. Las muestras procedían de médula ósea o ganglios linfáticos. Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes: la mutación estuvo presente en 101/ 117 (86%) MW, 27/31 (87%) IgM-MGUS, 3/14 (21%) SMZL y 9/48 (19%) ABC-DLBCL.

Finalmente, Varettoni y colaboradores, publican un artículo cuyo objetivo es estudiar la prevalencia, el significado clínico de la mutación, las características histológicas y el riesgo de progresión asociado a mutación, en WM y en una serie de desórdenes linfoproliferativos B relacionados(141). Se realizó a través de PCR y posterior confirmación a través de secuenciación por Sanger. En total se estudiaron

58 pacientes con MW, 77 con IgM-MGUS, 84 con SMZL y 52 con procesos linfoproliferativos crónicos de célula B. WM y IgM-MGUS fueron diagnosticados sobre las muestras de la médula ósea, mientras que los SMZL fueron diagnosticados en muestras de esplenectomías en 20 pacientes y en aspirados de médula ósea pareados con citometría de flujo en 64 pacientes. 52 pacientes fueron diagnosticados de procesos linfoproliferativos crónicos B en ausencia de alteraciones fenotípicas o genéticas específicas. Los resultados fueron los siguientes: la mutación se detectó en 58/58 (100%) pacientes con MW, 36/77 (47%) pacientes con IgM-MGUS, en 5/84 (6%) pacientes con SMZL y en 3/52 (6%) de procesos linfoproliferativos crónicos B.

En 2014, Hamadeh y colaboradores, publican un estudio en el que analizan la mutación en una amplia serie de casos con el fin de determinar si puede ser de utilidad en el diagnóstico diferencial con otros procesos linfoproliferativos(142). Para ello analizan 87 casos, entre ellos, linfoma linfoplasmacítico extramedular, linfoma esplénico de la zona marginal, linfomas B esplénicos inclasificables, CLL con diferenciación plasmacítica y NMZL con diferenciación plasmacítica. De todos estos, 18 resultaron positivos para MYD88 L265P (21%), incluyendo 9/9 (100%) LPL con características clásicas, 5/12 LPL con características morfológicas atípicas, 3/15(20%) NMZL con diferenciación plasmacítica y 1 de 6 (17%) de linfomas esplénicos inclasificables. El total de las muestras con diagnóstico de SMZL (19 de las cuales presentaban diferenciación plasmacítica) fueron negativos para la mutación.

En conclusión, estos resultados variables que han sido informados en torno a la frecuencia de la mutación MYD88 L265P en neoplasias linfoides pueden estar relacionados con:

- El uso de distintos métodos de detección con diferentes sensibilidades, o bien, el empleo de técnicas adicionales que permitan seleccionar la población celular tumoral a estudio.
- Diferencias en cuanto a porcentaje de células tumorales en las muestras utilizadas. Este es variable según se trate de aspirado de médula ósea, sangre periférica, biopsia de ganglio linfático o pieza de esplenectomía. En las piezas de esplenectomía la celularidad tiende a ser más representativa.
- La ausencia de tejido de confirmación en algunos estudios que incluyen secuenciación.
- Estudios con un tamaño muestral pequeño.

- Los criterios diagnósticos variables usados, sobre todo en linfomas B de bajo grado con diferenciación plasmacítica no-LPL. Así el sobrediagnóstico de LPL, el cual resultaría en una pequeña proporción de casos de linfoma B de célula pequeña mutados y a la inversa.

En nuestro estudio, usando un método de análisis con sensibilidad del 0,1 % y con muestras mayoritariamente procedentes de piezas de esplenectomía, detectamos la mutación MYD88 L265P en un 14,8 % de linfomas esplénicos de la zona marginal y en un 70,4 % de linfomas linfoplasmacíticos.

4.3. Características clínicas

En todas las publicaciones se analizan características clínicas de interés con el fin de investigar una posible relación entre éstas y la presencia de MYD88 L265P.

En el estudio de Treon del 2012, se describe que los casos mutados de linfomas marginales tuvieron extensa infiltración de médula ósea, paraproteinemia monoclonal IgM y mostraban además, características clínicas que se solapaban con WM(133).

Xu y colaboradores, en su estudio de 104 pacientes con diagnóstico de MW y 20 con diagnóstico de linfoma esplénico de la zona marginal, observaron que aquellos pacientes con la mutación MYD88 L265P presentaron una media de afectación de médula ósea superior ($p=0,01$) y unos niveles de IgM séricos mayores ($p=0,05$) que los nativos(137).

Por otra parte, Poulain y colaboradores, en el 2013, en su estudio de 67 pacientes con MW observaron que en los casos nativos para la mutación de MYD88 L265P en MW había una predominancia del sexo femenino ($p=0,004$), esplenomegalia($p=0,015$), ganancia en el cromosoma 3 ($p=0,006$) y expresión de CD27 ($p=0,0001$)(138).

Gachard y colaboradores, en su serie de 123 pacientes con diagnóstico de MW y MZL, concluyeron que todos aquellos que fueron positivos para la mutación presentaron un pico de IgM en sangre y que todos con excepción de un linfoma MALT, mostraron extensa infiltración de médula ósea(139).

Por otra parte, Jiménez y colaboradores, en su estudio de 117 pacientes con MW y 273 con diagnóstico de otros linfomas B, entre los que se incluían 14 linfomas

esplénicos de la zona marginal, concluyen que el fenotipo nativo se asocia a componente M más bajo ($p=0,022$), mayor linfocitosis ($p=0,006$), mayor nivel de LDH($p=0,002$) y fenotipo atípico CD23-, CD27+, FMC7+ ($p=0,08$; $p=0,015$), menor hipermutación somática ($p=0,012$) y menor selección *IGHV3.23* ($p=0,014$)(140).

En el año 2013, Varettoni y colaboradores, en la serie de pacientes estudiados con muestras de sangre periférica y médula ósea, con diagnósticos de MW, MGUS, SMZL y procesos linfoproliferativos B no clasificados, observaron que la mutación en MGUS se asociaba a mayor carga tumoral, a mayor proteinuria de Bences Jones en el momento del diagnóstico ($p=0,002$) y a unos mayores niveles de IgM ($p<0,0001$). En concreto en los SMZL, se vio que la presencia de paraproteína IgM era más frecuente en los pacientes con mutación 4/5 (80%), en comparación con los pacientes nativos, 14/72 (19%). Las otras características clínicas fueron similares en pacientes con o sin mutación(141).

En 2014, Treon y colaboradores, en un estudio realizado a través de secuenciación genética masiva revelaron la presencia de la mutación somática CXCR4 en MW, demostrando que la existencia de mutaciones activadoras de MYD88 así como las de CXCR4 son comunes en MW(181). CXCR4-NS están presentes en casos agresivos, de esta forma se observan niveles más altos de carga tumoral de médula ósea, niveles más altos de IgM sérica y más probabilidad de enfermedad sintomática por lo que requieren terapia (incluidos aquellos que presentaban hiperviscosidad). En dicho estudio, se analizó el estado mutacional de MYD88 L265P y CXCR4 en una serie de 175 pacientes con diagnóstico de MW y sin tratamiento. Se observó que aquellos pacientes con MYD88 nativo presentaron una edad más elevada ($p=0,01$) y tuvieron menos afectación de médula ósea, con independencia del estatus mutacional de CXCR4 ($p=0,03$). Igualmente por análisis multivariante, un alto porcentaje de los pacientes con MYD88 L265P nativo (72%) presentaron unos niveles de beta2-microglobulina mayores de 3.0 mg/L con respecto a los demás ($p=0,003$). Los pacientes con el subtipo nativo también presentaron diferencias en cuanto a linfocitos absolutos y contaje de plaquetas, pero estas diferencias no fueron clínicamente significativas. Además, pacientes con linfomas con mutación de MYD88 L265P y CXCR4 presentaron menor incidencia de adenopatías que aquellos que sólo tuvieron la mutación de MYD88L265P ($p<0,01$).

En el 2015, Hamadeh y colaboradores, concluyeron que la presencia de MYD88 L265P estuvo asociada a paraproteína IgM ($p<0,001$) y a infiltración de médula ósea

($p=0,09$), pero no encontraron asociación con la edad, el género o con la restricción de cadenas ligeras(142).

En el 2017, Varettoni y colaboradores publican un estudio donde analizan la presencia de mutación MYD88 L265P mediante PCR en 130 MW y 130 MGUS y observan que aquellos pacientes con linfomas nativos para la mutación presentaban menor infiltración de médula ósea ($p=0,01$) y mayor frecuencia de afectación extramedular ($p=0,001$) comparados con aquellos pacientes portadores de la mutación(153).

Con respecto a las variables clínicas analizadas en nuestro estudio, encontramos de forma general, diferencias estadísticamente significativas entre los grupos mutado y nativo en cuanto a la presencia de paraproteína del tipo IgM, los niveles de leucocitos, el ECOG inicial y el sexo. De tal forma, se observó que el estado mutado se asocia con más frecuencia al sexo masculino ($p=0,013$), a ECOG más bajo ($p=0,044$), a cifras de leucocitos más elevadas ($p=0,048$) y a niveles de paraproteína IgM más altos ($p=0,018$).

Separados por categorías diagnósticas, en el grupo de linfomas de la zona marginal esplénicos, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a ECOG, leucocitos, linfocitos y paraproteína IgM. De igual forma, el estado mutado se asoció con ECOG más bajo ($p=0,021$), cifras de leucocitos y de linfocitos más elevadas ($p=0,004$; $p=0,034$) y niveles de paraproteína IgM más elevados ($p=0,033$).

En el grupo con diagnóstico de linfoma linfoplasmacítico, se observaron solo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al ECOG, más elevado en el grupo de los mutados ($p=0,042$).

Con respecto a la paraproteína IgM, nuestros hallazgos son coincidentes con la literatura, se encuentra de forma constante una asociación importante entre IgM y mutación MYD88 L265P.

Con respecto al sexo, tan solo el estudio correspondiente a Poulain encontró hallazgos similares a los nuestros, pues detectó que el sexo femenino estuvo ligado a la ausencia de mutación(138).

En relación a los niveles de leucocitosis y linfocitosis, son varios los estudios que afirman que niveles altos se asocian a mutación.

Por último, la variable clínica ECOG inicial, también mostró diferencias significativas. La escala ECOG es una escala cuya función es medir la calidad de vida del paciente oncológico (“performance status”). Los valores se sitúan entre el 0 y el 5: 0 cuando el paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar las actividades y trabajos de su vida diaria y 5 cuando fallece el paciente.

Nuestro estudio encuentra diferencias estadísticamente significativas en el ECOG entre ambos grupos mutados y nativos, dentro de los distintos grupos diagnósticos, asociándose un ECOG más elevado de forma general en los nativos. Esto es así igualmente, cuando se analizan por separado los linfomas de la zona marginal esplénicos, sin embargo, en el grupo de los linfomas linfoplasmacíticos se invierte la relación, siendo la escala ligeramente más elevada en el grupo de los mutados. No hay mucho en la literatura publicado acerca de mutación MYD88 L265P y ECOG. Tan solo el grupo de Jiménez y colaboradores, estudió la escala ECOG entre las variables clínicas, y no encontró diferencias significativas entre mutados y nativos en una serie amplia de MW y MGUS(140).

4.4. Características histológicas

La mayoría de los estudios publicados hasta la fecha, se limitan a analizar las variables clínicas y biológicas más importantes. Tan solo dos estudios comentan algo acerca de las diferencias histológicas entre mutados y nativos. Aun así, en cuanto a linfomas de la zona marginal no hay mucho estudiado. Las características de los MZL portadores de la mutación aún quedan pendientes de describir.

Varettoni y colaboradores describieron en una serie amplia de SMZL las características de éstos cuando mostraban la mutación(141). Estudiaron por morfología e inmunofenotipo las biopsias de médula ósea y las piezas de esplenectomía y encontraron solapamiento de estas tuvieran o no la mutación, incluso a pesar de que la diferenciación plasmacítica fuera observada algo más frecuentemente en el primer grupo. En la médula ósea el patrón de infiltración hallado en SMZL fue nodular e intrasinusoidal mientras que en WM fue intersticial. Concluyeron que los hallazgos en biopsias de médula ósea y bazo eran similares con o sin mutación y que se observaba más grado de diferenciación plasmacítica en los casos mutados. No fue estudiada la restricción de cadenas ligeras.

En el estudio posterior de Hamadeh y colaboradores, analizaron 44 piezas de esplenectomía con diagnóstico de SMZL bien definido pero no encontraron evidencia de mutación MYD88 L265P en ninguno de ellos(142). Concluyeron que

esta mutación era rara incluso en aquellos casos con diferenciación plasmacítica y paraproteinemia IgM.

En nuestro estudio, examinamos de forma específica las características histológicas e inmunofenotípicas de los bazos de pacientes con mutación MYD88 L265P. De acuerdo con el estudio de Varettoni, la morfología del bazo hallada en los casos de nuestro estudio, tanto positivos como negativos para la mutación, fue similar, con la única excepción de que la diferenciación plasmacítica fue algo más frecuente en los casos mutados (69%).

Las características histológicas que mostraron los bazos con mutación de MYD88 L265P y diagnóstico de SMZL fueron las que exponemos a continuación:

El patrón de infiltración neoplásico fue micronodular. Se observó afectación de pulpa blanca (colonización de folículos linfoides). Muchos de los nódulos neoplásicos presentaban reemplazamiento de la zona del manto y diferenciación de la zona marginal. La citología era polimorfa, se encontraban linfocitos de pequeño tamaño, algunos blastos y células con diferenciación plasmocitoide. En algunos casos se encontraron granulomas y/o acúmulos de histiocitos epitelioides, que se localizaban en periferia de los nódulos neoplásicos o en la zona central. Por lo que respecta a pulpa roja, se observó infiltración de esta, frecuentemente con patrón micronodular y focalmente difusa, con sinusoides ensanchados. El estudio IHQ demostró un perfil inmunofenotípico homogéneo: CD20+, CD3-, CD5-, BCL2+, CD10-, CD23-, BCL6-, Ciclina D1-. El índice proliferativo Ki67 demostró patrón en diana de forma más o menos constante en todos los casos.

Nuestro estudio demuestra que casos con histología típica de SMZL pueden ser positivos para la mutación MYD88 L265P. Estas características histológicas incluyen un patrón micronodular bien definido en pulpa blanca y una prominente diferenciación de la zona marginal, lo que apoya aún más el diagnóstico.

Igualmente analizamos las características de los casos diagnosticados de LPL y positivos para la mutación MYD88 L265P.

Las características morfológicas de LPL infiltrando bazo se encuentran pobremente documentadas e ilustradas en la literatura revisada. Sin embargo, en el ganglio linfático se encuentran descritas y las características morfológicas que favorecen el diagnóstico de linfoma linfoplasmacítico sobre linfoma marginal ganglionar son las siguientes: proliferación atípica de células pequeñas con

linfocitos monótonos; regresión de los folículos; depósitos prominentes de hemosiderina; linfáticos y senos dilatados e incremento en el número de mastocitos(5).

En nuestro estudio, se observaron en bazo las siguientes características:

Patrón de crecimiento vagamente nodular o difuso con afectación predominante en pulpa roja. Regresión de folículos con escasa presencia de pulpa blanca. Infiltrado vagamente nodular de predominio en pulpa roja, que se distribuye de forma homogénea por ésta y que frecuentemente presenta localización periarteriolar. Celularidad monótona constituida por linfocitos de pequeño tamaño y numerosas células plasmáticas y células con diferenciación plasmocitoide. Depósitos de hemosiderina. No se identificaron mastocitos.

4.5. Supervivencia y factor de progresión

Son varias las publicaciones que estudian la mutación MYD88 L265P en relación con la supervivencia y con el riesgo de progresión de la enfermedad.

En el 2013, Varettoni y colaboradores subrayan que la mutación MYD88 L265P se encuentra asociada a mayor carga tumoral y a mayor riesgo de progresión de MW a otro proceso linfoproliferativo B (aprox. 1,5% por año), siendo la concentración inicial de IgM monoclonal sérica el principal predictor de progresión(141).

Jiménez y colaboradores, en el 2013, estudian en su cohorte de 117 MW y 273 procesos linfoproliferativos B, la respuesta al tratamiento, la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos mutados y nativos(140).

En el estudio llevado a cabo por Treon en el 2014, en el que identifica la mutación CXCR4 con elevada frecuencia en MW, se muestra que el riesgo de muerte, no estuvo asociado a la presencia de mutación CXCR4, pero sí estuvo condicionado por el estatus de MYD88 L265P nativo ($p=0,0018$)(181). Los pacientes con MYD88 nativo mostraron una mortalidad más alta (38%) frente a los pacientes con mutación de MYD88 L265P (6%) durante el periodo medio de seguimiento de 23,45 meses. Las diferencias en la curva de supervivencia basándose en el estado mutacional de MYD88 y CXCR4 fueron significativas ($p<0,0001$), con la mortalidad

más alta observada en el grupo nativo para MYD88 L265P y CXCR4 (5/15; 30%). Las tasas más bajas de mortalidad fueron observadas en pacientes con mutación de MYD88 L265P.

En octubre de 2017, en un estudio realizado en una larga cohorte de pacientes con WM, el estatus de *MYD88* fue analizado para estudiar específicamente el impacto del estado de MYD88 L265P en el curso clínico de la enfermedad(135). De 557 pacientes estudiados, el estado de *MYD88* se obtuvo en 219 pacientes, y de estos, 174 (79%) fueron positivos para la mutación y 45 (21%) fueron negativos. El tiempo medio de seguimiento fue de 7 años. El tiempo entre el tratamiento inicial y el siguiente régimen fue similar para ambos grupos. En este estudio se observó que la frecuencia de transformación a linfoma de alto grado o al desarrollo de síndrome mielodisplásico relacionado con terapia fue más alto en la cohorte del grupo de los MYD88 nativo (16% versus 4% en el grupo de los mutados, $p=0,009$). Todos los pacientes que tuvieron transformación a linfoma de alto grado o desarrollaron síndrome mielodisplásico posterior a la terapia habían recibido previamente tratamiento con análogos de nucleósidos o agentes alquilantes.

A principios de 2018, otro estudio publicado por Treon, en una serie de 64 casos con diagnóstico de MW y tiempo de seguimiento medio de 74 meses, se observó que la supervivencia estimada en 10 años fue del 73% en los nativos *versus* del 90% para los mutados ($p<0,001$)(182). El análisis multivariante demostró que el estado mutacional *MYD88* fue un determinante significativo para la supervivencia media ($p<0,001$).

El hecho de que el estado nativo se asocie predominantemente a peor pronóstico ha intentado ser explicado en algunos estudios(183). Algunos postulan que se debe a la presencia de otras mutaciones que le confieren mal pronóstico, como es el caso de las mutaciones en *MLL2* en los pacientes nativos para MYD88 L265P(184). Las mutaciones en *MLL2* se han hallado frecuentemente en los linfomas foliculares (89%) y en linfomas no-Hodgkin agresivos, como el linfoma B difuso de célula grande (32%)(133).

Por el contrario, en el año 2017, Varettoni y colaboradores concluyen en su estudio sobre el patrón de mutaciones somáticas en MW mediante secuenciación, que ninguno de los pacientes con MYD88 L265P nativo, tuvieron mutación adicional en otros genes estudiados(153).

De cualquier forma, se subraya la urgencia de entender la patogénesis de los casos con MYD88 L265P nativo así como la necesidad de desarrollar dianas terapéuticas y tratamientos más efectivos para este subgrupo.

En nuestro estudio, de forma concordante con parte de la literatura revisada, el estado nativo se asocia a peor supervivencia.

5. MYD88 L265P en el diagnóstico de linfomas

El fenotipo de las células linfoplasmáticas del LPL/MW sugiere que el clon inicial es una célula B de origen post-centro germinal capaz de diferenciarse espontáneamente hacia célula plasmática in vitro (Figura 16). Algo que es firmemente apoyado por los resultados del análisis de la naturaleza y distribución de las mutaciones somáticas, en las cadenas pesadas y ligeras de las regiones variables, realizadas en pacientes con LPL/MW. Los análisis moleculares de LPL e IgMGUS han demostrado la presencia de hipermutación somática extensa en el gen de la *IgH*. Estos datos indican que la neoplasia se origina de una célula B de memoria IgM+ y /o IgM+IgD+. Normalmente las células B de memoria IgM+ se localizan en médula ósea, donde maduran hacia células secretoras de IgM. Por lo tanto, la neoplasia deriva de una célula B de memoria positiva, cuya contrapartida normal se localiza en médula ósea para madurar hacia célula plasmática secretora de IgM(122)(185).

En todos los artículos publicados, al igual que en nuestro estudio, se demuestra una relación estadísticamente significativa entre la mutación MYD88 L265P y la secreción de paraproteína monoclonal IgM. La paraproteína IgM, se relaciona con linfomas B de bajo grado con extenso componente de células plasmáticas o linfocitos con diferenciación plasmocitoide.

Se define por diferenciación plasmocitoide/plasmática a la presencia de células linfoplasmocitoides o células plasmáticas que expresan el mismo tipo de Ig que los linfocitos tumorales. Las células linfoplasmocitoides se distinguen por no tener prominentes cuerpos de Golgi y su citoplasma es menos basófilo y menos abundante que el de las células plasmáticas(186).

En muchas ocasiones el desarrollo de un linfoma representa un bloqueo completo en la secuencia de maduración normal del linfocito, siendo este bloqueo incompleto en otra proporción variable de linfomas. Así, la diferenciación

plasmacítica es variable según el tipo de linfoma, oscilando entre aquellos en los cuales esta diferenciación es lo esperable y otros en los que es un evento infrecuente, variando desde mínima y solamente reconocible con la ayuda de técnicas inmunohistoquímicas, a muy extensa, casi sin componente linfoide. Pero la diferenciación plasmacítica no define ningún tipo específico de linfoma B. La categorización en un subtipo de linfoma debería estar basada en las células linfoides más específicas que haya presentes, teniendo en cuenta su morfología, fenotipo y características citogenéticas y moleculares así como en los datos clínicos disponibles. Esto queda lejos de la práctica cuando se trata de linfomas linfoplasmacíticos ya que el diagnóstico del LPL/WM, siguiendo la actual clasificación de la WHO, se define como LPL a una neoplasia de linfocitos B pequeños, linfocitos plasmocitoides y células plasmáticas que afectan a la médula y a veces ganglios linfáticos y bazo, que no cumple con todos los criterios para el diagnóstico de otra neoplasia B linfoide de células pequeñas que también pueda tener diferenciación plasmacítica. Por tanto, la organización mundial de la salud recomienda que el diagnóstico de LPL se haga tras la exclusión de otros linfomas B de célula pequeña de bajo grado con diferenciación plasmacítica/plasmocitoide. Esta definición de exclusión y ligada a la diferenciación plasmacítica unido a que la mayoría de los LPL carecen de expresión de un inmunofenotipo específico, como es habitual en el resto de neoplasias linfoides B, hacen que el diagnóstico específico de LPL no sea siempre fácil. Cuando esto no es posible, es necesario recurrir al impreciso término de “Linfoma B de células pequeñas con diferenciación plasmacítica”. En este contexto, parece ser que el uso del análisis de la mutación podría ser de gran ayuda para redefinir los criterios útiles para el reconocimiento de LPL(187).

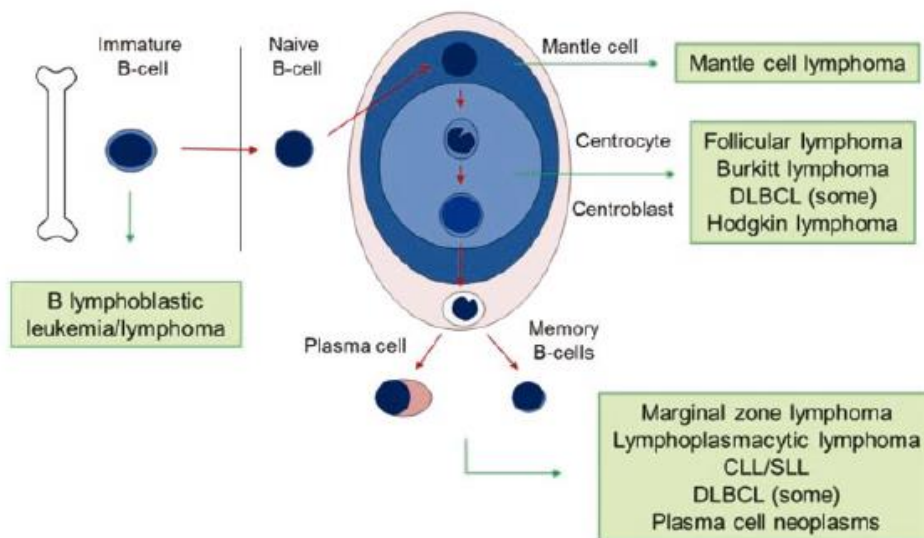


Figura 16. Esquema del origen celular de los linfomas como contrapartida maligna de los estadios específicos de la maduración linfocitaria. Imagen tomada de "Lymphomas essentials for clinicians" ESMO(188).

El origen de la célula de los linfomas marginales es un poco confuso y no se encuentra bien definido. En los linfomas marginales esplénicos se sabe que una gran proporción de las células tumorales son linfocitos pequeños IgD positivos, en los cuales la diferenciación de la zona marginal es producida sólo por el microambiente provisto por la zona marginal esplénica normal(122). De hecho, se encuentra descrita la presencia de un componente de zona marginal en otros subtipos de linfoma B de bajo grado, cuando estos afectan a bazo, lo que apoya la posibilidad de que las células tumorales puedan modular su morfología de acuerdo a las condiciones ambientales locales(189)(190). En este sentido, la presencia de mutaciones somáticas en genes implicados en el desarrollo de la zona marginal normal, como *NOTCH2*, apoya la relación entre células neoplásicas y zona marginal normal. Por otra parte la baja carga de mutaciones de genes *IgVH* en linfomas esplénicos de la zona marginal no ayuda a establecer una relación próxima a las células B de la zona marginal normal, que típicamente, tienen gran cantidad de mutaciones en genes *IgVH* tras haber pasado por el centro germinal. Estos hallazgos sugieren la existencia de una subpoblación de células B pequeñas, localizadas en los folículos linfoides primarios del bazo con potencial capacidad para diferenciación hacia células B de la zona marginal en un adecuado ambiente y para adquirir mutaciones somáticas tras la exposición a antígenos presentes en el centro germinal (Figura 15).

Con respecto a los linfomas de la zona marginal, la problemática en el diagnóstico es menos marcada que en el linfoma linfoplasmacítico, ya que muestran determinadas características morfológicas o clínicas que tomadas en conjunto, pueden ayudar en el diagnóstico. Pero igualmente surgen dificultades, particularmente cuando se presenta con diferenciación plasmacítica o en ausencia de hallazgos moleculares característicos. Por esta razón la búsqueda de nuevos marcadores a través de estudios mutacionales puede ser de gran utilidad, incluso siendo muchas de las mutaciones poco comunes y presentes tan solo en una minoría de los casos(187).

El linfoma de la zona marginal ganglionar muestra dificultades porque su patrón de crecimiento y su apariencia histológica es variable y en ausencia de un fenotipo específico, es a veces usado como cajón de sastre para los linfomas B de bajo grado que de otra forma son inclasificables. A pesar de que la expresión de IRTA1 ha sido descrita para servir de ayuda en identificar los linfomas ganglionares, este anticuerpo no está disponible comercialmente. Solo el anticuerpo MNDA constituye una ayuda potencial en este diagnóstico diferencial. El diagnóstico diferencial para los linfomas marginales ganglionares incluye todos los linfomas de célula pequeña. La distinción entre linfoma de la zona marginal ganglionar con diferenciación plasmacítica e IgM+ del linfoma linfoplasmacítico puede ser particularmente difícil. Por esto, la ausencia de mutación MYD88 L265P en la mayoría de los casos descritos en la literatura y de forma coincidente en nuestro estudio, ayuda a hacer el diagnóstico correcto(187).

El linfoma marginal extraganglionar asociado a mucosas, debido a las diferencias en comportamiento clínico y en el manejo terapéutico, requiere ser distinguido de otros linfomas B de bajo grado que puedan infiltrar tejidos extraganglionares. Igualmente este puede presentarse con diferenciación plasmacítica y el diagnóstico diferencial con linfoma linfoplasmacítico debería ser establecido. A veces, en etapas tempranas, se observa el patrón arquitectural característico de las células neoplásicas infiltrando la zona marginal en torno a los folículos y se aprecia la citología típica de células B de la zona marginal. En caso de que no sea tan evidente el estudio morfológico, puede ser de utilidad apoyarse en el contexto clínico, ya que la presencia de médula ósea con infiltración o de paraproteína en suero va a favor de LPL. En el caso de los linfomas marginales extraganglionares asociados a mucosas, aunque no en nuestro estudio, se ha descrito la presencia de mutación de MYD88 L265P en una pequeña proporción de

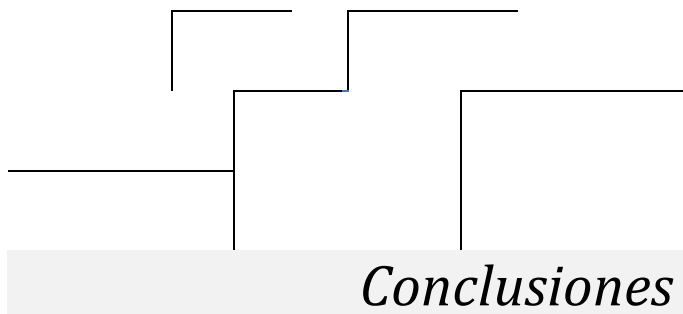
casos, por lo que aunque esta orienta en el diagnóstico de exclusión de MALT, habría que tomar esta información con cautela(187).

El diagnóstico de linfoma esplénico de la zona marginal presenta desafíos, particularmente cuando se hace sin el examen morfológico del bazo, ya que es ahí donde se evidencia el patrón micronodular con reemplazamiento de los folículos de la pulpa blanca esplénica y la presencia de la característica diferenciación de la zona marginal, que es lo que define a los linfomas esplénicos de la zona marginal. En las últimas décadas este hecho empieza a ser más frecuente ya que la esplenectomía no se contempla como primera opción terapéutica. Por tanto, el diagnóstico debe establecerse en la medida de lo posible basándose en el examen morfológico de la sangre periférica y en el aspirado y biopsia de médula ósea(187).

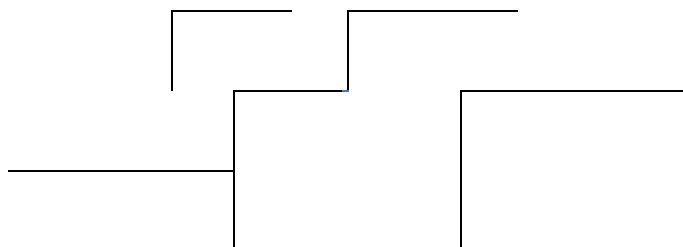
Uno de los mayores problemas que se presenta es el hecho de que algunos linfomas esplénicos marginales tienen diferenciación plasmacítica con paraproteína IgM sugiriendo la posibilidad de linfoma linfoplasmacítico. La presencia de citología típica bifásica y el patrón de infiltración intrasinuoidal en médula ósea pueden ayudar en hacer el diagnóstico correcto. Por otra parte, los pacientes con SMZL aunque muestren secreción de paraproteína monoclonal raramente tienen tan elevados los niveles de IgM en sangre como para provocar síntomas de hiperviscosidad característicos de LPL, como hemos observado en nuestro estudio.

Aun así, en ocasiones, establecer el diagnóstico diferencial entre LPL y MZL no parece tan evidente. En estos casos la ausencia de mutación en *MYD88* puede ser de mucha ayuda, pero como hemos demostrado en nuestro estudio una pequeña proporción de hasta el 14% de los linfomas marginales esplénicos muestran tener la mutación de *MYD88* L265P y además estos, con más tendencia a tener diferenciación plasmacítica y paraproteína IgM. Por tanto, la presencia de mutación en esta situación orientaría hacia LPL, pero debe ser tomada con cautela.

En resumen, la identificación de la mutación *MYD88* L265P es una herramienta útil que puede ser usada de forma rutinaria en el reconocimiento de LPL. No obstante hay que tener en cuenta que algunos casos con mutación en el gen *MYD88* no cumplen criterios diagnósticos para LPL.



- La mutación MYD88 L265P es una herramienta útil en el diagnóstico diferencial de los linfomas B de célula pequeña. Cuando aparece en el contexto de una neoplasia con diferenciación plasmacítica y componente sérico monoclonal, permite reconocer linfomas linfoplasmacíticos.
- La mutación MYD88 L265P se encuentra presente en los linfomas linfoplasmacíticos con una frecuencia muy elevada (>70%). Igualmente, aunque en menor proporción, se encuentra en los linfomas de la zona marginal esplénicos (14%). No se ha hallado la mutación en linfomas de la zona marginal ganglionar ni en linfomas marginales extraganglionares del tejido linfoide asociado a mucosa.
- La mutación MYD88 L265P, de forma general, presenta asociación con sexo masculino así como con niveles elevados de leucocitos y paraproteína IgM en sangre periférica. En linfomas de la zona marginal esplénicos se asocia a niveles más elevados de leucocitos, linfocitos y paraproteína IgM en sangre periférica.
- Las características morfológicas en linfomas esplénicos de la zona marginal con y sin mutación MYD88 L265P son similares.
- Con respecto a la relevancia de la mutación MYD88 L265P, la escala ECOG, que valora la calidad de vida del paciente, muestra valores más elevados (peor calidad) en aquellos pacientes con mutación MYD88 L265P. Por otra parte, el estado mutacional MYD88 L265P confiere una mejor supervivencia con respecto al estado nativo.



Referencias bibliográficas

1. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8):517–34.
2. Intlekofer AM, Younes A. Precision therapy for lymphoma — current state and future directions. *Nat Publ Gr*. 2014;11(10):585–96.
3. Galceran J, Carulla M, Mateos A, Ramón Quirós J, Alemán A, Rojas D, et al. Supervivencia de Cáncer en España. REDECAN. 2000.
4. REDECAN. REDECAN Incidencias 2019. REDECAN. 2019;1–14.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4^o Edición Vol 2. 2017. 10-585 p.
6. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery ASH 50th anniversary review Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2009;112(12):4384–99.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
8. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719–24.
9. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101–5.
10. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Müller-Hermelink HK. World Health Organization Classification of lymphomas: a work in progress. *Ann Oncol*. 1998;9 Suppl 5:S25–30.
11. Harris NL. New Approaches to Lymphoma Diagnosis. *Hematology*. 2001;2001(1):194–220.
12. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375–91.
13. Soldini D, Campo E. New insights into the diagnosis of lymphomas. *Ann Oncol*. 2012;23(SUPPL. 10):x83–8.
14. Sun R, Medeiros LJ, Young KH. Diagnostic and predictive biomarkers for lymphoma diagnosis and treatment in the era of precision medicine. *Mod Pathol*. 2016;29(10):1118–42.
15. Simon R, Roychowdhury S. Implementing personalized cancer genomics in clinical trials. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):358–69.

16. Biankin A V., Piantadosi S, Hollingsworth SJ. Patient-centric trials for therapeutic development in precision oncology. *Nature*. 2015;526(7573):361–70.
17. He S, Roberts A. Targeted therapies in haematological malignancies. In: *Cancer Forum*. 2008. p. 163.
18. Hamilton A, Gallipoli P, Nicholson E, Holyoake T. Targeted therapy in haematological malignancies. *J Pathol*. 2010;220(4):404–18.
19. Tsimberidou A-M. Targeted therapy in Cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;76(6):1113–32.
20. van den Brand M, Scheijen B, Hess CJ, van Krieken JHJ, Groenen PJTA. Pathways towards indolent B-cell lymphoma — Etiology and therapeutic strategies. *Blood Rev*. 2017;31(6):426–35.
21. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet*. 2013;14(10):703–18.
22. Sorigue M, Sancho J. La revisión de 2016 de la clasificación de la OMS de las neoplasias linfoides: la visión del clínico. *Med Clin (Barc)*. 2017;(xx):2016–8.
23. Pileri SA, Agostinelli C, Sabattini E, Bacci F, Sagrarnoso C, Pileri A, et al. Lymphoma classification: The quiet after the storm. *Semin Diagn Pathol*. 2011;28(2):113–23.
24. Rizzo K, Nassiri M. Diagnostic Workup of Small B Cell Lymphomas: A Laboratory Perspective. *Lymphoma*. 2012;2012:1–15.
25. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond : evolving concepts and practical applications The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond : evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2014;117(19):5019–33.
26. Dierlamm J, Pittaluga S, Wlodarska I, Stul M, Thomas J, Boogaerts M, et al. Marginal zone B-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood*. 1996;87(1):299–307.
27. PIRIS MA, RIVAS C, MORENTE M, CRUZ MA, RUBIO C, OLIVA H. Monocytoid B-cell lymphoma, a tumour related to the marginal zone. *Histopathology*. 1988;12(4):383–92.
28. Ferreri AJM, Zucca E. Marginal-zone lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;63(3):245–56.
29. Piri MA, Arribas A, Mollejo M. Marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 2011;28(2):135–45.
30. Zucca E, Bertoni F, Stathis A, Cavalli F. Marginal Zone Lymphomas. *Hematol*

- Oncol Clin North Am. 2008;22(5):883–901.
31. Morse HC, Kearney JF, Isaacson PG, Carroll M, Fredrickson TN, Jaffe ES. Cells of the marginal zone - Origins, function and neoplasia. *Leuk Res.* 2001;25(2):169–78.
 32. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):118–32.
 33. Morente M, Piris M, Orradre L, Rivas C, Villuendas R. Human tonsil intraepithelial B cells: a marginal zone-related subpopulation. *J Clin Pathol.* 1992;45:668–72.
 34. Martin F, Kearney JF. Marginal-Zone B Cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):323–35.
 35. Arnon TI, Horton RM, Grigorova IL, Cyster JG. Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature.* 2012;493(7434):684–8.
 36. Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(6):410–21.
 37. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, et al. Human blood IgM memory B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood.* 2004;104(12):3647–54.
 38. Victora GD. ILCs in the zone. *Nat Immunol.* 2014;15(4):313–4.
 39. Thieblemont C, Felman P, Callet-Bauchu E, Traverse-Glehen A, Salles G, Berger F, et al. Splenic marginal-zone lymphoma: A distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol.* 2003;4(2):95–103.
 40. Thieblemont C, Davi F, Noguera ME, Briere J, Bertoni F, Zucca E, et al. Splenic Marginal Zone Lymphoma: Current Knowledge and Future Directions. *Oncology.* 2012;26(2):194–202.
 41. Hermine O, Lefrère F, Bronowicki J-P, Mariette X, Jondeau K, Eclache-Saudreau V, et al. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002;347(2):89–94.
 42. Kalpadakis C, Pangalis GA, Angelopoulou MK, Sachanas S, Kontopidou F, Moschogiannis M, et al. Validation of the simplified prognostic score for splenic marginal zone lymphoma of the Splenic Marginal Zone Lymphoma Working Group. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(11):2640–2.
 43. Joshi M, Sheikh H, Abbi K, Long S, Sharma K, Tulchinsky M, et al. Marginal zone lymphoma: old, new, targeted, and epigenetic therapies. *Ther Adv Hematol.* 2012;3(5):275–90.

44. Dreyling M, Thieblemont C, Gallamini A, Arcaini L, Campo E, Hermine O, et al. ESMO Consensus conferences: guidelines on malignant lymphoma. part 2: marginal zone lymphoma, mantle cell lymphoma, peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2013;24(4):857-77.
45. Ladetto M, Buske C, Hutchings M, Dreyling M, Gaidano G, Le Gouill S, et al. ESMO consensus conference on malignant lymphoma: general perspectives and recommendations for prognostic tools in mature B-cell lymphomas and chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(12):2149-60.
46. Zucca E, Copie-Bergman C, Ricardi U, Thieblemont C, Raderer M, Ladetto M. Gastric marginal zone lymphoma of MALT type: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(suppl 6):vi144-vi148.
47. Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*. 2008;22(3):487-95.
48. Matutes E. Splenic marginal zone lymphoma: disease features and management. *Expert Rev Hematol*. 2013;6(6):735-45.
49. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Salles G, Felman P, Berger F. Splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2011;23(5):441-8.
50. Chacón JI, Mollejo M, Muñoz E, Algara P, Mateo M, Lopez L, et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood*. 2002;100(5):1648-54.
51. Oscier D, Owen R, Johnson S. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood Rev*. 2005;19(1):39-51.
52. Isaacson PG, Matutes E, Burke M, Catovsky D. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood*. 1994;84:3828-34.
53. Mollejo M, Menárguez J, Lloret E, Sanchez A, Campo E, Algara P, et al. Splenic Marginal Zone Lymphoma: A Distinctive Type of Low Grade B-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 1995;19(3):1146-57.
54. Isaacson PG, Piris M. Splenic Marginal Zone Lymphoma. *Adv Anat Pathol*. 1997;4(3):191-201.
55. Dogan A, Isaacson PG. Splenic marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 2003;20(2):121-7.
56. Schmid C, Kirkham N, Diss T, Isaacson P. Splenic marginal Zone Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 1992;16(5):455-66.
57. Molina TJ, Lin P, Swerdlow SH, Cook JR. Marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation and related disorders. *Am J Clin Pathol*.

- 2011;136(2):211–25.
58. Duong Van Huyen JP, Molina T, Delmer A, Audouin J, Le Tourneau A, Zittoun R, et al. Splenic marginal zone lymphoma with or without plasmacytic differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(12):1581–92.
 59. Mollejo M, Lloret E, Menárguez J. Lymph node involvement by splenic marginal zone lymphoma: morphological and immunohistochemical features. *Am J Surg Pathol*. 1997;21(7):772–80.
 60. Arcaini L, Varettoni M, Boveri E, Orlandi E, Rattotti S, Zibellini S, et al. Distinctive clinical and histological features of Waldenström's macroglobulinemia and splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2011;11(1):103–5.
 61. Robledo C, García JL, Benito R, Flores T, Mollejo M, Martínez-Climent JA, et al. Molecular characterization of the region 7q22.1 in splenic marginal zone lymphomas. *PLoS One*. 2011;6(9).
 62. Sole F, Woessner S, Florensa L, Espinet B, Mollejo M, Martin P, et al. Frequent involvement of chromosomes 1, 3, 7 and 8 in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 1997;98(2):446–9.
 63. Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Sanchez-Beato M, Martínez P, et al. 7Q31-32 Allelic Loss Is a Frequent Finding in Splenic Marginal Zone Lymphoma. *Am J Pathol*. 1999;154(5):1583–9.
 64. Sole F, Salido M, Espinet B. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7 q. *Haematologica*. 2001;86:71–7.
 65. Hernández JM, García JL, Gutiérrez NC, Mollejo M, Martínez-Climent JA, Flores T, et al. Novel genomic imbalances in b-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol*. 2001;158(5):1843–50.
 66. Rinaldi A, Mian M, Chigrinova E, Arcaini L, Bhagat G, Novak U, et al. Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood*. 2011;117(5):1595–604.
 67. Algara P, Mateo MS, Sanchez-Beato M, Mollejo M, Navas IC, Romero L, et al. Analysis of the IgVH somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood*. 2002;99(4):1299–304.
 68. Mateo MS, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Martínez P, Piris MA. Analysis of the frequency of microsatellite instability and p53 gene mutation in splenic marginal zone and MALT lymphomas. *J Clin Pathol Mol Pathol*. 1998;51:262–7.

69. Salido M, Baró C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood*. 2010;116(9):1479–88.
70. Onaindia A, Medeiros LJ, Patel KP. Clinical utility of recently identified diagnostic, prognostic, and predictive molecular biomarkers in mature B-cell neoplasms. *Mod Pathol*. 2017;1–29.
71. Martínez N, Almaraz C, Vaqué JP, Varela I, Derdak S, Beltran S, et al. Whole-exome sequencing in splenic marginal zone lymphoma reveals mutations in genes involved in marginal zone differentiation. *Leukemia*. 2014;28(6):1334–40.
72. Yan Q, Huang Y, James Watkins A, Kocialkowski S, Zeng N, Hamoudi RA, et al. BCR and TLR signaling pathways are recurrently targeted by genetic changes in splenic marginal zone lymphomas. *Haematologica*. 2012;97(4):595–8.
73. Ruiz-ballesteros E, Mollejo M, Rodriguez A, Camacho FI, Algara P, Martinez N, et al. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood*. 2005;106(5):1831–8.
74. Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, Zhao L, Weigelin HG, Chiang MY, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med*. 2012;209(9):1553–65.
75. Clipson A, Wang M, de Leval L, Ashton-Key M, Wotherspoon A, Vassiliou G, et al. KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia*. 2015;29(5):1177–85.
76. Piva R, Deaglio S, Famà R, Buonincontri R, Scarfò I, Brusca A, et al. The Krüppel-like factor 2 transcription factor gene is recurrently mutated in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia*. 2015;29(2):503–7.
77. Campos Y, Martínez N, Martínez-López A. Clinical and diagnostic relevance of NOTCH2 and KLF2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica*. 2017;102(8):310–2.
78. Parry M, Rose-Zerilli MJJ, Ljungström V, Gibson J, Wang J, Kalpadakis C, et al. Europe PMC Funders Group Genetics and Prognostication in Splenic Marginal Zone Lymphoma: Revelations from Deep Sequencing. *Clin Cancer Res*. 2016;21(18):4174–83.
79. Parry M, Rose-Zerilli MJJ, Ljungström V, Gibson J, Wang J, Walewska R, et al. Genetics and prognostication in splenic marginal zone lymphoma: Revelations from deep sequencing. *Clin Cancer Res*. 2015;21(18):4174–83.
80. Arribas AJ, Rinaldi A, Mensah AA, Kwee I, Cascione L, Robles EF, et al. DNA methylation profiling identifies two splenic marginal zone lymphoma

- subgroups with different clinical and genetic features. *Blood*. 2015;125(12):1922–32.
81. Traverse-Glehen A, Bachy E, Baseggio L, Callet-Bauchu E, Gazzo S, Verney A, et al. Immunoarchitectural patterns in splenic marginal zone lymphoma: Correlations with chromosomal aberrations, IGHV mutations, and survival. A study of 76 cases. *Histopathology*. 2013;62(6):876–93.
 82. van den Brand M, Han J, van Krieken JM. Recognizing nodal marginal zone lymphoma: Recent advances and pitfalls. A systematic review. *Haematologica*. 2013;98(7):1003–13.
 83. Campo E, Miquel R, Krenacs L, Sorbara L, Raffeld M, Jaffe E. Primary nodal marginal zone lymphomas of splenic and MALT type. *Am J Surg Pathol*. 1999;23(1):59–68.
 84. Camacho FI, Algara P, Mollejo M, García JF, Montalbán C, Martínez N, et al. Nodal marginal zone lymphoma: A heterogeneous tumor: A comprehensive analysis of a series of 27 cases. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(6):762–71.
 85. Kanellis G, Roncador G, Arribas A, Mollejo M, Montes-Moreno S, Maestre L, et al. Identification of MNDA as a new marker for nodal marginal zone lymphoma. *Leukemia*. 2009;23(10):1847–57.
 86. Falini B, Agostinelli C, Bigerna B, Pucciarini A, Pacini R, Tabarrini A, et al. IRTA1 is selectively expressed in nodal and extranodal marginal zone lymphomas. *Histopathology*. 2012;61(5):930–41.
 87. Falini B, Tiacchi E, Pucciarini A, Bigerna B, Kurth J, Hatzivassiliou G, et al. Expression of the IRTA1 receptor identifies intraepithelial and subepithelial marginal zone B cells of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *Blood*. 2003;102(10):3684–92.
 88. Bob R, Falini B, Marafioti T, Paterson JC, Pileri S, Stein H. Nodal reactive and neoplastic proliferation of monocytoid and marginal zone B cells: An immunoarchitectural and molecular study highlighting the relevance of IRTA1 and T-bet as positive markers. *Histopathology*. 2013;63(4):482–98.
 89. Arribas AJ, Campos-martín Y, Gómez-Abad C, Algara P, Rodríguez-pinilla MS, Montes-moreno S, et al. Nodal marginal zone lymphoma : gene expression and miRNA profiling identify diagnostic markers and potential therapeutic targets. *Blood*. 2012;119(3):9–22.
 90. Piris MA. Nodal marginal zone mutational signature. *Blood*. 2016;128(10):1315–6.
 91. Spina V, Khiabani H, Messina M, Monti S, Cascione L, Brusca A, et al. The genetics of nodal marginal zone lymphoma. *Blood*. 2016;128(10):1362–74.
 92. Piris M, Rivas C, Morente M, Orradre J, Rodríguez R, Cruz M, et al. Linfoma B gástrico de bajo grado originado en tejido linfoide asociado a mucosas.

- Relación de las células tumorales con la zona marginal y los linfocitos B monocitoides. Estudio inmunohistoquímico y ultraestructural. *Med Clin (Barc)*. 1990;94(16):601–6.
93. Montalbán C, Castrillo J, Abaira V, Serrano M, Bellas C, Piris M, et al. Gastric B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Clinicopathological study and evaluation of the prognostic factors in 143 patients. *Ann Oncol*. 1995;6(4):355–62.
 94. Zinzani PL. The many faces of marginal zone lymphoma. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2012;2012:426–32.
 95. Wöhrer S, Streubel B, Bartsch R, Wo S, Chott A, Raderer M. Monoclonal Immunoglobulin Production Is a Frequent Event in Patients with Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Monoclonal Immunoglobulin Production Is a Frequent Event in Patients with Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7179–81.
 96. Arcaini L, Rossi D, Paulli M. Splenic marginal zone lymphoma: from genetics to management. *Blood Rev*. 2016;127(17):2072–81.
 97. Curiel-Olmo S, Mondejar R, Almaraz C, Mollejo M, Cereceda L, Mares R, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma displays increased expression of cyclin D3 and recurrent CCND3 mutations. 2018;129(8):1042–6.
 98. Savilo E, Campo E, Mollejo M, Pinyol M, Piris M. Absence of Cyclin D1 protein expression in splenic marginal zone lymphoma. *Mod Pathol*. 1998;11(7):601–6.
 99. Berger F, Traverse-Glehen A, Felman P, Callet-Bauchu E, Baseggio L, Gazzo S, et al. Clinicopathologic features of Waldenström's macroglobulinemia and marginal zone lymphoma: Are they distinct or the same entity? *Clin Lymphoma*. 2005;5(4):220–4.
 100. Owen R, Treon S, Al-Katib A. Clinicopathological Definition of Waldenstrom's Macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations From the Second International Workshop on Waldestrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003;30(2):110–5.
 101. Owen RG, Parapia LA, Higginson J, Misbah SA, Child JA, Morgan GJ, et al. Clinicopathological correlates of IgM paraproteinemias. *Clin Lymphoma*. 2000;1(1):35–9.
 102. Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2017;92(2):209–17.
 103. Ghobrial IM. Are you sure this is Waldenstrom macroglobulinemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:586–94.
 104. Benevolo G, Nicolosi M, Santambrogio E, Vitolo U. Current options to manage Waldenström's macroglobulinemia. *Expert Rev Hematol*. 2017;10(7):637–47.

105. Gustine JN, Meid K, Dubeau T, Hunter ZR, Xu L, Yang G, et al. Serum IgM level as predictor of symptomatic hyperviscosity in patients with Waldenström macroglobulinemia. *Br J Haematol*. 2017;177:717–25.
106. Vitolo U, Ferreri AJM, Montoto S. Lymphoplasmacytic lymphoma-Waldenström's macroglobulinemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(2):172–85.
107. Bartl R, Frisch B, Mahl G. Bone Marrow Histology in Waldenström's Macroglobulinaemia. *Scand J Haematol*. 1983;31:359–75.
108. Lin P, Medeiros LJ. Lymphoplasmacytic Lymphoma - Waldenström Macroglobulinemia - An Evolving Concept. *Adv Anat Pathol*. 2005;12(5):246–55.
109. Lin P, Molina TJ, Cook JR, Swerdlow SH. Lymphoplasmacytic lymphoma and other non-marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation. *Am J Clin Pathol*. 2011;136(2):195–210.
110. Konoplev S, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE, Jorgensen JL, Lin P. Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(3):414–20.
111. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, Mateo G, Sánchez-Guijo F, Sánchez ML, et al. Immunophenotypic analysis of Waldenström's macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003;30(2):187–95.
112. Ocio EM, Hernandez JM, Mateo G, Sanchez ML, Gonzalez B, Vidriales BB, et al. Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenström's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2005;5(4):241–5.
113. Lin K-I, Tunyaplin C, Calame K. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. *Immunol Rev*. 2003;194:19–28.
114. Lin P, Hao S, Handy BC, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ. Lymphoid Neoplasms Associated With IgM Paraprotein. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(2):200–5.
115. Kyle R, Garton J. The Spectrum of IgM Monoclonal Gammopathy in 430 Cases. *Mayo Clin Proc*. 1987;62:719–31.
116. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Remstein ED, Offord JR, Larson DR, et al. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2003;102(10):3759–64.
117. Gordon DS, Jones B, Browning SW, Spira TJ. Persistent Polyclonal Lymphocytosis of B Lymphocytes. *N Engl J Med*. 1982;307(4):232–6.
118. Florensa L, Navarro JT, Pérez Vila ME, Domingo A, De La Banda E, Rozman M, et al. Linfocitosis B policlonal persistente: estudio de 35 casos. *Med Clin (Barc)*. 2011;136(13):565–73.

119. Troussard X, Cornet E, Lesesve J-F, Kourel C, Mossafa H. Polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes (PPBL). *Onco Targets Ther.* 2008;1:59–66.
120. Del Giudice I, Pileri SA, Rossi M, Sabattini E, Campidelli C, Starza I Della, et al. Histopathological and molecular features of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL) with progressive splenomegaly. *Br J Haematol.* 2009;144(5):726–31.
121. Martinez-Lopez A, Montes-Moreno S, Mazorra F, Miranda-Vallina C, Ulibarrena C, Martin JLA, et al. Persistent polyclonal b-cell lymphocytosis with splenomegaly: Histologic description of 2 cases. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(7):1085–90.
122. Jaffe ES, Arbor DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martínez L. *Hematopathology.* 2017. 1-1199 p.
123. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation. *Front Immunol.* 2014;5(JUL):1–10.
124. Botos I, Segal DM, Davies DR. Structural biology of TLRs. *Structure.* 2011;19(4):447–59.
125. Fonte E, Agathangelidis A, Reverberi D, Ntoufa S, Scarfò L, Raghetti P, et al. Toll-like receptor stimulation in splenic marginal zone lymphoma can modulate cell signaling, activation and proliferation. *Haematologica.* 2015;100(11):1460–8.
126. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1–14.
127. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16(1):3–9.
128. Bernuth H Von, Picard C, Jin Z, Pankla R, Ku C, Chrabieh M, et al. Pyogenic Bacterial Infections in Humans with MYD88 Deficiency. *Science (80-).* 2008;321(5889):691–6.
129. Jeelall YS, Horikawa K. Oncogenic MYD88 mutation drives Toll pathway to lymphoma. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(6):659–60.
130. Avbelj M, Wolz OO, Fekonja O, Benčina M, Repič M, Mavri J, et al. Activation of lymphoma-associated myd88 mutations via allosterically-induced tir-domain oligomerization. *Blood.* 2014;124(26):3896–904.
131. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 2011;470(7332):115–9.
132. Xu L, Sohani A, Arcaini L. A Somatic Variant in MYD88 (L265P) Revealed by Whole Genome Sequencing Differentiates Lymphoplasmacytic Lymphoma From Marginal Zone Lymphomas. *ASH Annu Meet Abstr.* 2011;88:261.

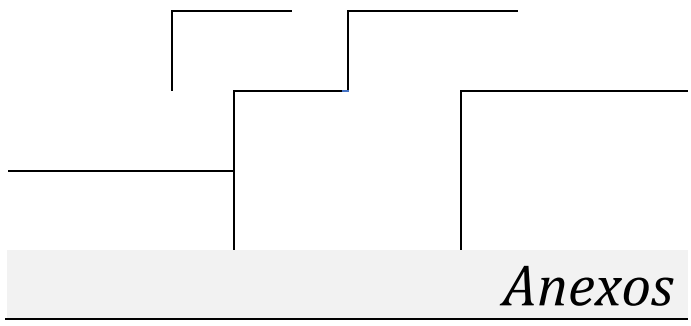
133. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826–33.
134. Treon SP, Hunter ZR. A new era for Waldenstrom macroglobulinemia: MYD88 L265P. *Blood*. 2013;121(22):4434–6.
135. Abeykoon JP, Paludo J, King RL, Ansell SM, Dingli D, Ph D, et al. Impact of MYD88 Mutation Status in Waldenström Macroglobulinemia. *Am J Hematol*. 2017;93(2):187–94.
136. Ondrejka SL, Lin JJ, Warden DW, Durkin L, Cook JR, Hsi ED. MYD88 L265P somatic mutation: Its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(3):387–94.
137. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Zhou Y, Cao Y, Liu X, et al. MYD88 L265P in Waldeström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 2013;121(11):2051–8.
138. Poulain S, Roumier C, Decambon A, Renneville A, Herbaux C, Bertrand E, et al. MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2013;121(22):4504–11.
139. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia*. 2013;27(1):183–9.
140. Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*. 2013;27(8):1722–8.
141. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, Rattotti S, Riboni R, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013;121(13):2522–8.
142. Hamadeh F, MacNamara SP, Aguilera NS, Swerdlow SH, Cook JR. MYD88 L265P mutation analysis helps define nodal lymphoplasmacytic lymphoma. *Mod Pathol*. 2015;28(4):564–74.
143. Caner V, Sen Turk N, Baris IC, Cetin GO, Tepeli E, Hacıoglu S, et al. MYD88 expression and L265P mutation in mature B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2015;19(7):372–8.
144. Zhang X, Aguilera N. New immunohistochemistry for B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(12):1666–72.

145. Choi JW, Kim Y, Lee JH, Kim YS. MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol.* 2013;44(7):1375–81.
146. Landgren O, Tajeja N. MYD88 and beyond: novel opportunities for diagnosis, prognosis and treatment in Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia.* 2014;28(9):1799–803.
147. Yang G, Zhou Y, Liu X, Xu L, Cao Y, Manning RJ, et al. A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2013;122(7):1222–32.
148. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood.* 2014;123(11):1637–46.
149. Castillo JJ, Hunter ZR, Yang G, Treon SP. Novel approaches to targeting MYD88 in Waldenström macroglobulinemia. *Expert Rev Hematol.* 2017;10(8):739–44.
150. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, et al. Ibrutinib in Previously Treated Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2015;372(15):1430–40.
151. Seiler T, Dreyling M. Bruton's tyrosine kinase inhibitors in B-cell lymphoma: current experience and future perspectives. *Expert Opin Investig Drugs.* 2017;26(8):909–15.
152. Wells JM. MYD88 L265P Somatic Mutation in IgM MGUS. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2255–7.
153. Varettoni M, Zibellini S, Defrancesco I, Ferretti VV, Rizzo E, Malcovati L, et al. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenström macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica.* 2017;102(12):2077–85.
154. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Cao Y, Liu X, Manning R, et al. Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenström's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia.* 2014;28(8):1698–704.
155. Varettoni M, Zibellini S, Arcaini L. To the editor : MYD88 (L265P) mutation is an independent risk factor for progression in patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood.* 2013;122(13):2284–5.
156. Martínez-Trillos A, Navarro A, Aymerich M, Delgado J, López-Guillermo A, Campo E, et al. Clinical impact of MYD88 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016;127(12):1611–3.
157. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Rossi D, Sutton LA, Kminkova

- J, et al. Prognostic relevance of MYD88 mutations in CLL: The jury is still out. *Blood*. 2015;126(8):1043–4.
158. Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, Aymerich M, Jares P, Juan M, et al. Mutations in TLR / MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood*. 2014;123(24):3790–6.
159. Fernández-Rodríguez C, Bellosillo B, García-García M, Sánchez-González B, Gimeno E, Vela MC, et al. MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2014;88(June):2104–6.
160. Rovira J, Karube K, Valera A, Colomer D, Enjuanes A, Colomo L, et al. MYD88 L265P mutations, but no other variants, identify a subpopulation of DLBCL patients of activated B-cell origin, extranodal involvement, and poor outcome. *Clin Cancer Res*. 2016;22(11):2755–64.
161. Kraan W, Horlings HM, Van Keimpema M, Schilder-Tol EJM, Oud MECM, Scheepstra C, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J*. 2013;3(9):e136-4.
162. Pulido JS, Johnston PB, Nowakowski GS, Castellino A, Raja H. The diagnosis and treatment of primary vitreoretinal lymphoma: A review. *Int J Retin Vitre*. 2018;4(18):1–11.
163. Cani AK, Soliman M, Hovelson DH, Liu C-J, McDaniel AS. Comprehensive Genomic Profiling of orbital and ocular adnexal lymphomas identifies frequent alterations in MYD88 and chromatin modifiers: New routes to targeted therapies. *Mod Pathol*. 2016;29(7):685–97.
164. Touitou V, Costopoulos M, Maloum K. Detection of MYD88 mutations in vitreoretinal lymphoma and its implications. *JAMA Ophthalmol*. 2018;136(10):1104–5.
165. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution [Internet]. Vol. 45, *Nucleic Acids Research*. 2017 [cited 2019 May 26]. p. D777–83. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw1121>
166. Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A, Wiestler OD, Siebert R, Deckert M. Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol*. 2011;122(6):791–2.
167. Takano S, Hattori K, Ishikawa E, Narita Y, Iwadate Y, Yamaguchi F, et al. MyD88 Mutation in Elderly Predicts Poor Prognosis in Primary Central Nervous System Lymphoma: Multi-Institutional Analysis. *World Neurosurg*. 2018;112:e69–73.
168. Schrader AMR, Jansen PM, Willemze R, Vermeer MH, Cleton-Jansen AM,

- Somers SF, et al. High prevalence of MYD88 and CD79B mutations in intravascular large B-cell lymphoma. *Blood*. 2018;131(18):2086–9.
169. Pham-Ledard A, Beylot-Barry M, Barbe C, Leduc M. High Frequency and Clinical Prognostic Value of MYD88 L265P Mutation in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma , Leg-Type. *JAMA Dermatology*. 2014;150(11):1173–9.
170. Shin S-Y, Lee S-T, Kim H-Y, Park C, Kim H, Kim J, et al. Detection of MYD88 L265P in patients with lymphoplasmacytic lymphoma / Waldenstrom macroglobulinemia and other B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood Res*. 2016;51(3):181–6.
171. Menter T, Juskevicius D, Alikian M, Steiger J. Mutational landscape of B-cell post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2017;178(2016):48–56.
172. Traverse-Glehen A, Verney A, Gazzo S, Jallades L, Chabane K. Splenic diffuse red pulp lymphoma has a distinct pattern of somatic mutations amongst B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(3):666–75.
173. Rosenquist R, Rosenwald A, Du MQ, Gaidano G, Groenen P, Wotherspoon A, et al. Clinical impact of recurrently mutated genes on lymphoma diagnostics: State-of-the-art and beyond. *Haematologica*. 2016;101(9):1002–9.
174. Wang YL. MYD88 Mutations and Sensitivity to Ibrutinib Therapy. *J Mol Diagnostics*. 2018;20(2):264–6.
175. Castillo JJ, Treon SP. Toward personalized treatment in Waldenström Macroglobulinemia. 2017;365–70.
176. Berglöf A, Hamasy A, Meinke S, Palma M, Krstic A, Månsson R, et al. Targets for Ibrutinib Beyond B Cell Malignancies. *Scand J Immunol*. 2015;82(3):208–17.
177. O'Brien SM, Jaglowski S, Byrd JC, Bannerji R, Blum KA, Fox CP, et al. Prognostic Factors for Complete Response to Ibrutinib in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncol*. 2018;4(5):712–6.
178. Brown JR. How I treat CLL patients with ibrutinib. *Blood*. 2018;131(4):379–86.
179. Montes-Moreno, S, Mollejo M, Fraga M, Garcia JF, Villar JL, Martinez A, Rociquez SR, Batlle A, Provencio M, Rozman M G-SR. Recomendaciones Para El Estudio Histopatológico , Inmunohistoquímico, Citogenético y Molecular e Informe Diagnóstico De Los Procesos Neoplásicos Linfoides. 1ª Edición SEAP, SEHH, GOTEL. 2015;
180. Beck TF, Mullikin JC, Biesecker LG. Systematic evaluation of Sanger validation of next-generation sequencing variants. *Clin Chem*. 2016;62(4):647–54.

181. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2014;123(18):2791–7.
182. Treon SP, Gustine J, Xu L, Manning RJ, Tsakmaklis N, Demos M, et al. MYD88 wild-type Waldenstrom Macroglobulinaemia: differential diagnosis, risk of histological transformation, and overall survival. *Br J Haematol*. 2018;180(3):374–80.
183. Patkar N, Subramanian PG, Deshpande P, Ghodke K, Tembhare P, Mascarenhas R, et al. MYD88 mutant lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia has distinct clinical and pathological features as compared to its mutation negative counterpart. *Leuk Lymphoma*. 2014;8194(October):1–6.
184. Hunter ZR, Yang G, Xu L, Liu X, Castillo JJ, Treon SP. Genomics, signaling, and treatment of Waldenström Macroglobulinemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):994–1001.
185. García-Sanz R, Jiménez C, Puig N, Paiva B, Gutiérrez NC, Rodríguez-Otero P, et al. Origin of Waldenstrom’s macroglobulinemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2016;29(2):136–47.
186. Hsi ED. Plasmacytic Differentiation in Small B-cell Lymphomas (Other than EMZL) • Review of plasma cell differentiation.
187. Swerdlow SH, Kuzu I, Dogan A, Dirnhofer S, Chan JKC, Sander B, et al. The many faces of small B cell lymphomas with plasmacytic differentiation and the contribution of MYD88 testing. *Virchows Arch*. 2016;468(3):259–75.
188. Ghielmini M. *Lymphoma Essentials for Clinicians*. 2012. 1-144 p.
189. Piris MA, Mollejo M, Campo E, Menárguez J, Flores T, Isaacson PG. A marginal zone pattern may be found in different varieties of non- Hodgkin’s lymphoma: The morphology and immunohistology of splenic involvement by B-cell lymphomas simulating splenic marginal zone lymphoma. *Histopathology*. 1998;33(3):230–9.
190. Mateo MS, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Sanchez-Beato M, Martínez P, et al. Molecular heterogeneity of splenic marginal zone lymphomas: Analysis of mutations in the 5’ non-coding region of the bcl-6 gene. *Leukemia*. 2001;15(4):628–34.



Anexo I

Índice de tablas

Tabla 1.	Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los linfomas B maduros	28
Tabla 2.	Principales características de las líneas celulares utilizadas como controles positivos y negativos para nuestro estudio	62
Tabla 3.	Características de los anticuerpos usados en el estudio IHQ	67
Tabla 4.	Número de casos mutados y nativos y porcentaje dentro del diagnóstico y dentro del total de la serie	72
Tabla 5.	Resumen de las características de los casos reclasificados	74
Tabla 5A.	Frecuencia de la mutación MYD88 L265P en linfomas B de bajo grado de célula pequeña antes de la reclasificación	75
Tabla 5B.	Frecuencia de la mutación MYD88 L265P en linfomas B de bajo grado de célula pequeña tras la reclasificación	75
Tabla 6.	Características clínicas en linfomas B de bajo grado	85
Tabla 7.	Características clínicas en linfomas esplénicos de la zona marginal	86
Tabla 8.	Características clínicas en linfomas linfoplasmacíticos	87
Tabla 9.	Estratificación de los niveles de IgM monoclonal en sangre en relación a la mutación	100
Tabla 10.	Estratificación de los niveles de IgM monoclonal en sangre en relación a la mutación	102
Tabla 11.	Estratificación de los niveles de IgM monoclonal en sangre en relación a la mutación	103
Tabla 12.	Diferenciación plasmacítica en SMZL con presencia de mutación MYD88 L265P	104

Índice de figuras

Figura 1.	Patrón morfológico de la linfocitosis B policlonal persistente similar a SMZL	46
Figura 2.	Vía de señalización de TLRs, MYD88 dependientes y MYD88 independientes	49
Figura 3.	Localización de las mutaciones de MYD88 en la estructura tridimensional del dominio TIR. La mutación L265P ocurre en un residuo que es invariable, en una región conservada evolutivamente	51
Figura 4.	Niveles de actuación de fármacos sobre sus dianas terapéuticas contenidas en la vía de señalización TLR- MYD88 dependiente	53
Figura 5.	Esquema del diseño de los ensayos utilizados para determinar la presencia o ausencia de mutación. Ensayo utilizado para detectar el alelo mutante: 4476206 MYD88_85940_mu. Ensayo diseñado para detectar el alelo wt: 4476206 MYD88_85940_wt (Applied Biosystems, Foster City, CA)	62
Figura 6.	Diagramas de amplificación correspondientes a la utilización de los 2 tipos de ensayos (mutante y nativo). Izquierda: diagrama de amplificación obtenido con el ADN de la línea SM28. Centro: diagrama de amplificación obtenido con el ADN de la línea OCI-Ly3. Derecha: diagrama de amplificación obtenido con el ADN de la línea HBL1	65
Figura 7.	Izquierda. Patrón arquitectural de SMZL. Derecha. Celularidad polimorfa SMZL	89
Figura 8.	Hallazgos histológicos de un linfoma esplénico de la zona marginal con mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón micronodular. Superior derecha. Diferenciación zona marginal. Inferior izquierda. Detalle de la celularidad. Inferior derecha. Ki67 con patrón targetoide.	89
Figura 9.	Hallazgos histológicos de un linfoma esplénico de la zona marginal, positivo para mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón de infiltración micronodular. Superior derecha. Infiltración pulpa roja. Inferior izquierda. Diferenciación zona marginal. Inferior derecha. Detalle diferenciación zona marginal	88
Figura 10.	Hallazgos histológicos de un linfoma esplénico de la zona marginal, positivo para mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón micronodular. Superior derecha. Infiltración pulpa roja. Inferior izquierda. Diferenciación zona marginal. Inferior derecha. Detalle diferenciación zona marginal.	91
Figura 11.	Hallazgos histológicos de un linfoma esplénico de la zona marginal, positivo para mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón de infiltración micronodular. Superior derecha. Infiltración pulpa roja. Inferior izquierda. Diferenciación zona marginal. Inferior derecha. Detalle diferenciación zona marginal	92

- Figura 12.** Izquierda. Patrón arquitectural LPL. Derecha. Celularidad monótona LPL 93
- Figura 13.** Hallazgos histológicos de un linfoma linfoplasmacítico en bazo, positivo para mutación de MYD88 L265P. Superior izquierda. Patrón de infiltración vagamente nodular de localización periarteriolar. Superior derecha. Patrón vagamente nodular. Inferior izquierda. Afectación de pulpa roja. Inferior derecha. Depósitos de hemosiderina. 93
- Figura 14.** Hallazgos histológicos de un caso con mutación MYD88 L265P, inicialmente diagnosticado como SMZL y posteriormente reclasificado como LPL por la presencia de diferenciación plasmacítica con restricción de cadenas ligeras (caso reclasificado nº 5). Superior derecha e izquierda. Patrón micronodular y diferenciación plasmacítica. Inferior izquierda. Tinción inmunohistoquímica Kappa. Inferior derecha. Tinción inmunohistoquímica Lambda. 94
- Figura 15.** Hallazgos histológicos de un linfoma esplénico de la zona marginal negativo para mutación de MYD88 L265P, con diferenciación plasmacítica y sin paraproteína monoclonal. Superior izquierda. Patrón micronodular. Superior derecha. Diferenciación de zona marginal. Inferior izquierda. Diferenciación plasmacítica. Inferior derecha. Expresión de IgM. 105
- Figura 16.** Esquema del origen celular de los linfomas como contrapartida maligna de los estadios específicos de la maduración linfocitaria. Imagen tomada de "Lymphomas essentials for clinicians" ESMO(183). 128

Índice de gráficas

Gráfica 1.	Porcentaje de casos mutados y nativos de la serie estudiada	71
Gráfica 2.	Número de casos de mutados y nativos clasificados por diagnóstico	72
Gráfica 3.	Media de edad en el momento del diagnóstico	76
Gráfica 4.	Media de escala ECOG en el momento del diagnóstico	77
Gráfica 5.	Media de niveles de leucocitos en sangre	77
Gráfica 6.	Niveles medios de neutrófilos en sangre	78
Gráfica 7.	Niveles medios de linfocitos en sangre	79
Gráfica 8.	Niveles medios de hemoglobina en sangre	79
Gráfica 9.	Niveles medios de plaquetas en sangre	80
Gráfica 10.	Niveles medios de LDH sérica	80
Gráfica 11.	Niveles medios de albúmina sérica	81
Gráfica 12.	Niveles medios de Beta2-Microglobulina	81
Gráfica 13.	Niveles medios de Paraproteína IgM en sangre	82
Gráfica 14.	Niveles medios de Paraproteína IgG séricos	82
Gráfica 15.	Niveles medios de Paraproteína IgA sérica	83
Gráfica 16.	Proporción de hombres y mujeres de la serie	83
Gráfica 17.	Niveles medios de paraproteína IgM en mutados y nativos	95
Gráfica 18.	Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos	96
Gráfica 19.	Niveles de paraproteína IgM según diagnóstico	96
Gráfica 20.	Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos en SMZL	97
Gráfica 21.	Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos en SMZL	98
Gráfica 22.	Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos en LPL	99
Gráfica 23.	Niveles de paraproteína IgM en mutados y nativos en LPL	99
Gráfica 24.	Niveles de paraproteína IgM estratificados en mutados y nativos	100
Gráfica 25.	Niveles de paraproteína IgM estratificados por diagnóstico	101
Gráfica 26.	Niveles de paraproteína IgM estratificados en mutados y nativos, en SMZL	102
Gráfica 27.	Niveles de paraproteína IgM estratificados en mutados y nativos, en LPL	103
Gráfica 28.	Curva de supervivencia de la serie estudiada	106
Gráfica 29.	Curva de supervivencia en SMZL	106
Gráfica 30.	Curva de supervivencia en LPL	107

Anexo II

MYD88 (L265P) Somatic Mutation in Marginal Zone B-cell Lymphoma

Azahara Martinez-Lopez, MD,*† Soraya Curiel-Olmo, BSc,† Manuela Mollejo, MD, PhD,*
 Laura Cereceda, Tech,† Nerea Martinez, PhD,† Santiago Montes-Moreno, MD,†
 Carmen Almaraz, Tech,† Jose B. Revert, Tech,† and Miguel A. Piris, MD, PhD†

Abstract: *MYD88* L265P is a somatic mutation that has been identified in about 90% of Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas (LPLs). It has also been detected in a subset of marginal zone lymphoma (MZL) cases, but the frequency and clinical and histologic features of these mutated MZL cases has only been partially characterized. We have developed a customized TaqMan allele-specific polymerase chain reaction for sensitive detection of this mutation in paraffin-embedded tissue. We analyzed samples from 19 patients with LPL, 88 patients with splenic marginal zone lymphoma (SMZL), 8 patients with nodal marginal zone lymphoma (NMZL), 21 patients with extranodal mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), and 2 patients with B-cell lymphoma not otherwise specified. By integrating mutational, histologic, and clinical data, 5 cases were reclassified as LPL. After reclassification, *MYD88* L265P was detected in 13/86 (15%) SMZL and in 19/24 LPL (79%) cases. The mutation was absent from NMZL and MALT cases. A strong correlation was found between the presence of an IgM monoclonal paraproteinemia and the *MYD88* L265P mutation ($P < 0.0001$). SMZL cases positive for *MYD88* L265P were also associated with monoclonal IgM paraproteinemia (4/13 cases; $P < 0.0283$), although with less serum paraproteinemia. They also had a higher frequency of plasmacytic differentiation (9/13) but with no correlation between the presence of mutation and of light chain-restricted plasma cells in tissue. Demonstration of the *MYD88* L265 mutation is a valuable tool for the diagnosis of LPL, although some SMZL cases carrying the mutation do not fulfill the diagnostic criteria for LPL.

Key Words: *MYD88* L265P, lymphoplasmacytic lymphoma, marginal zone lymphoma, splenic marginal zone lymphoma, IgM paraprotein, plasmacytic differentiation

(*Am J Surg Pathol* 2015;39:644–651)

Marginal zone lymphoma (MZL) is a heterogeneous group of lymphoproliferative disorders that are distinguished by the presence of marginal zone differentiation upon histologic examination. Three main subtypes are recognized in the World Health Organization (WHO) classification: nodal marginal zone lymphoma (NMZL), extranodal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT), and splenic marginal zone lymphoma (SMZL).^{1–4}

Their prevalence varies with subtype and geographic localization, but they account for 3% to 7% of all non-Hodgkin lymphomas in adults. The main histologic features of these tumors are marginal zone cytology, germinal center colonization, and a variable degree of plasmacytic differentiation. All these features are also found to some extent in lymphoplasmacytic lymphoma (LPL).⁴

Recently, whole-genome sequencing has identified a recurrent targetable somatic mutation in the *MYD88* gene consisting of a single nucleotide change (T > C) at position 38182641 in chromosome 3p22.2 that results in an amino acid change from leucine to proline (L265P). It constitutively activates *MYD88*-dependent signaling in the TLR pathway, leading to nuclear factor (NF- κ B) activation.^{5,6}

Initially described in ABC-subtype diffuse large B-cell lymphoma (29%) and MALT lymphomas (9%),⁵ its study has been extended to other B-cell lymphomas (BCLs) using more sensitive methods.⁶ The presence of *MYD88* L265P has been particularly closely associated with Waldenström macroglobulinemia (WM)/LPL (90%), and it has been correlated with plasmacytic differentiation and monoclonal IgM paraproteinemia.^{7–9} Some reports have also described isolated MZL cases carrying the *MYD88* L265P mutation.¹⁰

The aim of this study was to assess the frequency of *MYD88* (L265P) mutation in a series of low-grade BCLs, to analyze the relationship between *MYD88* (L265P) and clinical phenotype, and to characterize MZL cases

From the *Department of Pathology, Hospital Virgen de la Salud, Toledo; and †Department of Pathology, Hospital Universitario Marques de Valdecilla, IDIVAL, Santander, Spain.

Conflicts of Interest and Source of Funding: A.M.-L. was in receipt of a grant (CM11/0022) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). This study was supported by grants from the Red Temática de Investigación contra el Cáncer (RTICC), the Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), the ISCIII (FIS 12/1682, INT 13/046, and RD 09/0076/00074), and the MINECO-SPAIN (SAF2013-47416-R). The authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article.

Correspondence: Miguel A. Piris, MD, PhD, Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IDIVAL, Avenida de Valdecilla, 25, 39008 Santander, Spain (e-mail: mapiris@idival.org). Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

carrying this mutation. The essential issue investigated was whether the presence of *MYD88* L265P mutation was a more specific marker of the difference between LPL and MZL than morphology or immunophenotype. For this purpose, we developed a competitive allele-specific TaqMan polymerase chain reaction (PCR) assay, which provides a reliable and sensitive method for detecting the mutation in formalin-fixed paraffin-embedded samples. This enabled us to evaluate the presence of the mutation in a large series of LPL, SMZL, NMZL, and MALT lymphomas and investigate its associations with clinical information and histologic features.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A total of 117 MZL cases were studied, including a series of 88 SMZL patients, 8 NMZL patients, and 21 extranodal MZLs of MALT. In addition, 19 LPLs and 2 BCLs not otherwise specified (BCL-NOS) were included in the study. Diagnoses were made following the criteria defined in the 2001-2008 WHO classification. All samples were from initial diagnostic specimens, collected before the patient received therapy. Analyzed SMZL samples were all derived from splenectomy specimens. MALT lymphoma diagnosis was made from tonsils, endometrium, gastric mucosa, salivary gland, large bowel mucosa, orbit, lung, kidney, or thyroid. LPL was diagnosed in samples from peripheral blood, lymph node, bone marrow, or spleen. Immunohistochemical techniques were performed in tissue microarrays. The Ethics Committee of the Hospital Universitario Marques de Valdecilla approved the project.

After the *MYD88* L265P study, some MZLs were reclassified as LPL if they met the following 3 criteria: monoclonal IgM paraproteinemia, histologic evidence of plasmacytic differentiation in the tumor, and positivity for the *MYD88* L265P mutation.

DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks from diagnostic samples by the phenol-chloroform method. The quantity and integrity of purified DNA was assessed by spectrophotometry (Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Germany).

Cell Lines

OCI-Ly3 (DSMZ no.: ACC 761) (homozygous for the mutation), OCI-Ly10, and HBL1 (both heterozygous for the mutation) are diffuse large B-cell lymphoma cell lines that were used as positive controls for the mutation. A375 (ATCC; no: CRL-1619) and SM28 (ATCC no: HTB-72) are melanoma cell lines identified as being negative for the mutation by Sanger sequencing and used as negative controls.

Development of PCR Assay for *MYD88* L265P Assessment

Quantitative detection of *MYD88* L265P mutation was developed using a TaqMan allele-specific custom cast PCR assay 4476206 MYD88_85940_mu and MYD88_85940_wt (Applied Biosystems, Foster City, CA). Mutated or wild-type sequences from samples were specifically amplified in competitive allele-specific PCR according to the manufacturer's instructions in the ABI 7900 HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems). The PCR reaction was performed in a 5-step protocol with the following thermal cycling conditions: 10 minutes at 95°C (1 cycle); 15 seconds at 92°C and 1 minute at 58°C (5 cycles); 15 seconds at 92°C and 1 minute at 60°C (40 cycles). Each sample was assayed in triplicate. In a final volume of 10 µL, 100 ng of DNA was used. Three types of control were used: homozygous, heterozygous, and wild type for the mutation. The analytical sensitivity for detecting the mutation by this method has a lower limit of 0.1%. To identify and quantify mutations, PCR results were analyzed using SDS version 2.2 (Applied Biosystems) and Mutation Detector version 2.0 software (Applied Biosystems).

Confirmatory Sanger Sequencing

Sanger sequencing was used to confirm the PCR results. The forward and reverse PCR primers were 5' TT GAAGACTGGGCTTGTCCTCC 3' and 5' GGTGGTGT AGTCGCAGACA 3', respectively. They were designed to amplify a 167-bp fragment covering exon 5 (Sigma Aldrich, St Louis, MO).

Statistical Analysis

Numerical variables were summarized as their median and range; categorical variables were described as percentages of subjects in each category. Group differences between numerical variables were examined with the nonparametric Mann-Whitney *U* test, whereas those between categorical variables were investigated with the 2-tailed Fisher exact test, both calculated with GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA).

RESULTS

MYD88 L265P Mutation Status in Low-grade Small BCLs

In our study, PCR identified the *MYD88* L265P somatic variant in cases with a previous diagnosis of LPL (14/19), SMZL (15/88), NMZL (1/8), and in 2/2 BCL-NOS with LPL features (Table 1). Sanger sequencing confirmed the positive results found with PCR and was also used for cases considered doubtful by PCR, confirming the presence of *MYD88* mutations. Five cases initially diagnosed as SMZL, BCL-NOS, and NMZL lymphomas were reclassified as LPL, on account of the presence of the *MYD88* L265P mutation, and after a review of the clinical and morphologic data (Fig. 1; Tables 1 and 2). All reclassified cases showed an IgM monoclonal serum component, varying between 5.1 and 24.0 g/L, and histologic evidence of plasmacytic differentiation, with monotypic plasma cells (Table 2). The final

TABLE 1. Frequency of *MYD88* L265P Mutation in Low-grade BCLs

	No. Cases	<i>MYD88</i> L265P
Initial diagnosis		
NMZL	8	1
SMZL	88	15
MALT	21	0
LPL	19	14
BCL, NOS	2	2
Total of cases	138	32
Reviewed diagnosis		
NMZL	7	0
SMZL	86	13
MALT	21	0
LPL	24	19
BCL, NOS	0	0
Total of cases	138	32

prevalence of the mutation in low-grade BCLs after the reviewed diagnosis was 15% (13/86) for SMZL and 79% (19/24) for LPL, whereas no evidence of mutation was found in NMZL and MALT lymphomas (Table 1).

Clinical Phenotype in Low-grade BCLs Positive for the *MYD88* (L265P) Mutation

Clinical features are summarized in Table 3. Male patients were more likely to have a mutated *MYD88* L265P genotype than female patients ($P < 0.0211$). Compared with *MYD88*-wt, those carrying *MYD88* L265P more commonly displayed IgM monoclonal paraproteinemia ($P < 0.0001$), and levels of IgM were higher in 21/30 patients for whom data were available (70%), the range varying between 3.0 and 11.9 g/L. In contrast, in wild-type patients, an IgM monoclonal gammopathy was found in

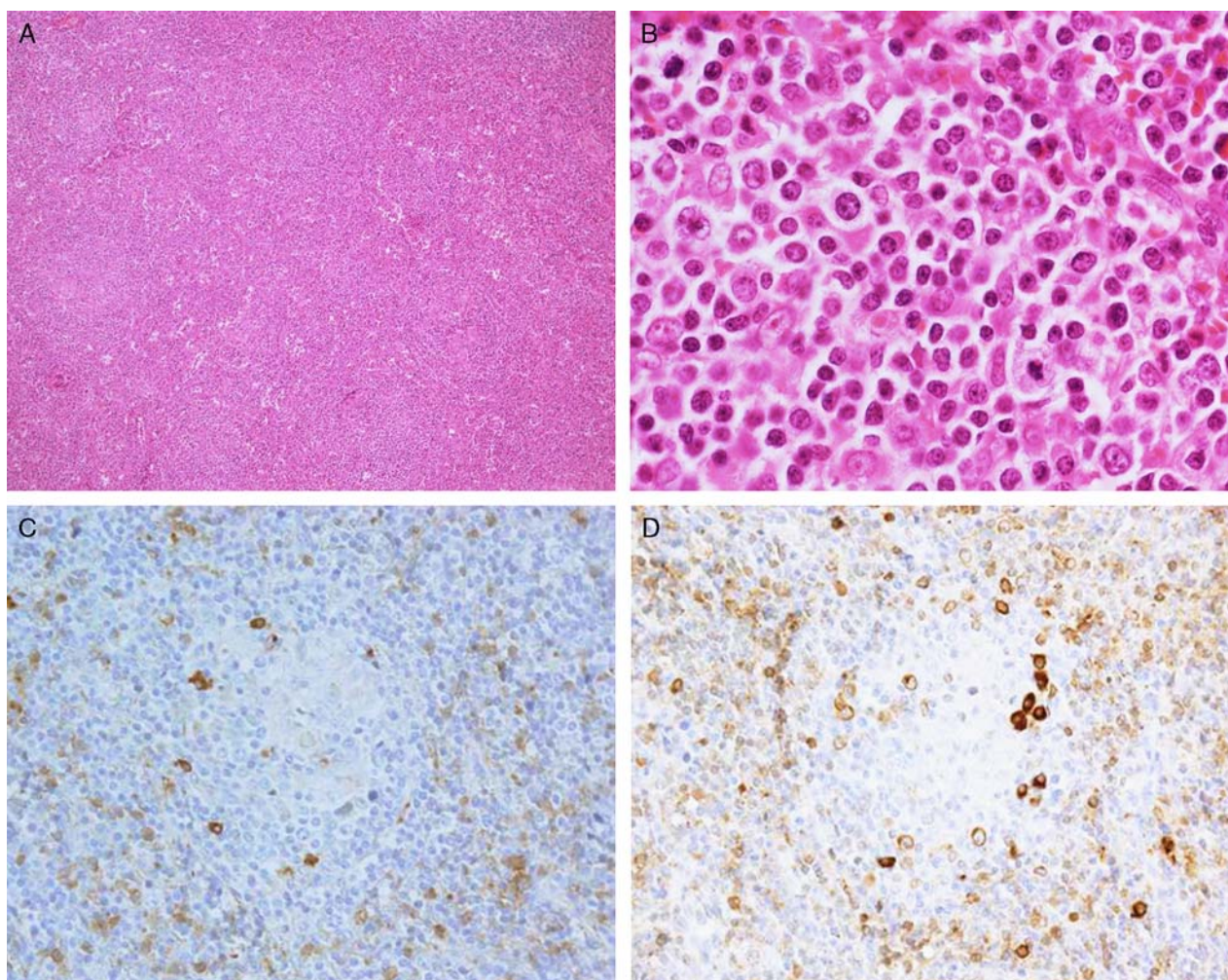


FIGURE 1. Histologic findings from an *MYD88* L265P-mutated case, initially diagnosed as SMZL and reclassified as LPL because of the presence of plasmacytic differentiation with light-chain restriction in both lymphocytic and plasma cell component (case N5) (hematoxylin and eosin). A and B, Micronodular pattern and plasmacytic differentiation. C, κ immunostaining. D, λ immunostaining showing light-chain restriction.

TABLE 2. Summary of Features of Reclassified Cases

Case No	Initial Diagnosis	Light-chain Restriction by Plasma Cells	Revised Diagnosis	Diagnostic Sample	Splenomegaly	Bone Marrow Involvement	Serum IgM Paraprotein (g/L)
1	NMZL	λ	LPL	LN	Absent	Present	24.0
2	BCL-NOS vs LPL	κ	LPL	BM	Absent	Present	11.0
3	BCL-NOS	κ	LPL	BM	Absent	Present	10.3
4	SMZL	κ	LPL	SPLEEN	Present	Present	7.3
5	SMZL	λ	LPL	SPLEEN	Present	Present	5.1

BM indicates bone marrow; LN, lymph node.

only 14/78 patients (18%), and the levels found were lower, varying between 3.7 and 6.6 g/L. IgG or IgA monoclonal paraproteinemia was much less frequent in those patients with mutant or wild-type *MYD88* (Table 3).

Clinical Phenotype in *MYD88* (L265P)-mutated SMZLs

Histologic reevaluation of the cases revealed that SMZLs were the only subtype of MZLs that carried the *MYD88* L265P somatic mutation. The clinical features of these patients are reported in Table 4. The presence of IgM paraproteinemia was more common in mutated cases (4/13, 31%) than in wild-type patients (6/60, 10%) ($P < 0.05$). The IgM concentrations ranged between 7.1 and 25.3 g/L. No other differences were found in analytical or clinical features.

Histologic Findings and Plasmacytic Differentiation in *MYD88* (L265P)-mutated SMZLs

Histologic features of spleen sections were similar for mutated *MYD88* (L265P) and wild-type cases. All cases exhibited a micronodular pattern. Morphologic features of

plasmacytic differentiation (eccentric eosinophilic cytoplasm, prominent Golgi area, radial clumped chromatin) were noted in 9/13 cases (69%), although they all lacked a plasma cell neoplastic compartment. Immunohistochemical study of κ and λ light-chain restriction did not identify light-chain restriction in the plasma cells found in the spleen sections. There was a moderate association between the plasmacytic morphology and the presence of serum monoclonal paraproteinemia (5/13 cases, 38%). The histologic features are shown in Figures 2 and 3, and the associations between the presence of plasmacytic differentiation and the monoclonal serum component are summarized in Table 5. *MYD88*-mutated SMZL cases did not differ in the frequency of IgD and CD5 expression. Macroscopic and microscopic features of these cases were similar to those of the wt-*MYD88* SMZL cases.

DISCUSSION

MYD88 L265P is a somatic mutation with a significant role in lymphomagenesis as an important step in

TABLE 3. Clinical Features of Mutated and Wild-type Low-grade BCLs

Clinical Features	<i>MYD88</i> L265P Mutation (n = 32)	<i>MYD88</i> L265P Wild Type (n = 98)	P
Age, median (range) (y)	62 (32-98)	64 (4-82)	NS
Sex (n [%])			
Male	19/31 (61)	34/94 (37)	0.0211
Female	12/31 (39)	59/94 (63)	0.0211
HCV infection (n [%])	0/11 (0)	3/26 (12)	NS
HBV infection (n [%])	1/11 (9)	5/26 (19)	NS
HIV infection (n [%])	1/11 (9)	0/26 (0)	NS
Hemoglobin, median (range) (g/dL)	11.0 (6.6-15.9)	11.0 (6.1-15.7)	NS
LDH median (range) (U/L)	473.4 (112-4233)	477.8 (23-2561)	NS
β2 microglobulin, median (range) (mg/L)	3.7 (1.2-7.8)	3.9 (0.3-8.1)	NS
Serum albumin, median (range) (g/dL)	3.6 (2.7-5.1)	3.8 (0.4-5)	NS
Paraprotein			
IgG			
Range (g/L)	NA-20.5	NA-22.6	
n (%)	1/30 (3)	1/78 (1)	NS
IgA			
Range (g/L)	NA-31	NA	
n (%)	1/30 (3)	0/78 (0)	NS
IgM			
Range (g/L)	3.0-11.9	3.7-6.6	
n (%)	21/30 (70)	14/78 (18)	< 0.0001
Light-chain type (n [%])			
κ	8/9 (11)	3/4 (75)	NS
λ	1/9 (89)	1/4 (25)	NS

NA indicates not applicable; NS, not significant.

TABLE 4. Clinical Features of Mutated and Wild-type SMZL

Clinical Features in SMZL	<i>MYD88</i> L265P Mutation (n = 13)	<i>MYD88</i> L265P Wild Type (n = 73)	P
Age, median (range) (y)	58 (32-98)	65 (25-82)	NS
Sex (n [%])			
Male	8/13 (62)	24/69 (35)	NS
Female	5/13 (38)	45/69 (65)	NS
HCV infection (n [%])	0/6 (0)	2/12 (17)	NS
HBV infection (n [%])	0/6 (0)	0/12 (0)	NS
HIV infection (n [%])	0/6 (0)	0/12 (0)	NS
Hemoglobin, median (range) (g/dL)	10.6 (7.4-12.6)	10.8 (7.1-14.6)	NS
LDH, median (range) (U/L)	404 (252-559)	513 (23-2561)	NS
β 2 microglobulin, median (range) (mg/L)	4.3 (1.2-7.4)	4.3 (2.2-8.1)	NS
Serum albumin, median (range) (g/dL)	3.5 (2.7-4.6)	3.7 (1.6-4.8)	NS
Paraprotein			
IgG			
Range (g/L)	NA-20.5	NA-22.6	
n (%)	1/13 (8)	1/60 (2)	NS
IgA			
Range (g/L)	NA	NA	
n (%)	0/13 (0)	0/60 (0)	NS
IgM			
Range (g/L)	7.1-25.3	4-9.2	
n (%)	4/13 (31)	6/60 (10)	0.0283

NA indicates not applicable; NS, not significant.

the activation of NF- κ B, following signaling from the Toll-like receptor pathway. The presence of *MYD88* (L265P) mutation is emerging as a reliable marker for the diagnosis of LPL/MW,^{9,10} and has also been found in half of patients with IgM-monoclonal gammopathy of undetermined significance. It has been demonstrated to be an independent predictor of progression of IgM-monoclonal gammopathy of undetermined significance to WM or to other lymphoproliferative disorders.^{10,11}

The interface between LPL and other BCLs with marginal zone differentiation is otherwise quite blurred. The WHO classification recommends that LPL should be diagnosed after exclusion of plasmacytic/plasmacytoid variants of other BCLs.³ In this context, it seems that the use of mutation analysis for detecting the *MYD88* L265P mutation could be of great help for refining the criteria for the recognition of LPL.

We have examined the presence of the *MYD88* (L265P) mutation in a large series of 115 patients with a previous diagnosis of MZL and an addition 23 LPL cases and 2 cases of BCL-NOS using a sensitive method. A TaqMan allele-specific assay PCR detected the mutation with 0.01% sensitivity and was found to be valid for use with paraffin-embedded samples. We also performed Sanger sequencing to validate the positive results and to confirm uncertain results.

The identification of the *MYD88* L265P mutation, coupled with other morphologic and clinical features, allowed us to reclassify some cases previously diagnosed as nodal MZL, SMZL, or BCL-NOS. The reclassification to LPL from other B-cell lymphoproliferative disorders was done in those cases in which the mutation was associated with the presence of histologic features of plasmacytic differentiation (plasma cells with light-chain restriction) and was associated with the presence of in-

creased monoclonal paraproteinemia. After reclassifying the diagnosis, we found a prevalence of 16% for SMZL and of 78% for LPL, with the *MYD88* L265P mutation being absent from NMZL and MALT lymphomas.

In our reclassified LPL patients, IgM paraprotein values ranged from 5.1 to 24.0 g/L. As previously reported, the presence of a much higher level of serum IgM favors the presence of LPL, although the concentration of IgM by itself is insufficient for a diagnosis of LPL.¹²⁻¹⁴

The presence of *MYD88* L265P in SMZL has been described previously. Treon et al⁷ used Sanger sequencing to detect 3 of 46 (7%) patients positive for *MYD88* L265P with a diagnosis of MZL (1 SMZL, 1 NMZL, and 1 MALT lymphoma), all of them with extensive bone marrow involvement, monoclonal IgM paraproteinemia, and clinical data that were also consistent with WM. After using conventional and quantitative allele-specific PCR, Xu et al⁶ detected the mutation in 2 of 20 patients (10%) with an SMZL diagnosis. DNA sequencing of exon 5 of *MYD88* in a B-cell lymphoproliferative series enabled Poulain et al⁸ to identify 1 of 16 (6%) SMZLs that were positive for the mutation. Using the same method, Gachard et al¹⁵ detected the mutation in 2 of 53 (4%) SMZLs, and Jimenez et al,⁹ using PCR with allele-specific oligonucleotides, found 3 of 14 (21%) SMZLs positive for *MYD88* L265P, all of which had an IgM monoclonal component and bone marrow infiltration.

We found a lower prevalence of *MYD88* mutations within the LPL cases than did other authors.⁶⁻⁸ This may be due to the lack of selection of the tumoral cell population, given that all previous studies used DNA extracted from mononuclear cells that were CD19⁺-sorted from bone marrow and/or peripheral blood. In contrast, we detected *MYD88* L265P in about 17% of patients with SMZL. This prevalence is slightly higher than those pre-

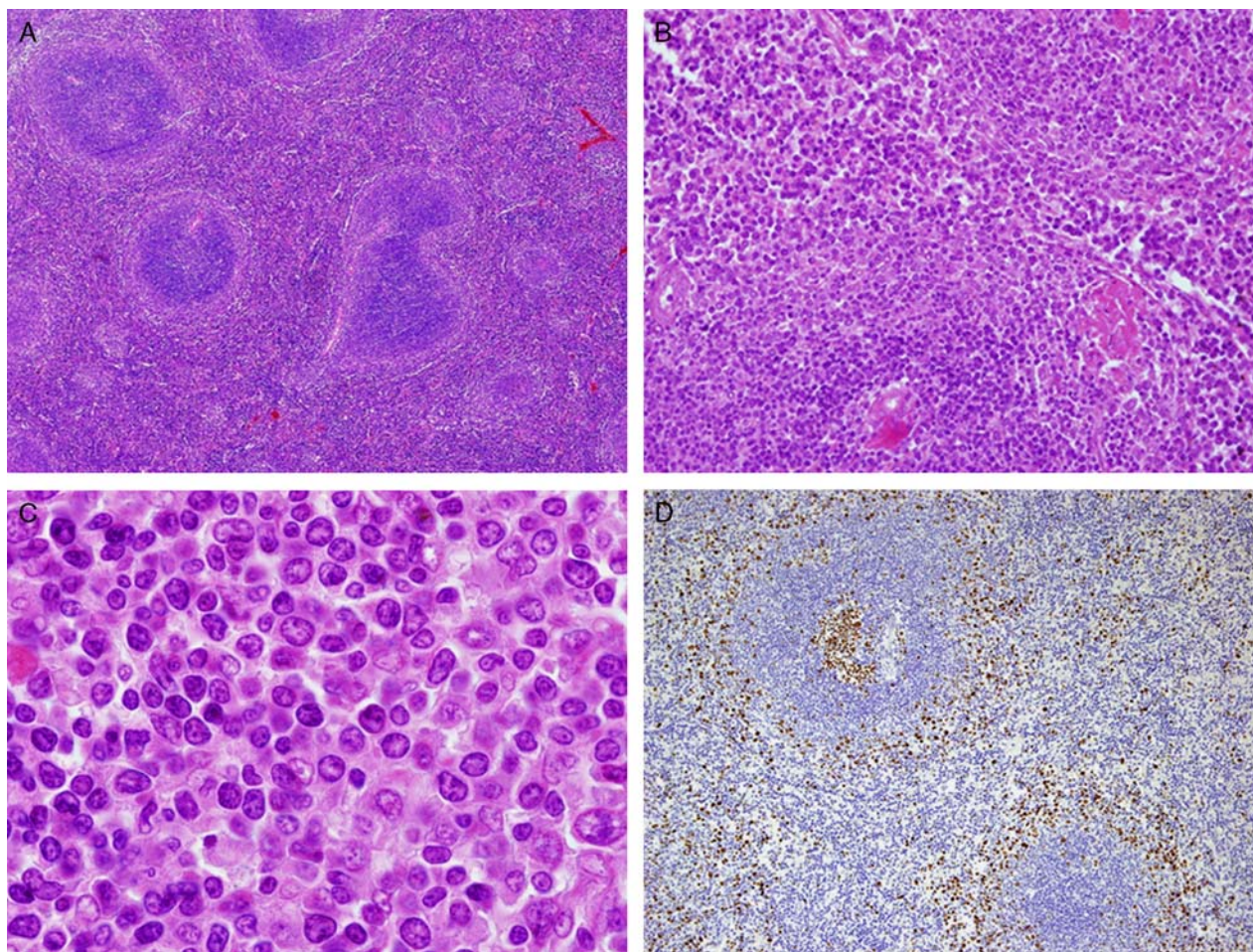


FIGURE 2. Histologic findings from a spleen tissue section of an *MYD88* L265P-mutated SMZL, lacking both plasmacytic differentiation and serum paraproteinemia (hematoxylin and eosin). A–C, Micronodular pattern with marginal zone differentiation. Neoplastic infiltration highlights an increase in both size and number of white pulp follicles in a characteristic micronodular pattern. D, Ki-67 immunostaining shows a distinctive targetoid pattern.

viously reported, possibly because tumoral cells tend to be more highly represented in splenectomy samples.

Using both PCR and Sanger sequencing, none of the reclassified NMZL or MALT lymphomas exhibited the *MYD88* L265P mutation. Its presence has rarely been noted in NMZL, and our result is coincident with other published findings. However, this is not the case for MALT lymphomas.¹⁶ None of our 21 cases harbored the mutation, but the low proportion of neoplastic cells and the absence of selection of the tumoral cell population may have limited the sensitivity of the technique.

The features of MZLs bearing this *MYD88* mutation have not been widely described. Varettoni and colleagues reported on the largest series of SMZL studied for *MYD88* L265P. They used allele-specific PCR and found that 5 of 84 (6%) patients had the somatic variation.^{10,11} They showed that the IgM paraprotein was significantly more common in SMZL patients with the *MYD88* (L265P) mutation than in those without it (80% vs. 19%) ($P = 0.01$), but there were no other differences in the

clinical presentation. In keeping with that study, we found a significant relation between the presence of *MYD88* L265P and the IgM monoclonal serum paraproteinemia, although there were some bona fide SMZL cases that carried the *MYD88* mutation but lacked any histologic or analytical evidence of LPL.

With respect to the histologic features, Varettoni and colleagues concluded that findings in bone marrow biopsies and spleen tissue overlapped in SMZL with or without mutation and that there was a more diffuse degree of plasmacytic differentiation in mutated cases. The presence of light chain–restricted plasma cells was not described.¹⁰

Consistent with this, our reviewed mutated and nonmutated spleen samples were morphologically similar, the only exception being the more frequent plasmacytic (69%) differentiation in the mutated cases.

In a recent study, Hamadeh et al¹⁷ analyzed 44 splenectomy specimens in well-defined SMZL but found no evidence of the *MYD88* L265P mutation in any of them.

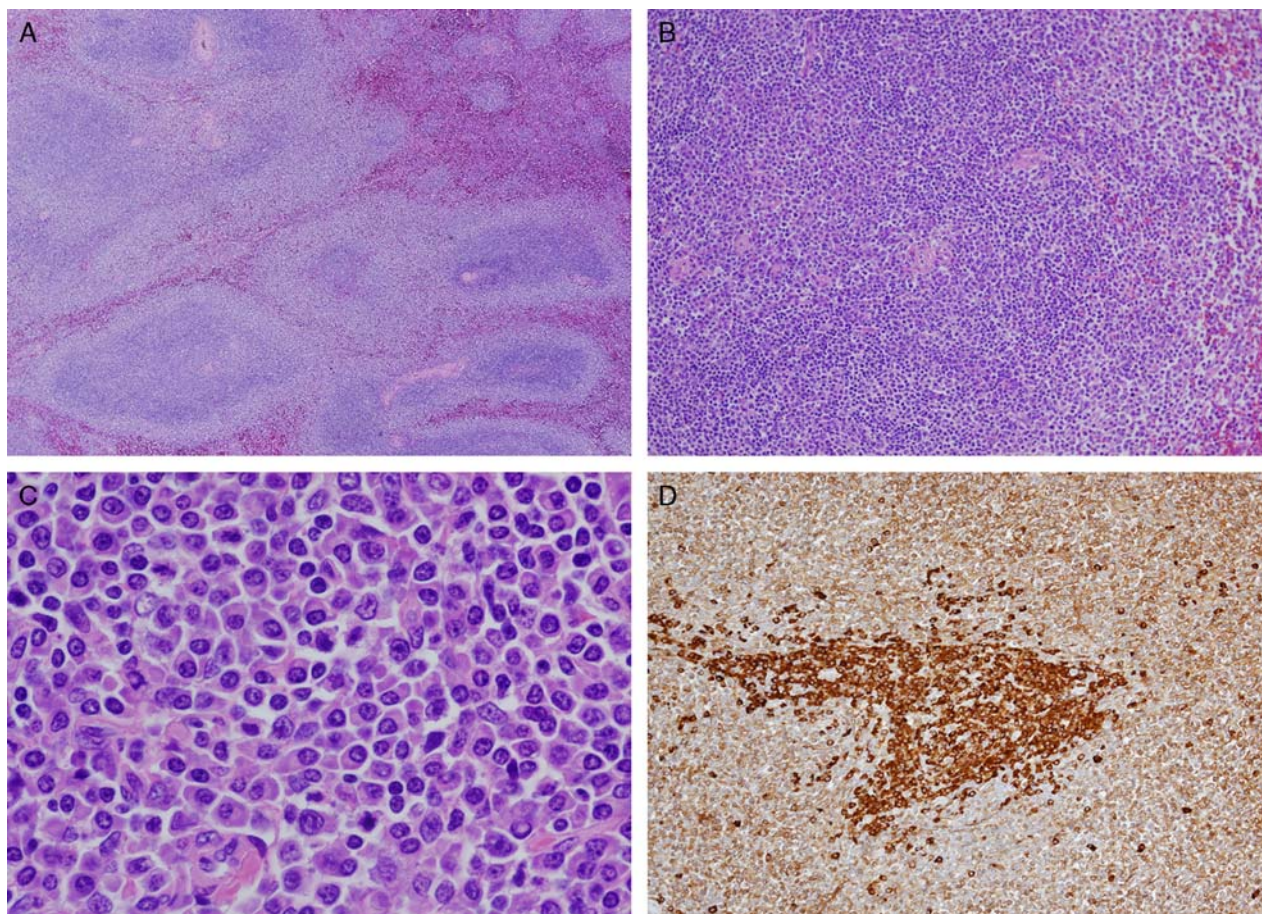


FIGURE 3. A–C, *MYD88* L265P-negative SMZL with plasmacytic differentiation, lacking monoclonal paraproteinemia. Micro-nodular pattern with both marginal zone and plasmacytic differentiation. D, Plasmacytic differentiation is highlighted by IgM staining.

They concluded that this mutation is very rare even in those cases with plasmacytic differentiation and IgM paraprotein.

We demonstrated in a spleen tissue section positive for *MYD88* L265P the typical histologic features required for the diagnosis of SMZL. These histologic features are a well-defined micronodular pattern in white pulp and prominent marginal zone differentiation. The absence of paraprotein supports even more strongly the diagnosis of SMZL.

In summary, identification of the *MYD88* L265 mutation is a useful diagnostic tool that may be used in the routine recognition of LPL. Nevertheless, some SMZL cases with the mutated *MYD88* gene do not fulfill the diagnostic criteria for LPL.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Biobank of HUMV-IDIVAL (Santander, Spain) for providing biological samples as well

TABLE 5. Plasmacytic Differentiation in Mutated SMZL

Features	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case 10	Case 11	Case 12	Case 13	Total (n [%])
Plasmacytic morphology	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	9/13 (69)
Plasma cells with light-chain restriction	Neg	Neg	Neg	ND	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	0/13 (0)
Presence of monoclonal serum component	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	5/13 (38)
IgM	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	4/5 (80)
IgG	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1/5 (20)
IgA	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	0/0 (0)

Neg indicates negative; pos, positive.

as all the clinical colleagues who kindly submitted cases for centralized review.

REFERENCES

1. Matutes E, Oscier D, Montalban C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*. 2008;22:487–495.
2. Molina TJ, Lin P, Swerdlow SH, et al. Marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation and related disorders. *Am J Clin Pathol*. 2011;136:211–225.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2008.
4. Berger F, Traverse-Glehen A, Felman P, et al. Clinicopathologic features of Waldenstrom's macroglobulinemia and marginal zone lymphoma: are they distinct or the same entity? *Clin Lymphoma*. 2005;5:220–224.
5. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470:115–119.
6. Xu L, Hunter ZR, Yang G, et al. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 2013;121:2051–2058.
7. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367:826–833.
8. Poulain S, Roumier C, Decambron A, et al. MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2013;121:4504–4511.
9. Jimenez C, Sebastian E, Chillon MC, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenstrom's macroglobulinemia. *Leukemia*. 2013;27:1722–1728.
10. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013;121:2522–2528.
11. Varettoni M, Zibellini S, Arcaini L, et al. MYD88 (L265P) mutation is an independent risk factor for progression in patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2013;122:2284–2285.
12. Lin P, Hao S, Handy BC, et al. Lymphoid neoplasm associated with IgM paraprotein. A study of 382 patients. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:200–205.
13. Owen RG, Parapia LA, Higginson J, et al. Clinicopathological correlates of IgM paraproteinemias. *Clin Lymphoma*. 2000;1:39–43; discussion 4–5.
14. Kyle RA, Garton JP. The spectrum of IgM monoclonal gammopathy in 430 cases. *Mayo Clin Proc*. 1987;62:719–731.
15. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia*. 2013;27:183–189.
16. Li ZM, Rinaldi A, Cavalli A, et al. MYD88 somatic mutations in MALT lymphomas. *Br J Haematol*. 2012;158:662–664.
17. Hamadeh F, MacNamara SP, Aguilera NS, et al. MYD88 mutation analysis helps define nodal lymphoplasmacytic lymphoma. *Mod Pathol*. 2014. [Epub ahead of print].