



TESIS DOCTORAL

Perfil mutacional de linfomas B con diferenciación plasmocelular

Mutational profile of B cell lymphoma with plasma cell differentiation

Tesis presentada por Julia Beatriz García Reyero.

Director de tesis: Dr. Santiago Montes Moreno.

Doctorado en Medicina y Ciencias de la Salud.

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria Universidad de Cantabria.

Santander, Noviembre 2020

A mi familia.

Julia García Reyero

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que han colaborado para que este proyecto se pudiese realizar, por su trabajo esfuerzo y dedicación. En especial a mi director de tesis, el Dr. Santiago Montes Moreno por su tiempo, su constante motivación y su confianza en mí desde el principio, y a todos los miembros del grupo de Hematopatología Traslacional del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla, particularmente a Nerea Martinez y Ainara Pereña. A la Dra. Sonia González de Villambrosía de la Unidad de Citogenética y el Dr. Andrés Insunza Gaminde, del departamento de Hematología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla por su colaboración en el estudio FISH y de CMF de los casos. A los miembros de la Unidad del Banco de Tumores del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla HUMV/IDIVAL (Tissue Node, PT13 / 0010/0024) por su apoyo en la logística de recolección de muestras. A los colaboradores del Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) Raul Tonda, Sergi Beltran y Marta Gut. A todos los clínicos y patólogos que han contribuido de una manera u otra en este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado en su mayor parte por el Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto de Investigación PI16 / 1397).

ÍNDICE

- I. INTRODUCCIÓN

1. Linfomas con diferenciación plasmocelular.....	1
1.1. Linfoma linfoplasmacítico:	
* Definición.....	1
- Linfoma linfoplasmacítico	
- Gammapatía monoclonal de significado incierto	
* Epidemiología y etiología.....	2
* Características clínicas.....	2
* Histopatología e inmunofenotipo.....	3
* Perfil genético.....	6
* Pronóstico.....	9
-Transformación a linfoma B difuso de célula grande.	
* Tratamiento y nuevos agentes terapéuticos.....	10
1.2. Linfoma plasmablastico:	
* Definición.....	12
* Epidemiología y etiología.....	12
* Características clínicas.....	13
* Histopatología e inmunofenotipo.....	13
- Características del microambiente tumoral	
* Perfil genético.....	16
* Pronóstico.....	16
* Tratamiento y nuevos agentes terapéuticos.....	17

2. Nuevas estrategias de diagnóstico molecular en linfomas.....18

- II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....20

- III. MATERIAL Y MÉTODOS

- 3.1. Selección de casos.....22

- 3.2. Histología y técnicas de inmunohistoquímica.....24

- Micromatrices de tejido

- 3.3. Hibridación in situ cromogénica, Hibridación in situ fluorescente y cariotipo convencional.....27

- 3.4. Cuantificación de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos y factores de transcripción.....29

- 3.5. PCR alelo-específica para la detección de mutaciones en *MYD88*.....31

- 3.6. Secuenciación directa para la detección de mutaciones en *CXCR4*.....32

- 3.7. Secuenciación de última generación a partir de librerías basadas en amplicones.....34

- 3.8. Interpretación y recogida de datos en secuenciación dirigida de última generación.....37

- 3.9. Análisis estadístico.....38

- IV. RESULTADOS

- 4.1. Linfoma linfoplasmacítico:

- *Características clínicas.....39

- *Estudio histopatológico y fenotípico.....39

*Cuantificación del infiltrado en médula ósea de las células B.....	43
*Perfil genético del linfoma linfoplasmacítico.....	46

4.2. Linfoma plasmablástico:

*Características clínicas.....	49
*Estudio histopatológico y fenotípico.....	50
*Perfil genético del linfoma plasmablástico.....	51
*Estudio del microambiente tumoral en linfoma plasmablástico.....	57

• V. DISCUSIÓN

5.1. Biopsia de médula ósea en el diagnóstico del linfoma linfoplasmacítico.....	60
5.2. Perfil mutacional de linfomas con diferenciación plasmocelular.....	61
5.3. Microambiente tumoral en linfoma plasmablástico.....	69

• VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....71

• VII. BIBLIOGRAFÍA.....75

• VIII.TABLAS.....83

ANEXO. PUBLICACIONES ORIGINALES.....	89
--------------------------------------	----

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

aSHM: “aberrant Somatic Hyper-Mutation”. Hipermutación somática aberrante.

BCR: “B-Cell Receptor”. Receptor de la célula B.

BTK: “Bruton’s Tyrosine Kinase”. Tirosina quinasa de Bruton.

B2M: β 2-microglobulina.

CGA: Campo de gran aumento.

CISH: “Chromogenic In Situ Hybridization”. Hibridación cromogénica in situ.

CMF: Citometría de flujo.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

FAV: Frecuencia alélica de la variante.

FDA: “Food and Drug Administration”. Administración de medicamentos y alimentos.

FFIP: Fijado en formol e incluido en parafina.

FISH: “Fluorescent in situ hybridization”. Hibridación fluorescente in situ.

GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto.

H&E: Hematoxiloina-eosina

Ig: Inmunoglobulina.

IgH: "Immunoglobulin heavy chain". Cadena pesada de inmunoglobulina.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IGV: "Integrative Genomics Viewer". Visor Genómico Integrado.

IPI: Índice pronóstico internacional.

IPSS: "International Prognostic Scoring System". Sistema pronóstico internacional.

LBDCG: Linfoma B difuso de célula grande.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LF: Linfoma folicular.

LH: Linfoma de Hodgkin.

LLC/LLCP: Leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas.

LLP: Linfoma linfoplasmacítico

LNH: Linfoma no Hodgkin.

LPB: Linfoma plasmablastico

LZM: Linfoma B de la zona marginal.

MAT: Macrófagos asociados al tumor.

MHCII: "Major Histocompatibility Complex class II". Complejo de histocompatibilidad principal clase II.

MM: Mieloma múltiple.

MW: Macroglobulinemia de Waldenström

NGS: "Next Generation Sequencing". Secuenciación de nueva generación.

PCR: "Polymerase chain reaction". Reacción en cadena de la polimerasa.

PD1: "Programmed cell death 1". Proteína de muerte celular programada 1

PD-L1: "Programmed Death-ligand 1". Ligando 1 de la proteína de muerte celular programada.

PLP-B: Proceso linfoproliferativo B.

SG: Supervivencia general.

SNC: Sistema nervioso central.

SNPs: "Single Nucleotide Polymorphisms". Polimorfismos de nucleótido único.

TMA: "Tissue Microarrays". Micromatriz tisular.

VEB: Virus de Epstein Barr.

VHC: Virus de la hepatitis C.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

WES: "Whole Exome Sequencing". Secuenciación del exoma completo.

WGS: "Whole Genome Sequencing". Secuenciación del genoma completo

RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL

El objetivo de esta investigación, es describir el perfil mutacional del linfoma B con diferenciación plasmocelular del tipo linfoma B linfoplasmacítico y linfoma plasmablástico.

Los objetivos secundarios son: 1) estudiar la relación existente entre el perfil mutacional y el fenotipo de los linfomas con diferenciación plasmocelular y 2) caracterizar el microambiente tumoral en los casos de linfoma plasmablástico, así como la expresión de proteínas relacionadas con la inmunovigilancia tumoral.

Para ello, se dispone de muestras de linfoma linfoplasmacítico, gammapatía monoclonal de significado incierto IgM y linfoma plasmablástico. Realizamos técnicas de inmunohistoquímica para el estudio del fenotipado y técnicas de hibridación in situ (FISH y CISH), secuenciación dirigida del exoma mediante NGS, secuenciación directa de tipo Sanger y PCR cuantitativa alelo específica para el estudio del perfil genético. En los casos de linfoma plasmablástico realizamos una cuantificación de las poblaciones inmunes asociadas al tumor (macrófagos y poblaciones de células T) y de la expresión de marcadores implicados en la inmunovigilancia antitumoral: la proteína de muerte celular programada 1 y su ligando (PD-L1, PD1) y el complejo de histocompatibilidad principal clase II.

Los resultados obtenidos demuestran que el linfoma linfoplasmacítico presenta un perfil mutacional simple y relativamente uniforme, con mutaciones recurrentes en *MYD88*pL265P y ocasionales mutaciones somáticas en *CXCR4*, *KMT2D*, *PRDM1/Blimp1*, *MYC* e *ID3*. El perfil mutacional del linfoma plasmablástico es heterogéneo y está relacionado con la presencia del virus de Epstein Barr (VEB). Las alteraciones genéticas en *MYC*, *STAT3* y *PRDM1/Blimp1* son más frecuentes en casos VEB positivos. De forma ocasional se identifican mutaciones en la vía MAPK (i.e *BRAF*). Los reordenamientos de *MYC* y las mutaciones en el dominio SH2 de *STAT3* producen una sobreexpresión de *MYC* y *STAT3*-P, respectivamente. El microambiente tumoral del linfoma plasmablástico presenta un enriquecimiento de macrófagos asociados al tumor y linfocitos T PD1.

Este proyecto de investigación contribuye, en el aspecto científico- técnico, al desarrollo de paneles de secuenciación dirigida para el diagnóstico molecular de linfomas B. La identificación de alteraciones en la vía de JAK/STAT y MAPK es característica de los linfomas plasmablasticos y puede servir de base para terapias dirigidas en este tipo de linfoma.

ABSTRACT

The aim of this research, is to describe the mutational profile of a series of B cell lymphoma with plasma cell differentiation, including lymphoplasmacytic B cell lymphoma and plasmablastic lymphoma.

The secondary aims of this investigation are: 1) The study of the relationship between the mutational profile and the phenotype and 2) The characterization of the tumor microenvironment as well as the expression immune checkpoint related proteins in cases of plasmablastic lymphoma

To this end, samples of lymphoplasmacytic lymphoma, IgM monoclonal gammopathy of uncertain significance and plasmablastic lymphoma were subjected to a comprehensive analysis including immunohistochemistry, in situ hybridization, targeted NGS sequencing, Sanger sequencing and Allele specific Quantitative PCR. A detailed characterization of the immune populations (macrophages and T cells) as well as the expression of immune checkpoint markers (PD-L1, PD1 and MHCII) was done in plasmablastic lymphoma cases.

Our results show that lymphoplasmacytic lymphoma is characterized by a simple mutational profile, with a recurrent mutation in *MYD88*pL265P and occasional somatic mutations in *CXCR4*, *KMT2D*, *PRDM1/Blimp1*, *MYC* and *ID3*. In contrast the mutational profile of plasmablastic lymphoma is heterogeneous and associated with EBV infection. Genetic lesions in *MYC*, *STAT3* and *PRDM1/Blimp1* are more frequent in EBV positive tumors. In some cases, MAPK pathway mutations such as *BRAF* are detected. Both *MYC* rearrangements and *STAT3* SH2 mutations lead to overexpression of MYC and Phospho-STAT3, respectively. An enrichment in TAM and PD1 reactive T lymphocytes is found in the microenvironment of plasmablastic lymphoma.

In conclusion, targeted NGS methods are suitable for the molecular diagnosis of B lymphomas. The identification of characteristic recurrent mutations in JAK/STAT and MAPK pathway in plasmablastic lymphomas may offer new therapeutic options for these aggressive neoplasms.

I. INTRODUCCIÓN:

1. LINFOMAS CON DIFERENCIACIÓN PLASMOCELULAR

La diferenciación plasmocelular es una característica propia de algunos subtipos de linfoma no Hodgkin-B (LNH-B), como el Linfoma linfoplasmacítico (LLP) y el linfoma plasmablastico (LPB). Las alteraciones genéticas que definen estos subtipos de linfoma B están solo parcialmente descritas y no explican totalmente el fenotipo observado en estos tumores.

1.1. LINFOMA LINFOPLASMACÍTICO:

Definición:

El LLP es una neoplasia clínicamente indolente, de células linfoides B pequeñas, linfocitos plasmocitoides y células plasmáticas, que generalmente afecta a la médula ósea y, a veces, a los ganglios linfáticos y bazo (Swerdlow SH et al, 2017).

La macroglobulinemia de Waldestrom (MW) se define por la combinación de LLP con un componente monoclonal IgM, independientemente de la cantidad de la paraproteína monoclonal (Swerdlow SH et al, 2017). Se denomina MW “*smouldering*” o asintomática a casos con diagnóstico de LLP y ausencia de manifestaciones clínicas de MW.

- Gammapatía monoclonal de significado incierto IgM (GMSI-IgM):

Esta categoría se aplica a aquellos casos con menos del 10% de infiltración por LLP en la médula ósea, < 3 g/dL de proteína monoclonal IgM en suero y ausencia de anemia,

síntomas constitucionales, hiperviscosidad, linfadenopatías, hepatoesplenomegalia, u otros daños orgánicos relacionados el proceso linfoproliferativo.

La GMSI-IgM se considera una condición precursora que puede progresar a un linfoma, típicamente LLP/MW o a amiloidosis (Swerdlow SH et al, 2017).

Epidemiología y etiología

El LLP es una entidad poco frecuente, que representa el 3% de todas las gammapatías monoclonales, y el 6% de los procesos linfoproliferativos de células B (PLP-B) leucémicos (Wang H et al, 2012).

Se observa predominantemente en adultos, con una edad media en la séptima década de la vida, y muestra un ligero predominio masculino. Se han reportado casos en la literatura de predisposición genética familiar, en pacientes jóvenes (Swerdlow SH et al, 2017).

Características clínicas

Las manifestaciones clínicas se deben a la infiltración tisular por el tumor y a la cantidad y propiedades específicas de la paraproteína circulante y su depósito en los tejidos (Kapoor et al, 2015).

Los síntomas que se asocian con la infiltración del tejido hematopoyético incluyen citopenias, siendo lo más frecuente anemia normocítica normocrómica, que provoca debilidad y fatiga. En un 15-30% de los pacientes se observa esplenomegalia, hepatomegalia y/o adenopatías y de forma menos frecuente nódulos pulmonares o

derrame pleural, y el síndrome de Bing-Neel, que se debe a la infiltración del sistema nervioso central (SNC) (Bing J et al, 1936).

Los síntomas clínicos debidos a la paraproteína monoclonal están principalmente relacionados con la hiperviscosidad, reportándose en un 30-35% de los casos de LLP. Estos incluyen sangrado muco-cutáneo, trastornos visuales, cefalea, alteración del fondo de ojo y mareos entre los más frecuentes. En un 20% de los casos se ha descrito crioglobulinemia o fenómenos autoinmunes. Se ha descrito que la complicación neurológica más frecuente es la neuropatía periférica, que podría deberse a la reactividad de la paraproteína IgM con antígenos de la vaina de mielina (Levine T et al, 2006) y al depósito de amiloide.

Otros síntomas que se han descrito son coagulopatías, síntomas gastrointestinales y síntomas a nivel de la piel (Kapoor et al, 2015; Swerdlow SH et al, 2017).

La mayoría de los pacientes con LLP presentan paraproteína IgM y cumplen criterios de MW, pero minoritariamente pueden presentar otro tipo de paraproteína (IgG o IgA) o no presentar paraproteína o de forma aún más infrecuente presentar más de un tipo. Se ha descrito que los casos de LLP IgA, muestran características clínicas y patológicas heterogéneas, siendo de utilidad para el diagnóstico los hallazgos histopatológicos en médula ósea y la demostración de la mutación *MYD88pL265P*. La evidencia disponible sobre las características biológicas de LLP IgA y LLP IgG apoya la inclusión de estos casos en el espectro del LLP (Cao X et al, 2016; King RL et al, 2016; Urqueta Lam M et al, 2019).

Histopatología e inmunofenotipo

Clásicamente se ha descrito, que la afectación de la médula ósea, se caracteriza por un patrón de infiltración nodular, difuso y/o intersticial. Sin embargo, los estudios más recientes describen un patrón de infiltración combinado predominante paratrabecular asociado a otro patrón intersticial (Bassarova A et al, 2015).

El infiltrado neoplásico usualmente se caracteriza por linfocitos pequeños, linfocitos plasmocitoides y un número variable de células plasmáticas. Otras características que se han descrito, son el aumento de células mastocitarias, la presencia de cuerpos de Dutcher (pseudoinclusiones intranucleares de inmunoglobulina, PAS positivas), y la presencia de histiocitos salpicados, algunos de ellos cargados con pigmento hemosiderínico.

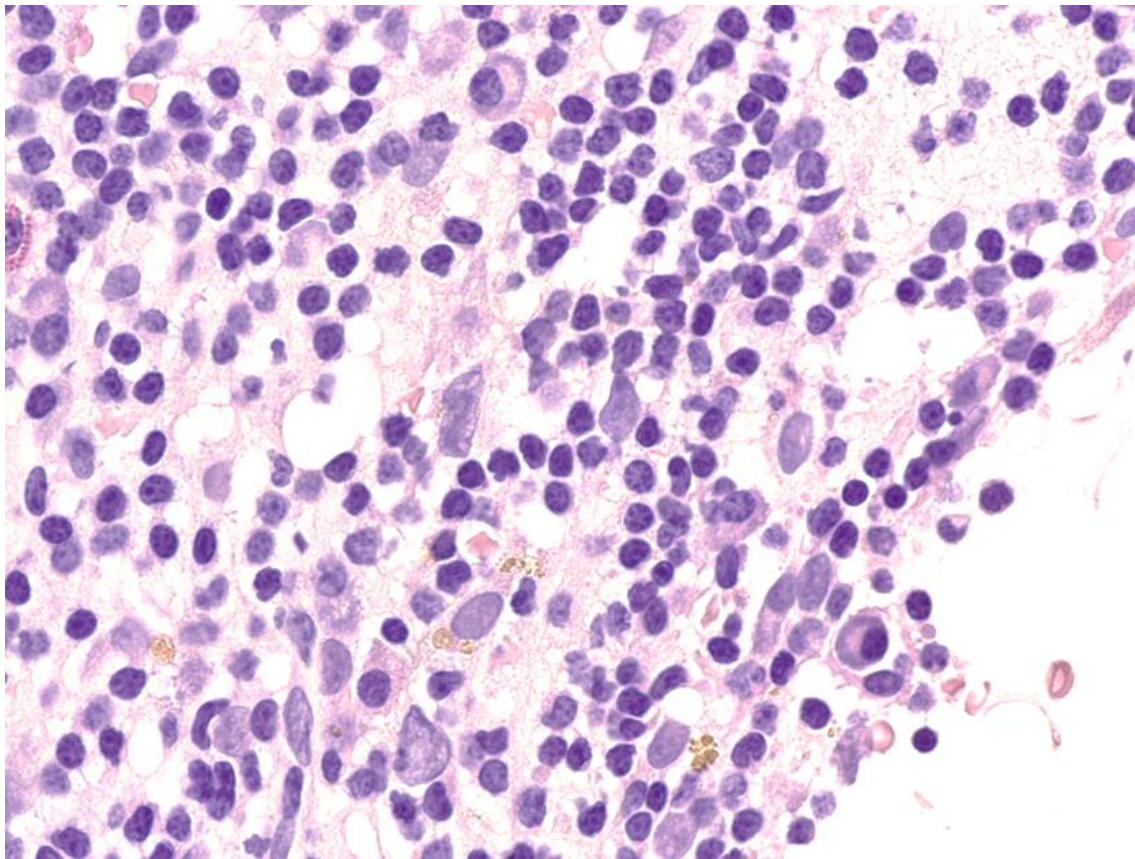


Figura 1. Infiltración en médula ósea por linfoma linfoplasmacítico (H&E, x60).

Detalle histológico de biopsia de médula ósea en un caso de LLP. El infiltrado característico del LLP se compone principalmente de células linfoides, células plasmocitoides y células plasmáticas. Es característica la presencia de cuerpos de Dutcher, histiocitos salpicados cargados de hemosiderina, y un aumento de células mastocitarias.

Fenotípicamente, el LLP expresa marcadores de linfocitos B; como: CD19, CD20, CD22 y CD79a, y marcadores de células plasmáticas: CD138, CD38, con negatividad para CD5, CD10, CD123, CD23, ciclinaD1 y BCL6. A pesar de que la mayoría de LLP muestran negatividad para CD5, CD10 y/o CD23, se ha descrito en la literatura que un 17% de los casos con diagnóstico de LLP eran CD5 + y un 16% CD10 + (Lin P et al, 2011).

La mayoría de las células expresan inmunoglobulina de superficie, y las células plasmáticas con restricción de cadenas ligeras expresan inmunoglobulina citoplasmática; en la mayoría de los casos IgM, y de formas más infrecuente IgG e IgA (Swerdlow SH et al, 2017; Urquieta Lam et al, 2019; King RL et al, 2016; Cao X et al, 2016.)

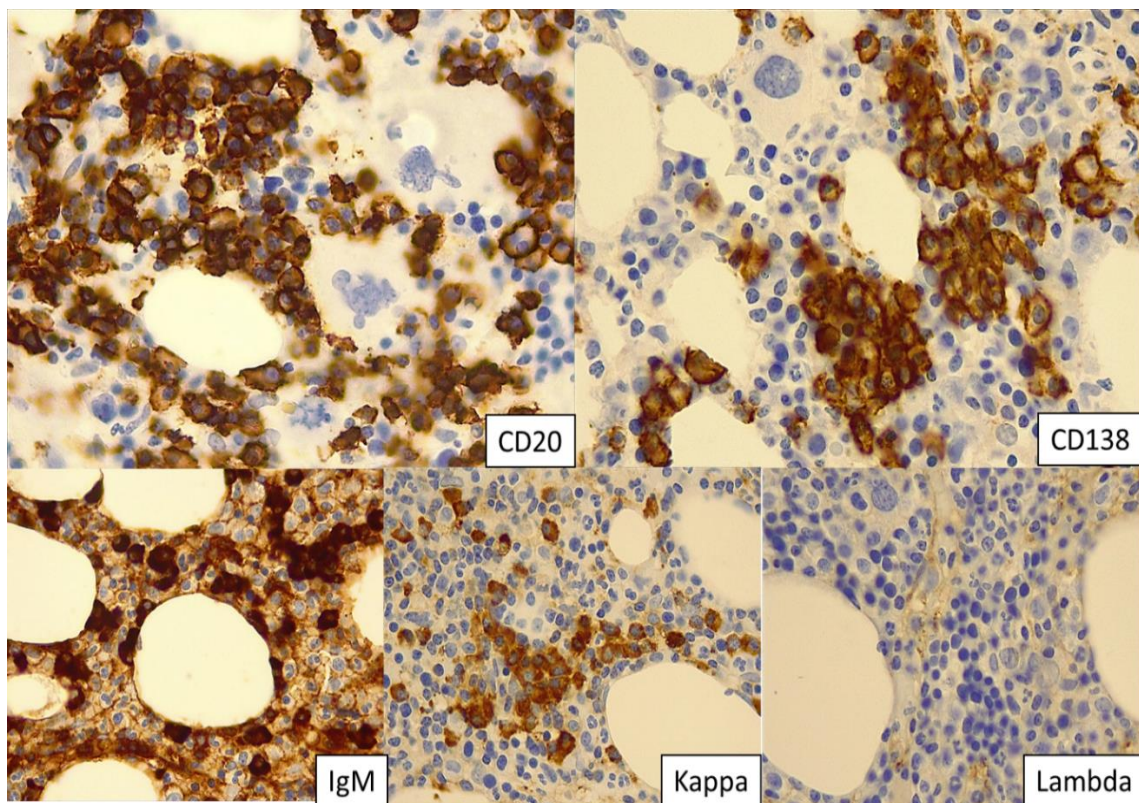


Figura 2. Fenotipo característico del linfoma linfoplasmacítico.

El LLP se caracteriza por la expresión de marcadores de células B (CD20) y marcadores de células plasmáticas (CD138). Se puede detectar inmunoglobinas citoplasmáticas (característicamente IgM) y muestran restricción de cadenas ligeras (en la imagen, restricción de kappa).

Desde el punto de vista histopatológico el LLP se debe diferenciar del linfoma B de la zona marginal (LZM). El término linfoma B de célula pequeña con diferenciación plasmacítica se ha sugerido para casos con fenotipo no concluyente. Sin embargo, el diagnóstico diferencial con otros linfomas B de célula pequeña es relevante para la elección de la terapia óptima. En este sentido el patrón de infiltración en médula ósea en casos de LLP se ha caracterizado en series retrospectivas de casos (Bassarova A et al, 2015; Fang H et al, 2018). El artículo de Bassarova A et al, 2015, describe que los parámetros que permiten un diagnóstico adecuado de LLP frente al LZM u otras neoplasias de células pequeñas con diferenciación plasmacítica son: una infiltración neoplásica paratrabecular, la presencia de células linfoplasmocitoides, la presencia de células con cuerpos de Dutcher, un mayor número de mastocitos y la presencia de la mutación *MYD88pL265P*.

Perfil genético

Desde el punto de vista genético la mutación somática L265P en el gen *MYD88* (*MYD88pL265P*) situado en el cromosoma 3, que da como resultado un cambio de leucina a prolina en el aminoácido 265, se detecta en la mayoría de los casos (>90%) (Hunter ZR et al, 2014; Treon SP et al 2012-2014).

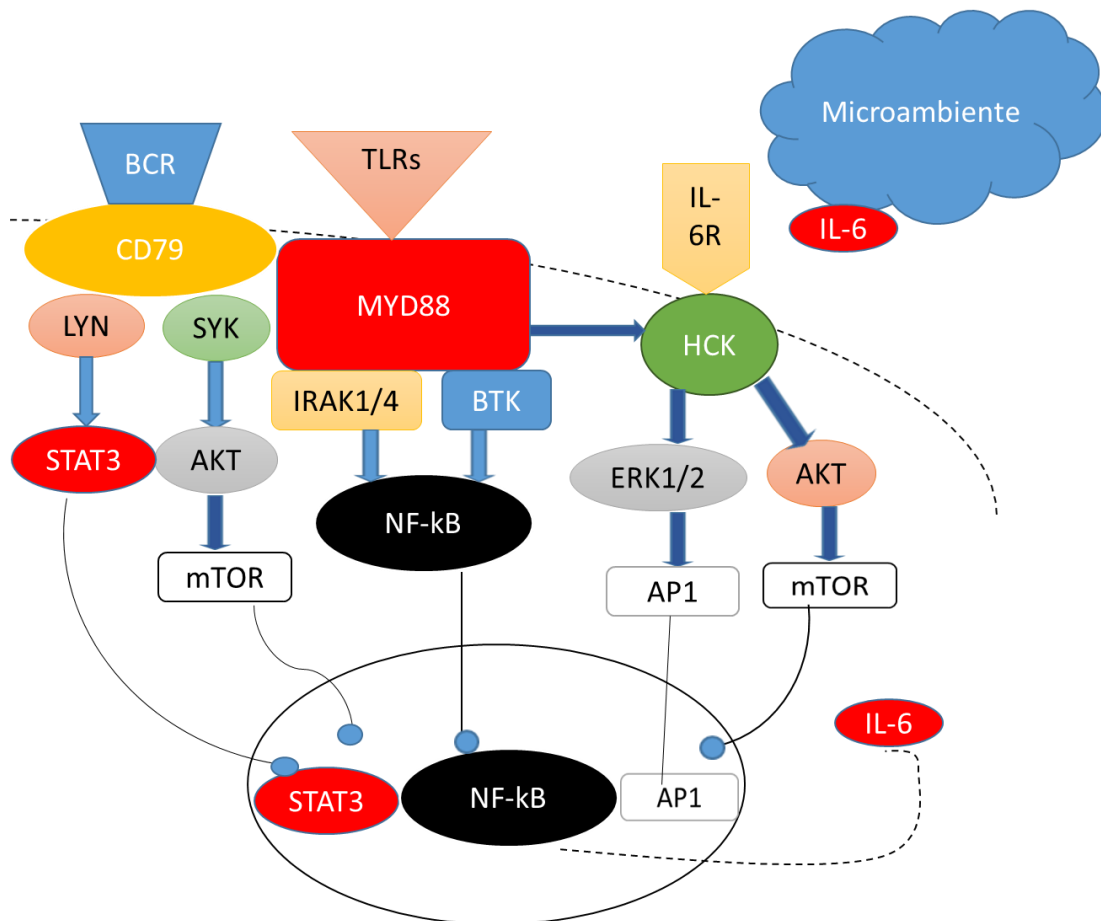


Figura 3. Representación esquemática vía de la vía TLR/MYD88. (modificada de Munshi M et al, Blood Cancer Journal 2020).

La proteína MYD88 mutada activa NF-κB a través de vías divergentes las cuales incluyen a los mediadores IRAK1/4 y BTK. También Induce la transcripción y activación de HCK y SYK, que a su vez activan STAT3 y AKT. Estas vías promueven el crecimiento y la supervivencia celular del LLP/MW.

Se ha visto que los casos con la mutación *MYD88*pL265P se asocian con una mayor carga tumoral, aumento de la población linfóide y aumento de infiltrados de mastocitos en la biopsia de médula ósea en comparación con los casos *MYD88 wild type*. No se han observado diferencias histopatológicas entre los casos *MYD88*pL265P mutados y los casos *MYD88 wild type* (Fang H et al, 2018).

Respecto al perfil mutacional de los LLP; además de la mutación *MYD88*pL265P, se ha descrito mediante secuenciación del exoma completo que la segunda mutación somática más comúnmente encontrada es *CXCR4*.

Hunter ZR et al, analizaron el gen *CXCR4* en casos de MW demostrando que las mutaciones somáticas activadoras en el dominio carboxi-terminal del gen *CXCR4* (receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4) se detectan en el 30-40% de los pacientes con MW, usualmente asociadas a la mutación *MYD88pL265P*. Se han descrito más de 30 mutaciones diferentes en el dominio C terminal del gen *CXCR4*. Las mutaciones somáticas incluyen mutaciones con desplazamiento o cambio del marco de lectura y mutaciones sin sentido (Hunter ZR et al, 2014, Poulain S et al, 2016).

Treon SP et al, describen que los pacientes con mutaciones en *CXCR4*, muestran una forma de presentación clínica más agresiva, con un mayor porcentaje de infiltración tumoral en médula ósea, niveles séricos de IgM más elevados y clínica sintomática, en particular síndrome de hiperviscosidad (Treon et al, 2014).

Otras mutaciones que han sido descritas recientemente en un porcentaje menor de los casos son *ARID1A* (17% de los casos) *CD79B*, *MYBBP1A*, *TP53* y *KMT2D* (Hunter ZR et al, 2018).

El perfil mutacional de los casos de GMSI-IgM es similar al descrito en los casos de LLP. Aproximadamente la mitad de los casos son positivos para *MYD88pL256P* y el 20% para *CXCR4* (Xu L et al, 2016).

Por otro lado, en relación a alteraciones citogenéticas que han sido descritas en los LLP; la delección que involucra el brazo largo del cromosoma 6 (6q), se describe en más de la mitad de los casos (Chang H et al, 2007) aunque no es un hallazgo específico, ya que se encuentran entre las alteraciones estructurales más comunes en otros tipos de linfoma B no Hodgkin (LNH-B).

La delección 6q ha demostrado estar asociada con algunos parámetros clínicos desfavorables como: anemia, hipoalbuminemia, β 2-microglobulina (B2M) elevada y baja producción de IgM, considerándose un factor de mal pronóstico (Chang H et al, 2007; Nguyen-Khac F et al, 2013). Otras alteraciones citogenéticas que se han descrito son delecciones de 13q14, trisomía del 18, trisomía del 4, y delección de 17p.

Pronóstico

La MW tiene un curso crónico y progresivo, con una supervivencia media superior a 5 años y con al menos un 30% de pacientes vivos a los 10 años del diagnóstico. Su evolución es variable, con un curso de enfermedad heterogéneo, describiéndose casos que permanecen estables durante años y otros con un comportamiento clínico más agresivo (García-Sanz R et al, 2001).

Una herramienta comúnmente usada para el pronóstico, en los casos sintomáticos es el Sistema Pronóstico Internacional (IPSS), que incluye los siguientes parámetros: edad mayor a 65 años, nivel de hemoglobina, conteo de plaquetas, nivel de B2M y concentración de proteína monoclonal en suero. Ese sistema consiste en asignar 1 punto a cada parámetro, excepto a la edad, que se le atribuyen 2 puntos. La puntuación total de cada paciente al momento del inicio de la terapia los sitúa en la categoría de bajo (puntuación ≤ 1), intermedio (puntuación =2) o alto riesgo (puntuación ≥ 3) (Morel P et al, 2009).

La media de supervivencia de pacientes con LLP/MW ha mejorado en la última década. Los últimos estudios sugieren que el factor pronóstico más importantes es la edad en el momento del diagnóstico (Trean SP et al, 2014-2018).

La transformación de MW a linfoma B difuso de células grandes (LBDCG) ocurre en hasta el 10% de los pacientes y se asocia con un peor pronóstico y menor supervivencia desde el momento de la transformación (Lin P et al, 2003). El estado de *MYD88* no mutado es un factor de riesgo asociado de forma independiente a transformación en casos con diagnóstico de MW (Zanwar S. et al, 2019).

En este sentido, Jiménez C et al, realizaron WES para estudiar el fenómeno de transformación de MW a LBDCG y estudiar las alteraciones genéticas que pueden estar implicadas en dicho proceso. En sus resultados describen que el fenómeno de transformación muestra un patrón genético heterogéneo y complejo, que depende de la frecuencia y la especificidad de las variantes adquiridas. Encuentran mutaciones implicadas en ambas entidades como son *MYD88* y *CD79*. *MYD88pL265P* al estar presente en más de un 90% de los casos de MW no se puede demostrar su implicación

en el fenómeno de transformación a LBDCG, en cambio si se observa una incidencia mayor de mutaciones en *CD79B* en casos de MW con transformación a LBDCG, que en casos no transformados.

Por otra parte, no todos los eventos serian igual de importantes, aunque no se ha encontrado un patrón común, describen alteraciones que están presentes en una alta proporción de células tumorales clonales y que se conservan durante la transformación a LBDCG, lo que sugiere que pueden tener un papel clave como mutaciones precursoras. Además, describen que se ganan otras mutaciones durante el proceso (*FRYL*, *HNFB1B*, *PIM1*) pudiéndose tratar de eventos cooperadores en el fenómeno de transformación a LBDCG (Jiménez C et al, 2013).

Tratamiento y nuevos agentes terapéuticos

La indicación de terapia está mejor establecida en pacientes con MW, que presentan sintomatología como: síntomas constitucionales, anemia, linfadenopatías y esplenomegalia sintomática y progresiva, síntomas de hiperviscosidad, crioglobulinemia sintomática, neuropatía y amiloidosis.

En general, se recomienda que el tratamiento se reserve para pacientes con síntomas o signos atribuibles a la MW. El inicio de la terapia no debe basarse únicamente en los niveles de IgM, ya que pueden no correlacionarse con la carga de enfermedad, la sintomatología o el pronóstico.

Los pacientes con GMSI-IgM o LLP asintomático, aunque no presentan síntomas relacionados con la enfermedad, deben ser monitorizados (cada 3-4 meses).

Dentro del protocolo terapéutico, se incluyen: agentes alquilantes, análogos de nucleósidos, inhibidores de proteasoma e inmunodeladores, que se combinan a menudo con rituximab u ofatumumab.

Como nuevos agentes terapéuticos, destaca ibrutinib (inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton, BTK) ya que actualmente, es el único agente aprobado por la administración

de alimentos y medicamentos (FDA) de primera línea y en recaída en pacientes con LLP/MW. Ibrutinib es un inhibidor oral de BTK irreversible y muy potente, que se une covalentemente a un residuo de cisteína-481 en el sitio activo de BTK, dando como resultado una fuerte inhibición de la actividad quinasa (Wilson WH et al, 2015; Kim JH et al, 2016; Castillo JJ et al, 2016).

La BTK, es un componente de la vía de señalización del receptor de la célula B (BCR). El BCR está implicado en la tumorigénesis de la MW, pero también constituye un regulador importante de otras vías de supervivencia de las células B que median la apoptosis, la adhesión, la migración y el anidamiento celular. En pacientes seleccionados se realizará trasplante autólogo de células madres.

El tratamiento sintomático incluye plasmaféresis para el síndrome de hiperviscosidad, síntomas de crioglobulinemia, neuropatía, amiloidosis y nefropatía por cadenas ligeras, y corticoesteroides para la anemia hemolítica autoinmune o trombocitopenia.

El tratamiento de los pacientes debe ser individualizado según las características de la enfermedad (niveles de IgM, presencia de citopenias, complicaciones inmunológicas de la IgM, volumen de enfermedad), del paciente (edad fisiológica, estado funcional, comorbilidades y preferencia por la terapia oral frente a la parenteral) y los objetivos de la terapia, ya que no todos requieren una respuesta inmediata con un tratamiento intensivo (Leblond V et al, 2016; Kastiris E et al, 2016).

1.2 LINFOMA PLASMABLÁSTICO:

Definición

El LPB fue inicialmente descrito como una variante clínico-patológica de linfoma de célula grande, que afectaba predominantemente la cavidad oral en pacientes inmunodeprimidos por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Delecluse HJ et al, 1997). Hoy en día se considera una entidad dentro del grupo de Linfoma B difuso de célula grande.

El LPB se define como una neoplasia linfoide de patrón difuso de células grandes (plasmablastos e inmunoblastos) que presentan un fenotipo plasmocelular (Swerdlow SH et al, 2017).

Epidemiología y etiología

Es una neoplasia infrecuente, que ocurre predominantemente en adultos con inmunodeficiencias; usualmente VIH, constituyendo aproximadamente un 2% de los linfomas relacionados con VIH. También se ha descrito en pacientes post- trasplantados y con trastornos autoinmunes, y en pacientes de edad avanzada. Puede ocurrir en niños con inmunodeficiencias, principalmente VIH (Swerdlow SH et al, 2017).

En la patogenia del LPB influyen el estado de inmunodeficiencia y factores genéticos. Estudios recientes han identificado la presencia de reordenamientos en el gen *MYC* en las células neoplásicas (Valera A et al, 2010) y su asociación con la infección por el VEB como importantes mecanismos patogénicos. Recientemente se ha demostrado que los reordenamientos de *MYC* (identificados en un 70% de los LPB) conducen a la

sobreexpresión de la proteína MYC y se asocian frecuentemente con mutaciones en *PRDM1/Blimp1*. La sobreexpresión de MYC detectada por inmunohistoquímica (IHQ) parece no estar restringida, sin embargo, a los casos con traslocación de *MYC*. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de MYC tiene un papel central en la patogenia del LPB pero se desconocen otros posibles genes implicados en la patogénesis de los casos que no muestran lesiones estructurales en el gen *MYC* (Montes-Moreno et al, 2017).

Características clínicas

El LPB es más frecuente en hombres, con una edad media al diagnóstico de 50 años. La edad de presentación es menor en pacientes con VIH, con una edad media al diagnóstico de 40 años (López et al, 2018).

La mayoría de los casos se presentan como una masa en regiones extraganglionares de la cabeza y el cuello, en particular en la cavidad oral y senos paranasales, siendo el 90% de estos pacientes VIH. La segunda localización en frecuencia es el tracto gastrointestinal.

Otras localizaciones extraganglionares descritas en > 1% de los casos incluyen el hueso, partes blandas y piel y el SNC.

Histopatología e inmunofenotipo

El LPB muestra un patrón difuso y cohesivo de células de tipo plasmablasto e inmunoblasto. La célula de tipo inmunoblasto se caracteriza por un citoplasma amplio, un núcleo vesicular redondo central con nucléolos prominentes. Las células de tipo plasmablasto, se caracteriza por un citoplasma basófilo, un núcleo redondo excéntrico, halo perinuclear y nucléolo prominente.

Son frecuentes las figuras mitóticas y células apoptóticas. Es frecuente el patrón en cielo estrellado, con macrófagos con cuerpos tingibles. Pueden observarse áreas de necrosis confluyente (Swerdlow SH et al, 2017; Castillo JJ et al, 2015).

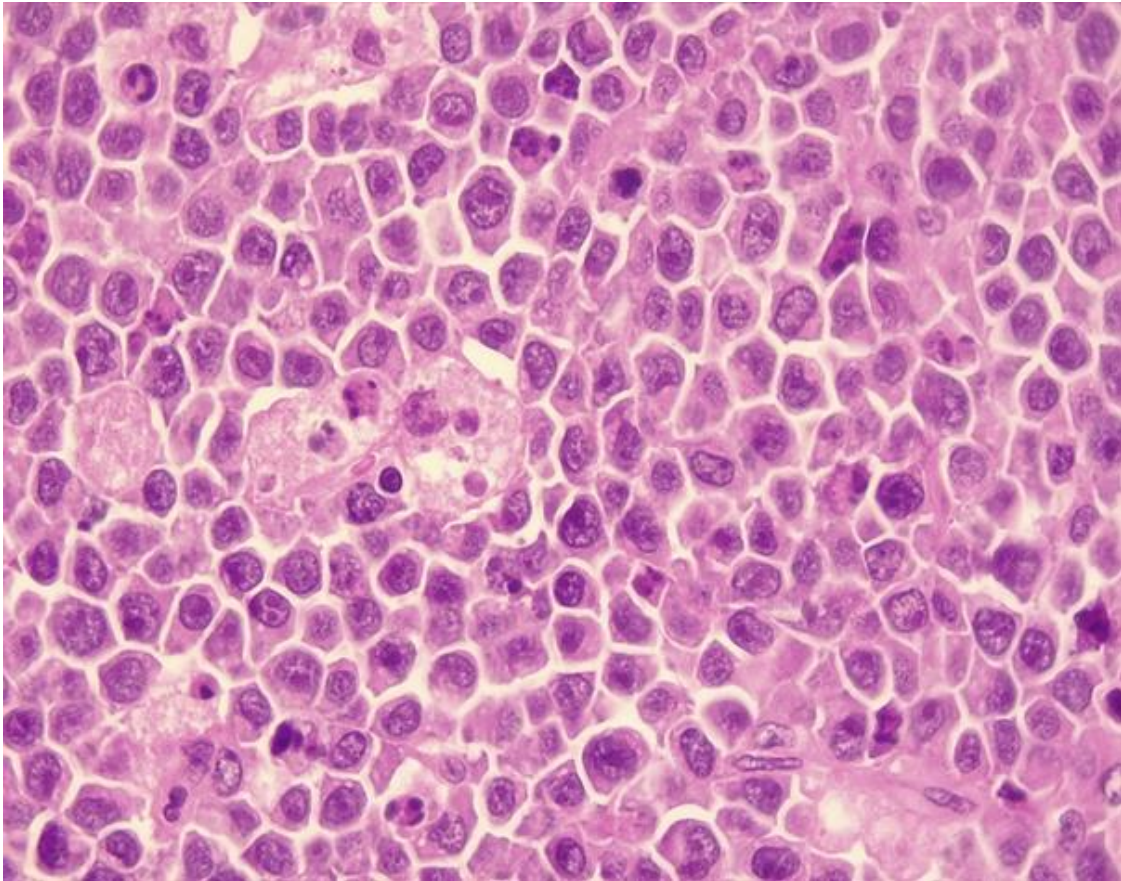


Figura 4. Características histológicas del linfoma plasmablástico. (H&E, x60).

Imagen de un caso de nuestra serie de LPB, donde se observa una morfología característica. Se identifican células de tipo plasmablasto que muestran un citoplasma amplio basófilo, núcleo excéntrico, nucléolo prominente y halo perinuclear. Se observa en la imagen macrófagos con cuerpos tingibles y figuras mitóticas.

El perfil IHQ característico del LPB, demuestra una expresión de CD20 ausente y una expresión reducida / ausente de PAX5. CD79a es positivo en el 40% de los casos. Son positivos en la mayoría de los casos los marcadores de diferenciación de células plasmáticas como CD138 (61%) CD38 (59%), MUM1 / IRF4 (96%) y los factores de transcripción inductores de la diferenciación plasmocelular PRDM1 / Blimp1 (80%) y XBP1s (54%). En el 57% de los casos se observa un inmunofenotipo plasmablástico

completo que consiste en la pérdida de marcadores de células B con expresión de dos marcadores de células plasmáticas (Montes-Moreno et al, 2010).

La restricción de cadenas ligeras generalmente puede ser demostrada mediante IHQ. La proteína MYC se sobreexpresa en la práctica totalidad de los casos estudiados (~100%) con intensidad variable. En la gran mayoría de los casos el índice de proliferación celular Ki67 suele ser > 90%. CD10, CD56 y CD30 son positivos en 20-30% de los casos y BCL6 en un 16%.

La hibridación in situ para EBER es más frecuentemente positiva en pacientes con VIH (82% positivos para EBV-EBER) que en el resto de individuos (40-60%). EBV-LMP1 suele ser negativo (6%) (Montes-Moreno et al, 2010; Montes-Moreno 2017). No se detecta expresión de la proteína ALK ni de HHV-8-LANA1, por definición (Swerdlow et al, referencia OMS 2017).

Características del microambiente tumoral

Recientemente se ha descrito, que el LPB desarrolla varias vías de escape inmune que implica la expresión de puntos de control inmune como PD-1 y PD-L1, que se expresa en las células tumorales y del microambiente (Laurent C et al, 2016). Esto genera un microambiente tolerogénico. Lauren C et al, 2016, describen en su serie de casos expresión de PD1, PD-L1 Y CD163 en las células del microambiente tumoral, mientras que en las células neoplásicas identifican positividad inmunohistoquímica para PD1 en un 22,5% de los casos y para PD-L1 en un 5%. Describen por otra parte que la positividad para VEB en LPB se asocia a un aumento de expresión de la proteína PD-L1 y otros marcadores de inmuno-checkpoint.

El estudio de la proteína del complejo de histocompatibilidad principal clase II (MHC II) /HLA DR en LPB, ha sido reportado por Schmelz M et al, donde describen en la mayoría de los casos la ausencia de expresión inmunohistoquímica de la proteína en los LPB (Schmelz M et al, 2012).

Perfil genético

En el caso del LPB, han sido descritas en la literatura alteraciones genéticas que consisten en traslocaciones en el gen *MYC*. El gen *MYC* generalmente se reordena con genes de las IG (inmunoglobina), y en el contexto de cariotipos complejos (Valera A et al, 2010). Otra alteración genética, recientemente identificada, son las mutaciones puntuales en *PRDM1/Blimp*. Estas mutaciones pueden contribuir a la oncogenicidad del gen *MYC* (Montes-Moreno et al, 2017).

Otras alteraciones genéticas no han sido reportadas hasta el momento, por lo que el perfil genético de los linfomas plasmablasticos no está totalmente caracterizado.

Recientemente, se ha descrito que el LPB tiene un perfil transcripcional distinto del LBDCG, con diferencias en la activación de la señalización de BCR y factores de transcripción *MYC*, *MYB* y de diferenciación plasmocelular (Chapman J et al, 2015).

Pronóstico

El pronóstico es generalmente malo, con una media de supervivencia de 9 meses a 3 años en las series publicadas. Una revisión sistemática reciente de 300 pacientes, mostro una mediana de supervivencia global (SG) de 8 meses (Castillo JJ et al, 2015). La mayoría de los estudios publicados hasta ahora describen que la infección por VIH se asocia con mejor pronóstico, teniendo peor pronóstico los pacientes inmudeprimidos VIH negativos (Liu JJ et al, 2011).

El índice pronóstico internacional (IPI), en linfomas agresivos incluye: la edad, el estado funcional, los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), afectación extranodal y el estadio clínico. Los factores pronósticos no están del todo claro en las series descritas. Algunos autores describen que la edad y los niveles de LDH, son los factores pronósticos más importantes, asociándose estos con un peor pronóstico (Schommers P et al, 2013),

mientras en otra serie retrospectiva (Colomo L et al, 2004) la edad, los niveles de LDH, y la afectación de la médula ósea no son considerados factores de peor pronóstico. Más recientemente, Loghavi et al, describen que los factores de peor pronóstico son una edad mayor a 50 años, estadios III-IV de la enfermedad y la afectación de ganglios linfáticos, sugiriendo que pacientes jóvenes, con estadio limitados y tratados con quimioterapia pueden tener un pronóstico favorable (Loghavi et al, 2015).

Los reordenamientos y ganancias en *MYC* han sido asociados con peor pronóstico y una supervivencia más corta (Morscio J et al, 2014).

Tratamiento y nuevos agentes terapéuticos:

No hay un protocolo terapéutico establecido; algunos autores recomiendan de primera línea un tratamiento basado en 6 ciclos de infusión EPOCH ajustado a la dosis (con o sin bortezomib), profilaxis intratecal con cada ciclo de EPOCH, trasplante autólogo de células madre en primera remisión para candidatos apropiados.

Los pacientes VIH, se benefician de terapias antrirretrovirales combinadas (HAART).

Dentro de los nuevos agentes terapéuticos que se han descrito en los últimos años; se encuentra bortezomib, un inhibidor de la proteasoma que actúa a su vez inhibiendo la vía NF-KB, utilizado en el tratamiento del mieloma múltiple, describiéndose también su actividad en linfomas como el LBDCG o linfoma del manto. También se han descrito agentes antivirales o inmunomodulares, inhibidores del brodominio extratermial (BET), Ac monoclonales y conjugados (brentuximab, daratumumab) y Ac anti- IL6 (siltuximab) (Lopez A et al, 2018; Castillo JJ et al, 2015).

2. NUEVAS ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN LINFOMA.

Hoy en día las técnicas de diagnóstico molecular, son una herramienta que nos permiten analizar diferentes biomarcadores a nivel genómico, transcriptómico y proteómico.

La secuenciación del ADN permite identificar patrones de variación genética asociados a determinados fenotipos clínicos. Los desarrollos en la última década de nuevas técnicas de secuenciación genética han supuesto un avance en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades de base genética como el cáncer.

La NGS, que se basa en lectura en paralelo de millones de secuencias mediante equipos de última generación, ha demostrado su coste-efectividad y está siendo integrada en las rutinas diagnósticas. Además, estas técnicas tienen el potencial para detectar diversos tipos de variaciones genéticas en un único análisis.

Existen tres estrategias para abordar el diagnóstico molecular empleando secuenciación masiva:

- Secuenciación del genoma completo (WGS): cubre casi completamente la información codificada en el ADN de una muestra, incluyendo regiones exónicas, intrónicas y reguladoras.

- Secuenciación del exoma completo (WES): incluye las regiones codificantes (exones) de todos los genes, corresponde aproximadamente con el 1,5% del genoma.

- Secuenciación dirigida del exoma: se secuencian una selección de genes relevantes en determinada patología.

Los paneles de secuenciación dirigida, analizan un número limitado de genes, con una cobertura suficiente en regiones de interés. Esta aproximación asegura una profundidad de lectura mayor que permite la detección de variantes con baja frecuencia alélica. Este diseño también facilita el posterior análisis de datos.

La mayoría de estudios de genotipado en procesos neoplásicos han utilizado paneles de secuenciación masiva del genoma o exoma que utilizan muestras de tejido en fresco, congelado y/o tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFIP). La implementación clínica de secuenciación dirigida del exoma utilizando muestras FFIP, es hoy en día un desafío, ya que es necesario generar datos de alta calidad y crear algoritmos de interpretación de los mismos, con resultados robustos y reproducibles.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1. HIPÓTESIS

La rápida evolución de las técnicas de secuenciación masiva, tanto en aumento del rendimiento como en reducción de costes, ha cambiado radicalmente la investigación biomédica en campos como el diagnóstico molecular o la medicina personalizada.

La secuenciación mediante paneles dirigidos, utilizando muestras de tejido FFIP, supone hoy en día una poderosa herramienta de diagnóstico molecular. Su implementación en los laboratorios de diagnóstico clínico, sigue siendo un reto tanto a nivel técnico como en el manejo de datos.

El conocimiento del perfil mutacional, las vías de señalización implicadas en la patogenia de los linfomas con diferenciación plasmocelular (LLP y LPB), y el estudio del microambiente tumoral en el caso de los LPB, podría suponer un gran avance en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas.

La *hipótesis* es que; las técnicas de secuenciación de nueva generación mediante paneles dirigidos en muestras FFIP en casos con diagnóstico de linfomas con diferenciación plasmocelular (LLP y LPB) permiten identificar una firma genética específica.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es la descripción del perfil mutacional de linfomas B con diferenciación plasmocelular: LLP Y LPB, mediante paneles de secuenciación dirigida del exoma, utilizando muestras clínicas FFIP.

Los objetivos específicos son:

- Estudiar la relación existente entre el perfil mutacional y el fenotipo de los linfomas con diferenciación plasmocelular (LLP y LPB).
- Descripción del microambiente tumoral en casos de LPB y de la expresión de proteínas relacionadas con el control inmunitario.

III. MATERIAL Y MÉTODOS:

3.1. SELECCIÓN DE CASOS

Linfoma B linfoplasmacítico

-Se realiza una recogida retrospectiva de casos desde el 2009 al 2018. En total se dispone de 28 casos, 24 con diagnóstico de LLP y 4 con diagnóstico de GMSI-IgM, del archivo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Se dispone de un total de 31 muestras de tejido FFPI de biopsias de médula ósea, las cuales fueron revisadas para su inclusión en el estudio.

En todos los pacientes se disponía de biopsia de médula ósea pre-tratamiento. Aparte de la biopsia de médula ósea, algunos pacientes tenían disponible material de bloque celular (coagulo) procedente de aspirado de MO. Se obtuvo aspirado de médula ósea en todos los pacientes y este fue analizado mediante morfología convencional, citometría de flujo (CMF) y FISH/cariotipo.

Los datos clínicos de todos los pacientes se revisaron y se recogieron y anotaron para su posterior estudio. Se recogieron en todos los casos; el sexo, la edad y signos y síntomas relacionados con MW/LLP, como son: anemia, astenia, pérdida de peso y fiebre, dolor de cabeza, alteraciones visuales, síntomas relacionados con la hiperviscosidad, depósito de amiloide, neuropatía, esplenomegalia palpable, afectación nodal y extranodal, crioglobulinemia e infección por virus de la hepatitis C (VHC) (**tabla 1**).

Por último, para realizar un correcto diagnóstico diferencial con otros linfomas B de célula pequeña que pueden tener diferenciación plasmacítica, se incluye una serie de 47 biopsias de médula ósea con diagnóstico de LZM (24 casos) y leucemia linfática crónica (LLC) (23 casos), en los cuales se estudió las características morfológicas,

estudiando los diferentes patrones de infiltración neoplásica en médula ósea, así como sus características fenotípicas (**tabla 2**).

Linfomas plasmablasticos

- Se realiza una recogida retrospectiva de casos con diagnóstico de LPB. En el estudio se han incluido 42 casos con diagnóstico de LPB, de los cuales 28 fueron obtenidos de los archivos del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Diez casos fueron recibidos del archivo Departamento de Hematopatología de MD Anderson Cancer Center (Houston) y 4 casos del departamento de Patología del Hospital San Bortolo (Vicenza, Italia). Los acuerdos de transferencia de material fueron firmados por el IDIVAL y las instituciones colaboradoras.

En todos los casos se confirmó el diagnóstico histopatológico siguiendo los criterios diagnósticos de la OMS (Swerdlow SH et al, 2017), los cuales incluyen entre otros la negatividad para marcadores pan B (CD20), HHV-8 y ALK y la expresión de marcadores de diferenciación plasmocelular.

Se han recogido en todos los casos los datos clínicos. Se revisó y anotó en todos los casos: sexo, edad, localización de la biopsia, infección por VIH, trasplante previo u otras inmunodeficiencias, síntomas CRAB que se relacionan con el mieloma múltiples (lesiones óseas, anemia, problemas renales, hipercalcemia), componente M, e infiltración neoplásica en médula ósea (**tabla 3**).

El estudio y la recolección de muestras fueron aprobadas por el comité de ética local (CEIC, Cantabria) y cumple con la declaración de Helsinki. Se ha obtenido el consentimiento informado por escrito cuando fue necesario.

3.2. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

El diagnóstico histopatológico de LLP y LPB se establece siguiendo los criterios diagnósticos vigentes en la OMS, mediante el estudio morfológico, fenotípico y molecular de todos los casos estudiados (Swerdlow SH et al, 2017).

Para el estudio histológico se realiza técnicas de tinción mediante hematoxilina-eosina (H&E) que consiste en una mezcla de colorantes, que permite visualizar y diferenciar la estructura de los tejidos.

La IHQ es un método que permite, mediante el uso de anticuerpos (Ac) marcar las proteínas y evaluar su expresión a nivel celular.

El método de conjugación que se utiliza en IHQ es un método de conjugación indirecto, donde el marcador va unido a un Ac secundario. El Ac primario se une por medio de sus fragmentos Fab al antígeno, siendo reconocido su fragmento Fc por un Ac secundario. Este dominio Fc es igual para todos los Ac de una misma especie determinada, por lo que un mismo Ac secundario será capaz de unirse a distintos tipos de Ac primarios.

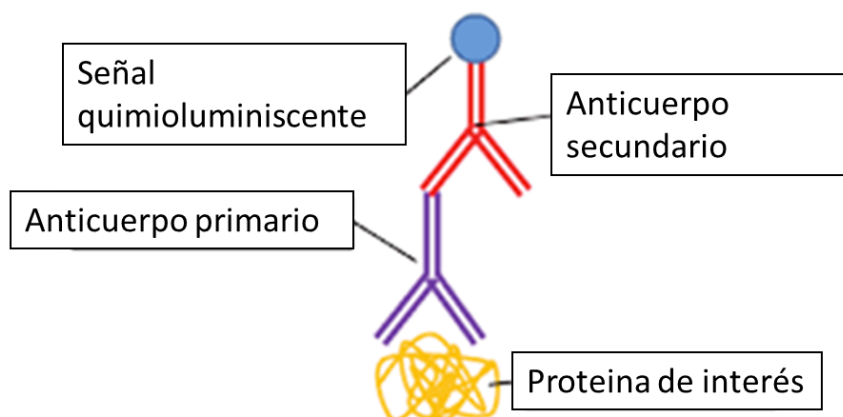


Figura 5. Inmunohistoquímica indirecta.

Al añadir el sustrato de la enzima, se genera un producto visible donde se encuentra el elemento tisular buscado (más el Ac y la enzima) permitiendo a su vez identificar su localización dentro de la muestra tisular.

Las técnicas de IHQ, se realizaron siguiendo los procedimientos convencionales automatizados en todos los casos (**tabla 4**).

-Para el diagnóstico de LLP se utilizaron los siguientes Ac: CD20, PAX-5, CD138, MUM1, Kappa, Lambda, Triptasa, IgM, DBA-44.

-Para el diagnóstico de LPB se utilizaron los siguientes Ac: CD20, PAX-5, CD138, CD38, IRF4/MUM-1, Blimp-1, Kappa, Lambda, BCL-6, BCL-2, CD10, Ki67, C-MYC, HHV-8, EBV-LMP1, CD30, ALK, p53, Phospho-STAT3 (Tyr705), PD-L1 (clon 22C3), PD1, CD3, CD4, CD8, CD163 y HLA-DP/DR.

Micromatrices de tejido, (del inglés *Tissue Microarrays*, TMAs)

El microarray de tejido (o micromatriz tisular) se construye adquiriendo muestras cilíndricas de tumores o zonas de interés a partir de los bloques de parafina. Todos los cilindros así obtenidos se incorporan a un bloque de parafina receptor, que es a su vez cortado en múltiples secciones para la realización de técnicas de interés.

El microarray de tejido tiene varias ventajas y aplicaciones, nos permite analizar el perfil de expresión de nuestros Ac de interés en múltiples tejidos normales y tumorales al mismo tiempo, asegurando la homogeneidad del protocolo y consiguiendo una comparación fiable de los resultados inmunohistoquímicos en menor tiempo.

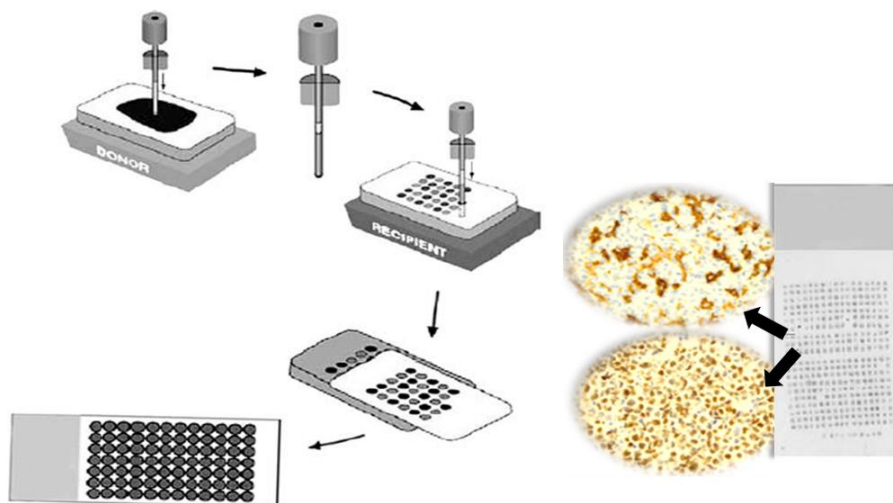


Figura 6. Procedimiento de elaboración de micromatrices de tejido.

Se realiza mediante la obtención de muestras cilíndricas en zonas relevantes para el estudio en los bloques de parafina seleccionados y su posterior incorporación en un bloque de parafina receptor, que puede ser cortando en múltiples secciones permitiéndonos realizar técnicas IHQ o FISH, de forma homogénea y de manera más rápida.

Realizamos en las muestras de LPB un TMA para la realización de técnicas de IHQ y FISH para MYC. Un subgrupo de casos procedentes del centro MD Anderson Cancer Center (Houston) se incluyeron en un TMA adicional. Se realizaron diecinueve cortes de los TMA, para las siguientes técnicas de IHQ: C-MYC (x2), Phospho-STAT3(x2), HLA-DP, CD163, PD-L1 (22C3), PD1, CD2, CD3, CD8, CD4, CD56, CD57, TIA-1, TCRDELTA, TCRBF1, GranzimaB, Perforina. En aquellos casos en los que no se disponía de suficiente tejido para realizar TMA se realizó el estudio IHQ y FISH en secciones completas del bloque FFIP original.

3.3 HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA, HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE Y CARIOTIPO CONVENCIONAL.

La hibridación in situ, es un método para localizar ácidos nucleicos en un tejido, mediante la hibridación de sondas complementarias marcadas.

La FISH utiliza sondas que emiten fluorescencia (ADN complementario marcado) para encontrar los fragmentos diana por hibridación. Puede utilizarse para detectar alteraciones en cromosomas incluyendo deleciones de genes, amplificaciones, traslocaciones y fusiones.

Para la detección de la deleción de 6q mediante FISH usamos una sonda XL 6q21/6q23/6cen, *Metasystems*. La sonda específica de locus XL 6q21 / 6q23 / 6cen detecta deleciones en el brazo largo del cromosoma 6. La sonda marcada en verde se hibrida con una región específica en 6q21 que incluye el gen SEC63. La sonda marcada con naranja hibrida específicamente con la región del gen MYB en 6q23. Una sonda marcada en azul que hibrida con el centrómero del cromosoma 6 funciona como una sonda de referencia. Para interpretar los resultados, se consideró positivo un caso cuando presentaba deleción de 6q en al menos el 10% de las células.

Existen dos estrategias diferentes para estudiar los reordenamientos mediante FISH, cada una con un tipo de sonda de locus específico diferente: las sondas de doble fusión o colocación y las sondas de separación.

En nuestro trabajo utilizamos en un primer paso sondas *Dual Color Break Apart*, que involucran la región específica del gen *MYC* en el cromosoma 8q24. (*Abbott Molecular*). Se basa en el empleo de dos sondas específicas de locus que flanquean el punto de ruptura de gen a estudio. Al menos un 10% de células con señal break apart fueron requeridas para considerar un caso reordenado y al menos un 15% de células con copias extra para el gen *MYC*, fueron necesarias para considerar un caso positivo para ganancias del número de copias del gen *MYC*.

También se utilizaron sondas *Dual Fusion Translocation* que nos permiten detectar la yuxtaposición del locus de cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IgH) y la región del gen *MYC* en interfase.

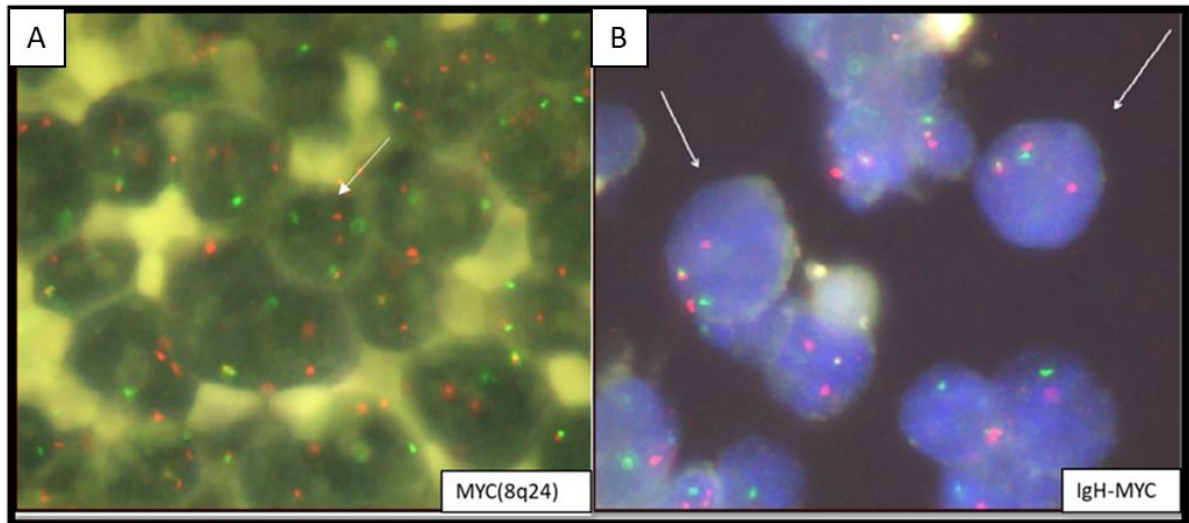


Figura 7. FISH, para estudio de reordenamientos en el gen *MYC*, con sondas *Dual Color Break apart* y *Dual Fusion Translocation*.

En la imagen de la izquierda (A) se muestra una imagen de un caso con traslocación de *MYC*. Las células normales muestran un patrón con dos señales de fusión, mientras que células con traslocación que implica al gen *MYC*, presentan una señal roja, una señal verde y una señal de fusión. En la imagen de la derecha (B) se muestra una imagen de un caso con reordenamiento *IgH-MYC*. En una muestra normal el patrón de hibridación con esta sonda es de dos señales rojas, dos señales verdes. Cuando existe translocación t(8:14) recíproca aparece un patrón de una señal roja, una señal verde, dos señales de fusión.

Para la detección del VEB se realizó hibridación in situ cromogénica (CISH), que utiliza sondas marcadas con haptenos, en vez de sondas marcadas con fluorocromos. Los híbridos se detectan por métodos de IHQ, produciendo una reacción colorada visible al microscopio óptico. Se utilizó una sonda anti ARN viral de EBV (EBER) y un KIT de detección PNA ISH (*Dako Cytomation*). Una vez obtenidos los resultados, EBER fue considerado positivo cuando había más de un 80% de células grandes atípicas positivas.

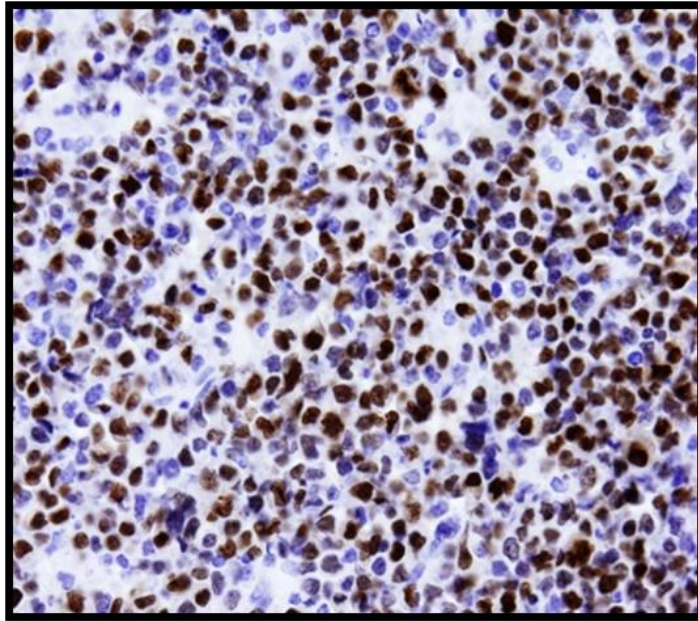


Figura 8. Hibridación cromogénica in situ (CISH), con sondas anti RNAs de EBV (EBER). Imagen de un caso de nuestra serie de LPB, en el cual se identifican más del 80% de células neoplásicas positivas para EBER.

3.4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

En los casos de LPB, se realizó una cuantificación de la expresión de marcadores IHQ y factores de transcripción, con el objetivo de estudiar qué células inmunitarias están implicadas, así como la activación de vías oncogénicas. Para la cuantificación de las poblaciones celulares del microambiente tumoral y la expresión de factores de transcripción hemos desarrollado un método que nos permite la cuantificación de las diferentes subpoblaciones celulares. Realizamos las siguientes técnicas IHQ: CD3, CD8, PD1, CD163, PD-L1 (clon 22C3) y MHCII/HLA DP/DR, para identificar las diferentes poblaciones celulares y MYC y P-STAT3 para el estudio de factores de transcripción.

En cada caso, se realizó fotografías de 3 campos representativos de gran aumento (CGA) (40x.) usando microscopio modelo Leica (DM2000LED) con cámara (Leica ICC50W). Se seleccionaron las áreas con mayor positividad (hotspots) en cada una de las técnicas.

Todos los marcadores de IHQ se cuantificaron y se calculó la media de células positivas en los tres campos seleccionados. Se tuvo en cuenta la localización subcelular del antígeno (i.e de membrana con CD3 o nuclear con C-MYC). Para la cuantificación de marcadores como PD-L1, se cuantificó la población tanto en las células neoplásicas como en las células del microambiente tumoral. La técnica IHQ MHCII/HLA DP/DR únicamente se cuantificó en las células neoplásicas. El patrón de tinción se anotó como tinción citoplasmática o de membrana.

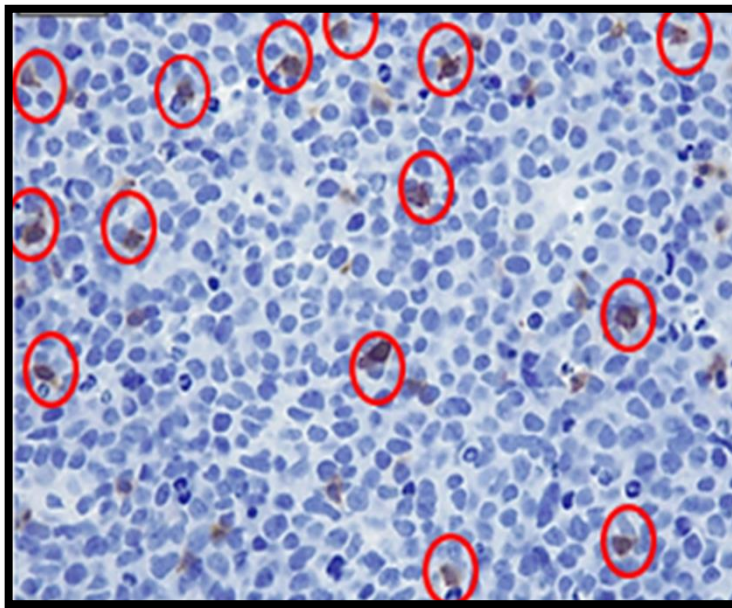


Figura 9. Cuantificación del microambiente tumoral en linfoma plasmablástico.

Imagen representativa de la cuantificación en un campo de gran aumento (40x) de la expresión de PD1. Se contabilizaron 14 células (linfocitos T) con tinción positiva para PD1 en un campo de gran aumento. Se calculó la media de expresión en tres campos de gran aumento de las áreas más positivas (*hot-spots*).

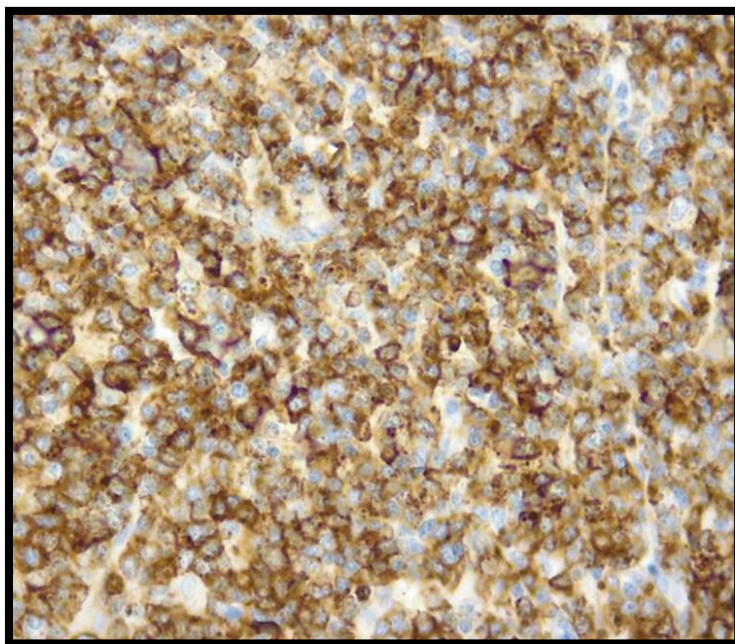


Figura 10. Imagen inmunohistoquímica de la expresión MHCII/HLA (DP, DR).

Se identificaron dos patrones de tinción mediante MHCII/HLA (DP, DR), en la imagen se observa un caso de nuestra serie de LPB que muestra una tinción citoplasmática granular y de membrana.

3.5. PCR ALELO-ESPECÍFICA PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN *MYD88*pL265P.

La PCR a tiempo real permite cuantificar el producto obtenido a partir de cada muestra, mientras se lleva a cabo la amplificación. El equipo se compone de un termociclador y un lector de fluorescencia, acoplado al ordenador, el cual permite monitorizar la amplificación de una secuencia específica en tiempo real. La PCR alelo específica permite realizar una amplificación diferencial del ADN molde con presencia de la mutación puntual y del ADN molde *wild type*. Para esto se generaron sondas *Taqman custom* para la detección de la mutación L265P en *MYD88* (Martinez-Lopez A. et al, 2015).

Esta tecnología se ha validado para uso clínico en nuestro laboratorio. Los resultados de validación de esta metodología mostraron una especificidad del 100% para la

identificación de la mutación *MYD88pL265P*. El límite de detección es del 5% para muestras FFIP y del 1% a partir de ADN en fresco.

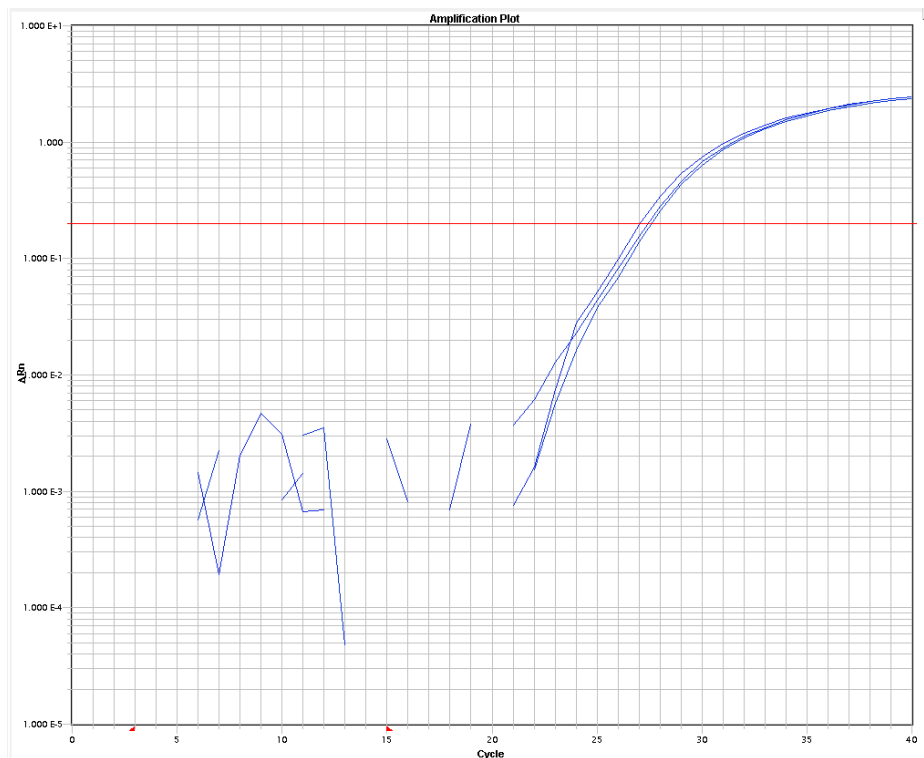


Figura 11. PCR alelo específica a tiempo real, para la detección de la mutación de *MYD88pL265P*.

En la imagen se muestran los datos de la amplificación mediante RT-PCR para *MYD88pL265P* en un caso de la serie de LLP que presentaba la mutación. Se muestran las curvas por triplicado obtenidas tras amplificación con la sonda específica para el ADN mutado. Esta técnica está basada en la detección y cuantificación de un *reporter* fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR generado en la reacción. En el eje de las abscisas se muestra el número de ciclos de PCR (Ct) y en el eje de las ordenadas la intensidad de emisión del fluoróforo. El Ct es inversamente proporcional al número de copias del ADN diana.

3.6. SECUENCIACIÓN DIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN CXCR4

El método de Sanger utiliza una ADN-polimerasa para copiar un ADN molde (ADN a secuenciar). El método se basa en que junto con los desoxinucleótidos o dNTPS

normales, se incluyen didesoxinucleótidos o ddNTPS (marcados con un fluorocromo diferente), que son unos análogos químicos de los dNTPs que carecen del grupo hidroxilo en 3' necesario para formar el enlace entre un nucleótido y el siguiente en la hebra de ADN.

Como la incorporación de los ddNTPs en lugar de los dNTPs ocurre al azar, el resultado es una colección de fragmentos de ADN de diferente longitud, los cuales se separan en función del tamaño mediante electroforesis capilar (Sanger F et al, 1975; Sanger F et al 1977). Un detector fluorimétrico registra el color de la fluorescencia que emiten los fragmentos de ADN según van diluyendo del capilar, de menor a mayor tamaño.

En cuatro casos de nuestra serie de LLP con ADN disponible, se ha realizado, para la detección de las mutaciones sin sentido y mutaciones con cambio de marco de lectura, del dominio C terminal de *CXCR4*, secuenciación directa Sanger siguiendo la metodología previamente descrita (Ballester et al, 2016).

Se utilizaron cebadores marcados con M13 para *CXCR4*:

Fw: 5'TGTAAAAC GACGGCCAGTTT TCTTCCACT GTTGTCTGAACC-3' y reverse:
5'CAGGAAACAGCTATGACCgactgactgactgactgactgatgactgactgactgactACATCTGTGTT
AGCTGGAGTGA-3'.

Un producto adecuado de PCR (268 pb) fue confirmado mediante gel de agarosa y posteriormente se purificó el ADN. La reacción de PCR de secuenciación se realizó usando los primers M13 Pw y reverse: M13 forward (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') M13 reverse (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3').

Posteriormente se realizó secuenciación directa en ABI13130 instrument (Applied Biosystems) en ambos sentidos, forward y reverse. Finalmente, las secuencias fueron procesadas y analizadas usando el Software de Análisis de secuenciación V5.2 y Chromas.

3.7. SECUENCIACIÓN DE ÚLTIMA GENERACIÓN A PARTIR DE LIBRERIAS BASADAS EN AMPLICONES.

El principio fundamental de las técnicas de NGS es similar en muchos aspectos al método de secuenciación de Sanger: el ADN molde se fragmenta y la secuencia de bases se determina mediante las señales emitidas por los nucleótidos cuando se incorporan a la hebra creciente de ADN.

Las técnicas de secuenciación masiva, NGS, son capaces de procesar millones de muestras en paralelo, acelerando el proceso de secuenciación a un coste más reducido. Estas técnicas tienen el potencial para detectar diversos tipos de variaciones genómicas en un único análisis (Heather J M et al, 2016; Behjati S et al, 2013; Buermans HPJ et al, 2014).

Los principios en los que se basa la NGS, consta de los siguientes pasos:

- Fragmentación al azar del ADN genómico y acoplamiento de adaptadores en los extremos.
- Inmovilización de los fragmentos de ADN molde en una superficie y amplificación para producir un elevado número de copias idénticas de cada ADN molde.
- Secuenciación de los fragmentos de ADN mediante ciclos consecutivos de adición de sustrato y detección.

La detección en este caso se realiza bioquímicamente, por la incorporación de nucleótidos marcados y análisis de imagen (Shendure J et al; 2017).

Los conceptos que se utilizan para medir la calidad de la técnica molecular son:

- Amplitud de cobertura: Regiones del genoma (%) cubiertas por la secuenciación.
- Profundidad de cobertura: Número de veces que cada base ha sido secuenciada.

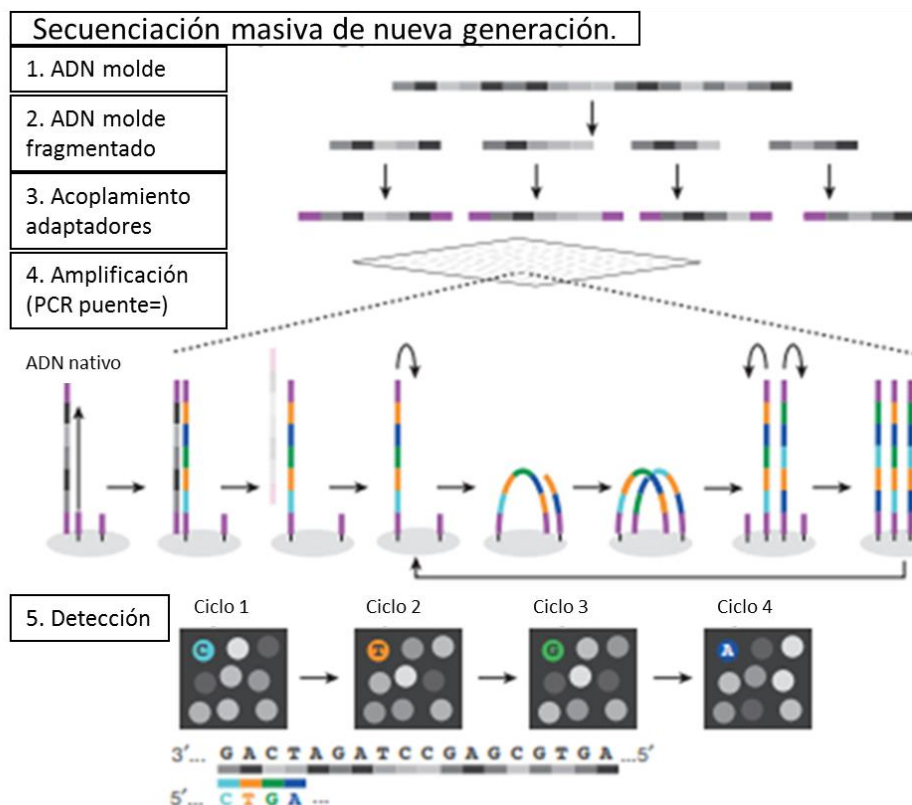


Figura 12. Método de secuenciación masiva de segunda generación-NGS (Imagen modificada de Shendure,J et al, Nature 2017).

Para el estudio nuevas mutaciones que pueden estar implicadas en la patogenia de los linfomas con diferenciación plasmocelular realizamos NGS a partir de librerías basadas en amplicones.

Protocolo de secuenciación dirigida:

1. Extracción del ADN: el ADN fue extraído de tejido FFIP de los casos disponibles, usando *PicoPure™ DNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific)* y fue cuantificado mediante *Qbit fluorometer (ThermoFisher Scientific)*.

Todas las muestras de LPB en las cuales se realizó NGS se requirió que tuvieran más de un 50% de células neoplásicas identificadas morfológicamente (H&E), mientras que en las muestras de LLP en las cuales se realizó NGS se requirió que tuvieran más del 10% de células B clonales identificadas por CMF o IHQ.

2. Diseño de la librería: se realizó el diseño de una librería *TruSeq® Custom Amplicon Low Input Library*, la cual contiene regiones exónicas de 35 genes de interés: *CARD11, ARID1A, NOTCH1, TCF3, SMARCA4, STAT6, EP300, CREBBP, MLL2, BTK, NOTCH2, TNFRSF14, ATM, FOXO1, B2M, PLCG2, CD79B, TP53, STAT3, BCL2, MEF2B, CD79A, CXCR4, PTPN1, MYD88, FAT2, PRDM1, TNFAIP3, SGK1, CCND3, PIM1, EZH2, BRAF, MYC, NOTHC2*. A continuación, se procedió a la amplificación del ADN para su posterior secuenciación (Illumina).

Para la generación de librerías se purificó cada PCR siguiendo el protocolo del fabricante y se determinó la concentración de las librerías. Dependiendo de la disponibilidad del ADN, entre 6ng y 400 ng de ADN fueron utilizados para preparar las librerías. Dos librerías complementarias de cada muestra de tumor FFIP fueron preparadas con el propósito de reducir la tasa de identificación de cambios relacionados con deaminación asociados al procesamiento del tejido.

3. Secuenciación: Después de preparar las librerías para las muestras de LLP y LPB y realizar la cuantificación de las librerías se secuenciaron mediante *HiSeq instrument (Illumina, paired end, 2x150)* en el Centro de Análisis Genómico (CNAG, Barcelona, España).

4. Análisis bioinformático: Posteriormente a la secuenciación se aplica un protocolo de análisis bioinformático normalizado para la identificación de variantes.

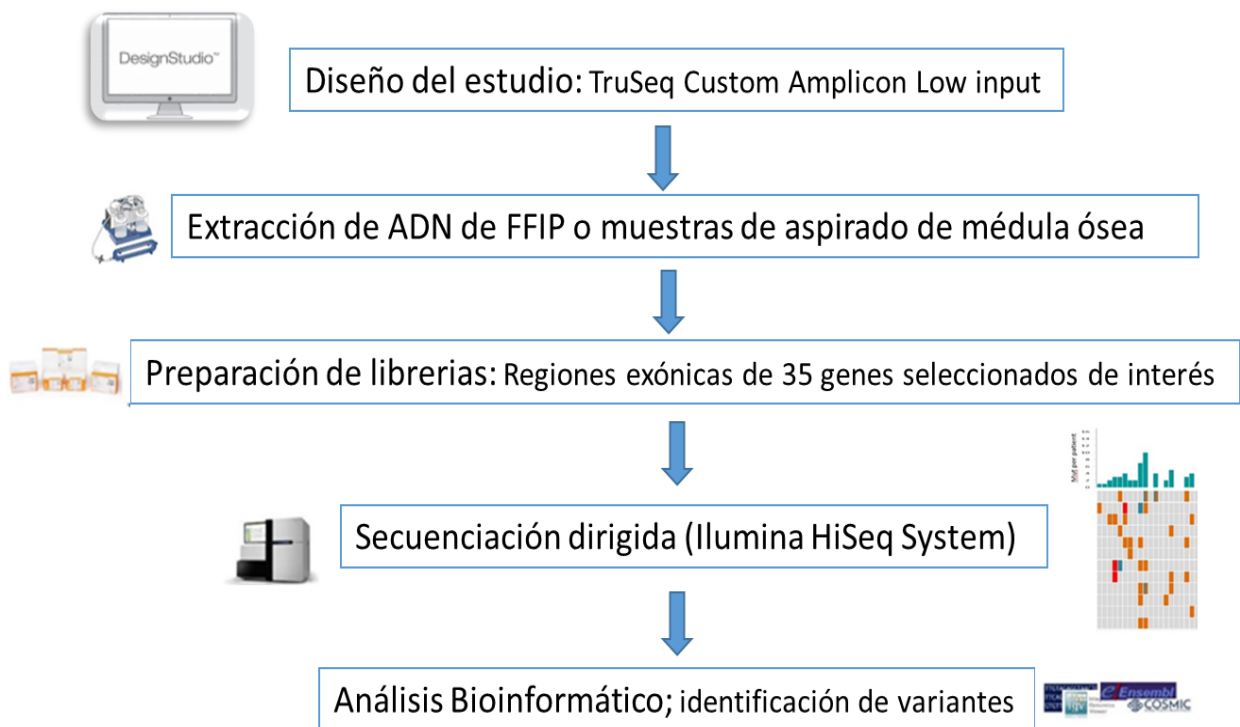


Figura 13. Flujo de trabajo de secuenciación dirigida mediante NGS.

3.8. INTERPRETACIÓN Y RECOGIDA DE DATOS DE SECUENCIACIÓN DE ÚLTIMA GENERACIÓN

Las lecturas se asignaron según la referencia del genoma humano hg19 con secuencias señuelo (hs37d5) utilizando el Kit de herramientas *GEM* (versión 3 (Marco-Sola S et al, 2012). Se utilizó el kit de herramientas de análisis del genoma (*GATK*) (McKenna A et al, 2010) para el alineamiento de secuencias. La identificación de variantes se realizó utilizando *HaplotypeCaller* de *GATK* siguiendo las guías prácticas recomendadas.

Se agregaron anotaciones funcionales usando *SnpEff*, que anota y predice los efectos de las variantes genéticas en genes y proteínas, con la base de datos GRCh37.75 (Cingolani P et al, 2012). Las variantes se anotaron con *SnpSift* (Cingolani P et al, 2012; Liu X et al, 2013).

En todos los casos se obtuvieron datos de secuenciación de ambas librerías complementarias. Solo se seleccionaron para el análisis posterior variantes en las que en ambas bibliotecas tenían una profundidad mayor o igual a 300 lecturas y tenían el mismo genotipo.

Posteriormente solo mutaciones somáticas con cambio de sentido (*missense*), mutaciones con pérdida de la pauta de lectura (*frameshift*), y mutaciones sin sentido (*nonsense*) con frecuencias alélicas superiores al 10% fueron consideradas.

Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) se filtraron según la comparación de las frecuencias alélicas de las variantes, con la cuantificación de las células B clonales por CMF / IHQ y después de la búsqueda en dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

Se verificó la base de datos *COSMIC* (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) en todos los casos y se anotó el *COSMIC Id*. Se utilizaron tres algoritmos para predecir las consecuencias funcionales de las variantes encontradas: *SIFT* (<http://sift.bii.aster.edu.sg/>), *Polyphen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) y *Condel* (<http://bg.upf.edu/fannsdb/>).

Las variantes seleccionadas se visualizaron usando *Integrative Genomics Viewer* (IGV, Robinson JT et al, 2011).

Finalmente, se consideraron en los casos estudiados de LLP 16 mutaciones somáticas: 15 mutaciones sin sentido (*nonsense*) y 1 mutación con pérdida de la pauta de lectura (*frameshift*), en 5 genes. (**tabla 5**). En los casos estudiados de LPB se consideraron 34 mutaciones somáticas: 31 con cambio de sentido (*missense*) y 3 sin sentido (*nonsense*), en 14 genes (**tabla 6**).

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El *software XLSTAT Biomed* (versión 19.4), se utilizó para el análisis estadístico. Se realizaron estudios estadísticos descriptivos.

IV. RESULTADOS.

4.1. LINFOMA LINFOPLASMACÍTICO:

Características clínicas

En relación a las características clínicas de los LLP; la cohorte consistió en 28 pacientes, de los cuales 20 eran hombres (70%) y 8 mujeres (30%). La mediana de edad al diagnóstico fue 72 años (rango de 49 a 89 años).

El diagnóstico se realizó siguiendo los criterios diagnósticos de la versión más reciente de la clasificación de la OMS (Swerdlow SH et al, 2017). Diecinueve de 28 pacientes (68%) cumplieron los criterios diagnósticos de LLP/MW, 5 pacientes fueron clasificados como LLP asintomáticos (19%) y 4 casos como GMSI-IgM.

Entre los casos de LLP/MW la presentación clínica más frecuente incluyó anemia (65%), síntomas constitucionales (60%) y síntomas relacionados con la hiperviscosidad (50%). Cinco pacientes presentaron clínica de neuropatía relacionada con la enfermedad, 1 solo paciente presentó crioglobulinemia. Se identificó esplenomegalia palpable en 2 pacientes (10 %) y afectación ganglionar detectada por pruebas de imagen en 9 pacientes (45%). En 3 pacientes se confirmó la afectación nodal mediante biopsia. Ninguno de los pacientes presentó infección por VHC (**tabla 1**).

Estudio histopatológico y fenotípico

Todos los casos mostraron la presencia de linfocitos B pequeños, linfocitos plasmocitoides y células plasmáticas con diferentes grados de diferenciación plasmocelular. Se observaron cuerpos de Dutcher, pero no de manera frecuente.

Una muestra mostró una ausencia total de células linfoides B, estando únicamente compuesta por células plasmocitoides y células plasmáticas (caso n4 GMSI-IgM).

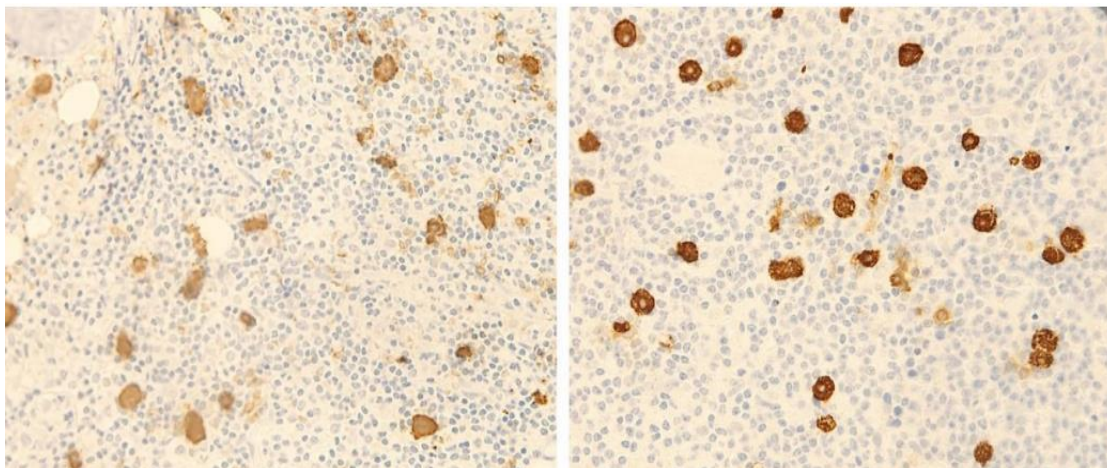


Figura 14. Imágenes representativas del % de infiltración de células mastocitarias en biopsias médula ósea de pacientes con diagnóstico de LLP. (Triptasa x 40).

Las células mastocitarias se evidencian histoquímicamente mediante Triptasa, apreciándose en ambas imágenes mastocitosis salpicados en dos casos de nuestra serie de LLP con un porcentaje de infiltración entre el 5-10%.

En cuanto al fenotipo, todos los casos mostraron un fenotipo compatible con LLP. Se sobreexpresó PRDM1 / Blimp1, en el componente diferenciado de células plasmáticas en 6 de los 6 casos estudiados. Se realizó DBA44 en 15 casos. En 5 casos, la tinción de DBA44 estaba en un rango de entre 1-5% de la celularidad. En 10 casos la tinción fue negativa.

Se realizó triptasa en 18 muestras para poner de manifiesto la población de células mastocitarias. En 5 muestras (28%) los mastocitos comprendían <5% de la celularidad de la médula ósea. En 13 muestras (72%) el porcentaje de mastocitos se encontraba entre un 5-10%.

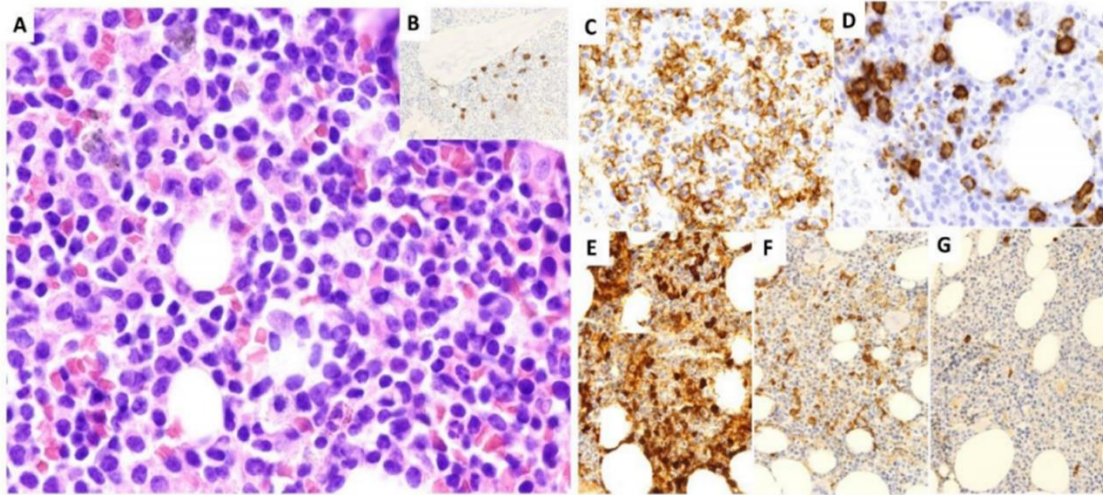


Figura 15. Características histológicas e inmunofenotípicas del linfoma linfoplasma

A) El infiltrado neoplásico en médula ósea está compuesto por células linfoides pequeñas, células plasmocitoides, y células plasmáticas. Células con cuerpos de Dutcher son características, así como histiocitos salpicados con hemosiderina y mastocitos, que se ponen de manifiesto mediante Triptasa (B). Se evidenció expresión de CD20 (C), CD138 (D), IgM (E), y restricción de cadenas ligeras (F, Kappa, G, Lambda).

*Patrones de infiltración en médula ósea

Se realizó el estudio histológico de las 35 muestras de biopsias de médula ósea. 31 muestras de pacientes con diagnóstico de LLP y 4 muestras con diagnóstico de GMSI-IgM. En relación al patrón de infiltración, 21 muestras (67%) mostraron un patrón de infiltración paratrabecular combinado con un patrón de infiltración intersticial.

Los patrones intersticiales combinados con patrón paratrabecular que se observaron fueron los siguientes: Nueve muestras presentaron un patrón intersticial parcheado (25%), 7 muestras un patrón intersticial nodular (19%) y 5 muestras un patrón intersticial difuso (13%).

Las otras 10 muestras (32%) mostraron un patrón no paratrabecular con infiltración intersticial. En 3 muestras se identificó un patrón intersticial parcheado, en 2 muestras un patrón intersticial nodular, en 1 muestras un patrón intersticial difuso y en 4 muestras un patrón intersticial difuso-sólido.

Las muestras que presentaron un patrón de infiltración intersticial parcheado procedían de dos pacientes (n10, n24,) los cuales tenían biopsias de médula ósea previas donde se evidenciaba un infiltrado significativo.

Los 4 casos de GMSI-IgM mostraron un patrón de infiltración intersticial parcheado.

Se recogen los patrones de infiltración de médula ósea en la **tabla 7**.

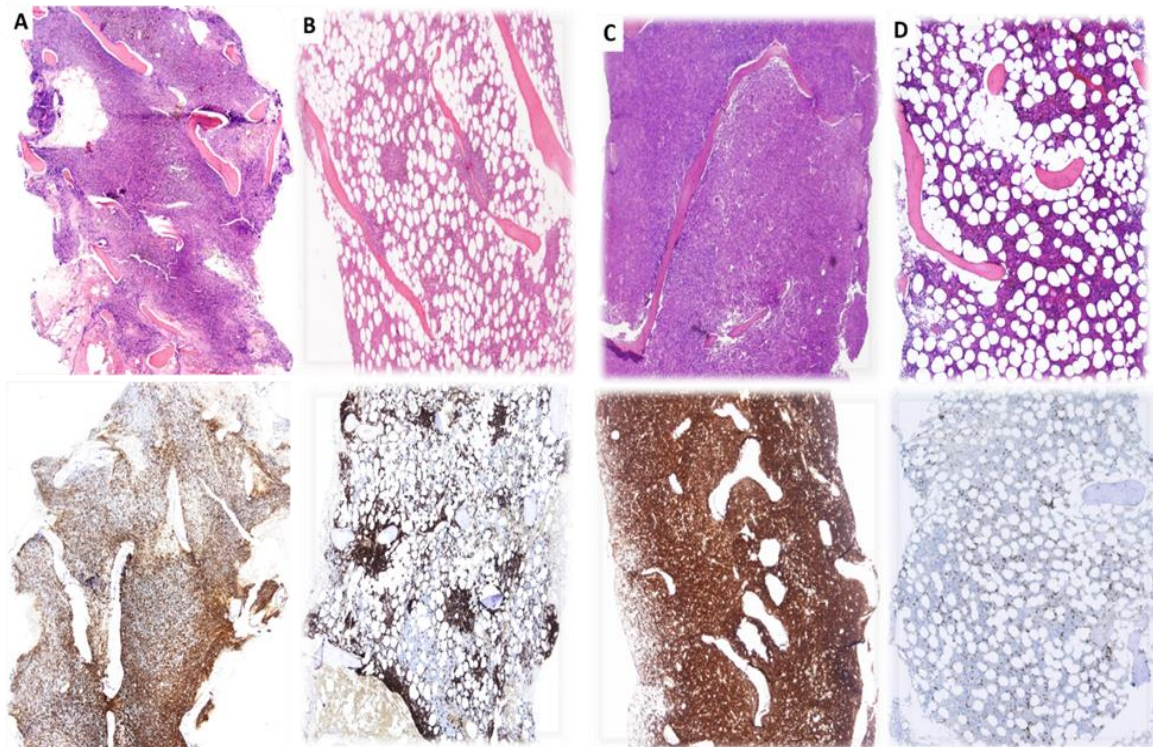


Figura 16. Patrones de infiltración del linfoma linfoplasmacítico en médula ósea. (H&E x10; CD20 x10).

Imágenes mediante H&E e IHQ para CD20 de los patrones de infiltración en médula ósea en orden de mayor a menor frecuencia.: A) patrón de infiltración combinado paratrabecular e intersticial-difuso; B) patrón de infiltración combinado paratrabecular e intersticial-nodular; C) patrón de infiltración intersticial difuso-sólido; D) patrón de infiltración intersticial parcheado.

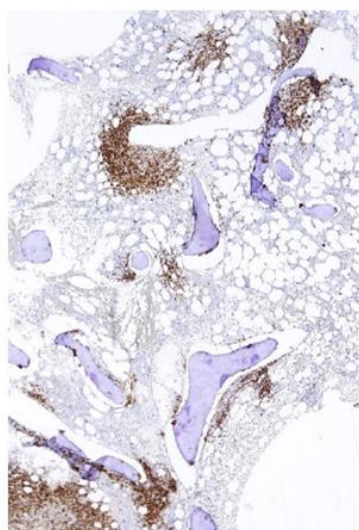
En contraste, solo 6 de 23 casos (25%) de LZM (19 casos de LZM esplénico, 3 LZM nodal y 1 caso de linfoma de tipo MALT) mostraron un componente paratrabecular y solo 1 de los 24 casos (4%) de LLC mostró este tipo de patrón. El patrón de infiltración más común en LZM fue intersticial e intrasinusoidal (10 muestras, 42%), seguido de un patrón intersticial (8 muestras, 33%). En los casos de LLC se mostró un patrón casi puramente intersticial (22 muestras, 96%) (**tabla 2**).

Cuantificación del infiltrado en médula ósea de las células B.

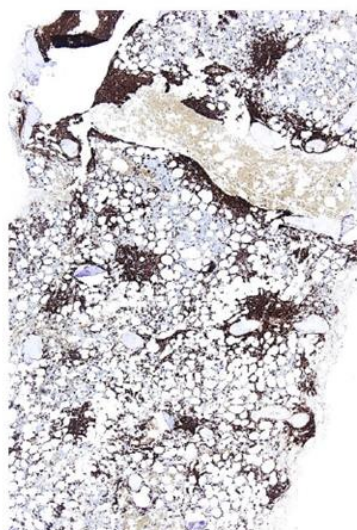
Se cuantificó el infiltrado neoplásico en médula ósea usando técnicas de IHQ. Utilizamos CD20 para la identificación de linfocitos B y CD138 para la identificación de células plasmáticas. Se cuantificó el porcentaje de infiltración mediante CD20 en las 35 muestras biopsia de médula ósea, obteniendo una mediana del 20% (rango del 0% al 80%) y un porcentaje de infiltración total mediante CD20 y CD138 del 40% (rango del 5% al 90%).

Mediante CMF realizado en material de aspirado de médula ósea se identificó un porcentaje de infiltración de células B clonales del 6,6% (rango de 0% al 62%).

Por lo tanto, la cuantificación de células B mediante IHQ usando CD20, mostró mayor porcentaje de infiltración que por CMF en 32 de los 35 casos estudiados (prueba de Wilcoxon $p < 0,0001$). A su vez, se identificó una alta correlación entre la cuantificación de las células B usando CD20 por IHQ y la cuantificación de células B clonales por CMF (Pearson 0.78, valor de $p < 0.0001$).



Case n16
CD20 IHC estimation 20%
Clonal B cells FCM 2.2%



Case n15
CD20 IHC estimation 30%
Clonal B cells FCM 3.5%

Figura 17. Infiltración por células B mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo.

Ejemplos representativos de casos con resultados discordantes en el porcentaje de infiltración de células B en médula ósea. En ambos ejemplos la estimación de células B positivas para CD20 fue mayor al 10%, mientras que la cuantificación de células B clonales mediante CMF fue considerada por debajo de este porcentaje. Ambos casos fueron clasificados como LLP.

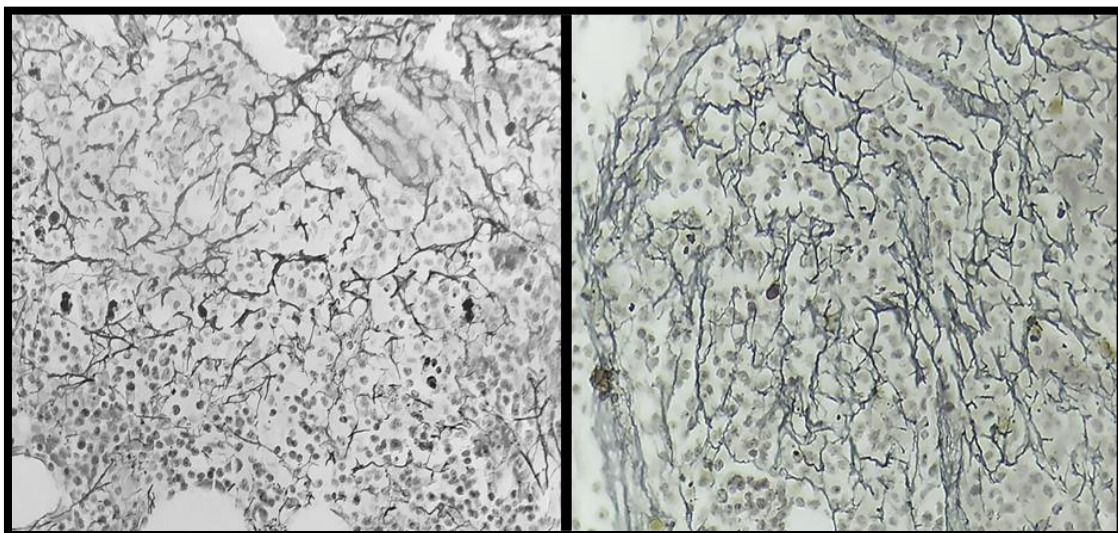


Figura 18. Técnica histoquímica de Reticulina en dos casos de la serie de linfoma linfoplasmacítico.

En las imágenes se muestra la técnica histoquímica de Reticulina (x60), que evidencia la fibrosis reticulínica asociada a los infiltrados neoplásicos en dos casos de la serie LLP. La fibrosis reticulínica asociada a los infiltrados neoplásicos predominantemente paratrabeculares podría suponer uno de los motivos de subestimación del infiltrado neoplásico mediante CMF.

Respecto a la correlación entre el porcentaje de infiltración neoplásica en médula ósea y la presencia de síntomas atribuibles a la enfermedad, no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de infiltración en los casos LLP asintomáticos y los casos LLP sintomáticos. Como se muestra en la **tabla 8**, los casos de LLP sintomático (6, 7, 14, 23, 28) tenían un porcentaje medio de células B por IHQ del 20% (rango 10%-35%) y un porcentaje de células B por CMF del 6.6% (rango 1.6-18.5%).

*PCR alelo específica para *MYD88pL265P*.

Veintidós de los 24 casos de LLP / MW (92%) fueron positivos para la mutación *MYD88pL265P*, mediante PCR alelo específica. En 1 de los dos casos negativos, la cuantificación de las células B clonales en la muestra analizada fue inferior al límite de detección de la técnica, por lo tanto, no se puede descartar que se trate de un falso negativo. Uno de los 4 casos de GMSI-IgM fue positivo para *MYD88pL265P*.

La mediana de la frecuencia alélica de los 23 casos mutados fue de 9% (rango 0-72%). El único caso de GMSI-IgM positivo para *MYD88pL265P* tuvo una FAV del 4%.

La correlación entre la cuantificación en las muestras evaluadas mediante PCR alelo específica y la cuantificación mediante CMF en material de aspirado de médula ósea, en las 27 muestras evaluadas fue significativa (valor de correlación de *Spearman* 0.477, p valor de 0.013) así como la correlación entre la cuantificación mediante PCR alelo específica y la cuantificación mediante IHQ para CD20 en biopsias de médula ósea (Valor de correlación de *Spearman* 0.457, valor de p 0.017).

Perfil genético del linfoma linfoplasmacítico

Un resumen de los resultados se muestra en la **figura 19** y **tabla 5**.

Nueve de 11 casos estudiados mediante secuenciación dirigida presentaron la mutación *MYD88*pL265P y 2 casos fueron negativos para la mutación (n21, n22). En 6 de estos 9 casos, solo se encontró la mutación *MYD88*pL265P sin encontrarse alteraciones genéticas adicionales. En los otros dos casos, se identificaron mutaciones adicionales en *PRDM1*, *MYC* (caso n15) y *KMT2D* (caso n 24). Uno de los dos casos *MYD88*pL265P *wild type*, presentó una mutación en ID3.

Se encontraron mutaciones recurrentes, diferentes de *MYD88*pL265P en *KMT2D*. Curiosamente un caso (n24) tenía dos mutaciones *KMT2D* diferentes (una mutación por desplazamiento del marco de lectura en el exón 14 y una mutación sin sentido de un solo nucleótido (c.7670C> T) en el exón 31). Este hecho sugiere la posibilidad de inactivación del gen por mutación bialélica.

Se realizó secuenciación directa Sanger, y se identificó la mutación en *CXCR4* c.1025 C> G (p. S342 *) en uno (n6) de los cuatro casos con ADN disponible (el 25%)

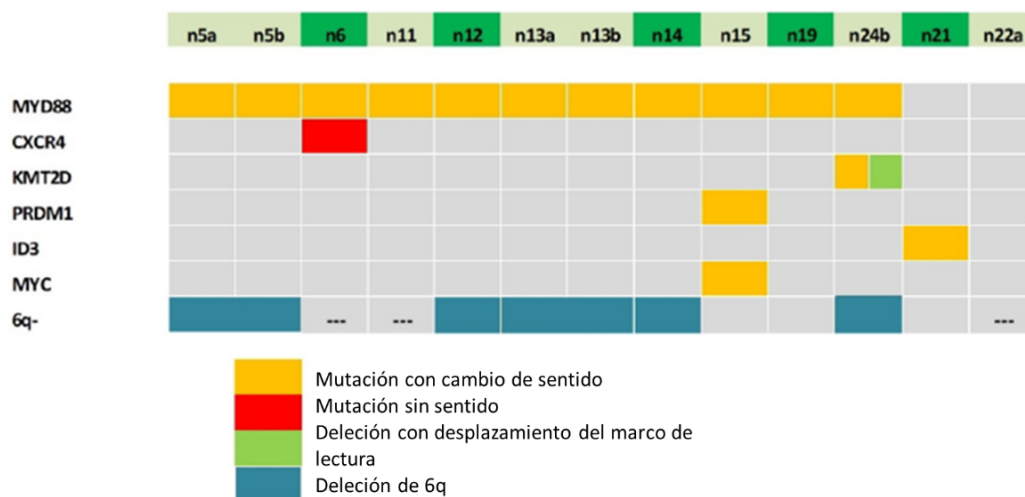


Figura 19. Perfil mutacional de los casos de linfoma linfoplasmácítico.

Resumen de las mutaciones encontradas analizadas mediante NGS. Se encontraron mutaciones somáticas adicionales a *MYD88*pL265P en aproximadamente un cuarto de los casos (3 de 11 casos), que involucraban los genes *KMT2D*, *CXCR4** *PRDM1* / *Blimp1*, *MYC* e *ID3*.

* La mutación *CXCR4* se detectó mediante secuenciación directa Sanger.

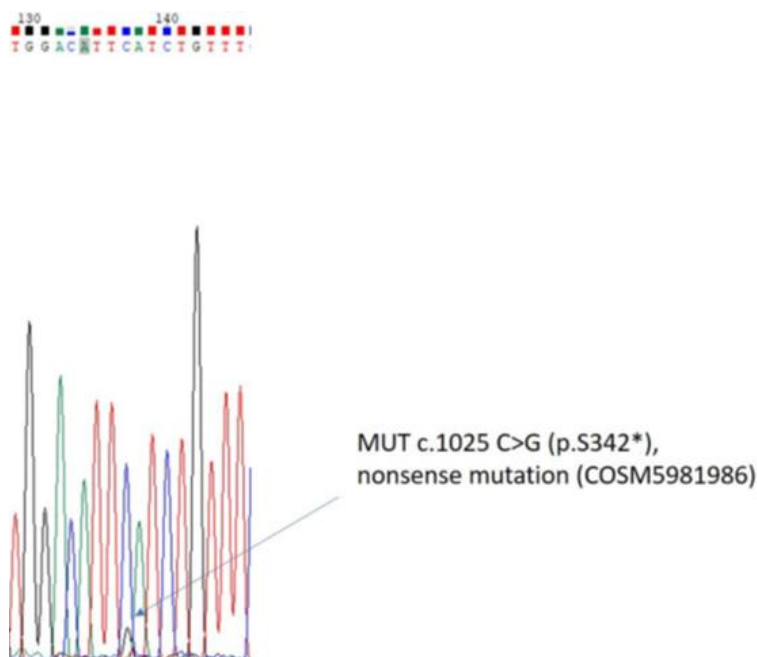


Figura 20. Mutación sin sentido *CXCR4* c.1025 C>G (p.S324*), mediante el método de secuenciación Sanger.

En la imagen se muestra el caso n6 de la serie de LLP/MW, en el cual se evidencio mediante el método previamente descrito para detectar mutaciones en *CXCR4* (Ballester et al, 2016), la mutación C1025G, que afecta al aminoácido S324 produciendo una pérdida de residuos de Serina. Este hallazgo fue confirmado por duplicado.

Por otra parte, se estudió la delección de 6q en 9 casos mediante FISH de interfase convencional y / o cariotipo convencional. Se encontró delección de 6q en 5 de 9 casos (55%) (n5, n12, n13, n14 y n25). Los cinco casos presentaron la mutación *MYD88pL265P*.

En resumen, nuestros hallazgos demuestran que la evaluación de la biopsia de la médula ósea es superior a la CMF para la cuantificación de la infiltración neoplásica. Un patrón de infiltración combinado paratrabecular e intersticial es el más frecuentemente observado en casos de LLP / MW, mientras que un patrón de infiltración intersticial parcheado es más característico en casos de GMSI-IgM. La mutación *MYD88pL265P* fue encontrada por PCR alelo específica en el 92% de los casos de LLP y el 25% de los casos de GMSI-IgM. Se encontró una correlación significativa entre la frecuencia alélica de la mutación *MYD88pL265P* y la cuantificación de la población de células B clonales por CMF y una correlación significativa entre la frecuencia alélica de la mutación *MYD88pL265P* y el % de linfocitos B mediante IHQ. El perfil genético mediante secuenciación identificó, que además de *MYD88pL265P*, se encontraron otras mutaciones somáticas en *KMT2D*, *CXCR4*, *PRDM1 / Blimp1*, *MYC* e *ID3* en una minoría de casos de LLP.

4.2. LINFOMA PLASMABLASTICO:

Características clínicas

Se obtuvieron datos clínicos de 30 pacientes con diagnóstico de LPB. La edad media al diagnóstico fue de 52 años (rango: 29-92 años). La edad media de presentación en pacientes VIH positivos fue de 41,8 años y en pacientes VIH negativos fue de 70 años. En relación al sexo, 24 fueron hombres (80%) y 6 mujeres (20%). La localización anatómica de la biopsia realizada al diagnóstico, fue cavidad oral, nasal/parasnal (40%), ganglio linfático (27%), y en menor frecuencia gastro-intestinal, recto, región perineal, tejidos blandos, piel, y ovarios. En los pacientes VIH la localización extraganglionar se encontró en el 86% de los casos.

En relación a la infección por VIH, el dato clínico estuvo disponible en 25 casos de los cuales, 15 fueron positivos (60%) y 10 negativos (40%).

De los 28 pacientes con dato disponible, 2 eran trasplantados (7%), uno de ellos era un trasplantado renal (n 1) y el otro era un trasplante alogénico de células hematopoyéticas por LLC (n 18). Ambos casos fueron VIH negativos. No se han encontrado otras inmunodeficiencias en los casos estudiados.

En relación a los síntomas CRAB recogidos en los 28 pacientes con dato disponible, solo uno presento lesiones óseas (n 14).

El componente M se recogió en doce pacientes, solo en uno fue positivo (n 36) y en ninguno de los casos estudiados hubo infiltración neoplásica en la biopsia de médula ósea.

Las características clínicas analizadas se recogen en la **tabla 3**.

Estudio histopatológico y fenotípico

Todos los casos presentaron una morfología y un inmunofenotipo acorde con los criterios diagnósticos de la WHO del 2017, como se detalla a continuación (Swerdlow SH et al, 2017).

El inmunofenotipo en los casos analizados de nuestra serie, mediante marcadores inmunohistoquímicos mostró negatividad para marcadores de células B en todos los casos.

Los marcadores de células plasmáticas presentaron sobreexpresión en la mayoría de los casos; CD138 mostró positividad en un 67% de los casos (28/42), mientras que CD38 fue positivo en un 70% de los casos (17/24), BLIMP1 en un 83% de los casos (34/41) y MUM1 en un 94% de los casos (31/33).

Se identificó en un 13 % de los casos (4/30) positividad para BCL6, en un 27% (9/34) positividad para CD10, en un 31% (8/26) positividad para BCL2 y en un 30% (9/30) positividad para CD30.

El índice de proliferación celular ki-67, fue mayor al 70% en el 93% de los casos (37/40). Hubo restricción de cadenas ligeras en la totalidad de los casos en los que se obtuvo en dato, el 71% de los casos mostraron expresión de Kappa (17/24) y el 29% de lambda (7/24).

Todos los casos fueron negativos para HHV8-LANA1 y ALK, como se establece en los criterios diagnósticos.

En relación con la infección por VEB, 22 casos fueron positivos (73%) y 8 casos negativos (7%). Todos los casos VEB positivos fueron pacientes VIH positivos.

En cuanto a la expresión de VEB por inmunohistoquímica (EBV-LMP1) el 78% de los casos (18/23) mostraron una expresión negativa, mientras que mediante EBER el 60% de los casos (25/42) fueron positivos.

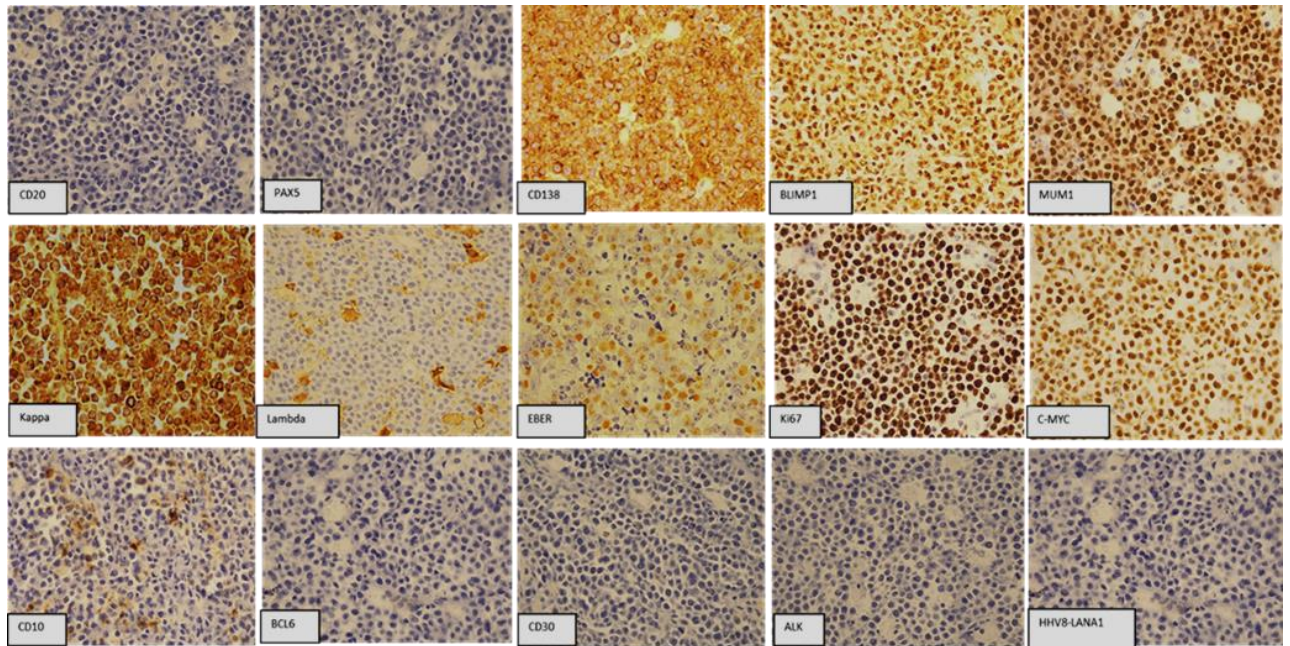


Figura 21. Perfil inmunofenotípico característico del linfoma plasmablástico.

El inmunofenotipo característico consiste en la pérdida de marcadores de células B (PAX5, CD20) y la presencia de marcadores de células plasmáticas (CD138, BLIMP1, MUM1) con restricción de cadenas y un índice proliferativo próximo al 100%. No se identifica expresión de ALK ni HHV-8.

Perfil genético del linfoma plasmablástico

En 18 de los 30 casos de linfoma plasmablástico (60%) se identificaron, mediante secuenciación dirigida mutaciones somáticas. Los casos negativos para VEB tendieron a mostrar una mayor tasa de mutaciones, en comparación con los casos positivos (87.5% vs 54%, respectivamente, Chicquadrado, $p > 0.05$) (**figura 22**).

El perfil mutacional también fue diferente entre los casos VEB positivos y los casos VEB negativos. Se encontraron mutaciones somáticas recurrentes restringidas a los casos VEB positivos en *PRDM1* / *Blimp1* en 6 casos y *STAT3*, en 5 casos.

Se encontraron mutaciones *STAT3* en 5 casos (16%), todos los casos eran VEB positivos. Todas menos una (*STAT3*pD566Y) de las mutaciones involucraba el dominio SH2 de la proteína *STAT3* (*STAT3*pY640F, *STAT3*pM648L, *STAT3*pG618R, *STAT3*pN647I) y conducen a la sobreexpresión de la proteína fosfoSTAT3 (Tyr705) (véase más adelante).

La mayoría de los casos de LPB (16 de 23 casos probados, 69%) albergaban alteraciones estructurales en el locus *MYC*. Catorce casos mostraron traslocaciones en *MYC* (60%) usando sondas break apart. *MYC*-IGH se confirmó en 7 de 9 casos (77%). Se encontró en 2 casos adicionales mediante FISH amplificación de *MYC*. Por lo tanto, en casos con reordenamientos de *MYC*, *MYC*-IGH es la alteración estructural más frecuente.

Aunque hubo una clara tendencia a la asociación entre los casos positivos para VEB y los casos con reordenamiento de *MYC*, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Chi cuadrado 0,06).

Se encontró que *MYC* estaba mutado en 3 casos. Todas las mutaciones menos unas involucraban al exón 2, y consistían en trasversiones y transiciones en C: G (4 de 7 mutaciones) (**tabla 6**). Además, la mutación *MYC*p79S involucra WRCY. Todas estas características se deben a un mecanismo relacionado fenómenos de hipermutación somática aberrante (aSHM).

En dos casos, ambos VEB negativos, se encontraron mutaciones en la vía MAPK, en el gen *BRAF*, un caso con la mutación activadora canónica *BRAF*pV600E y la otra con la mutación *BRAF*pG469A en el sitio de unión de ATP.

Mutaciones frecuentes en LBDCG NOS, que implican la activación de BCR, TLR / NFkB, genes modificadores de histonas y la vía NOTCH se encontraron en 8 casos (**tabla 6 y figura 22**). Esas mutaciones involucraban; *CD79*pAW76 *, *CD79B*pD34N, *MYD88*pL265P, *NOTCH1*pP401L, *NOTCH2*pR2400 *, *SGK1*Kp136 * y *EP300*pM2010I / *EP300*pR1731H. La vía NOTCH estaba alterada por mutaciones somáticas en *NOTCH2* (1 caso), *NOTCH1* (1 caso) y *SGK1* (2 casos). Otras mutaciones encontradas fueron *SMARCA4*pR1005Q y *TP53*pR273H.

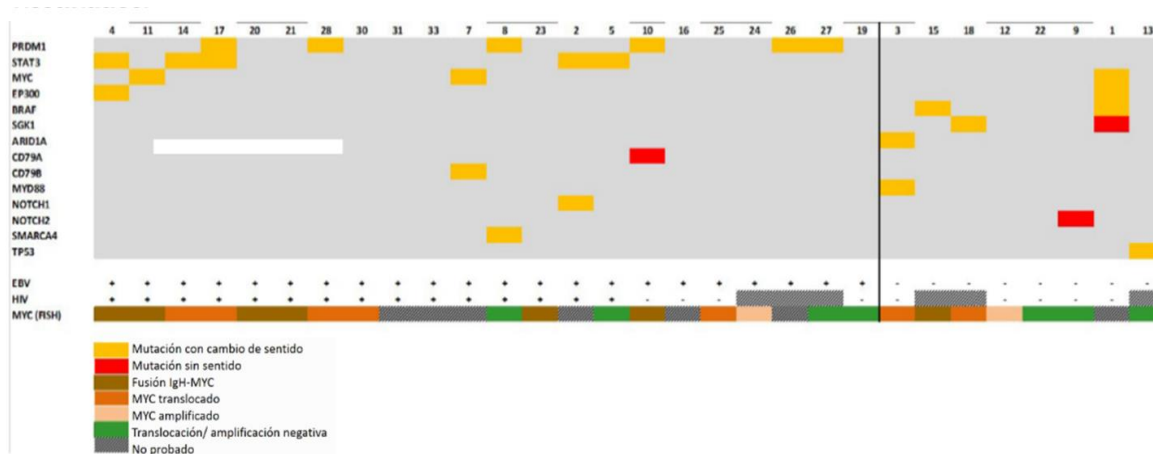


Figura 22. Perfil mutacional de los casos de linfoma plasmablástico.

Resumen de las mutaciones encontradas en 18 de los 30 casos (60%) analizados mediante NGS. Se muestra los casos VEB positivos e VIH, junto con el estado del gen *MYC* determinado mediante FISH. El perfil de las mutaciones somáticas fue heterogéneo, con mayor número de mutaciones somáticas en los casos VEB negativos. Las mutaciones en el gen *MYC* (traslocaciones, amplificaciones y mutaciones puntuales) son los eventos genéticos más frecuentes en LPB. Otras mutaciones no descritas hasta ahora, son *STAT3* (16%), *BRAF*, *MYD88*, *NOTCH2* y *P53*.

Las alteraciones genéticas en *MYC* y *STAT3* (SH2) conducen a sobreexpresión de los factores de transcripción MYC y Phospho-STAT3 respectivamente.

La expresión por IHQ de la proteína fosfo-STAT3 (Tyr705) se cuantificó en 20 casos en los cuales había dato del estado mutacional. La expresión media de fosfo-STAT3 en estos casos, fue de 48 núcleos por CGA (40x). La expresión media en los casos con mutación en el dominio SH2 (2 casos con mutaciones disponibles y datos de IHQ) fue de 249 núcleos por CGA. La expresión media de fosfo-STAT3 en los casos *STAT3* wild type fue de 28 núcleos por CGA. Por último, la expresión media de fosfo-STAT3 para la muestra mutada en *STAT3* no SH2 fue de 40 núcleos por CGA.

Por lo tanto, las mutaciones del dominio *STAT3* SH2 (*STAT3*pY640F, *STAT3*pM648L, *STAT3*pG618R, *STAT3*pN647I) se asociaron con la sobreexpresión de phospho-STAT3 por IHQ.

La proteína MYC se expresó consistentemente en todos los casos (rango 59-236 núcleos por CGA, media 236), independientemente de la presencia de la traslocación de *MYC*. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la cuantificación de la expresión de MYC, según el estado del gen *MYC*.

Los casos traslocados (14 casos) y amplificados (2 casos) tenían, como se esperaba, una mayor expresión de la proteína MYC que los casos sin reordenamientos *MYC* (7 casos). La media de núcleos positivos fue 109 por CGA en casos no reordenados, frente a la media de 282 núcleos positivos por CGA en casos con reordenamiento de *MYC* (Prueba de Mann-Whitney valor $p < 0,0001$)

La expresión media de la proteína MYC en los 22 casos en los cuales se disponía del dato fue de 236 núcleos por CGA, significativamente superior a la media de la expresión de la proteína fosfo-STAT3, que fue de 48 núcleos por CGA (Wilcoxon prueba $p = 0.001$). No hubo correlación entre los niveles de expresión de ambas proteínas (Pearson no significativo).

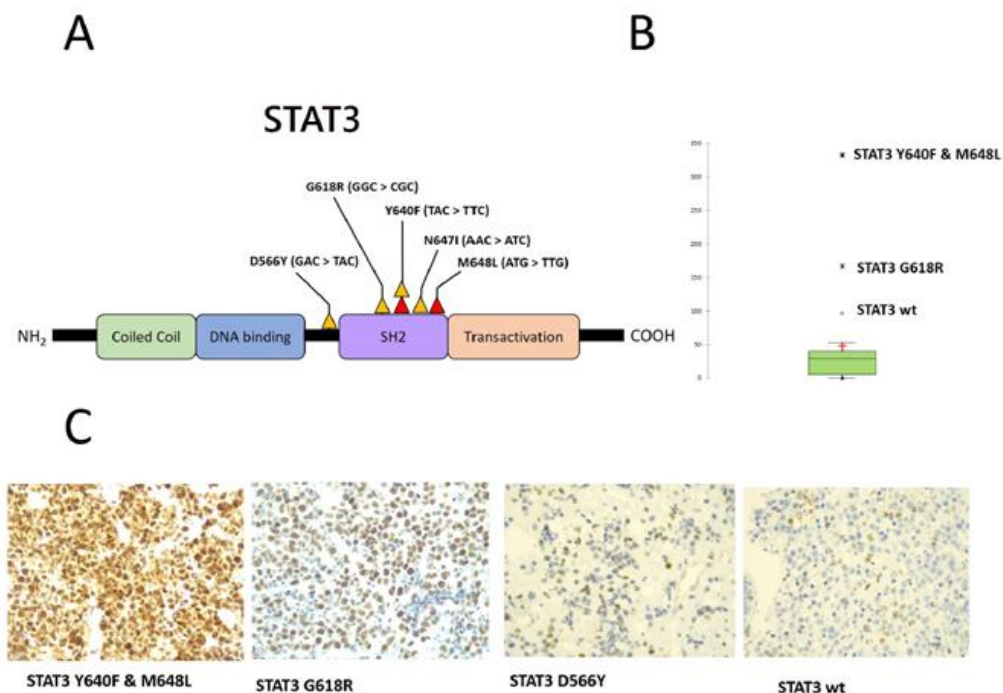


Figura 23. Mutaciones en *STAT3* en nuestra serie de casos de linfoma plasmablástico.

Mutaciones en *STAT3* fueron encontradas en 5 casos (16%), en todos los casos VEB positivos. Fue de interés, que todas las mutaciones, menos una (*STAT3*pD566Y), involucraban el dominio SH2 de la proteína *STAT3*. A) La media de expresión para casos con mutación en el dominio SH2 (2 casos con el dato IHQ y de mutación) fue de 249 por CGA(40x). La media de expresión de P-*STAT3* en los casos con *STAT3* wild type fue de 28 núcleos por CGA (40x). B) Las mutaciones en el dominio SH2 de *STAT3* conducen a una sobreexpresión y activación de la proteína *STAT3*. C) Se muestran imágenes representativas de la tinción con Phospho-*STAT3* (Tyr705) mediante IHQ.

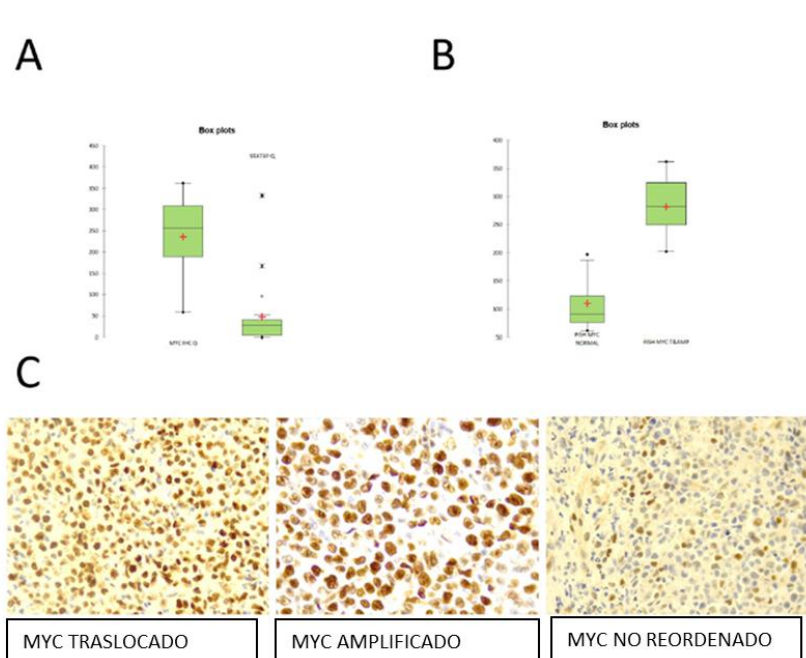


Figura 24. Expresión de la proteína MYC en nuestra serie de casos de linfoma plasmablástico. La expresión de la proteína MYC se identificó en todos los casos. La media de expresión de MYC en 22 casos en los cuales los datos estaban disponibles fue de 236 núcleos por CGA (40X), significativamente mayor de la media de expresión de 48 núcleo por CGA en los casos con expresión de P-STAT3 (Wilcoxon test $p = 0.001$). A) MYC estaba traslocado en 14 casos y amplificado en 2 casos, en estos casos se observó una expresión mayor de MYC que en los 7 casos con reordenamiento de MYC (Mann-Whitney test p valor < 0.0001) B) Se muestran imágenes representativas de MYC (IHC).

Debido a la alta prevalencia de traslocaciones y amplificación en *MYC* y los niveles relativamente bajos de expresión de fosfo-STAT3 y la ausencia de correlación entre ambas proteínas, es poco probable que la activación de *STAT3* contribuya a la sobreexpresión de *MYC* en la mayoría de los casos de LPB.

Sin embargo, uno de nuestros casos mostró mutaciones del dominio *STAT3* SH2 y ausencia de translocación *MYC* por FISH, y se observó mediante IHQ altos niveles de expresión de las proteínas fosfo-STAT3 y MYC, sin detectarse mutaciones en *PRDM1* / *Blimp1*, lo que sugiere que la sobreexpresión de MYC podría estar relacionada con la activación mediante mutaciones de *STAT3* en este caso.

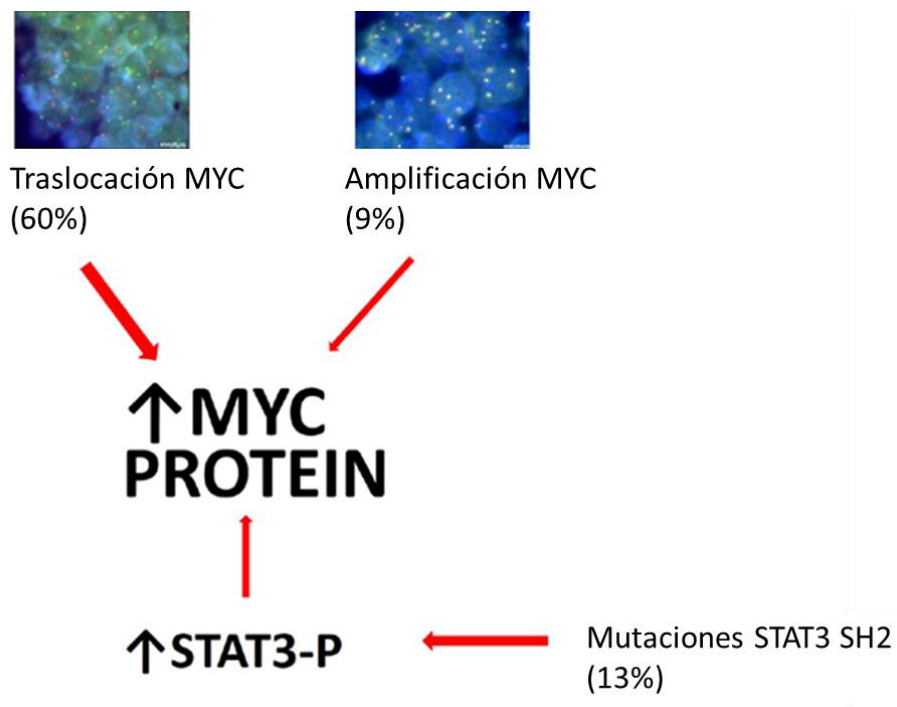


Figura 25. La expresión de la proteína MYC se debe a reordenamientos que implican *MYC* en un alto porcentaje de los casos (69% de la serie).

La mayoría de las traslocaciones involucran a *MYC* e *IGH*, y en muy pocos casos se observa amplificaciones del gen *MYC*. Además, aquí mostramos que un porcentaje de los LPB tienen activación de *STAT3*, debido a mutaciones somáticas en el dominio SH2, que podrían aumentar la expresión de *MYC* por IHQ.

En resumen, la sobreexpresión de la proteína *MYC* se debe a reordenamientos que involucran a *MYC* en una alta proporción de casos de linfoma plasmablastico (69% en estas series). La mayoría de las traslocaciones fusionan *MYC* a *IGH* y en pocos casos se observaron amplificaciones del gen *MYC*. Ambas alteraciones conducen a la sobreexpresión de la proteína *MYC*.

De forma novedosa, este es el primer trabajo que describe la existencia de mutaciones en el dominio SH2 de *STAT3* en casos de LPB, que dan lugar a la sobreexpresión y activación de este oncogen.

Microambiente tumoral en linfomas plasmablasticos

Cuantificamos la expresión de CD163 y PD-L1 en células histiocíticas / dendríticas en los casos de LPB. La expresión media de PD-L1 fue de 33 núcleos por CGA (rango 1.67-61) y la media expresión de CD163 fue de 38 núcleos por CGA (rango 2-84, **figura 26**). La correlación entre la expresión de CD163 y la expresión de PD-L1 fue significativa (*Pearson* 0.6, valor de $p < 0.05$), lo que sugiere que en los casos de LPB las células PD-L1 positivas son histiocitos.

No hubo una diferencia significativa en la cantidad y distribución de las células positivas para CD163 y PD-L1 (histiocitos) entre los casos VEB positivo y los casos VEB negativos (prueba de *Mann-Whitney* $p > 0.05$).

Se cuantificaron las subpoblaciones de células T CD8 positivas y PD1 positivas. El número medio de linfocitos CD8 positivos fue de 52 núcleos por CGA (rango 1-117) y el número medio de linfocitos PD1 positivo fue de 32 núcleos por CGA (rango 0-76). Hubo una diferencia significativa en la distribución de células positivas para CD8 y PD1 (prueba de *Wilcoxon*, p significativo < 0.001) lo cual sugiere que se trate de diferentes poblaciones celulares. Sin embargo, el valor de correlación de *Pearson* fue significativo (*Pearson* 0.59, valor $p < 0.05$). No hubo diferencias significativas en la cantidad y la distribución de linfocitos positivos para CD8 y PD1 entre los casos VEB positivos y VEB negativos (prueba de *Mann-Whitney* $p > 0.05$).

PD-L1 fue expresado por las células tumorales en 5 de 24 casos evaluados (20%) (media de 59 núcleos por CGA, rango 25-98). Cuatro de los 5 casos positivos para PD-L1 (en las células neoplásicas) fueron positivos para VEB. Catorce casos positivos para VEB fueron PD-L1 negativos en las células tumorales. Por lo tanto, no hubo asociación entre la infección por VEB por células tumorales y la expresión de PD-L1, ya que la mayoría de los casos VEB positivos fueron negativos para PD-L1.

Un caso con mutación en *STAT3* SH2 mostro expresión concurrente de PD-L1 y Phospho-STAT3 (Tyr705). En los otros casos con *STAT3* SH2 mutados los datos de expresión PD-L1 no estaban disponibles para probar esta posible asociación.

De acuerdo con los datos publicados previamente, en los casos de LPB la proteína MHCII/HLA (DP, DR) estuvo prácticamente ausente en las células neoplásicas. Solo 3 casos de los 25 evaluados fueron positivos (12%, media 349 núcleos por CGA, rango 284-440). Dos casos mostraron un patrón de tinción de membrana y citoplasmática granular y el otro un patrón únicamente de membrana. Los 3 casos fueron positivos para VEB. Los otros 22 casos fueron completamente negativos para la expresión de HLA en células tumorales.

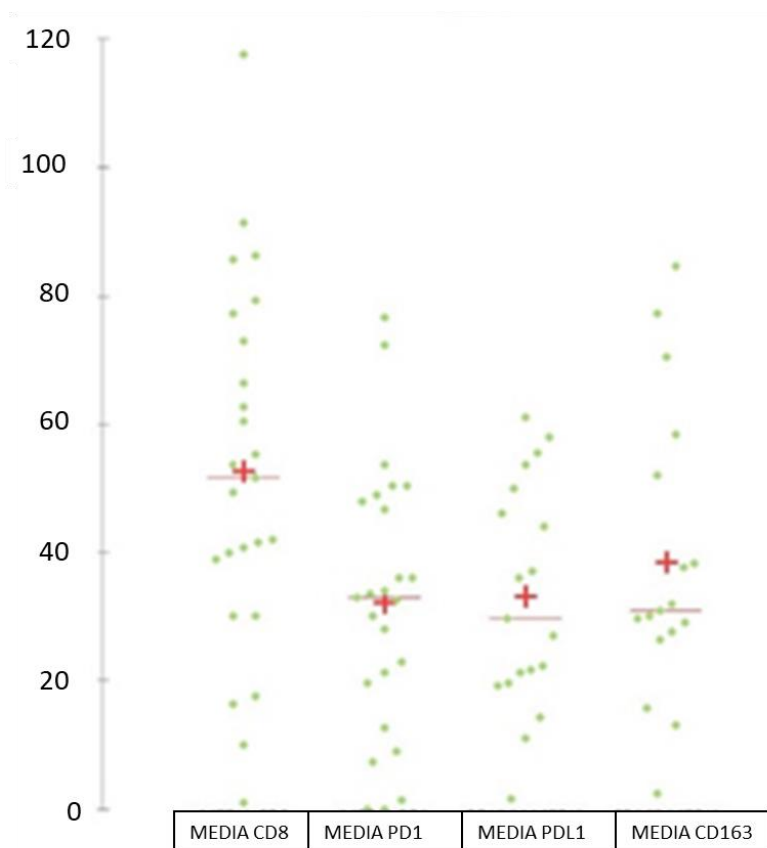


Figura 26. Gráfica de las poblaciones que componen el microambiente tumoral de los linfomas plasmablastos.

La gráfica muestra la media y rango de expresión de las células después de realizar marcadores IHQ para CD8, PD1 en linfocitos T y PD-L1 y CD163 en histiocitos y células dendríticas. Se observó una diferencia significativa en la distribución de células positivas para CD8 y PD1, lo cual sugiere que se trate de diferentes poblaciones celulares. La correlación entre la expresión de CD163 y la expresión de PD-L1 fue significativa, lo que sugiere que las células PD-L1 positivas son histiocitos.

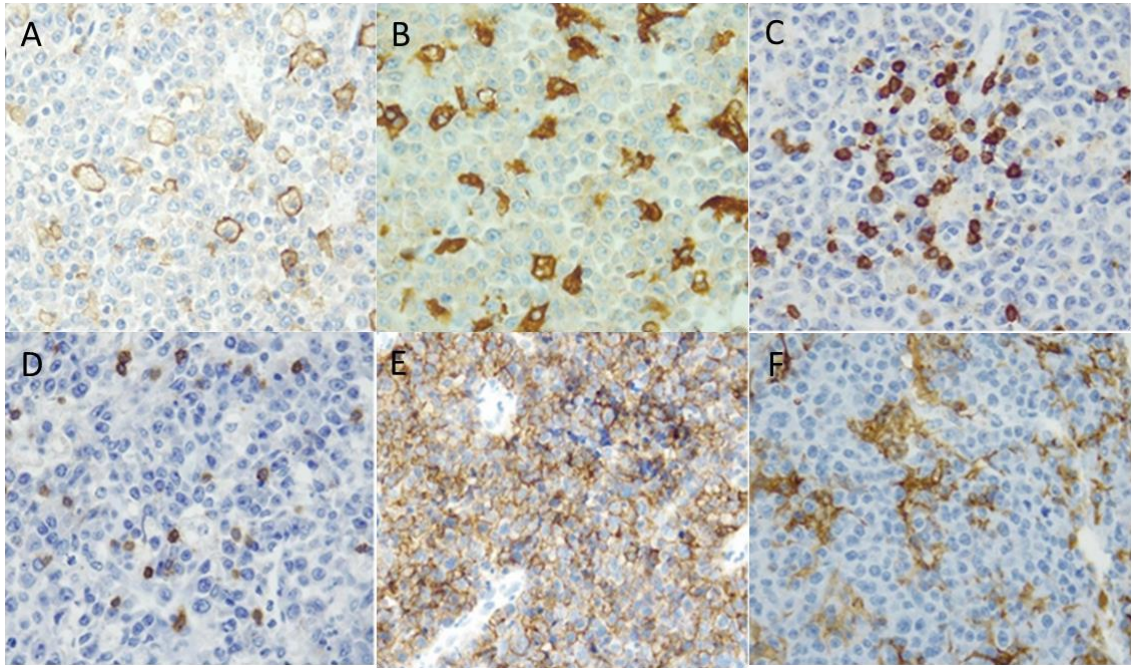


Figura 27. Microambiente tumoral de los linfomas plasmablásticos.

A) Imagen representativa de un caso con una media de expresión de 36 células no neoplásicas PD-L1 positivas. B) El mismo caso mostró una media de 37 células positivas para CD163, compatibles con histiocitos. C) La media de expresión de las células CD8 positivas en este caso representativo fue de 53. D) PD1 identificó una subpoblación de linfocitos T diferente (la media de expresión en este ejemplo representativo fue de 36 células PD1 positivas, caso n25). E) En 5 de los 24 casos examinados, se identificó expresión de PD L1 en células neoplásicas (20%). F) La proteína MHCII/HLA (DP,DR), fue en la mayoría de los casos restringida a los histiocitos y células endoteliales. La expresión de MHCII/HLA (DP,DR) se identificó en las células neoplásicas, en 3 de los 25 casos disponibles (12%). Dos de 3 casos mostraron una tinción citoplasmática granular y de membrana y un caso mostró tinción de membrana.

V. DISCUSIÓN.

5.1. BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA EN EL DIAGNÓSTICO DE LLP/MW.

El diagnóstico de LLP/MW, según la nueva clasificación de WHO, se establece por un porcentaje de infiltración por células neoplásicas MW/LLP mayor al 10% en médula ósea. La categoría de GMSI-IgM se ha incorporado para clasificar aquellos casos que no tienen una infiltración significativa de la médula ósea (Swerdlow et al, 2017).

En nuestro estudio, evidenciamos que se pueden obtener resultados discordantes al analizar el porcentaje de infiltración por células neoplásicas, según las diferentes herramientas diagnósticas utilizadas. El porcentaje de infiltración por células B clonales se puede identificar mediante aspirado de médula ósea, biopsia de médula ósea, CMF y estudios de clonalidad (Owen RG et al, 2003; Feiner HD et al, 1990).

Este es el primer estudio que ha analizado la correlación entre las diferentes técnicas diagnósticas, incorporando las nuevas herramientas de diagnóstico molecular, con el propósito de establecer un diagnóstico correcto de LLP/MW y por consiguiente un tratamiento adecuado.

Nuestros resultados demuestran que hay una buena correlación entre el porcentaje de células B clonales por CMF e IHQ, pero es importante destacar que en la mayoría de los casos se obtuvo un porcentaje de infiltración en médula ósea mayor cuando se analizó mediante técnicas de IHQ la biopsia de médula ósea.

En 14 de 24 pacientes la cuantificación de las células B clonales mediante CMF fue menor al 10%. Cinco de estos 14 pacientes fueron considerados clínicamente asintomáticos. Los motivos para la subestimación del infiltrado neoplásico mediante CMF se puede deber a la distribución heterogénea y multifocal del infiltrado neoplásico y a la distribución paratrabecular de los agregados de células neoplásicas con fibrosis reticulínica asociada.

Como describimos en nuestra serie de casos y otras publicaciones previas el patrón de infiltración en médula ósea más frecuente es un patrón paratrabecular asociado a un patrón intersticial (60%) (Fang H et al, 2018; King RL et al, 2016) en contraste con el concepto vigente que describe un patrón puramente intersticial (Swerdlow et al, 2017). Este patrón de infiltración puede ser de utilidad en el diagnóstico diferencial con otros linfomas B de célula pequeña que pueden tener diferenciación plasmacítica, como el LZM y la LLC, donde se observa un patrón predominantemente intersticial, asociado a un patrón intrasinusoidal en los casos de LZM.

Todos los casos de GMSI-IgM mostraron un patrón de infiltración intersticial parcheado. Sólo tres muestras con diagnóstico de LLP mostraron este patrón. Estas tres muestras proceden de dos pacientes con biopsias previas con un infiltrado significativo pre-tratamiento. Por lo tanto este patrón intersticial parcheado al diagnóstico es propio de los casos de GMSI de tipo IgM.

En conclusión, la biopsia de médula ósea es necesaria para el diagnóstico de LLP/MW; el adecuado estudio histológico y detección de infiltrados linfoides B con técnicas de IHQ nos permite detectar infiltrados linfoides significativos.

5.2. PERFIL MUTACIONAL DE LINFOMAS CON DIFERENCIACIÓN PLASMOCELULAR

Perfil mutacional del linfoma linfoplasmacítico:

El LLP presenta un perfil genético homogéneo, con una mutación recurrente en *MYD88*pL265P y mutaciones adicionales en menor frecuencia.

La mutación L265P en el gen *MYD88*, se ha identificado en múltiples series, demostrando su presencia hasta en el 91% de los casos con diagnóstico de LLP y

hasta en un 50% en los casos con diagnóstico de GMSI-IgM (Treon SP et al, 2012-2014; Castillo JJ et al, 2016; Xu L et al, 2013; Varettoni M et al, 2017; Ondrejka SL et al, 2013; Jimenez C et al, 2013). En este estudio identificamos la mutación somática *MYD88*pL265P en 22 de los 24 casos de LLP (92%), siendo la prevalencia de la mutación semejante a la descrita en otras cohortes, y en un caso de los cuatro de GMSI-IgM.

No se encontraron otras mutaciones en *MYD88* distintas a L265P, como: S219C M232T y S243N, después de realizar NGS. Estas mutaciones se han descrito en pacientes con diagnóstico de MW y otras neoplasias de células B como el LBDCG, pero no de manera frecuente (Treon SP et al, 2014).

La detección de mutaciones en *MYD88*pL265P, mediante PCR a tiempo real alelo específica constituye hoy en día una herramienta óptima para el diagnóstico de esta lesión molecular. Presenta una elevada sensibilidad cuando se usan muestras clínicas de tejido FFIP, ya que es capaz de detectar mutaciones con una FAV relativamente baja en comparación con métodos tradicionales como la secuenciación Sanger. Los casos de LLP con una baja infiltración tumoral podrían no detectarse mediante secuenciación directa ya que es necesario frecuencias alélicas superiores al 20% para ser detectadas. Además, mediante RT-PCR-AS se pueden detectar casos con infiltración en el rango de la GMSI de tipo IgM.

En nuestro estudio comparamos los resultados obtenidos mediante PCR alelo específica para *MYD88*pL265P y secuenciación dirigida mediante NGS, y se encontró que en 20 de 21 (92%) casos analizados en nuestra serie, fueron concordantes. En estudios previos, se compara la capacidad de detección mediante secuenciación dirigida NGS y PCR alelo específica, reportando tasas de hasta un 31% de falsos negativos mediante secuenciación dirigida NGS (Varettoni M et al, 2017, Amanda Kofides M, Xia Liu MS, Christopher Patterson MD. Alternative Mutations and Isoform Dysregulation in *MYD88* in Waldenström's Macroglobulinemia. ASH Annual Meeting, San Diego, USA, 2018).

Por otra parte, describimos que la cuantificación de células neoplásicas mediante técnicas de PCR alelo específica se correlacionó significativamente con la

cuantificación de células B clonales detectadas mediante CMF y con la cuantificación de células B detectadas mediante técnicas de IHQ en las biopsias de médula ósea. La PCR alelo específica podría ser una buena herramienta molecular para la cuantificación de la población neoplásica.

La mutación en *MYD88*pL265P está prácticamente ausente o de forma de infrecuente en neoplasias morfológicamente semejantes al LLP como; el LZM (10-15%) y la LLC (3-8%) (Xu L et al 2013; Martinez-Lopez A et al, 2015; Jiménez C et al, 2013). En ningún caso de mieloma múltiple se ha detectado la mutación *MYD88*pL265P.

La vía NF-Kb se puede activar a través de varias vías divergentes entre las que se incluye BTK, actual diana del fármaco aprobado por la FDA, ibrutinib. *MYD88*pL265P podría constituir un biomarcador molecular tanto para el diagnóstico, como para el tratamiento en pacientes candidatos, y el posterior seguimiento de la enfermedad (Dimopoulos MA et al, 2018).

Después de realizar NGS, con un panel de 35 genes relacionados con la patogenia del linfoma se encontraron mutaciones somáticas adicionales a *MYD88*pL265P en una minoría de casos.

Los genes co-mutados fueron *MYD88* y *CXCR4*, *MYD88* y *KMT2D* y *MYD88*, *PRDM1* y *MYC*. Hay que destacar que un caso *MYD88* no mutado, se detectó una mutación sin sentido en *ID3*.

Las mutaciones en *CXCR4*, *KMT2D* y *PRDM1* han sido previamente descritas en casos de LLP/MW. Las mutaciones en *MYC* e *ID3* no han sido descritas previamente en esta entidad.

CXCR4, es un gen situado en brazo largo del cromosoma 2 (2q22.1), que codifica una proteína receptora, la cual activa las vías de señalización (MAPK1/MPAK3), y juega un papel en la migración de las células hematopoyéticas y los linfocitos B. Las mutaciones en *CXCR4*, son las segundas mutaciones más frecuentemente descritas en LLP/MW, hasta en un 40% de los casos, y están presentes casi siempre en asociación con mutaciones en *MYD88*. Estas mutaciones han sido reportadas de forma infrecuente en casos de LZM (7%) y LBDCG (1-7%) (Cao XX et al 2017).

Las mutaciones en *CXCR4* se han asociado un peor pronóstico en pacientes con MW (Treon SP et al, 2014; Sklavenitis-Pistofidis R et al, 2018). Se ha descrito, que la presencia de la mutación se asocia de forma más frecuentemente con una enfermedad agresiva y sintomática. Un ensayo clínico reciente en fase III sugiere, sin embargo que las mutaciones de *CXCR4* no alteran la supervivencia global o tiempo libre de progresión en pacientes tratados con una combinación de Rituximab e Ibrunitib (Dimopoulos MA et al, 2018).

KMT2D, es un gen situado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q13.12), que codifica la enzima lisina metiltransferasa H3K4 KMT2D. Se ha descrito la implicación de esta enzima como supresor tumoral al controlar la regulación de vías de señalización celular. H3K4 KMT2 también está implicada en la diferenciación terminal de las células B. Las mutaciones en línea germinal de *KMT2D* están asociadas con el Síndrome de Kabuki, donde se produce una deficiencia inmunológica debido a la alteración en la diferenciación terminal de las células B determinada por la pérdida de metilación de H3K4 (Lindsley AW et al, 2016; Zhang J, 2015; Ortega-Molina A et al, 2015).

Se ha descrito que frecuentemente se encuentra alterado en linfomas B, principalmente en el linfoma folicular (89%) y también en el LBDCG (32%) (Morin RD et al, 2011). Previamente se han descrito mutaciones en *KMT2D* en un 20-25% de los casos de MW con mutación en *MYD88* pL265P, y en casos *MYD88* wild type. Algunos autores detectaron una mayor incidencia de estas mutaciones, en los casos sin mutación de *MYD88* pL265P (Hunter ZR et al, 2018) sin embargo, también se ha detectado mutaciones subclonales en casos con mutación en *MYD88* pL265P, sugiriendo que juegan un papel en la patogenia de la enfermedad (Varettoni M et al, 2017). Adicionalmente, la presencia de mutaciones en *KMT2D* puede servir de base para terapias dirigidas con inhibidores de la desmetilación (Rao RC et al, 2015).

PRDM1 es el gen que codifica para la proteína BLIMP1; se encuentra en el cromosoma 6 (q21-q22.1) Este gen se transcribe a un factor de transcripción que regula una gran variedad de genes implicados en la diferenciación terminal en múltiples líneas celulares, siendo un importante regulador de la diferenciación plasmocelular de las células B.

En este trabajo hemos identificado una mutación somática sin sentido en el exón 7 del gen (c. 2251C> T; H673Y), que involucra la proteína 1 con dominio de dedos de zinc PR., responsable de la regulación transcripcional de los genes diana de la proteína PRDM1/Blimp1.

Esta mutación ha sido detectada en LPB (Montes-Moreno S; 2017) y en aproximadamente en un 8% de LBDCG (Pasqualucci L et al, 2011; Zhang J et al, 2013). Recientemente se ha descrito que se encuentra mutado en 4% de los casos de LLP/MW (Varettoni M et al; 2017).

La delección en 6q es la alteración cromosómica más frecuente en LLP/MW (40-50%). Las regiones suprimidas con mayor frecuencia son 6q21, donde se ha identificado el gen *PRDM1/BLIMP1*, y 6q 23.

Se ha descrito que *PRMD1* frecuentemente se encuentra inactivado en LBDCG, debido a deleciones o mutaciones genéticas en el locus 6q21-q22.1, en un porcentaje significativo de los LBDCG de subtipo ABC (23-24%) (Pasqualucci L et al, 2017; Tam W et al, 2016). Es de interés, destacar que, en nuestra serie, el caso con mutación en *PRDM1/ Blimp1* no presento delección en 6q, descartando por lo tanto que se tratase de una inactivación bialélica de *PRDM1/Blimp1*.

Perfil mutacional del linfoma plasmablastico:

En este trabajo, estudiamos el perfil genético en nuestra serie de casos de LPB usando NGS y correlacionado los resultados con la infección por VEB y la expresión de factores de transcripción oncogénicos y de proteínas relacionados con el control inmunitario tanto en las células neoplásicas como en las células del microambiente tumoral.

Tras la realización de un estudio completo mediante FISH y NGS con un panel dirigido de 35 genes relacionados con la patogenia del linfoma, nuestros resultados muestran que las alteraciones genéticas en el gen *MYC*, son la alteración más

frecuente. De forma relevante se encuentra un perfil mutacional distinto en casos VEB positivos y casos VEB negativos. Las mutaciones restringidas a los casos VEB positivo se encontraron en *PRDM1* y *STAT3* y se encontró asimismo un predominio de casos con traslocación de *MYC*.

El gen *MYC* se sitúa en el brazo largo del cromosoma 8 (8q24). Entre las diversas funciones celulares en las que participa el gen se encuentra su implicación en la proliferación y diferenciación celular. Se ha visto que la regulación negativa *MYC* es necesaria para la salida de la célula del ciclo celular y su posterior diferenciación.

Las alteraciones genéticas identificadas en el gen *MYC* comprenden en su mayoría traslocaciones, que se producen mayoritariamente con el gen de IgH (Valera A et al, 2010; Taddesse-Heath L; 2010), pero también se han detectado en menor frecuencia amplificaciones o ganancia del número de copias (Montes-Moreno et al, 2017). Ambas alteraciones genéticas producen una sobreexpresión de la proteína *MYC* detectable mediante técnicas de IHQ.

En nuestro trabajo, hemos identificado además mutaciones puntuales en *MYC* que consisten principalmente en tranversiones y transiciones en C: G, que implican al exón 2, y en el caso de la mutación *MYCp79S* a *WRCY*. Estas mutaciones se han relacionado con el fenómeno de hipermutación somática aberrante o aSHM (Pasqualucci L et al, 2001).

Por otra parte, el gen *PRDM1* se ha encontrado mutado en un 8% de los LBDCG, y como se ha descrito previamente está recurrentemente mutado en LPB (50%) y estas mutaciones se asocian frecuentemente con las alteraciones en el gen *MYC* y VEB (Montes-Moreno et al, 2017).

De forma novedosa, en nuestro estudio describimos que el 16% (5 casos) de nuestros casos tienen mutaciones somáticas recurrentes en el oncogén *STAT3*. Estas mutaciones implican preferentemente al dominio SH2 de la proteína *STAT3* es un gen ubicado en el cromosoma 7 (17q21.2), que pertenece a la familia de factores de transcripción *STAT* y forman parte de la cascada de la vía de señalización *JAK/STAT*. En respuesta a citoquinas y factores de crecimiento, los miembros de la familia *STAT* son fosforilados actuando como activadores de la transcripción, constituyendo por

lo tanto proteínas clave en procesos celulares como el crecimiento celular y la apoptosis.

Las mutaciones en *STAT3* se han asociado con diversas enfermedades autoinmunes multisistémicas y con el síndrome de hiperinmunoglobulina E, encontrándose también una activación persistente en diversas neoplasias hematológicas entre ellas, aunque de forma infrecuente en el LBDCG NOS (6%) (Ohgami RS et al, 2014). También se ha descrito la expresión de Phospho-STAT3, en linfomas B de célula grande ALK positivos, asociándose en ese caso, con la presencia de reordenamientos y sobreexpresión de ALK (Valera A et al, 2013).

Demostramos en nuestro estudio, que estas mutaciones conducen a una mayor expresión de la proteína P-STAT3 (Tyr705) mediante técnicas de IHQ.

Por otra parte, como se ha descrito previamente en LBDCG, la activación de *STAT3* debido a mutaciones somáticas en el dominio STAT3-SH2, puede contribuir a la sobreexpresión de la proteína MYC (Sarosiek KA, 2010).

Es de interés señalar, que un caso de nuestra serie, presenta, de forma concurrente, la mutación de *STAT3* SH2, y la sobreexpresión tanto de P-STAT3 (Tyr705) como de PD-L1 por inmunohistoquímica, confirmándose publicaciones previas que sugieren que la activación de *STAT3* podría desencadenar la sobreexpresión de PD-L1. (Tabanelli V, 2019).

Las mutaciones en *STAT3* no habían sido reportadas hasta ahora, en el LPB. Estas mutaciones podrían tener implicaciones terapéuticas dado que existen numerosos fármacos con actividad inhibitoria de la vía JAK/STAT.

El perfil mutacional en los casos VEB negativos fue más heterogéneo, que en pacientes VEB positivos.

En 8 casos se encontraron mutaciones que implican la activación de BCR, TLR/ NF-Kb, genes modificadores de histonas y de la vía NOTCH.

El patrón de mutaciones en *CD79A* y *CD79B* fue diferente al descrito previamente en los casos de LBDCG NOS. *CD79A* y *CD79B* codifican las dos cadenas de una proteína transmembrana que forma un complejo con BCR. Las mutaciones en el dominio de

activación (ITAM), han sido descritas en LBDCG del subtipo ABC (Davis RE et al, 2010) donde se ha descrito que promueven el crecimiento y la supervivencia celular a través de la activación de la cascada de señalización BCR. En los casos de LPB se han encontrado mutaciones ubicadas fuera de los dominios ITAM.

NOTCH es una proteína transmembrana que actúa como un factor de transcripción en la vía de señalización de NOTCH, la cual desempeña un papel fundamental en las diferentes etapas del desarrollo celular como la proliferación, crecimiento, diferenciación y apoptosis. Se identificaron mutaciones en *NOTCH2*, *NOTCH1* y *SGK1*.

Previamente se ha descrito que *NOTCH*pR2400* es una mutación sin sentido que trunca el dominio PEST de la proteína NOTCH, identificándose con anterioridad en LNH-B, incluido en LBDCG (Karube K et al, 2018). Se han identificado mutaciones que truncan el dominio PEST, en múltiples tipos de tumores, sugiriéndose en los estudios publicados, que dichas mutaciones pueden servir de diana terapéutica mediante su bloqueo farmacológico con inhibidores de la γ -secretasa (Wang K et al, 2015).

La mutación *NOTCH1*pP401L, ha sido descrita previamente en un 5-10% de LLC (Sutton LA et al, 2015). Se ha descrito previamente, que los pacientes con LLC que tienen mutaciones en *NOTCH1*, tienen un mayor riesgo de transformación a LBDCG.

SGK1 inhibe la señalización de NOTCH1 mediante la fosforilación de Fbm7. SGK1 es un regulador negativo de la vía de señalización NOTCH que actúa degradando la proteína NOTCH y reduce la activación γ -secretasa (Mo JS et al, 2011). Las mutaciones en *SGK1* implican mutaciones puntuales en *SGK1*pS45F1, *SGK1*p A380V y mutaciones truncadoras en *SGK1*pK136*. Estas mutaciones no se han descrito previamente en casos de LBDCG NOS (Karube K et al, 2018).

Otras mutaciones que hemos encontrado en nuestra serie de casos son *SMARCA2*p R1005Q y *TP53*pR273H.

De forma relevante en nuestra serie de caso, hemos encontrado mutaciones activadoras de la vía MAPK/ERK, que involucran el gen *BRAF* (*BRAF* V600E, *BRAF* G469A) en dos de nuestros casos, ambos VEB negativo. Es infrecuente la presencia

de estas mutaciones en neoplasias con diferenciación plasmocelular. Se han reportado un 4% mutaciones *BRAF* en casos con diagnóstico de mieloma múltiple (Chapman MA et al, 2011) describiéndose su asociación con una presentación clínica más agresiva, un fenotipo plasmablástico y una evolución clonal (Bohn OL et al, 2014; Andrulis M et al, 2013). Las mutaciones en *BRAF*, tienen importantes implicaciones terapéuticas por la disponibilidad de fármacos inhibidores de la vía MEK/ERK.

5.3. MICROAMBIENTE TUMORAL EN CASOS DE LINFOMA PLASMABLÁSTICO

Nuestros resultados confirman estudios previos que describen un enriquecimiento de macrófagos asociados al tumor (MAT), los cuales expresan CD163 y PD-L1. También se identificó una población significativa de células T CD8 positivas, que eran independientes de la expresión casi ausente de la proteína del MHCII/HLA por las células neoplásicas (Schmelz M et al, 2012). Se identificó junto a las células T CD8 positivas, una población diferente de células T PD1 positivas.

En nuestra serie de casos estudiados, no se ha identificado diferencias en la cuantificación de células MAT, CD8 y PD1 positivas, entre los casos VEB positivos y negativos, como se ha descrito en otras series.

Con relación a la proteína PD-L1, en nuestra serie, se ha encontrado de expresión en el 20% de los casos analizados. No se encontró asociación entre los casos positivos y negativos para VEB y la expresión de PD-L1 por las células neoplásicas, ya que la mayoría de casos VEB positivos no expresaban PD-L1. Estos hallazgos concuerdan con los datos publicados sobre la expresión de PD-L1 por la población neoplásica en LPB, con un porcentaje de expresión variable (20-44%) (Chen BJ et al, 2013). En nuestra serie no confirmamos su asociación entre el VEB y la expresión de la proteína, como si han sugerido otros estudios (Laurent C et al, 2018).

Estas diferencias podrían deberse a una combinación de factores, entre los que se encuentra la utilización de diferentes clones para la detección de la expresión de PD-

L1. En nuestro estudio utilizamos el clon 22C3, mientras que otros estudios publicados utilizan el clon SP142, también los diferentes métodos de cuantificación y de análisis estadísticos utilizados podrían influir en los resultados.

Otro factor biológico, que podría estar implicado en ausencia de asociación entre VEB y PD-L1 es el patrón de latencia de virus propio del LPB. La sobreexpresión de PD-L1 en asociación con VEB se encuentra en casos con patrón de latencia 2 y 3, usualmente desordenes linfoproliferativos post-trasplante (Veloza L et al, 2019). La mayoría de los casos en nuestra serie muestran un patrón de latencia 1, como ya ha sido descrito previamente (Gravelle P et al, 2018).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el microambiente tumoral y las proteínas de control inmunitario, pueden jugar un papel importante en la patogenia del LPB. Estos hallazgos son de gran relevancia debido a las implicaciones terapéuticas que podría suponer en el futuro.

VI. CONCLUSIONES Y NUEVAS ESTRATEGIAS DE FUTURO.

Las técnicas de secuenciación de nueva generación mediante paneles dirigidos, en muestras clínicas de tejido FFIP en casos con diagnóstico de linfomas con diferenciación plasmocelular (LLP y LPB)), nos han permitido estudiar el perfil mutacional de ambas entidades, con el propósito de caracterizar una firma genética específica que permita identificar nuevas dianas terapéuticas.

En nuestra serie de casos de LLP, identificamos un perfil mutacional relativamente uniforme, que se caracteriza principalmente por la mutación *MYD88pL265P* en la gran mayoría de los casos y por mutaciones somáticas puntuales en *CXCR4*, *KMT2D*, *PRDM1/Blimp1*, *MYC* e *ID3* en un pequeño porcentaje de los casos.

La activación de la vía TLR inducida por la mutación *MYD88pL265P*, es común a varios subtipos de LNH-B, y hay un amplio desarrollo de fármacos dirigidos frente a esta vía. La inhibición de BTK ha sido hasta ahora la más estudiada. Un inhibidor de BTK, ibrutinib, está aprobado como tratamiento para LLC, linfoma de células del manto, LZM recidivante / resistente al tratamiento y MW por la FDA. No obstante, se han descrito de forma frecuente resistencias y efectos adversos al tratamiento con ibrutinib. Los inhibidores de BTK de próxima generación, como acalabrutinib y zanubrutinib, se están desarrollando e investigando en ensayos clínicos (Owen RG et al, 2020; Trotman J et al, 2017). Otros fármacos en desarrollo, están dirigidos hacia la inhibición de genes o moléculas adaptadoras implicadas en la patogenia del LLP/MW como son; los inhibidores de MTOR, inhibidores de PI3K, inhibidores directa o indirecta en la formación del complejo Midosoma: inhibidores de IRAK1/IRAK4, inhibidores de TAK1 (Spinner MA et al, 2018).

En LPB, identificamos que el perfil mutacional está relacionado con la infección por VEB en las células tumorales. Identificamos alteraciones genéticas recurrentes en *MYC*, *STAT3* y *PRDM1/Blimp1*, que se asocian en tumores VEB positivos. Por primera vez, se describe que la mutación de *STAT3*, está implicada en la patogenia del LPB. Tanto las alteraciones genéticas de *MYC* (traslocaciones y amplificaciones) como las mutaciones en el dominio SH2 de *STAT3* conducen a la sobreexpresión de las proteínas MYC y P-STAT3 respectivamente. En nuestra serie de LPB VEB negativos encontramos otras mutaciones somáticas que incluyen *BRAF*pV600E, *MYD88*pI265P, *NOTCH*pR2400* y *TP53*pR273H.

Describimos en este estudio, nuevas posibles dianas terapéuticas, que incluyen la activación de *MYC* y *STAT3*, las vías de MAPK/ERK (mutaciones en *BRAF*) y NOTCH y la implicación de proteínas del control del sistema inmunitario.

Recientemente se ha descrito inhibidores de proteínas con dominio bromo y estraterminal (BET) como JQ1, que presenta una actividad inhibitoria sobre *MYC* (Delmore JE et al, 2011).

Las mutaciones en *STAT3* no habían sido reportadas hasta ahora, en el LPB. Estas mutaciones podrían tener implicaciones terapéuticas dado que existen numerosos fármacos con actividad inhibitoria de la vía JAK/STAT (Johnson DE et al, 2018).

Notablemente, tras la publicación de uno de los manuscritos originales que sirven de base para esta tesis (Garcia-Reyero J, et al, 2020) se ha publicado un estudio de caracterización genómica de 110 casos de LPB en pacientes VIH que confirma nuestros hallazgos, demostrando una elevada prevalencia de mutaciones en las vías de JAK/STAT y MAPK (Liu Z et al, 2020).

Chapman MA et al, describieron que un 4% de los mielomas múltiples (MM), al realizar secuenciación de genoma, presentaban mutaciones en *BRAF*, sugiriendo que dichos pacientes podrían beneficiarse de inhibidores de BRAF (Chapman MA et al, 2011).

Se ha demostrado que los pacientes que presentan mutación de BRAF V600E tienen un curso clínico agresivo, y el tratamiento con vemurafenib, un inhibidor de BRAF, en melanoma y tricoleucemia, ha demostrado tener claros beneficios clínicos.

Cobimetinib es un medicamento aprobado por la FDA para tratar melanoma con mutación en *BRAF* V600E o V600K, en combinación con vemurafenib. En la actualidad se necesitan ensayos a mayor escala para estudiar el papel de los inhibidores de la mutación *BRAF* para el tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas que albergan la mutación V600E.

Por otra parte, selumetinib y sorafenib son dos agentes en investigación para su uso en MM con mutaciones en la vía Ras / Raf / Mek / Erk (Anwer F et al, 2019). El desarrollo de estas terapias dirigidas podría suponer un gran avance en el tratamiento personalizado de pacientes con LPB.

En relación con la composición del microambiente y la expresión de marcadores de regulación inmune como PD-1 y PD-L1, la introducción de los inhibidores de la vía PD-1 / PD-L1 ha sido relevante en el tratamiento de varios tipos de tumores sólidos. En neoplasias hematológicas, los inhibidores de PD-1 / PD-L1, han mostrado actividad en el tratamiento linfoma de hodgkin clásico, que típicamente exhibe una sobreexpresión de PD -L1, PD -L2, debido a alteraciones en el cromosoma 9p24.1. En 2016, La FDA aprobó el uso de nivolumab de primera línea en el LH recidivante.

Aunque los resultados en otras neoplasias linfoides no han sido tan llamativos, el bloqueo de la vía PD-1 / PD-L1 ha dado lugar a respuestas significativas en otros tipos de linfomas, como el LBDCG s, el LF o varios tipos de linfomas de células T (Jelinek T et al, 2017).

Como se describe en estudios recientes y en nuestro trabajo la vía de escape inmune PD1, PD-L1 parece jugar un papel importante en los LPB, con una elevada expresión en las células del microambiente tumoral (linfocitosis T y MAT) y en las células neoplásicas. Estos resultados son de gran relevancia, ya que ciertos candidatos podrían beneficiarse de tratamientos basados en la inmunoterapia.

Por último, la elevada prevalencia de infección por VEB en las células neoplásicas y su impacto en el perfil mutacional sugieren nuevas estrategias terapéuticas con agentes antivirales e inmunoterapia celular dirigida al VEB.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- Andrulis M, Lehnert N, Capper D, et al. Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov.* 2013;3(8):862-869.
- Anwer F, Gee KM, Iftikhar A, et al. Future of Personalized Therapy Targeting Aberrant Signaling Pathways in Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2019;19(7):397-405.
- Armand P. Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. *Blood.* 2015; 125:3393–3400.
- Ballester LY, Loghavi S, Kanagal-Shamanna R, et al. Clinical validation of a CXCR4 mutation screening assay for Waldenstrom macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2016;16(7):395–403.
- Bassarova A, Trøen G, Spetsten S, et al. Lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma in the bone marrow: paratrabecular involvement as an important distinguishing feature. *Am J Clin Pathol* 2015; 143:797–806.
- Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013; 98:236–238.
- Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002; 48:1178–85.
- Bing J, Neel A. Two Cases of Hyperglobulinaemia with Affection of the Central Nervous System on a Toxi-Infectious Basis. *Acta Med Scand* 1936; 88: 492–506.
- Bohn OL, Hsu K, Hyman DM, Pignataro DS, Giralt S, Teruya-Feldstein J. BRAF V600E mutation and clonal evolution in a patient with relapsed refractory myeloma with plasmablastic differentiation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2014;14(2): e65-68.
- Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(10):1932–1941.
- Cao X, Medeiros LJ, Xia Y, et al. Clinicopathologic features and outcomes of lymphoplasmacytic lymphoma patients with monoclonal IgG or IgA paraprotein expression. *Leuk Lymphoma.* 2016; 57:1104–1113.
- Cao XX, Meng Q, Cai H, et al. Detection of MYD88 L265P and WHIM-like CXCR4 mutation in patients with IgM monoclonal gammopathy related disease. *Ann Hematol.* 2017;96(6):971-976.
- Castillo JJ, Bibas M, Miranda RN. The biology and treatment of plasmablastic lymphoma. *Blood.* 2015;125(15):2323-2330.
- Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, et al. Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenström Macroglobulinaemia: A Task Force from the 8th International Workshop on Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2016;175(1):77-86.

- Castillo JJ, Palomba ML, Advani R, Treon SP. Ibrutinib in Waldenström macroglobulinemia: latest evidence and clinical experience. *Ther Adv Hematol*. 2016;7(4):179-186.
- Chang H, Qi X, Xu W, Reader JC, Ning Y. Analysis of 6q deletion in Waldenström macroglobulinemia. *Eur J Haematol* 2007; 79: 244–247.
- Chapman J, Gentles AJ, Sujoy V, et al. Gene expression analysis of plasmablastic lymphoma identifies downregulation of B-cell receptor signaling and additional unique transcriptional programs. *Leukemia*. 2015. Nov;29(11):2270-3.
- Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471(7339):467-472.
- Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3462-3473.
- Cingolani P, Platts A, Wang IL, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80-92.
- Colomo L, Loong F, Rives S, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(6):736-747.
- Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
- Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997;89(4):1413-1420.
- Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011;146(6):904–917.
- Dimopoulos MA, Tedeschi A, Trotman J, et al. Phase 3 trial of ibrutinib plus rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2018; 378:2399–410.
- Fang H, Kapoor P, Gonsalves WI, et al. Defining lymphoplasmacytic lymphoma: does MYD88L265P define a pathologically distinct entity among patients with an IgM paraprotein and bone marrow-based low-grade B-cell lymphomas with plasmacytic differentiation? *Am J Clin Pathol* 2018; 150:168–76.
- Feiner HD, Rizk CC, Finfer MD, et al. IgM monoclonal gammopathy/Waldenström's macroglobulinemia: a morphological and immunophenotypic study of the bone marrow. *Mod Pathol* 1990; 3:348–56.
- García-Sanz R, Montoto S, Torreguerra A, de Coca AG, Petit J, Sureda A et al. Waldenström macroglobulinaemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases. *Br J Haematol* 2001; 115: 575–82.

- Gravelle P, Péricart S, Tosolini M, et al. EBV infection determines the immune hallmarks of plasmablastic lymphoma. *Oncoimmunology*. 2018;7(10): e1486950.
- Heather J. M., Chain B. (2016). The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics* 107 1–8. 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
- Hunter ZR, Xu L, Tsakmaklis N, et al. Insights into the genomic landscape of MYD88 wild-type Waldenström macroglobulinemia. *Blood Adv* 2018; 2:2937–46.
- Hunter ZR, Xu L, Yang G, et al. The genomic landscape of Waldenstrom macroglobulinemia is characterized by highly recurring MyD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* 2014; 123:1637–46.
- Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia* 2013; 27:1722–8.
- Jelinek T, Mihalyova J, Kascak M, Duras J, Hajek R. PD-1/PD-L1 inhibitors in haematological malignancies: update 2017. *Immunology*. 2017;152(3):357-371.
- Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(4):234-248.
- Kapoor P, Paludo J, Vallumsetla N, Greipp PR. Waldenström macroglobulinemia: What a hematologist needs to know. *Blood Rev*. 2015;29(5):301-319.
- Kastritis E, Dimopoulos MA. Current therapy guidelines for Waldenstrom's macroglobulinaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2016; 29:194–205.
- Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia*. 2018;32(3):675-684.
- Kim JH, Kim WS, Ryu K, Kim SJ, Park C. CD79B limits response of diffuse large B cell lymphoma to ibrutinib. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(6):1413-1422.
- King RL, Gonsalves WL, Ansell SM, et al. Lymphoplasmacytic lymphoma with a NonIgM paraprotein shows clinical and pathologic heterogeneity and may harbor MYD88L265P mutations. *Am J Clin Pathol* 2016; 145:843–51.
- Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1): D1062-D1067.
- Laurent C, Fabiani B, Do C, et al. Immune-checkpoint expression in Epstein-Barr virus positive and negative plasmablastic lymphoma: a clinical and pathological study in 82 patients. *Haematologica*. 2016;101(8):976-984.
- Leblond V, Kastritis E, Advani R, Ansell SM, Buske C, Castillo JJ et al. Treatment recommendations from the Eighth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Blood* 2016; 128: 1321–1328.
- Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-291.

- Levine T, Pestronk A, Florence J, Al-Lozi MT, Lopate G, Miller T et al. Peripheral neuropathies in Waldenström's macroglobulinaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 224–228.
- Lin P, Mansoor A, Bueso-Ramos C, Hao S. Diffuse Large B-Cell Lymphoma Occurring in Patients with Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia Clinicopathologic Features of 12 Cases. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 246–253.
- 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.
- Lindsley AW, Saal HM, Burrow TA, et al. Defects of B-cell terminal differentiation in patients with type-1 Kabuki syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137:179–87.
- Liu JJ, Zhang L, Ayala E, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-negative plasmablastic lymphoma: a single institutional experience and literature review. *Leuk Res.* 2011; 35(12):1571-1577.
- Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP v2.0: a database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Hum Mutat.* 2013;34(9): E2393-2402.
- Liu Z, Filip I, Gomez K, Engelbrecht D, Meer S, Lalloo P, et al. Genomic characterization of HIV-associated plasmablastic lymphoma identifies pervasive mutations in the JAK-STAT pathway. *Blood Cancer Discov* 2020; 1:112–25.
- Loghavi S, Alayed K, Aladily TN, et al. Stage, age, and EBV status impact outcomes of plasmablastic lymphoma patients: a clinicopathologic analysis of 61 patients. *J Hematol Oncol.* 2015; 8:65.
- Lopez A, Abrisqueta P. Plasmablastic lymphoma: Current perspectives. *Blood Lymphat Cancer.* 2018; 8:63–70.
- Marco-Sola S, Sammeth M, Guigó R, Ribeca P. The GEM mapper: fast, accurate and versatile alignment by filtration. *Nat Methods.* 2012;9(12):1185-1188.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303.
- Mo JS, Ann EJ, Yoon JH, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) controls Notch1 signaling by downregulation of protein stability through Fbw7 ubiquitin ligase. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 1):100-112.
- Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina AR, Rodriguez-Pinilla SM, et al. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica.* 2010;95(8):1342-1349.
- Montes-Moreno S, Martinez-Magunacelaya N, Zecchini-Barrese T, et al. Plasmablastic lymphoma phenotype is determined by genetic alterations in MYC and PRDM1. *Mod Pathol.* 2017;30(1):85-94.

- Morel P, Duhamel A, Gobbi P, Dimopoulos MA, Dhodapkar M V., McCoy J et al. International prognostic scoring system for Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2009; 113: 4163–4170.
- Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;476(7360):298-303.
- Morscio J, Dierickx D, Nijs J, et al. Clinicopathologic comparison of plasmablastic lymphoma in HIV-positive, immunocompetent, and posttransplant patients: single-center series of 25 cases and meta-analysis of 277 reported cases. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(7):875-886.
- Netto GJ, Saad RD, Dysert PA. Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I. *Proceedings (Baylor University Medical Center)* 2003; 16: 379–383.
- Nguyen-Khac F, Lambert J, Chapiro E, Grelier A, Mould S, Barin C et al. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica* 2013; 98: 649–54.
- Ohgami RS, Ma L, Monabati A, Zehnder JL, Arber DA. STAT3 mutations are present in aggressive B-cell lymphomas including a subset of diffuse large B-cell lymphomas with CD30 expression. *Haematologica*. 2014;99(7): e105-107.
- Ondrejka SL, Lin JJ, Warden DW, et al. MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2013; 140:387–94.
- Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat Med* 2015; 21:1199–208.
- Owen RG, McCarthy H, Rule S, D'Sa S, Thomas SK, Tournilhac O, et al. Acalabrutinib monotherapy in patients with Waldenstrom macroglobulinemia: a single-arm, multicentre, phase 2 study. *Lancet Haematol* 2020;7(2); e112–12.
- Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the second International workshop on Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30:110–5.
- Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 2001;412(6844):341-346.
- Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* 2011; 43:830–7.
- Poulain S, Roumier C, Venet-Caillault A, Figeac M, Herbaux C, Marot G et al. Genomic landscape of CXCR4 mutations in Waldenström macroglobulinemia. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 1480–1488.
- Rao RC, Dou Y. Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):334-346. doi:10.1038/nrc3929
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):24-26.

- Sakakibara A, Kohno K, Eladl AE, et al. Immunohistochemical assessment of the diagnostic utility of PD-L1: a preliminary analysis of anti-PD-L1 antibody (SP142) for lymphoproliferative diseases with tumour and non-malignant Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS)-like cells. *Histopathology*. 2018; 72:1156–1163.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463–546.
- Sarosiek KA, Malumbres R, Nechushtan H, Gentles AJ, Avisar E, Lossos IS. Novel IL-21 signaling pathway up-regulates c-Myc and induces apoptosis of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2010;115(3):570-580.
- Schmelz M, Montes-Moreno S, Piris M, Wilkinson ST, Rimsza LM. Lack and/or aberrant localization of major histocompatibility class II (MHCII) protein in plasmablastic lymphoma. *Haematologica*. 2012;97(10):1614-1616.
- Schommers P, Wyen C, Hentrich M, et al. Poor outcome of HIV-infected patients with plasmablastic lymphoma: results from the German AIDS-related lymphoma cohort study. *AIDS*. 2013;27(5):842-845.
- Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017;550(7676):345–353.
- Sklavenitis-Pistofidis R, Capelletti M, Liu C-J, et al. Bortezomib overcomes the negative impact of CXCR4 mutations on survival of Waldenstrom macroglobulinemia patients. *Blood* 2018; 132:2608–12.
- Spinner MA, Varma G, Advani RH. Novel Approaches in Waldenström Macroglobulinemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(5):875-890.
- Sutton LA, Ljungström V, Mansouri L, et al. Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: a high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. *Haematologica*. 2015;100(3):370-376.
- Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (Eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (revised 4th edition). IARC: Lyon; 2017.
- Tabanelli V, Corsini C, Fiori S, et al. Recurrent PDL1 expression and PDL1 (CD274) copy number alterations in breast implant-associated anaplastic large cell lymphomas. *Hum Pathol*. 2019; 90:60-69.
- Taddesse-Heath L, Meloni-Ehrig A, Scheerle J, Kelly JC, Jaffe ES. Plasmablastic lymphoma with MYC translocation: evidence for a common pathway in the generation of plasmablastic features. *Mod Pathol*. 2010;23(7):991-999.
- Tam W, Gomez M, Chadburn A, et al. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2006; 107:4090–100.
- Treon SP, Cao Y, Xu L, et al. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2014; 123:2791–6.
- Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826-833.

- Treon SP, Gustine J, Xu L, et al. MYD88 wild-type Waldenstrom macroglobulinaemia: differential diagnosis, risk of histological transformation, and overall survival. *mBr J Haematol* 2018;180(3):374–80.
- Trotman J, Opat S, Marlton P, Gottlieb D, Simpson D, Cull G, et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor BGB-3111 demonstrates high very good partial response (VGPR) rate in patients with Waldenström macroglobulinemia (WM). *Hematol Oncol*. 2017;35(S2):70–1.
- Urquieta Lam M, Moreno Aguirre A, Pereña Gonzalez A, et al. MYD88 L265P mutated IgA lymphoplasmacytic lymphoma. *Histopathology*. 2019;75(4):608-612.
- Valera A, Balagué O, Colomo L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(11):1686-1694.
- Valera A, Colomo L, Martinez A, et al. ALK-positive large B-cell lymphomas express a terminal B-cell differentiation program and activated STAT3 but lack MYC rearrangements. *Mod Pathol*. 2013;26(10):1329-1337.
- Varettoni M, Zibellini S, Defrancesco I, et al. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenström macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2017; 102:2077–85.
- Veloza L, Teixido C, Castrejon N, et al. Clinicopathological evaluation of the programmed cell death 1 (PD1) /programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) axis in post-transplant lymphoproliferative disorders: association with Epstein-Barr virus, PD-L1 copy number alterations, and outcome. *Histopathology*. 2019 Dec;75(6):799-812.
- Vijay A, Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2007;109(12):5096-5103.
- Wang H, Chen Y, Li F, Delasalle K, Wang J, Alexanian R et al. Temporal and geographic variations of Waldenström's macroglobulinemia incidence: a large population-based study. *Cancer* 2012; 118(15):3793-3800.
- Wang K, Zhang Q, Li D, et al. PEST domain mutations in Notch receptors comprise an oncogenic driver segment in triple-negative breast cancer sensitive to a γ -secretase inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2015;21(6):1487-1496.
- Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. 2015;21(8):922-926.
- Xu L, Hunter ZR, Tsakmaklis N, Cao Y, Yang G, Chen J et al. Clonal architecture of CXCR4 WHIM-like mutations in Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2016; 172: 735–44.
- Xu L, Hunter ZR, Yang G, et al. MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood* 2013; 121:2051–8.

-Ya-Jun Li, Ji-Wei, et al. HIV-negative plasmablastic lymphoma: report of 8 cases and a comprehensive review of 394 published cases. *Blood Res.* 2020;55(1):49-56.

-Zanwar S, Abeykoon JP, Durot E, King R, Perez Burbano GE, Kumar S, et al. Impact of MYD88(L265P) mutation status on histological transformation of Waldenstrom macroglobulinemia. *Am J Hematol.* 2019 Mar;95(3):274-281.

-Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med* 2015; 21:1190–8.

-Zhang J, Grubor V, Love CL, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:1398–403.

VII TABLAS

Tabla 1. Resumen de las características clínicas de nuestra serie de casos LLP/MW.

Sexo (masculino/femenino)	20/8.
Edad (mediana, rango)	72 (49-89).
Diagnóstico	
GMSI-IgM	4 casos
LLP/MW asintomático	5 casos
LLP/MW	19 casos
LLP/MW casos. Síntomas y signos clínicos.	
Anemia	13/19 casos (65%)
Astenia, pérdida de peso, fiebre	12/19 casos (60%)
Dolor cabeza	6/19 casos (30%)
Alteraciones visuales	2/19 casos (10%)
Síntomas relacionados con la hiperviscosidad	10/19 (50%)
Deposito de amiloide	0/19 (0%)
Neuropatía	5/19 (25%)
Esplenomegalia palpable	2/19 (10%)
Hepatomegalia	4/19 (20%)
Afectación de ganglios linfáticos	9/19 (45%)
Afectación extranodal	3/19 (15%)
Crioglobulinemia	1/19 (5%)
VHC	0/19 (0%)

Tabla 2. Patrones de infiltración en biopsias de médula ósea en nuestra serie de casos de LZM y LLC

Patrones de infiltración	24 LZM	23 LLC	
Intersticial	8 muestras (33%)	22 muestras (96%)	
Intersticial (parcheado)	0 muestras	2 muestras	
Intersticial (difuso)	3 muestras	15 muestras	
Intersticial (nodular)	4 muestras	4 muestras	
Intersticial (difuso-solido)	0 muestras	1 muestra	
Paratrabecular e intersticial	2 muestras (8%)	1 muestra (4%)	
Paratrabecular e intersticial (parcheado)	1 muestra	0 muestras	
Paratrabecular e intersticial (difuso)	0 muestras	0 muestras	
Paratrabecular e intersticial (difuso, nodular)	0 muestras	0 muestras	
Paratrabecular e intersticial (nodular)	1 muestra	1 muestra	
Paratrabecular, intersticial e intrasinusoidal	4 muestras (17%)	0 muestras	
Intersticial e intrasinusoidal	10 muestras (42%)	0 muestras	

*24 LZM: 19 LZM esplénico, 3 LZM nodal, 1 linfoma MALT.

Tabla 3. Resumen de las características clínicas de nuestra serie de casos de LPB.

Nº caso	Edad	Sexo	Localización anatómica	VIH	VEB	Trasplante	Otras inmuf.	Lesiones CRAB	Componente M	Biopsia M.O.
2	41	M	seno maxilar	positivo	positivo	no	no	no	-	negativo
4	57	M	seno maxilar	positivo	positivo	no	no	no	-	-
5	50	M	cavidad oral	positivo	positivo	no	no	no	-	-
7	38	M	recto	positivo	positivo	no	no	no	-	negativo
8	36	M	ganglio linfático	positivo	positivo	no	no	-	-	-
11	33	F	región perineal	positivo	positivo	no	no	no	negativo	negativo
14	56	M	cavidad oral	positivo	positivo	no	no	lesiones óseas	negativo	negativo
17	30	M	recto	positivo	positivo	no	no	no	negativo	negativo
20	29	M	ganglio linfático	positivo	positivo	no	no	-	-	-
21	36	M	partes blandas	positivo	positivo	no	no	no	positivo	negativo
23	44	M	region perineal	positivo	positivo	no	no	no	negativo	negativo
28	53	M	area nasofaringea	positivo	positivo	no	no	no	-	negativo
30	37	F	ovario	positivo	positivo	no	no	no	negativo	negativo
31	50	M	ganglio linfático	positivo	positivo	no	no	no	negativo	negativo
33	37	M	cavidad oral	positivo	positivo	no	no	no	negativo	negativo
24	66	M	ganglio linfático	negativo	positivo	trasplante renal	no	no	-	-
25	62	F	tracto gastro intestinal	negativo	positivo	alo trasplante (LLC)	no	no	-	-
1	66	M	ganglio linfático	negativo	negativo	no	no	no	negativo	negativo
3	64	M	ganglio linfático	negativo	negativo	no	no	no	-	-
9	75	M	ganglio linfático	negativo	negativo	no	no	no	negativo	negativo
10	58	F	tracto gastro intestinal	negativo	positivo	no	no	no	-	negativo
12	92	M	región nasal	negativo	negativo	no	no	no	-	-
16	62	M	seno maxilar	negativo	positivo	no	no	no	-	negativo
19	79	F	ganglio linfático	negativo	positivo	no	no	-	-	-
22	76	M	piel	negativo	negativo	no	no	no	-	negativo
13	75	M	region nasal	-	negativo	-	-	-	-	-
15	82	M	cavidad oral	-	negativo	-	-	no	-	-
18	56	F	intestino delgado	-	negativo	no	no	no	negativo	-
26	43	M	región paranasal	-	positivo	-	-	no	-	-
27	76	M	región paranasal	-	positivo	-	-	no	-	-

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para el diagnóstico de LLP y LPB.

Anticuerpo	Clon	Casa Comercial	Dilución
ALK	ALK1	DAKO	RTU
BCL-2	124	DAKO	RTU
BCL-6	PG-B6p	DAKO	RTU
Blimp-1	ROS195G	CNIO	RTU
CD10	56C6	DAKO	RTU
CD138	MI15	DAKO	RTU
CD163	EDHu-1	Serotec	–
CD20	L26	DAKO	RTU
CD3	policlonal	DAKO	RTU
CD30	Ber-H2	DAKO	RTU
CD38	SPC32	Leica	1.2
CD4	4B12	DAKO	RTU
CD8	C8/144B	DAKO	RTU
C-MYC	Y69	Abcam	1.50
DBA-44	DBA.44	DAKO	RTU
EBV-LMP1	CS. 1-4	DAKO	RTU
HHV-8	LN53	Novus Biologicals	1.10
HLA-DP/DR	JS76	CNIO	1.4
IRF4/MUM-1	MUM1p	DAKO	RTU
Kappa	policlonal	DAKO	RTU
KI67	MIB-1	DAKO	RTU
Lambda	policlonal	DAKO	RTU
PAX-5	DAK-Pax5	DAKO	RTU
PD1	NAT105C	CNIO	1.5
PD-L1	22C3	DAKO	–
P-STAT3 (Tyr705)	EP2147Y	Millipore	1.1
Triptasa	AA1	DAKO	RTU

Tabla 5. Resumen de las mutaciones somáticas identificadas mediante NGS de nuestra serie de LLP/MW

Nº Caso	Gen	Crom.	Localización	Alelo	Posición ADN	Cambio de Amin.	FAV (NGS)	Consecuencia	Registro-varint
5a.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	31%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
5b.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	28%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
6.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	3%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
6.	CXCR4	2	exon 1	G	c.1025C>G	342 S342*	—	Sin sentido	COSM5981986
11.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	51%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
12.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	28%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
13a.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	59%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
13b.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	20%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
14.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	13%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
15.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	10%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
15.	PRDM1	6	exon 7	T	c.2251C>T	673 H/Y	28%	Cambio de sentido/ deleterea	—
15.	MYC	8	exon 3	G	c.1721A>G	404 K/R	15%	Cambio de sentido/ deleterea	—
19.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	24%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
24b.	MYD88	3	exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	12%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM85940
24b.	KMT2D	12	exon 31	T	c.794T>C	2557 P/L	28%	Cambio de sentido/ deleterea	COSM1362024
24b.	KMT2D	12	exon 14			1379 Met1379fs	24%	Delección con desplazamnt./deleterea	—
21.	ID3	1	exon 1	T	c.376C>T	A/V	15%	Cambio de sentido/ deleterea	—

Tabla 6. Resumen de las mutaciones somáticas identificados mediante NGS de nuestra serie de LPB

Nº Caso	Gen	Local. crom.	Dominio	Alelo	Posición ADN	Codones	Cambio de Am.	Consecuenc.	Registro-varint
4	STAT3	17	—	A	2009	G a c / T a c	566 D/Y	deleterea	COSM220689
4	EP300	22	—	A	7249	a t G / a t A	2010 M/I	tolerada	—
11	MYC	8	—	G	578	a C c / a G c	23 T/S	tolerada	—
11	MYC	8	—	A	775	T a c / A a c	89 Y/N	tolerada	—
11	MYC	8	—	C	899	t T c / t C c	130 F/S	deleterea	COSM4171775
11	MYC	8	—	G	945	a t C / a t G	145 I/M	deleterea	—
14	STAT3	17	SH2	A	2255	A t g / T t g	648 M/L	tolerada	—
14	STAT3	17	SH2	A	2232	T a c / t T c	640 Y/F	probable dañ.	COSM1155743
17	STAT3	17	SH2	G	2165	G g c / C g c	618 G/R	deleterea	COSM1166777
17	PRDM1	6	PR	G	843	g a C / g a G	203 D/E	neutral	rs811925*, COSM4160094
28	PRDM1	6	PR	G	843	g a C / g a G	203 D/E	neutral	rs811925*, COSM4160094
7	MYC	8	—	T	1085	t A c / t T c	192 Y/F	probable dañ.	—
7	CD79B	17	—	T	175	G a c / A a c	34 D/N	tolerada	—
8	SMARCA4	19	—	A	3295	c G a / c A a	1005 R/Q	deleterea	—
8	PRDM1	6	Ac	A	2546	g G c / g A c	771 G/D	tolerada	—
2	STAT3	17	SH2	A	2253	a A c / a T c	647 N/I	deleterea	COSM1155744
2	NOTCH1	9	EGF-like	A	1278	c C c / c T c	401 P/L	deleterea	COSM4745915
5	STAT3	17	SH2	A	2232	t A c / t T c	640 Y/F	probable dañ.	COSM1155743
10	PRDM1	6	Pro-rich	A	1295	a G c / a A c	354 S/N	tolerada	rs143040512, COSM4406870
10	CD79A	19	—	A	413	t g G / t g A	76 W/*	—	COSM5493940
26	PRDM1	6	PR	G	843	g a C / g a G	203 D/E	neutral	rs811925*, COSM4160094
27	PRDM1	6	PR	G	843	g a C / g a G	203 D/E	neutral	rs811925*, COSM4160094
3	ARID1A	1	—	A	762	G g g / A g g	131 G/R	deleterea	—
3	ARID1A	1	—	C	6526	t G c / t C c	2052 C/S	deleterea	—
3	MYD88	3	TIR	C	794	c T g / c C g	265 L/P	deleterea	COSM85940
15	BRAF	7	P binding si	G	1467	g G a / g C a	469 G/A	deleterea	COSM460
18	SGK1	6	—	A	1950	t C c / t T c	451 S/F	deleterea	—
18	SGK1	6	—	A	1737	g C t / g T t	380 A/V	tolerada	—
9	NOTCH2	1	PEST	A	7418	C g a / T g a	2400 R/*	deleterea	COSM36210
1	MYC	8	—	T	747	a g C / a g T	79 S/	—	—
1	EP300	22	—	A	6411	c G c / c A c	1731 R/H	deleterea	—
1	BRAF	7	STKc_Raf	T	1860	g T g / g A g	600 V/E	deleterea	COSM476
1	SGK1	6	—	A	1004	A a g / T a g	136 K/*	deleterea	—
13	TP53	17	—	T	1008	c G t / c A t	273 R/H	probable dañ.	COSM10660

Tabla 7. Resumen de las características inmunológicas, histopatológicas, fenotípicas y moleculares de nuestra serie de LLP/MW.

Proteína M (mediana, rango)	2,53 gr (0,17-6,47)	
Restricción de cadenas ligeras	K 19 casos (68%)	
	L 9 casos (32%)	
Patrones de infiltración en médula ósea, casos LLP:		
<u>Paratrabecular e intersticial</u>	21 muestras (67%)	
Paratrabecular e intersticial (parcheado)	9 muestras	
Paratrabecular e intersticial (difuso)	4 muestras	
Paratrabecular e intersticial (difuso, nodular)	1 muestra	
Paratrabecular e intersticial (nodular)	7 muestras	
Intersticial	10 muestras (32%)	
Interticcial (parcheado)	3 muestras	
Intersticial (difuso)	1 muestra	
Intersticial (nodular)	2 muestras	
Intersticial (difuso-solido)	4 muestras	
Patrones de infiltración en médula ósea, casos GMSI-IgM:		
Intersticial (parcheado)	4 muestras (100%)	
Fenotipo		
Células B CD20 positivo (IHQ), mediana, rango	20% (0-80%)	
Células B clonales CD20 positivo (CMF), mediana, rango	6,6% (0-62%)	
Mutación MYD88pL265P (PCR-AS)		
LLP	22/24 (92%)	FAV 0,09 (0-0,72)
GMSI-IgM	1/4 (25%)	FAV 0,045

Tabla 8. Porcentaje de infiltración neoplásica en médula ósea mediante las diferentes técnicas diagnósticas.

Nº caso	Diagnóstico	Diagn clínico	Edad	Sexo	Patrón de infiltración en M.O.	Rest. c. ligeras	Comp. M (mg)	IHQ CD20	CMF cél. B clon.	Mut. MYD88L265P	FAV(PCR-AS,%)
1	GMSI-IgM	GMSI-IgM	72	M	intersticial (parcheado)	Kappa	570	2	0	positiva	0,45
2	GMSI-IgM	GMSI-IgM	79	M	intersticial (parcheado)	lambda	1120	5	1	negativa	0
3	GMSI-IgM	GMSI-IgM	88	M	intersticial (parcheado)	lambda	1970	5	6,7	negativa	0
4	GMSI-IgM	GMSI-IgM	84	F	intersticial (parcheado)	Kappa	1200	0	2,4	negativa	0
5	LLP/MW	sintomatico	83	M	intersticial (difuso-sólido)	Kappa	2890	80	62,1	positiva	46,6
6	LLP/MW	asintomatico	79	F	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	2500	10	1,6	positiva	7
7	LLP/MW	asintomatico	49	M	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	1960	20	6,4	positiva	5,61
8	LLP/MW	sintomatico	77	M	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	3210	15	5,6	positiva	2,2
8	LLP/MW	sintomatico	77	M	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	4000	15	5	positiva	11,2
9	LLP/MW	sintomatico	58	M	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	4170	70	36,1	positiva	23,4
9	LLP/MW	sintomatico	58	M	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	1560	20	0,02	positiva	20,3
10	LLP/MW	sintomatico	65	M	intersticial (difuso)	Kappa	3700	60	45	positiva	24,5
10	LLP/MW	sintomatico	65	M	intersticial (nodular)	Kappa	2560	2	6,5	negativa	0
10	LLP/MW	sintomatico	65	M	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	4050	20	20,2	negativa	0
10	LLP/MW	sintomatico	65	M	intersticial (parcheado)	Kappa	983	5	0	positiva	1,47
11	LLP/MW	sintomatico	70	M	intersticial (difuso-sólido)	Kappa	385	80	43,3	positiva	12,3
12	LLP/MW	sintomatico	81	M	intersticial (difuso) y paratrabecular	Kappa	962	80	26	positiva	9,85
13	LLP/MW	sintomatico	71	M	intersticial (nodular) y paratrabecular	lambda	4220	30	2,5	positiva	20,4
14	LLP/MW	asintomatico	77	F	intersticial (nodular) y paratrabecular	lambda	2670	35	18,5	positiva	20,6
15	LLP/MW	sintomatico	85	M	intersticial (nodular) y paratrabecular	lambda	6470	30	3,5	positiva	11,2
16	LLP/MW	sintomatico	82	M	intersticial (nodular) y paratrabecular	Kappa	1610	20	2,2	positiva	4
17	LLP/MW	sintomatico	85	F	intersticial (nodular) y paratrabecular	lambda	3120	60	7,05	positiva	3,25
18	LLP/MW	sintomatico	77	M	intersticial (nodular) y paratrabecular	Kappa	1090	30	6,6	positiva	9,5
19	LLP/MW	sintomatico	80	M	intersticial (difuso-nodular) y paratrabecular	Kappa	3000	40	9,4	positiva	4,8
20	LLP/MW	sintomatico	56	M	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	2620	60	2	positiva	33
21	LLP/MW	sintomatico	72	M	intersticial (nodular)	Kappa	2160	20	7	negativa	0
22	LLP/MW	sintomatico	64	M	intersticial (difuso) y paratrabecular	Kappa	3120	40	10,3	negativa	0
23	LLP/MW	asintomatico	58	M	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	3010	15	7,6	positiva	1,26
24	LLP/MW	sintomatico	64	F	intersticial (parcheado) y paratrabecular	Kappa	3490	30	30	—	—
24	LLP/MW	sintomatico	64	F	intersticial (parcheado)	Kappa	3000	2	16	positiva	72
24	LLP/MW	sintomatico	64	F	intersticial (parcheado)	Kappa	482	2	0	—	—
25	LLP/MW	sintomatico	64	F	intersticial (parcheado) y paratrabecular	lambda	350	20	2,9	positiva	0,88
26	LLP/MW	sintomatico	72	F	intersticial (difuso-sólido)	lambda	2680	80	46	positiva	43,4
27	LLP/MW	sintomatico	89	M	intersticial (difuso-sólido)	Kappa	1009	80	40	positiva	42,5
28	LLP/MW	asintomatico	70	F	intersticial (nodular) y paratrabecular	lambda	3200	30	6,6	positiva	7,06

ANEXO: PUBLICACIONES ORIGINALES.

- 1) TÍTULO:** Diagnostic value of bone marrow core biopsy patterns in lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinaemia and description of its mutational profiles by targeted NGS.

AUTORES: Garcia-Reyero J, Martinez Magunacelaya N, Gonzalez de Villambrosia S, Gomez Mediavilla A, Urquieta Lam M, Insunza A, Tonda R, Beltran S, Gut M, Gonzalez A, Montes-Moreno S.

REVISTA: J Clin Pathol. 2020; jclinpath-2019-206282. doi:10.1136/jclinpath-2019-206282

- 2) TÍTULO:** Genetic lesions in MYC and STAT3 drive oncogenic transcription factor overexpression in plasmablastic lymphoma.

AUTORES: Garcia-Reyero J, Martinez Magunacelaya N, Gonzalez de Villambrosia S, Loghavi S, Gomez Mediavilla A, Tonda R, Beltran S, Gut M, Pereña Gonzalez A, d' Ámore E, Visco C, Khoury JD, Montes-Moreno S.

REVISTA: Haematologica. 2020; haematol.2020.251579. doi:10.3324/haematol.2020.251579.

Journal of Clinical Pathology

Diagnostic value of Bone marrow core biopsy patterns in Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldeström Macroglobulinemia and description of its mutational profiles by targeted NGS.

Journal:	<i>Journal of Clinical Pathology</i>
Manuscript ID	jclinpath-2019-206282.R2
Article Type:	Original research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Garcia-Reyero, Julia; Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Anatomic Pathology Martinez Magunacelaya, Nerea; Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Anatomic Pathology Gonzalez de Villambrosia, Sonia; Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Anatomic Pathology Gomez Mediavilla, Angela; Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Anatomic Pathology Urquieta Lam, Marcela; Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Anatomic Pathology Insunza, Andres; Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Anatomic Pathology Tonda, Raul; Centre de Regulacio Genomica Beltran, Sergi; Centre de Regulacio Genomica Gut, Marta; Centre de Regulacio Genomica Gonzalez, Ainara; Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Anatomic Pathology Montes-Moreno, Santiago; Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Anatomic Pathology
Specialty:	Histopathology
Keywords:	LYMPHOMA, HISTOPATHOLOGY, MOLECULAR PATHOLOGY

SCHOLARONE™
Manuscripts



I, the Submitting Author has the right to grant and does grant on behalf of all authors of the Work (as defined in the below author licence), an exclusive licence and/or a non-exclusive licence for contributions from authors who are: i) UK Crown employees; ii) where BMJ has agreed a CC-BY licence shall apply, and/or iii) in accordance with the terms applicable for US Federal Government officers or employees acting as part of their official duties; on a worldwide, perpetual, irrevocable, royalty-free basis to BMJ Publishing Group Ltd ("BMJ") its licensees and where the relevant Journal is co-owned by BMJ to the co-owners of the Journal, to publish the Work in this journal and any other BMJ products and to exploit all rights, as set out in our [licence](#).

The Submitting Author accepts and understands that any supply made under these terms is made by BMJ to the Submitting Author unless you are acting as an employee on behalf of your employer or a postgraduate student of an affiliated institution which is paying any applicable article publishing charge ("APC") for Open Access articles. Where the Submitting Author wishes to make the Work available on an Open Access basis (and intends to pay the relevant APC), the terms of reuse of such Open Access shall be governed by a Creative Commons licence – details of these licences and which [Creative Commons](#) licence will apply to this Work are set out in our licence referred to above.

Other than as permitted in any relevant BMJ Author's Self Archiving Policies, I confirm this Work has not been accepted for publication elsewhere, is not being considered for publication elsewhere and does not duplicate material already published. I confirm all authors consent to publication of this Work and authorise the granting of this licence.

Diagnostic value of Bone marrow core biopsy patterns in Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldeström Macroglobulinemia and description of its mutational profiles by targeted NGS.

Running title: LPL/WM bone marrow infiltration features

Julia Garcia-Reyero^{1, 2*}, Nerea Martinez Magunacelaya^{2*}, Sonia Gonzalez de Villambrosia³, Angela Gomez Mediavilla², Marcela Urquieta Lam¹, Andres Insunza Gaminde³, Raul Tonda⁴, Sergi Beltran⁴, Marta Gut⁴, Ainara Gonzalez Pereña² and Santiago Montes-Moreno^{1, 2}.

1. Anatomic Pathology Service. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL. Universidad de Cantabria. Santander, Spain

2. Translational Hematopathology Lab, IDIVAL. Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC). Santander, Spain

3. Flow Cytometry Unit, Hematology Service, HUMV/IDIVAL. Santander, Spain

4. Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG-CRG). Barcelona Institute of Science and Technology (BIST). Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain.

* Both authors contributed equally to the paper. The authors declare no potential conflict of interest related to this work. WC:

3126 Abstract WC: 236, 2 Figures, 3 Tables. 2 Supplementary material files.

Acknowledgements: This study was supported by grants from MINECO (PI16/1397, SMM, Principal Investigator) and IDIVAL (NEXTVAL 15/09, SMM, Principal Investigator). NMM was supported by Asociación Española contra el Cancer (AECC). The authors want to acknowledge the Valdecilla Tumor Biobank Unit (Tissue Node, PT13/0010/0024) for their skillful handling of tissue samples.

Author for correspondence: Santiago Montes Moreno MD, PhD.

Anatomic Pathology Service, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Translational Hematopathology Lab. IDIVAL. Universidad de Cantabria.

Avda de Valdecilla s/n, 39010, Santander, Cantabria, España.

Tlf/ FAX: (34) 942-203492. E-mail: santiago.montes@scsalud.es

Abstract.

AIMS: The aim of this study was to describe the characteristics of the bone marrow infiltration found in a series of clinically defined LPL/WM and IgM-MGUS and to perform a targeted NGS for the identification of additional somatic mutations to *MYD88*p.L265P in LPL/WM.

METHODS: We have reviewed a series of 35 bone marrow biopsies from 28 patients with a clinical diagnosis of LPL/WM (24 cases) or monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) (4 cases). Bone marrow infiltration characteristics by morphology, IHC, FCM, allele-specific real-time PCR for the detection of *MYD88*p.L265P mutation, targeted exonic amplicon-based NGS of 35 lymphoma-related genes and direct sequencing were analyzed.

RESULTS: Our findings show that bone marrow trephine biopsy evaluation is superior to FCM in the identification of significant lymphoid infiltrates. A combined paratrabecular and interstitial infiltration pattern is the most common feature in LPL/WM while a patchy interstitial pattern characterizes IgM-MGUS cases. *MYD88*p.L265P mutation was found by AS-PCR in 92% of the LPL cases (22 out of 24) and 25% of IgM-MGUS cases (1 out of 4 cases). In addition to *MYD88*p.L265P somatic mutations in *CXCR4*, *KMT2D*, *PRDM1*/Blimp1, *MYC* and *ID3* were found by NGS and direct sequencing in 4 cases.

CONCLUSIONS: In conclusion, bone marrow core biopsy evaluation is critical in the identification of unequivocal bone marrow infiltration by LPL/WM. In addition to *MYD88*p.L265P, somatic mutations in *CXCR4*, *KMT2D*, *PRDM1*/Blimp1, *MYC* and *ID3* can appear in a fraction of LPL/WM.

KEY WORDS: Lymphoplasmacytic Lymphoma, Bone marrow infiltration patterns, NGS, *MYD88*

BACKGROUND

Lymphoplasmacytic lymphoma (LPL) is a neoplasm of small B cell lymphocytes, plasmacytoid lymphocytes and plasma cells, usually involving the bone marrow and sometimes lymph node and spleen¹. Waldenström Macroglobulinemia (WM) is defined by the combination of a LPL with an IgM monoclonal component², irrespective of the amount of the monoclonal paraprotein¹. *MYD88*p.L265P somatic mutation has been found to be the driver mutation in most cases³⁻⁶.

The pattern of bone marrow infiltration in cases of LPL/WM has been previously characterized in retrospective case series with some detail^{7,8}, emphasizing the differential diagnostic features with other small B cell lymphomas such as marginal zone lymphoma⁷. On the other hand, IgM Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) has been recently incorporated in the revised version of the WHO classification of tumors¹. This category has been also suggested to be applied in cases that may show equivocal evidence of marrow disease. In this regard, the equivalency of bone marrow aspirate cell count, the demonstration of clonal B cells by flow Cytometry (FCM) or molecular methods and bone marrow trephine infiltration patterns and cellular quantification is controversial.

The aim of this study was to describe the characteristics of the bone marrow infiltration in clinically defined LPL/WM and IgM-MGUS performing a correlation study between the bone marrow trephine biopsy patterns of infiltration and the results from immunohistochemistry (IHC), FCM and molecular testing for the detection of *MYD88*p.L265P mutation. In addition, we have performed targeted Next Generation Sequencing (NGS) and direct sequencing for the identification of additional somatic mutations in candidate genes relevant for lymphoma pathogenesis in a subset of cases.

METHODS.

Case Selection.

31 samples from 24 patients with Lymphoplasmacytic Lymphoma/WM and 4 cases diagnosed as IgM-MGUS were obtained retrospectively from the files of the Anatomic Pathology Department of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. In addition a series of 47 bone marrow trephine biopsies from patients with a diagnosis of Marginal Zone Lymphoma (MZL, 24 cases) and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL, 23 cases) were reviewed. Clinical data were retrieved in all cases (see summary in Table 1). The study and sample collection were approved by the local ethics committee (CEIC Cantabria) and complies with the Declaration of Helsinki. Informed written consent was obtained when required. Details about case and tissue procurement can be found in supplementary materials.

Morphology, Immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. Conventional karyotyping and flow cytometry.

Histopathological patterns in the bone marrow biopsy were categorized as paratrabecular, interstitial (diffuse), interstitial (nodular), interstitial (diffuse-solid), interstitial (patchy) or a combination of those. A focal infiltrate was considered paratrabecular when the contact surface of the infiltrate with the trabecular bone was larger than the maximum diameter perpendicular to the bone. Interstitial infiltrates were categorized as nodular when clearly defined focal infiltrates were found in an intertrabecular location. Diffuse infiltrates were considered patchy, diffuse or diffuse-solid according to the density of lymphoid cells in the bone marrow stroma (see supplementary figures 4 and 6 for details).

Immunohistochemical reactions were performed following conventional automated procedures. Conventional karyotyping and multicolor flow Cytometry were also performed using bone marrow whole cell population aspirate material. See supplementary materials for details.

Allele-Specific PCR for the detection of MYD88p.L265P mutation.

A customized assay based on allele specific Polymerase Chain Reaction (PCR) using Taqman probes (ThermoFisher) against wild type and mutant L265P *MYD88* gene was used. Validation results against Sanger sequencing showed a specificity of 100% for the identification of *MYD88*p.L265P mutation. Detection sensitivity using FFPE material was 5% and 1% using DNA from bone marrow aspirate fresh material.

Next Generation Sequencing using amplicon-based library generation and Sanger sequencing for the detection of *CXCR4* mutation.

DNA was extracted from formalin fixed paraffin embedded samples or fresh bone marrow aspirate samples using the PicoPure™ DNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific) and DNA was quantified by Qbit fluorometer (ThermoFisher Scientific). All samples subjected to NGS analysis were required to have >10% of clonal B cells as identified by either FCM or IHC. Details about amplicon-based library generation, NGS and direct sanger sequencing data interpretation and reporting can be found in supplementary materials. Finally, 16 somatic mutations (15 missense, 1 frameshift deletion) in 5 genes were considered (Table 3). The complete list of genes analysed, and variants identified in the cases analysed is shown in Supplementary material and Table 3.

Statistical analysis.

XLSTAT Biomed software (version 19.4) was used for statistical analysis. Wilcoxon test and Pearson correlation tests were calculated. Descriptive statistics were performed.

RESULTS.

A summary of the clinical features of the series can be found in Table 1 and supplementary Table. The cohort was composed of 28 patients, 20 male (70%) and 8 female. Median age was 72-year-old (range 49 to 89 year old). 19 out of 28 (68%) patients fulfilled criteria for LPL/WM, 5 patients (19%) were considered asymptomatic or smouldering LPL/WM² and 4 cases were classified as IgM-MGUS. Among LPL/WM the most common clinical presentation included anemia (65%), constitutional symptoms (60%) and hyperviscosity related symptoms (50%). 5 patients had IgM

related neuropathy and 1 single patient cryoglobulinemia. Palpable splenomegaly was found in 2 patients (10%) and nodal involvement by CT-scan in 9 patients (45%). In three patients lymph node biopsy confirmed involvement by LPL. None of our patients had HCV infection.

Lymphoplasmacytic Lymphoma/WM shows a predominantly paratrabecular pattern combined with interstitial infiltrates. IgM-MGUS shows a patchy interstitial pattern of infiltration.

LPL/WM bone marrow biopsy results are summarized in Table 2. LPL core biopsy samples were characterized by a paratrabecular infiltration pattern (21 samples, 67%), combined with either patchy (9 samples, 25%), nodular (7 samples, 19%) or diffuse (5 samples, 13%) interstitial patterns. The other 10 samples (32%) showed a non-paratrabecular pattern with interstitial involvement (patchy in 3 samples, nodular in 2 samples, diffuse in 1 sample, diffuse-solid in 4 samples). The samples with patchy interstitial infiltrate derived from 2 patients (n10, n24) with previous pretreatment core biopsies with a significant infiltrate. All 4 cases of IgM-MGUS showed a patchy interstitial infiltrate (Figure 1). In contrast only 6 out 23 (25%) cases of MZL (19 cases of SMZL, 3 NMZL and 1 case of MALT lymphoma) showed a paratrabecular component and only 1 out of 24 (4%) cases of CLL showed this pattern. The most common infiltration pattern in MZL was interstitial and intrasinusoidal (10 samples, 42%), followed by interstitial only (8 samples, 33%). CLL cases were almost purely interstitial (22 samples, 96%). (see supplementary Table 1).

Regarding the cytological features, all cases showed the presence of small B cell lymphocytes, plasmacytoid cells and plasma cells with variable degrees of plasma cell differentiation. Dutcher bodies were present although infrequent (Supplementary Figure 3). One sample showed a complete absence of B lymphoid cells and was composed purely of plasmacytoid and plasma cells (case n4, IgM-MGUS). Mast cells were present in almost every case.

Bone marrow quantification of B cells and correlation with *MYD88*p.L265P allele burden determination by AS-PCR.

Bone marrow cells in the trephine biopsy were stained with antibodies against CD20 and CD138 and positive cells were quantified by visual estimation against the overall marrow cellularity. A estimation of the percentage of positive cells with both markers was annotated for every sample in 5% increments. The median percentage of CD20 positive cells in all 35 available samples was 20% (range 0-80%) and the median presence of CD20 and CD138 positive cells was 40% (range 5-90%). Flow cytometry performed using bone marrow aspirate material disclosed a median percentage of clonal B cells of 6.6% (range 0-62%). Thus, quantification of B cells by IHC using CD20 antibody showed higher values than by FCM in 32 out of 35 cases (p value of the median difference, Wilcoxon test $p < 0.0001$, see supplementary Table 1 and supplementary figure 6). There was a high correlation between the quantification of B cells using CD20 IHC and the quantification of clonal B cells by FCM (Pearson 0.78, p value < 0.0001 , supplementary figure 1). Regarding the correlation between the amount of bone marrow infiltration by lymphoplasmacytic cells and the presence of symptoms attributable to the disease, we found no difference between smouldering LPL cases and LPL/WM cases. As shown in supplementary table, smouldering LPL cases (6, 7, 14, 23, 28) had a median % of B cells by IHC of 20 (range 10-35) and by FCM of 6.6 (range 1.6 -18.5). The same median values were obtained for the 19 LPL/WM cases.

In addition, we performed tryptase staining in 18 samples. In 5 samples (28%) mast cells comprised $< 5\%$ of the bone marrow cellularity. In 13 samples (72%) it was between 5 and 10% of the cellularity. DBA44 was also performed in 15 cases. In 5 cases DBA44 staining was in the range of 1-5% of the cellularity. In 10 cases it was negative.

After AS-PCR 22 out of 24 LPL/WM cases (92%) were positive for *MYD88*p.L265P mutation. In 1 out of 2 of the negative cases, the quantification of clonal B cells in the sample analyzed was

below the detection limit of the technique, thus a false negative result could not be ruled out. Median Variant Allele Frequency (i.e, the fraction of mutated DNA in the total DNA present in a given sample) of the mutated LPL cases was 9% (range 0-72%). One out of 4 (25%) IgM-MGUS cases was positive with a VAF of 4%. Correlation between the AS-PCR values from 27 samples with positive results for both AS-PCR and FCM was significant (Spearman correlation value 0.477, p value 0.013, supplementary figure 2A) as it was the comparison between AS-PCR and IHC (Spearman correlation value 0.457, p value 0.017, supplementary figure 2B).

Genetic characterization of LPL. Additional genetic events to *MYD88*p.L265P mutation include *CXCR4*, *KMT2D*, *PRDM1* and *MYC* mutations.

Targeted NGS was performed with a customized amplicon based NGS protocol using DNA from FFPE or aspirate bone marrow samples. 13 samples from 11 patients with a significant neoplastic infiltration ($\geq 10\%$ by FCM/IHC) were included in this analysis. A summary of the results is shown in Figure 2 and Table 3. Nine out of 11 cases were *MYD88*p.L265P mutated and 2 cases were negative (n21, n22). In 6 out of these 9 cases, only *MYD88*p.L265P mutation was found after targeted NGS. The other two cases had additional mutations in *PRDM1*, *MYC* (case n15) and *KMT2D* (case n 24). One of the two *MYD88* wild type cases had mutations in *ID3*. After direct Sanger sequencing 1 (case n6) out of 4 analyzed cases (25%) was found to harbor the *CXCR4* c.1025 C>G (p.S342*) mutation (Supplementary material). The lack of detection of this particular mutation in this case by targeted NGS was probably due to a drop-off NGS artifact.

Recurrent mutations, different than *MYD88*p.L265P were found in *KMT2D*. Interestingly one case (n24) had two different *KMT2D* mutations (one frameshift deletion in exon 14 and one missense single nucleotide mutation (c.7670C>T) in exon 31). A possible mechanism of *KMT2D* biallelic inactivation is suggested based on this pattern of *KMT2D* mutations.

In addition, 6q deletion was studied in 9 cases by conventional interphase FISH and/or conventional karyotyping. 6q deletion was found in 5 out of 9 cases (55%, n5, n12, n13, n14 and n25). All five cases were *MYD88*p.L265P mutated.

CONCLUSIONS

The diagnosis of LPL/WM according to the updated WHO classification relies on the identification of a significant bone marrow infiltration by LPL clonal B cells. The category of IgM-MGUS has been incorporated to classify those cases that do not have unequivocal bone marrow infiltration¹. An arbitrary cut-off of 10% clonal lymphoplasmacytic cells has been designated as the threshold to identify an LPL infiltrate as significant. However, discordant results can be found when analyzing the bone marrow infiltration with different available methods including morphological assessment of the bone marrow aspirate and bone marrow biopsy, identification of clonal B cell populations by FCM and clonality studies^{2,9}. To date, no study has analyzed the correlation between the different methods used in these multiparametric approach using new available molecular tools in the framework of the revised WHO classification. The aim of this study was to characterize and correlate the results of these complementary methods in a series of patients in order to optimize the identification of LPL/WM patients that may require therapeutic intervention. In addition, we have expanded the genetic characterization of our cases to identify coexisting genetic events in the disease.

Morphological assessment of the bone marrow infiltration pattern in the trephine core biopsy showed that a combined paratrabecular and interstitial pattern was the most common feature in LPL cases, with 60% of the cases showing different combinations of patterns. In contrast, MZL and CLL cases in our study showed predominantly interstitial patterns, combined with intrasinusoidal growth in the case of MZL. These results are in contrast with the traditional concept of a interstitial pattern of bone marrow involvement in LPL cases¹. Recent reports have shown a similar result to ours, with a relatively high frequency of paratrabecular involvement in

LPL cases, both MYD88 mutated and wild type^{8,10}. Interestingly this morphological feature has also been found by others as a significant differential feature with marginal Zone B cell lymphoma involving the bone marrow⁷. Thirty-two percent of our LPL samples showed a non-paratrabeular pattern with interstitial infiltration. Only 3 of the samples showed a limited patchy interstitial infiltrate and these samples derived from patients after initial therapy. In contrast to LPL cases, all four cases with IgM-MGUS showed a limited patchy interstitial infiltrate. Although the number of IgM-MGUS cases here analyzed is relatively small, our results suggest that a patchy interstitial infiltrate is the tissue correlate of IgM-MGUS. Adequate IHC analysis is required to identify this pattern in cases of pretreatment bone marrow samples with suspected IgM-MGUS. Interestingly this pattern can also be found in samples with low tumor burden after therapy.

Regarding the phenotypic evaluation of LPL infiltrates there was a good correlation between the quantification of clonal B cells by FCM and the estimation of B cells in the core biopsy sample by IHC. Importantly bone marrow core biopsy rendered in most cases a higher value than by FCM and this difference was significant. Interestingly in 14 out of 24 patients FCM quantification of clonal B cells was below the 10% threshold while the quantification by IHC in the bone marrow core biopsy was sufficient to meet the criteria for LPL according to WHO classification¹. 5 out of these 14 patients were considered smouldering LPL. Thus, our results suggest that it is worthwhile to evaluate the presence of neoplastic B cell infiltrates by IHC in the core biopsy samples to improve the detection of LPL cases. A possible explanation for these differences might be the preferential distribution of the LPL infiltrates in the paratrabeular regions and its association with reticulin fibrosis. This topography may prevent the aspiration the neoplastic infiltrate and its underestimation by FCM using bone marrow aspirate material. On the other hand, the multifocality and heterogeneous distribution of the infiltrate in the trephine biopsy may explain some discrepant results in few cases after serial sections of the material for downstream molecular methods.

We identified *MYD88*p.L265P somatic mutation by AS-PCR in 22 out of 24 LPL cases (92%) and one additional case of IgM-MGUS. This prevalence of *MYD88*p.L265P mutation is like previously reported cohorts^{5,6,11-15}. Interestingly AS-PCR quantitative results correlated well with the clonal B cell quantification by FCM and IHC of the bone marrow aspirate samples, providing an acceptable method for the quantification of the neoplastic population by molecular methods. AS-PCR and targeted NGS were concordant for the detection of *MYD88*p.L265P mutation in 20 out of 21 tested samples (92%) in our series. No other *MYD88* mutations were found after targeted NGS of *MYD88* exonic regions in our cases. Previously reported data have shown rates up to 31% of false negative results using targeted NGS when compared with AS-PCR^{13,16}.

After targeted NGS with a lymphoma dedicated panel of genes we found additional somatic mutations to *MYD88*p.L265P in roughly one fourth of the cases (3 out of 11 cases). Direct Sanger sequencing was required to identify *CXCR4* mutation in 1 additional case. Co-mutated genes were *MYD88* and *CXCR4*, *MYD88* and *KMT2D* and *MYD88*, *PRDM1* and *MYC*. Interestingly, one *MYD88* wild type case had a missense mutation in *ID3*. Except for *CXCR4*, *KMT2D* and *PRDM1* mutations, *MYC* and *ID3* have not been previously described in the disease. The VAF of these novel mutations is concordant with the clonal B cell fraction found in the samples by phenotyping and consistent with a derivation from the LPL clonal B cells.

CXCR4 mutations have been associated with worse outcome for LPL/WM patients^{5,17}. A recent phase III trial suggests that *CXCR4* mutations do not alter overall survival or progression free survival in patients treated with a combination including Ibrutinib plus Rituximab but evidence is limited¹⁸.

KMT2D somatic mutations have been previously found in both *MYD88*p.L265P mutated and wild type cases. The prevalence is roughly 20-25% and some groups reported a higher incidence in *MYD88*p wild type cases¹⁹ when compared with *MYD88*p.L265P mutated cases. It has been found at subclonal levels in *MYD88*p.L265P mutated cases¹³. Its relatively high prevalence in LPL

cases suggests a potential role in the pathogenesis of the disease. Interestingly *KMT2D* germline mutations have been found associated with Kabuki syndrome²⁰ and *KMT2D* knockout in mice leads to reduced class-switched B cell populations following immunization, consistent with defective terminal B cell differentiation^{21,22} and mirroring the immune deficiency found in Kabuki syndrome patients.

Regarding *PRDM1* mutations, we have identified a somatic missense mutation located in exon 7 of the gene (c.2251C>T; H673Y) that involves the Zn finger domain, responsible of transcriptional regulation of *PRDM1*/Blimp1 protein target genes. This mutation has been identified previously by our group in a case of plasmablastic lymphoma²³. *PRDM1* gene has been found mutated in ~ 8% of overall diffuse large B cell lymphoma^{24,25}. Furthermore, it has been found to be inactivated, either by mutation or genetic deletion of 6q21-q22.1 locus, in a significant fraction (23-24%) of ABC-type DLBCL^{26,27}. Recently *PRDM1* has been found mutated in 4% of cases of WM¹³. Importantly, in our series, the case with the *PRDM1*/Blimp1 mutation showed a normal pattern for 6q by FISH ruling out biallelic inactivation of *PRDM1*/Blimp1.

In summary, bone marrow core biopsy evaluation is critical in the identification of unequivocal bone marrow infiltration by LPL/WM. A combined paratrabecular and interstitial infiltration pattern is the most common feature in LPL/WM while a patchy interstitial pattern characterizes IgM-MGUS cases. It is particularly relevant in the framework of the revised WHO classification to differentiate between IgM-MGUS and LPL patients in order identify those that may require therapeutic intervention. Furthermore, the use of targeted NGS and direct sequencing confirms the relatively uniform molecular profiles of the disease, characterized by *MYD88*p.L265P mutation and occasional somatic mutations in *CXCR4*, *KMT2D*, *PRDM1*/Blimp1, *MYC* and *ID3* in a fraction of LPL/WM patient samples.

Compliance with ethical standards: The study and sample collection were approved by the local ethics committee (CEIC Cantabria) and complies with the Declaration of Helsinki. Informed written consent was obtained when required.

Funding: This study was supported by grants from MINECO (PI16/1397, SMM, Principal Investigator) and IDIVAL (NEXTVAL 15/09, SMM, Principal Investigator). NMM was supported by Asociación Española contra el Cancer (AECC).

Competing Interest: None declared.

Author contribution: JGR performed research, NMM performed research, APG performed research, SGdV provided clinical data, AGM performed research, MUL provided clinical data, AIG provided clinical data, RT performed research, SB performed research, MG performed research, SMM designed research, performed research and wrote the manuscript. All authors approved the manuscript.

Licence for Publication

The Corresponding Author grants on behalf of all authors, an exclusive licence on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd to permit this article to be published in JCP and any other BMJ PGL products and sublicences such use and exploit all subsidiary rights.

Take home messages

Bone marrow core biopsy evaluation is critical in the identification of unequivocal bone marrow infiltration by LPL/WM.

A combined paratrabecular and interstitial infiltration pattern is the most common feature in LPL/WM while a patchy interstitial pattern characterizes IgM-MGUS cases.

Somatic mutations in *CXCR4*, *KMT2D*, *PRDM1/Blimp1*, *MYC* and *ID3* can be found in a fraction of LPL/WM in addition to *MYD88*p.L265P.

REFERENCES

1. Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (Eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (revised 4th edition). IARC: Lyon; 2017.

2. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003;30(2):110-115.

3. Hunter ZR, Xu L, Yang G, et al. Transcriptome sequencing reveals a profile that corresponds to genomic variants in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2016;128(6):827-838.

4. Hunter ZR, Xu L, Yang G, et al. The genomic landscape of Waldenstrom 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):1637-1646.

5. 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 Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2014;123(18):2791-2796.

6. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2012;367(9):826-833.

7. Bassarova A, Troen G, Spetalen S, Micci F, Tierens A, Delabie J. Lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma in the bone marrow: paratrabecular involvement as an important distinguishing feature. *Am J Clin Pathol.* 2015;143(6):797-806.

8. Fang H, Kapoor P, Gonsalves WI, et al. Defining Lymphoplasmacytic Lymphoma: Does MYD88L265P Define a Pathologically Distinct Entity Among Patients With an IgM Paraprotein and Bone Marrow-Based Low-Grade B-Cell Lymphomas With Plasmacytic Differentiation? *Am J Clin Pathol.* 2018;150(2):168-176.

9. Feiner HD, Rizk CC, Finfer MD, et al. IgM monoclonal gammopathy/Waldenstrom's macroglobulinemia: a morphological and immunophenotypic study of the bone marrow. *Mod Pathol.* 1990;3(3):348-356.

10. King RL, Gonsalves WI, Ansell SM, et al. Lymphoplasmacytic Lymphoma With a Non-IgM Paraprotein Shows Clinical and Pathologic Heterogeneity and May Harbor MYD88 L265P Mutations. *Am J Clin Pathol.* 2016;145(6):843-851.

11. Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, et al. Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenstrom Macroglobulinaemia: A Task Force from the 8th International Workshop on Waldenstrom Macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2016;175(1):77-86.

12. 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(11):2051-2058.

13. Varettoni M, Zibellini S, Defrancesco I, et al. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenstrom macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica.* 2017;102(12):2077-2085.

14. 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):387-394.

15. 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(8):1722-1728.

16. Amanda Kofides MDNTLX, MS Xia Liu, MD Christopher Patterson , Maria Luisa Guerrero, MD Mani Munshi, MS Guang Yang, PhD, Jiaji G Chen Cristina Jimenez, PhD

- Gloria G Chan, MS Joshua Gustine, MPH , Jorge J. Castillo, MD , Steven P Treon, MD, PhD, FRCP and Zachary R Hunter, PhD. Alternative Mutations and Isoform Dysregulation in MYD88 in Waldenstrom's Macroglobulinemia. ASH Annual Meeting. San Diego, USA; 2018.
17. Sklavenitis-Pistofidis R, Capelletti M, Liu CJ, et al. Bortezomib overcomes the negative impact of CXCR4 mutations on survival of Waldenstrom macroglobulinemia patients. *Blood*. 2018;132(24):2608-2612.
18. Dimopoulos MA, Tedeschi A, Trotman J, et al. Phase 3 Trial of Ibrutinib plus Rituximab in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2018;378(25):2399-2410.
19. Hunter ZR, Xu L, Tsakmaklis N, et al. Insights into the genomic landscape of MYD88 wild-type Waldenström macroglobulinemia. *Blood Adv*. 2018;2(21):2937-2946.
20. Lindsley AW, Saal HM, Burrow TA, et al. Defects of B-cell terminal differentiation in patients with type-1 Kabuki syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):179-187.e110.
21. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med*. 2015;21(10):1190-1198.
22. Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat Med*. 2015;21(10):1199-1208.
23. Montes-Moreno S, Martinez-Magunacelaya N, Zecchini-Barrese T, et al. Plasmablastic lymphoma phenotype is determined by genetic alterations in MYC and PRDM1. *Mod Pathol*. 2017;30(1):85-94.
24. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-837.
25. Zhang J, Grubor V, Love CL, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(4):1398-1403.
26. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2006;203(2):311-317.
27. Tam W, Gomez M, Chadburn A, Lee JW, Chan WC, Knowles DM. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2006;107(10):4090-4100.

Table 1. Summary of clinical characteristics of the patients.

Gender (male/female)	20/8
Age (median, range)	72 (49-89)
Diagnosis:	
IgM-MGUS	4 cases
Smouldering LPL/WM	5 cases
LPL/WM	19 cases
LPL/WM cases. Clinical signs and symptoms:	
Anemia	13/19 cases (65%)
Asthenia, weight loss, fever	12/19 cases (60%)
Headache	6/19 cases (30%)
Vision changes	2/19 cases (10%)
Hyperviscosity related symptoms	10/19 (50%)
Amyloid deposits	0/19 (0%)
Neuropathy	5/19 (25%)
Palpable Splenomegaly	2/19 (10%)
Hepatomegaly	4/19 (20%)
Lymph node involvement	9/19 (45%)
Extranodal involvement	3/19 (15%)
Cryoglobulinemia	1/19 (5%)
HCV	0/19 (0%)

Table 2. Summary of immunological, histopathological, phenotypic and molecular features.

M protein (median, range)	2.53 gr (0.17-6.47)
M protein light chain restriction	K 19 cases (68%)
	λ 9 cases (32%)
<u>Bone marrow infiltration pattern, LPL cases:</u>	
Paratrabecular and interstitial	21 samples (67%)
Paratrabecular and interstitial (patchy)	9 samples
Paratrabecular and interstitial (diffuse)	4 samples
Paratrabecular and interstitial (diffuse, nodular)	1 samples
Paratrabecular and interstitial (nodular)	7 samples
Interstitial only	10 samples (32%)
Interstitial (patchy)	3 samples
Interstitial (diffuse)	1 sample
Interstitial (nodular)	2 samples
Interstitial (diffuse-solid)	4 samples
<u>Bone marrow infiltration pattern, IgM-MGUS cases:</u>	
Interstitial (patchy)	4 samples (100%)
Phenotype	
CD20 positive B cells (IHC), median, range	20% (0-80%)
CD20 positive clonal B cells (FCM), median, range	6.6% (0-62%)
	} *
<u>MYD88p.L265P mutation (AS-PCR)</u>	
LPL	22/24 positive (92%)
	Median VAF 0.09% (0-0.72)
IgM-MGUS	¼ positive (25%), VAF 0.045

* Quantification of B cells by IHC using CD20 antibody showed higher median values than by FCM (p value of the median difference, Wilcoxon test <0.0001). Correlation between the quantification of B cells using CD20 IHC and the quantification of clonal B cells by FCM was significant (Pearson 0.778, p value <0.0001).

Table 3. Summary of somatic mutations identified by targeted NGS.

CASE ID	Gene	Chr.	Location	Allele	cDNA_position	AA Change	VAF (NGS)	Consequence*	Existing_variation
5a	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	31%	missense/deleterious	COSM85940
5b	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	28%	missense/deleterious	COSM85940
6	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	3%	missense/deleterious	COSM85940
6	CXCR4	2	Exon 1	G	c.1025C>G	342 S342*	--- †	nonsense	COSM5981986
11	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	51%	missense/deleterious	COSM85940
12	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	28%	missense/deleterious	COSM85940
13a	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	59%	missense/deleterious	COSM85940
13b	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	20%	missense/deleterious	COSM85940
14	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	13%	missense/deleterious	COSM85940
15	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	10%	missense/deleterious	COSM85940
15	PRDM1	6	Exon 7	T	c.2251C>T	673 H/Y	28%	missense/deleterious	---
15	MYC	8	Exon 3	G	c.1721A>G	404 K/R	15%	missense/deleterious	---
19	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	24%	missense/deleterious	COSM85940
24b	MYD88	3	Exon 4	C	c.794T>C	265 L/P	12%	missense/deleterious	COSM85940
24b	KMT2D	12	Exon 31	T	c.7670C>T	2557 P/L	28%	missense/deleterious	COSM1362024
24b	KMT2D	12	Exon 14			1379 Met1379fs	24%	frameshift deletion/deleterious	---
21	ID3	1	Exon 1	T	c.376C>T	3 A/V	15%	missense/deleterious	---

† CXCR4 mutation was detected by direct Sanger sequencing.

Figure Legends

Figure 1. Main histopathological patterns. Bone marrow core biopsy infiltration patterns as shown with HE and CD20 IHC: A. Paratrabecular and interstitial-diffuse; B. Paratrabecular and interstitial-nodular; C. Diffuse interstitial-solid; D. Patchy interstitial.

Figure 2. Mutational profiles of LPL/WM. After targeted NGS with a lymphoma dedicated panel of genes we found additional somatic mutations to *MYD88*p.L265P in roughly one fourth of the cases (3 out of 11 cases). Co-mutated genes were *MYD88* and *KMT2D* and *MYD88*, *PRDM1* and *MYC*. Interestingly, one *MYD88* wild type case had a mutation in *ID3*. 6q deletion was found in 5 out of 9 cases (55%). All five cases were *MYD88*p.L265P mutated.

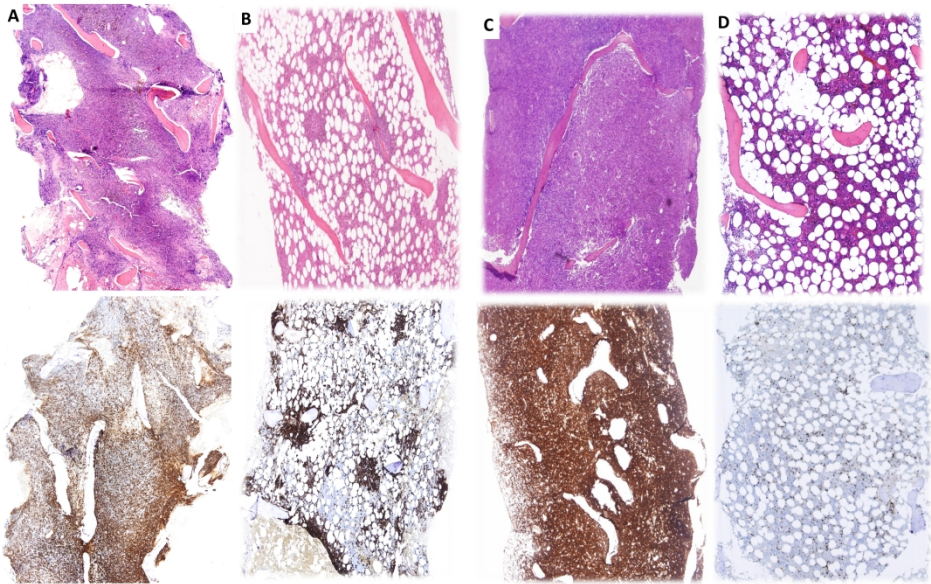


Figure 1

219x160mm (300 x 300 DPI)

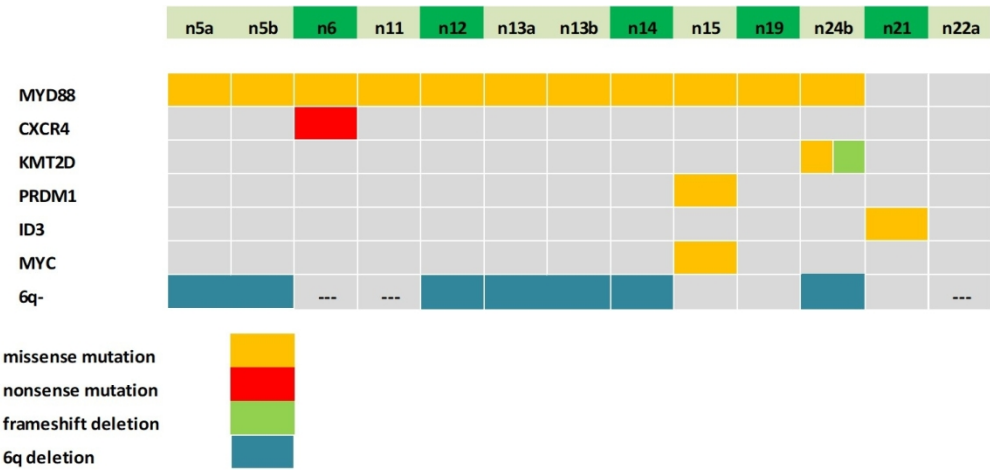


Figure 2

345x160mm (112 x 112 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary Material and Methods

Case Selection.

24 patients with Lymphoplasmacytic Lymphoma/WM and 4 patients diagnosed as IgM-MGUS were retrieved retrospectively from the files of the Pathology Department of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. In addition a series of 47 bone marrow trephine biopsies from patients with a diagnosis of Marginal Zone Lymphoma (MZL, 24 cases) and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL, 23 cases) were reviewed and bone marrow infiltration patterns were annotated. Cases were consecutively diagnosed in a period of three years. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue from bone marrow core biopsies was retrieved in every patient with a total number of 35 samples. In all patients (28 patients), a pretreatment bone marrow sample was available for review. In addition, some patients had available FFPE clot material. Bone marrow aspirate samples were also obtained in every patient and analyzed by conventional morphology, flow cytometry and FISH/karyotyping for diagnostic purposes. DNA was extracted for molecular analysis from bone marrow aspirate and/or FFPE trephine core biopsy material. Clinical data were retrieved in all cases (see summary in Table 1).

Immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. Conventional karyotyping and flow cytometry.

Primary antibodies against CD20 (DAKO, RTU), PAX-5 (DAKO, RTU), CD138 (DAKO, RTU), Blimp-1 (CNIO, 1:5), Kappa (DAKO, RTU), Lambda (DAKO, RTU), Tryptase (DAKO, RTU), DBA-44(DAKO, RTU) were used. Immunohistochemical stains were quantified and scored in 5% increments. Fluorescent in situ hybridization for the detection of 6q deletion was done using a probe for the detection of deletions in the long arm of chromosome 6 (XL 6q21/6q23/6cen, Metasystems). At least 10% of the cells were required to be considered as positive for 6qdel to identify a positive sample.

Next Generation Sequencing using amplicon-based library generation.

A TruSeq® Custom Amplicon Low Input Library containing exonic regions of 35 selected genes of interest was used to isolate the DNA for sequencing (Illumina). The list of genes was *CARD11*, *ARID1A*, *NOTCH1*, *TCF3*, *SMARCA4*, *STAT6*, *EP300*, *CREBBP*, *MLL2*, *BTK*, *NOTCH2*, *TNFRSF14*, *ATM*, *FOXO1*, *B2M*, *PLCG2*, *CD79B*, *TP53*, *STAT3*, *BCL2*, *MEF2B*, *CD79A*, *CXCR4*, *PTPN1*, *MYD88*, *FAT2*, *PRDM1*, *TNFAIP3*, *SGK1*, *CCND3*, *PIM1*, *EZH2*, *BRAF*, *MYC*, *NOTHC2*.

Depending on the availability of DNA, between 6ng and 400ng of DNA were used for libraries preparation. When possible, two different libraries of FFPE samples (one for each DNA strand) were prepared in order to eliminate false C-T mutations that commonly appear during formalin fixation. After library preparation and quantification by Qubit (ThermoFisher Scientific) libraries from 25

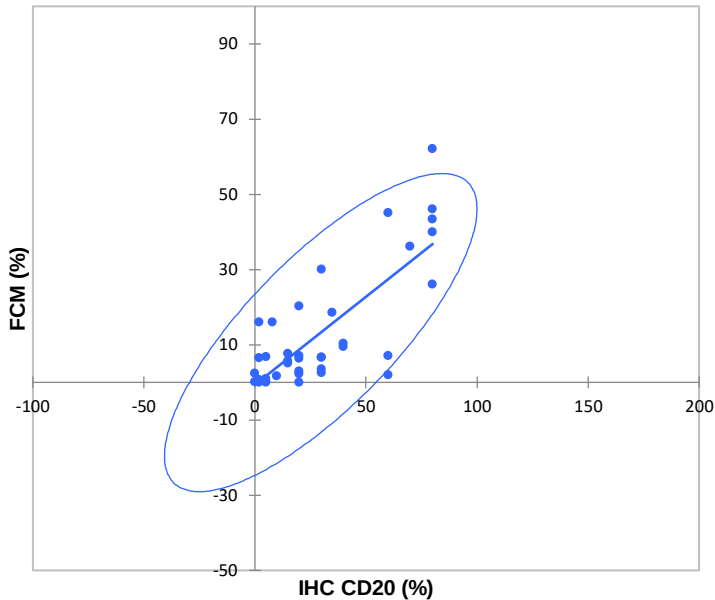
MYD88 mutational status was tested by AS-PCR in 38 samples and by targeted NGS in 21 samples. Library design for MYD88 mutations spans exons 1 to 5 of the gene. For the 21 samples with both results (% of B cells from 2.5% to 90%), a concordance of 92% for a positive result for MYD88L265P mutation was found. Only one case, positive with AS-PCR (VAF 0.05%) was negative with a targeted NGS approach.

Subsequently only missense, frameshift, and nonsense somatic mutations with variant frequency >10% were considered. SNPs were filtered out based on the comparison of the VAF of the variant with the quantification of clonal B cells by FCM/IHC and after search in dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) database was also checked in every case and COSMIC Id was annotated. Three algorithms were used to predict the functional consequences of the variants found, including SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and Condel (<http://bg.upf.edu/fannsdb/>). Selected variants were visualized using the Integrative Genomics Viewer (IGV)¹⁵. Finally, 16 somatic mutations (15 missense, 1 frameshift deletion) in 5 genes were considered (Table 3).

<https://mc.manuscriptcentral.com/jclinpathol>

gel and direct sequencing was performed in an ABI3130 instrument (Applied Biosystems). Sequences were processed and analyzed using the Sequencing Analysis Software v5.2 and Chromas.

Figure 1



Correlation matrix (Pearson):

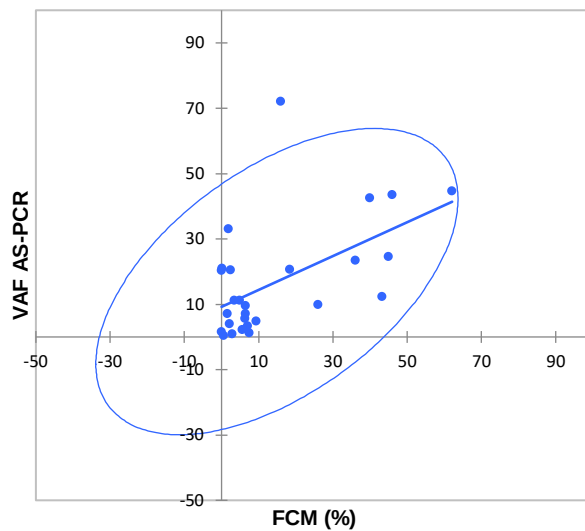
Variables	IHC CD20 (%)	FCM (%)
IHC CD20 (%)	1	0,778
FCM (%)	0,778	1

Values in bold are different from 0 with a significance level alpha=0,05

p-values (Pearson):

Variables	IHC CD20 (%)	FCM (%)
IHC CD20 (%)	0	< 0,0001
FCM (%)	< 0,0001	0

Figure 2A



Correlation matrix (Spearman):

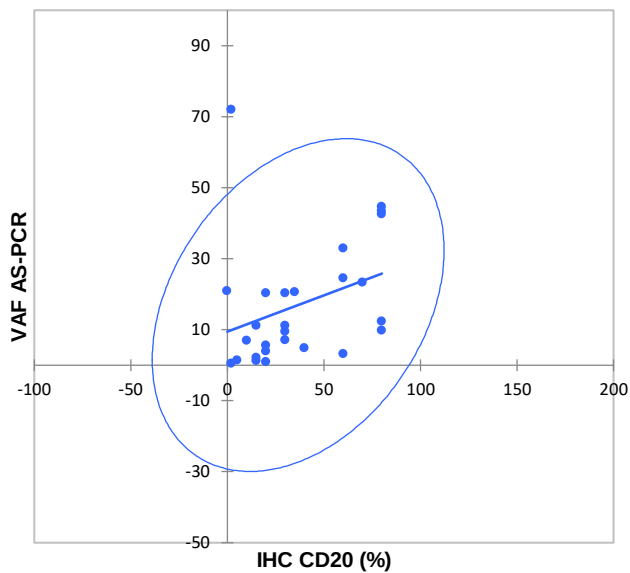
Variables	FCM (%)	VAF AS-PCR
FCM (%)	1	0,477
VAF AS-PCR	0,477	1

Values in bold are different from 0 with a significance level $\alpha=0,05$

p-values (Spearman):

Variables	FCM (%)	VAF AS-PCR
FCM (%)	0	0,013
VAF AS-PCR	0,013	0

Figure 2B



Correlation matrix (Spearman):

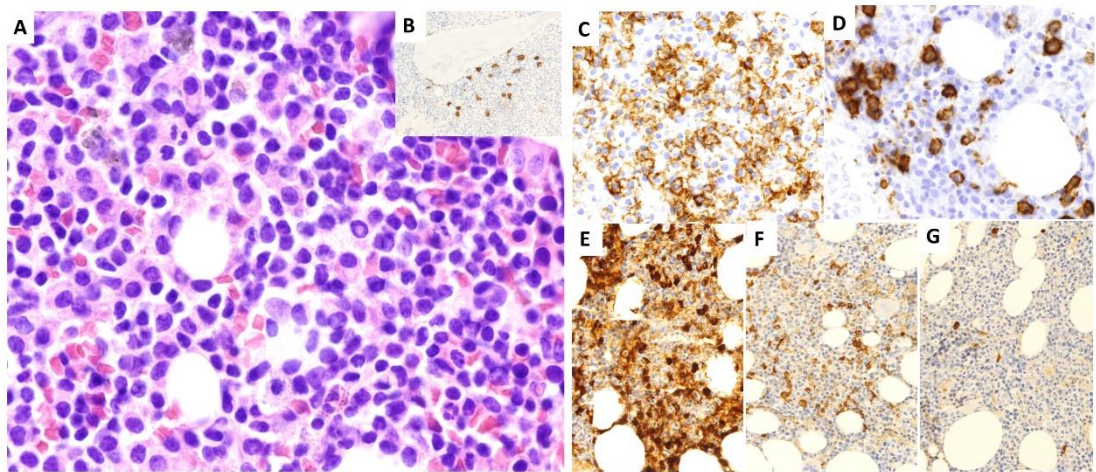
Variables	IHC CD20 (%)	VAF AS-PCR
IHC CD20 (%)	1	0,457
VAF AS-PCR	0,457	1

Values in bold are different from 0 with a significance level $\alpha=0,05$

p-values (Spearman):

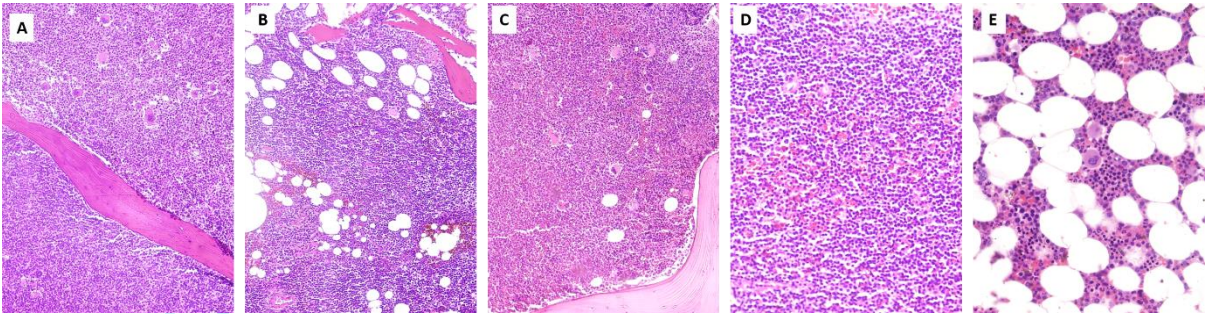
Variables	IHC CD20 (%)	VAF AS-PCR
IHC CD20 (%)	0	0,017
VAF AS-PCR	0,017	0

Figure 3



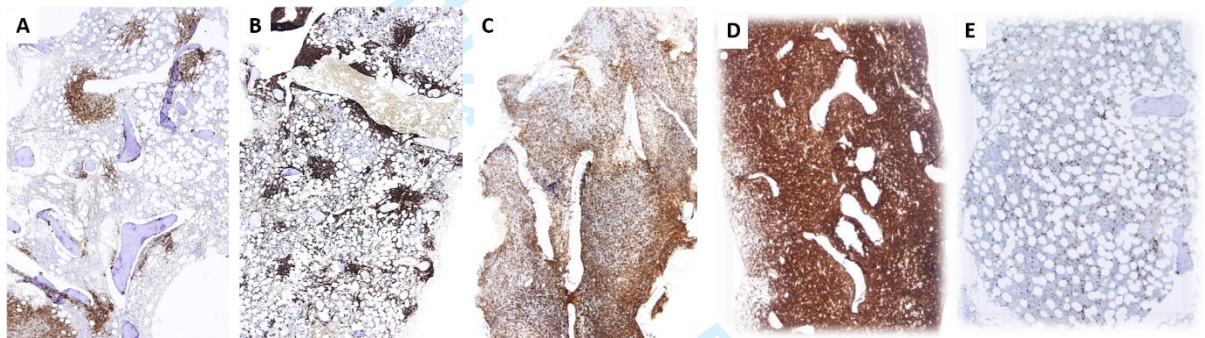
A. Lymphoplasmacytic lymphoma composed by small lymphoid cells, plasmacytoid cells and plasma cells. Cells with Dutcher bodies are characteristic as well as scattered histiocytes with some hemosiderin and mast cell infiltration. B. Mast cell infiltration can be highlighted with tryptase IHC. Expression of CD20 (C), CD138 (D), IgM (E), and light chain restriction (F, Kappa, G, Lambda) are shown.

Figure 4

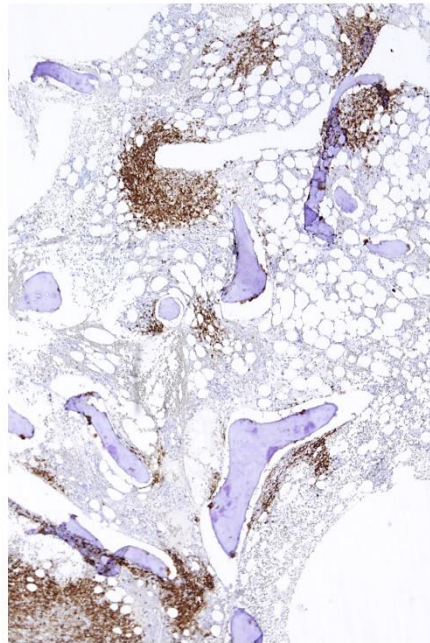


HE for the different histopathological patterns here described: A. Paratrabecular, B. Interstitial (nodular), C. Interstitial (diffuse), D. Intestinal (diffuse-solid), E Interstitial (patchy).

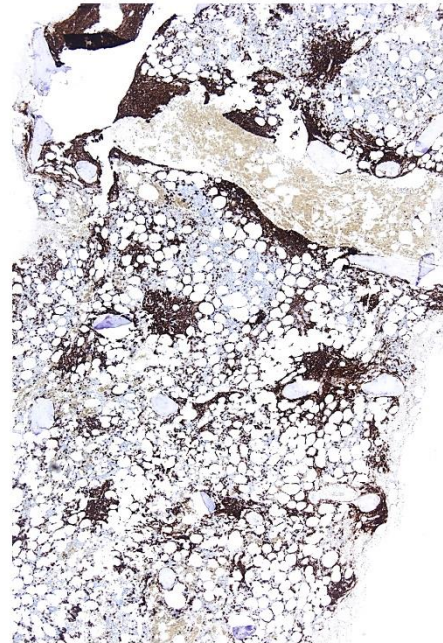
Figure 5



CD20 IHC for the different histopathological patterns here described: A. Paratrabecular, B. Interstitial (nodular), C. Interstitial (diffuse), D. Intestinal (diffuse-solid), E Interstitial (patchy).

Figure 6

Case n16
CD20 IHC estimation 20%
Clonal B cells FCM 2.2%



Case n15
CD20 IHC estimation 30%
Clonal B cells FCM 3.5%

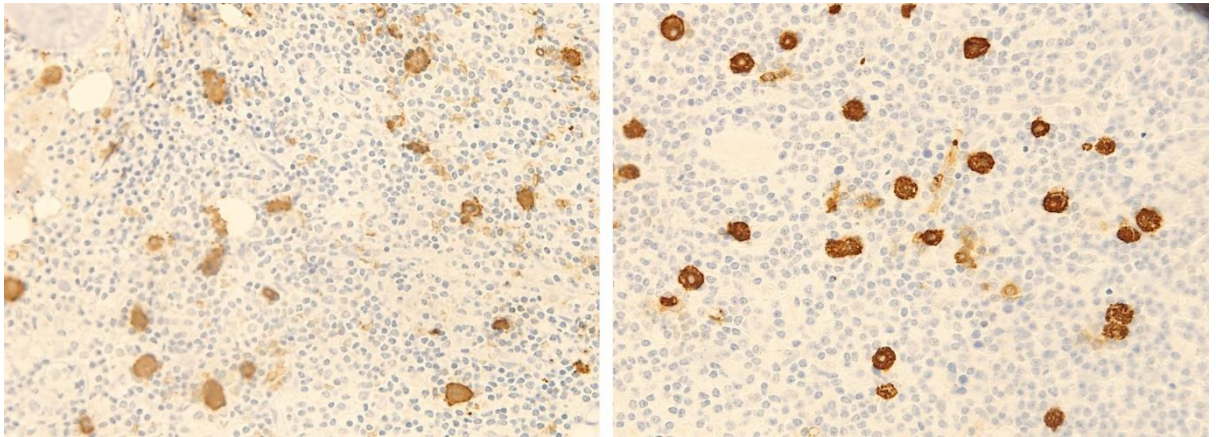
Representative examples of discordant cases according to IHC and FCM results. In both samples the estimation of CD20 positive B cells was >10%, while the FCB quantification of clonal B cells was considered below this threshold. Both cases were classified as LPL.

Figure 7



MUT c.1025 C>G (p.S342*),
nonsense mutation (COSM5981986)

Direct Sanger sequencing was performed for the detection of CXCR4 mutations following previously described methods (Ballester et al. Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia 2016). CXCR4 c.1025 C>G (p.S342*) was found in case n6. This finding was confirmed in duplicate.

Figure 8

Mast cell density was in the range of 5-10% in most cases analyzed (13 out of 18 samples, 72%). Two representative examples are shown.

Table 1

	24 MZL (19 SMZL, 3 NMZL, 1 MALT Lymphoma)	23 CLL
Interstitial only	8 samples (33%)	22 samples (96%)
Interstitial (patchy)	0 samples	2 samples
Interstitial (diffuse)	3 samples	15 samples
Interstitial (nodular)	4 samples	4 samples
Interstitial (diffuse-solid)	0 samples	1 samples
Paratrabecular and interstitial	2 samples (8%)	1 sample (4%)
Paratrabecular and interstitial (patchy)	1 samples	0 samples
Paratrabecular and interstitial (diffuse)	0 samples	0 samples
Paratrabecular and interstitial (diffuse, nodular)	0 samples	0 samples
Paratrabecular and interstitial (nodular)	1 samples	1 samples
Paratrabecular, interstitial and intrasinusoidal	4 samples (17%)	0 samples
Interstitial and intrasinusoidal	10 samples (42%)	0 samples

Table 2

Case n	Diagnosis	clinical diagnosis	Age	Sex	Bone marrow Infiltration pattern	M component light chain	M component (mg)	IHC CD20 positive cells (%)	FCM (% of clonal B cells)	MYD88L265P mutation	MYD88 L265P VAF (AS-PCR, %)
1	IgM-MGUS	IgM-MGUS	72	M	Interstitial (patchy)	kappa	570	2	0,7	positive	0,45
2	IgM-MGUS	IgM-MGUS	79	M	Interstitial (patchy)	lambda	1120	5	1	negative	0
3	IgM-MGUS	IgM-MGUS	88	M	Interstitial (patchy)	lambda	1970	5	6,7	negative	0
4	IgM-MGUS	IgM-MGUS	84	F	Interstitial (patchy)	kappa	1200	0	2,4	negative	0
5	LPL/WM	symptomatic	83	M	Interstitial (diffuse-solid)	kappa	2890	80	62,1	positive	44,6
6	LPL/WM	smouldering LPL	79	F	Interstitial (patchy) and paratrabecular	kappa	2500	10	1,6	positive	7
7	LPL/WM	smouldering LPL	49	M	Interstitial (patchy) and paratrabecular	kappa	1960	20	6,4	positive	5,61
8	LPL/WM	symptomatic	77	M	Interstitial (patchy) and paratrabecular	kappa	3210	15	5,6	positive	2,2
8	LPL/WM	symptomatic	77	M	Interstitial (patchy) and paratrabecular	kappa	4000	15	5	positive	11,2
9	LPL/WM	symptomatic	58	M	Interstitial (diffuse) and paratrabecular	kappa	4170	70	36,1	positive	23,4
9	LPL/WM	symptomatic	58	M	Interstitial (diffuse) and paratrabecular	kappa	1560	20	0,02	positive	20,3
10	LPL/WM	symptomatic	65	M	Interstitial (diffuse)	kappa	3700	60	45	positive	24,5
10	LPL/WM	symptomatic	65	M	Interstitial (nodular)	kappa	2560	2	6,5	negative	0
10	LPL/WM	symptomatic	65	M	Interstitial (patchy) and paratrabecular	kappa	4050	20	20,2	negative	0
10	LPL/WM	symptomatic	65	M	Interstitial (patchy)	kappa	983	5	0	positive	1,47
11	LPL/WM	symptomatic	70	M	Interstitial (diffuse-solid)	kappa	385	80	43,3	positive	12,3
12	LPL/WM	symptomatic	81	M	Interstitial (diffuse) and paratrabecular	kappa	962	80	26	positive	9,85
13	LPL/WM	symptomatic	71	M	Interstitial (nodular) and paratrabecular	lambda	4220	30	2,5	positive	20,4
14	LPL/WM	smouldering LPL	77	F	Interstitial (nodular) and paratrabecular	lambda	2670	35	18,5	positive	20,6
15	LPL/WM	symptomatic	85	M	Interstitial (nodular) and paratrabecular	lambda	6470	30	3,5	positive	11,2
16	LPL/WM	symptomatic	82	M	Interstitial (nodular) and paratrabecular	kappa	1610	20	2,2	positive	4
17	LPL/WM	symptomatic	85	F	Interstitial (nodular) and paratrabecular	lambda	3120	60	7,05	positive	3,25
18	LPL/WM	symptomatic	77	M	Interstitial (nodular) and paratrabecular	kappa	1090	30	6,6	positive	9,5
19	LPL/WM	symptomatic	80	M	Interstitial (diffuse, nodular) and paratrabecular	kappa	3000	40	9,4	positive	4,8
20	LPL/WM	symptomatic	56	M	Interstitial (patchy) and paratrabecular	kappa	2620	60	2	positive	33
21	LPL/WM	symptomatic	72	M	Interstitial (nodular)	kappa	2160	20	7	negative	0
22	LPL/WM	symptomatic	64	M	Interstitial (diffuse) and paratrabecular	kappa	3120	40	10,3	negative	0
23	LPL/WM	smouldering LPL	58	M	Interstitial (patchy) and paratrabecular	kappa	3010	15	7,6	positive	1,26
24	LPL/WM	symptomatic	64	F	Interstitial (patchy) and paratrabecular	kappa	3490	30	30	---	---
24	LPL/WM	symptomatic	64	F	Interstitial (patchy)	kappa	3000	2	16	positive	72
24	LPL/WM	symptomatic	64	F	Interstitial (patchy)	kappa	482	2	0	---	---
25	LPL/WM	symptomatic	64	F	Interstitial (patchy) and paratrabecular	lambda	350	20	2,9	positive	0,88
26	LPL/WM	symptomatic	72	F	Interstitial (diffuse-solid)	lambda	2680	80	46	positive	43,4
27	LPL/WM	symptomatic	89	M	Interstitial (diffuse-solid)	kappa	1009	80	40	positive	42,5
28	LPL/WM	smouldering LPL	70	F	Interstitial (nodular) and paratrabecular	lambda	3200	30	6,6	positive	7,06

	CASE N	CHROM	POS	REF	ALT	Gene_Name	AF4494_REF
1							
2							
3	5A	1	2488153	A	G	TNFRSF14	938
4	5A	3	38182641	T	C	MYD88	732
5	5A	12	49426605	T	A	KMT2D	1621
6	5A	12	49426606	T	A	KMT2D	1621
7	5A	6	106547372	C	G	PRDM1	1059
8	5A	11	108175462	G	A	ATM	875
9	5A	1	120611964	G	C	NOTCH2	623
10	5A	9	139401233	C	T	NOTCH1	2562
11	5A						
12	5B	1	2488153	A	G	TNFRSF14	822
13	5B	3	38182641	T	C	MYD88	916
14	5B	22	41548008	A	G	EP300	620
15	5B	6	106547372	C	G	PRDM1	780
16	5B	11	108175462	G	A	ATM	1064
17	5B	1	120611964	G	C	NOTCH2	388
18	5B						
19	6	1	2488153	A	G	TNFRSF14	18
20	6	1	2488153	A	G	TNFRSF14	2
21	6	17	7579472	G	C	TP53	4
22	6	22	41548008	A	G	EP300	1076
23	6	6	106547372	C	G	PRDM1	855
24	6	6	106547372	C	G	PRDM1	1182
25	6	9	139400219	G	A	NOTCH1	2735
26	6	9	139400219	G	A	NOTCH1	386
27	6						
28	11	1	2488153	A	G	TNFRSF14	8
29	11	3	38182641	T	C	MYD88	541
30	11	22	41548008	A	G	EP300	836
31	11	6	106547372	C	G	PRDM1	174
32	11	6	106553096	G	A	PRDM1	445
33	11	1	120611964	G	C	NOTCH2	914
34	12	3	38182641	T	C	MYD88	682
35	12	6	106547372	C	G	PRDM1	596
36	12	1	120611964	G	C	NOTCH2	278
37	12						
38	13A	1	2488153	A	G	TNFRSF14	8
39	13A	3	38182641	T	C	MYD88	2533
40	13A	6	106547372	C	G	PRDM1	916
41	13A	11	108183167	A	G	ATM	4
42	13B	1	2488153	A	G	TNFRSF14	14
43	13B	22	41548008	A	G	EP300	187
44	13B	6	106547372	C	G	PRDM1	253
45	13B	1	120512274	C	T	NOTCH2	461
46	13B	1	120512275	C	T	NOTCH2	461
47	13B	9	139396936	CT	C	NOTCH1	361
48	14	1	2488153	A	G	TNFRSF14	83
49	14	17	7579472	G	C	TP53	925
50	14	12	49432365	G	A	KMT2D	4046
51	14	12	49434820	G	C	KMT2D	402
52	14	11	108175462	G	A	ATM	2351
53	14	1	120611964	G	C	NOTCH2	410
54	14	9	139400219	G	A	NOTCH1	972
55	14						
56	15	19	1612319	C	T	TCF3	499

1							
2	15	22	41548008	A	G	EP300	336
3	15	12	49431305	TTGC	T	KMT2D	3173
4	15	12	49445724	A	G	KMT2D	1968
5	15	6	106554900	C	T	PRDM1	2281
6	15	8	128753050	A	G	MYC	2622
7	19	17	7579472	G	C	TP53	0
8	19	22	41548008	A	G	EP300	462
9	19	1	120611964	G	C	NOTCH2	160
10	19	6	138196066	T	G	TNFAIP3	776
11	21	1	2488153	A	G	TNFRSF14	991
12	21	1	23885910	G	A	ID3	1985
13	21	22	41548008	A	G	EP300	1284
14	21	12	49445724	A	G	KMT2D	3960
15	22A	19	1612319	C	T	TCF3	27
16	22A	1	2488153	A	G	TNFRSF14	670
17	22A	12	49434924	G	A	KMT2D	524
18	22A	6	106547372	C	G	PRDM1	997
19	22A	11	108186610	G	A	ATM	2982
20	22A	1	120611964	G	C	NOTCH2	246
21	22A	9	139399225	C	T	NOTCH1	399
22	22A	6	157528324	C	T	ARID1B	8
23	22A	6	157528330	G	A	ARID1B	8
24	24B	1	2488153	A	G	TNFRSF14	161
25	24B	12	49433883	G	A	KMT2D	6010
26	24B	12	49441847	CAT	C	KMT2D	11265
27	24B	6	106547372	C	G	PRDM1	2381
28	24B	11	108175462	G	A	ATM	3616
29	24B	11	108183167	A	G	ATM	0
30	24B	1	120611964	G	C	NOTCH2	1393
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							
50							
51							
52							
53							
54							
55							
56							
57							
58							
59							
60							

Review Only

AF4494_ALT	AF4494_AF	cDNA_positior	CDS_position	rotein_positio	Amino_acids	Codons
894	0,49	349	50	17	K/R	aAa/aGa
329	0,31	1002	818	273	L/P	cTg/cCg
266	0,14	11883	11883	3961	Q/H	caA/caT
267	0,14	11882	11882	3961	Q/L	cAa/cTa
1090	0,51	843	609	203	D/E	gaC/gaG
979	0,53	5942	5557	1853	D/N	Gat/Aat
316	0,34	277	57	19	C/W	tgC/tgG
1834	0,42	3912	3836	1279	R/H	cGt/cAt
1026	0,56	349	50	17	K/R	aAa/aGa
360	0,28	1002	818	273	L/P	cTg/cCg
738	0,54	4208	2989	997	I/V	Att/Gtt
931	0,54	843	609	203	D/E	gaC/gaG
1238	0,54	5942	5557	1853	D/N	Gat/Aat
207	0,35	277	57	19	C/W	tgC/tgG
2223	0,99	349	50	17	K/R	aAa/aGa
448	1,00	349	50	17	K/R	aAa/aGa
1731	1,00	405	215	72	P/R	cCc/cGc
1233	0,53	4208	2989	997	I/V	Att/Gtt
827	0,49	843	609	203	D/E	gaC/gaG
1151	0,49	843	609	203	D/E	gaC/gaG
2691	0,50	4205	4129	1377	P/S	Ccc/Tcc
312	0,45	4205	4129	1377	P/S	Ccc/Tcc
594	0,99	349	50	17	K/R	aAa/aGa
574	0,51	1002	818	273	L/P	cTg/cCg
845	0,50	4208	2989	997	I/V	Att/Gtt
1146	0,87	843	609	203	D/E	gaC/gaG
2218	0,83	1295	1061	354	S/N	aGc/aAc
1250	0,58	277	57	19	C/W	tgC/tgG
264	0,28	1002	818	273	L/P	cTg/cCg
710	0,54	843	609	203	D/E	gaC/gaG
157	0,36	277	57	19	C/W	tgC/tgG
6190	1,00	349	50	17	K/R	aAa/aGa
3714	0,59	1002	818	273	L/P	cTg/cCg
3220	0,78	843	609	203	D/E	gaC/gaG
3057	1,00	6333	5948	1983	N/S	aAt/aGt
590	0,98	349	50	17	K/R	aAa/aGa
148	0,44	4208	2989	997	I/V	Att/Gtt
204	0,44	843	609	203	D/E	gaC/gaG
41	0,08	1188	968	323	G/D	gGc/gAc
41	0,08	1187	967	323	G/S	Ggc/Agc
40	0,10	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
2054	0,96	349	50	17	K/R	aAa/aGa
1376	0,60	405	215	72	P/R	cCc/cGc
3303	0,45	8774	8774	2925	A/V	gCg/gTg
482	0,55	6733	6733	2245	L/V	Ctc/Gtc
3575	0,60	5942	5557	1853	D/N	Gat/Aat
363	0,47	277	57	19	C/W	tgC/tgG
763	0,44	4205	4129	1377	P/S	Ccc/Tcc
196	0,28	1767	1700	567	R/Q	cGg/cAg

1							
2	702	0,68	4208	2989	997 I/V	Att/Gtt	
3	335	0,10	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
4	399	0,17	1742	1742	581 M/T	aTg/aCg	
5	902	0,28	2251	2017	673 H/Y	Cac/Tac	
6	475	0,15	1721	1211	404 K/R	aAg/aGg	
7							
8	1043	1,00	405	215	72 P/R	cCc/cGc	
9	222	0,32	4208	2989	997 I/V	Att/Gtt	
10	138	0,46	277	57	19 C/W	tgC/tgG	
11	864	0,53	446	380	127 F/C	tTc/tGc	
12	672	0,40	349	50	17 K/R	aAa/aGa	
13							
14	358	0,15	376	8	3 A/V	gCg/gTg	
15	1034	0,45	4208	2989	997 I/V	Att/Gtt	
16	628	0,14	1742	1742	581 M/T	aTg/aCg	
17	185	0,87	1767	1700	567 R/Q	cGg/cAg	
18							
19	716	0,52	349	50	17 K/R	aAa/aGa	
20	567	0,52	6629	6629	2210 P/L	cCg/cTg	
21	1024	0,51	843	609	203 D/E	gaC/gaG	
22	2947	0,50	6452	6067	2023 G/R	Gga/Aga	
23	119	0,33	277	57	19 C/W	tgC/tgG	
24	399	0,50	4994	4918	1640 A/T	Gca/Aca	
25							
26	112	0,93	6050	6049	2017 L/F	Ctc/Ttc	
27	112	0,93	6056	6055	2019 V/I	Gtc/Atc	
28	7714	0,98	349	50	17 K/R	aAa/aGa	
29	2352	0,28	7670	7670	2557 P/L	cCg/cTg	
30	3652	0,24	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
31							
32	2098	0,47	843	609	203 D/E	gaC/gaG	
33	4151	0,53	5942	5557	1853 D/N	Gat/Aat	
34	5349	1,00	6333	5948	1983 N/S	aAt/aGt	
35	1347	0,49	277	57	19 C/W	tgC/tgG	
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							
50							
51							
52							
53							
54							
55							
56							
57							
58							
59							
60							

Existing_variation	SIFT	PolyPhen
rs4870,COSM4999217	tolerated(0.26)	benign(0.159)
rs387907272,COSM54160094	deleterious(0)	probably_damaging(1)
-	tolerated_low	benign(0.012)
-	tolerated_low	benign(0.007)
rs811925,COSM4160094	tolerated(1)	benign(0.036)
rs1801516,CM077896,C	tolerated(0.08)	benign(0.015)
rs11810554,COSM13273	tolerated(0.18)	benign(0)
rs61751543,COSM37743	tolerated(0.12)	benign(0.021)
rs4870,COSM4999217	tolerated(0.26)	benign(0.159)
rs387907272,COSM54160094	deleterious(0)	probably_damaging(1)
rs20551,COSM5009621	tolerated(0.31)	benign(0)
rs811925,COSM4160094	tolerated(1)	benign(0.036)
rs1801516,CM077896,C	tolerated(0.08)	benign(0.015)
rs11810554,COSM13273	tolerated(0.18)	benign(0)
rs4870,COSM4999217	tolerated(0.26)	benign(0.159)
rs4870,COSM4999217	tolerated(0.26)	benign(0.159)
rs1042522,CM961374,C	tolerated(0.57)	benign(0.045)
rs20551,COSM5009621	tolerated(0.31)	benign(0)
rs811925,COSM4160094	tolerated(1)	benign(0.036)
rs811925,COSM4160094	tolerated(1)	benign(0.036)
rs61751542,COSM37637	tolerated(0.48)	benign(0)
rs61751542,COSM37637	tolerated(0.48)	benign(0)
rs4870,COSM4999217	tolerated(0.26)	benign(0.159)
rs387907272,COSM54160094	deleterious(0)	probably_damaging(1)
rs20551,COSM5009621	tolerated(0.31)	benign(0)
rs811925,COSM4160094	tolerated(1)	benign(0.036)
rs143040512,COSM4406	tolerated(0.47)	benign(0.034)
rs11810554,COSM13273	tolerated(0.18)	benign(0)
rs387907272,COSM54160094	deleterious(0)	probably_damaging(1)
rs811925,COSM4160094	tolerated(1)	benign(0.036)
rs11810554,COSM13273	tolerated(0.18)	benign(0)
rs4870,COSM4999217	tolerated(0.26)	benign(0.159)
rs387907272,COSM54160094	deleterious(0)	probably_damaging(1)
rs811925,COSM4160094	tolerated(1)	benign(0.036)
rs659243,COSM4590264	tolerated(1)	benign(0)
rs4870,COSM4999217	tolerated(0.26)	benign(0.159)
rs20551,COSM5009621	tolerated(0.31)	benign(0)
rs811925,COSM4160094	tolerated(1)	benign(0.036)
-	tolerated(0.31)	benign(0.265)
-	tolerated(0.6)	benign(0.192)
#N/A	#N/A	#N/A
rs4870,COSM4999217	tolerated(0.26)	benign(0.159)
rs1042522,CM961374,C	tolerated(0.57)	benign(0.045)
rs199547661,COSM1717	tolerated(0.06)	benign(0.001)
rs201931833,COSM5574	tolerated(0.08)	benign(0.23)
rs1801516,CM077896,C	tolerated(0.08)	benign(0.015)
rs11810554,COSM13273	tolerated(0.18)	benign(0)
rs61751542,COSM37637	tolerated(0.48)	benign(0)
-	deleterious(0)	benign(0.331)

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

rs20551,COSM5009621 tolerated(0.31benign(0)

#N/A#N/A#N/A

- deleterious_lc benign(0)

- deleterious(0)possibly_damaging(0.831)

- deleterious(0. probably_damaging(0.998)

rs1042522,CM961374,C tolerated(0.57 benign(0.045)

rs20551,COSM5009621 tolerated(0.31benign(0)

rs11810554,COSM13273 tolerated(0.18 benign(0)

rs2230926,CM083789,C tolerated(0.14 benign(0.014)

rs4870,COSM4999217 tolerated(0.26 benign(0.159)

- deleterious(0) probably_damaging(0.998)

rs20551,COSM5009621 tolerated(0.31benign(0)

- deleterious_lc benign(0)

- deleterious(0) benign(0.331)

rs4870,COSM4999217 tolerated(0.26 benign(0.159)

rs201190869,COSM4775 tolerated(0.05 benign(0)

rs811925,COSM4160094 tolerated(1) benign(0.036)

rs11212587,CM092585,I deleterious(0) probably_damaging(0.972)

rs11810554,COSM13273 tolerated(0.18 benign(0)

rs976118697,COSM3086 tolerated(0.59 benign(0.001)

- deleterious(0. probably_damaging(0.999)

rs768433749,COSM5011 tolerated(0.06 possibly_damaging(0.487)

rs4870,COSM4999217 tolerated(0.26 benign(0.159)

rs189888707,COSM1362 deleterious(0. benign(0.001)

#N/A#N/A#N/A

rs811925,COSM4160094 tolerated(1) benign(0.036)

rs1801516,CM077896,C tolerated(0.08 benign(0.015)

rs659243,COSM4590264 tolerated(1) benign(0)

rs11810554,COSM13273 tolerated(0.18 benign(0)



Genetic lesions in MYC and STAT3 drive oncogenic transcription factor overexpression in plasmablastic lymphoma

by Julia Garcia-Reyero, Nerea Martinez Magunacelaya, Sonia Gonzalez de Villambrosia, Sanam Loghavi, Angela Gomez Mediavilla, Raul Tonda, Sergi Beltran, Marta Gut, Ainara Pereña Gonzalez, Emanuele d' Ámore, Carlo Visco, Joseph D. Khoury, and Santiago Montes-Moreno

Haematologica 2020 [Epub ahead of print]

Citation: Julia Garcia-Reyero, Nerea Martinez Magunacelaya, Sonia Gonzalez de Villambrosia, Sanam Loghavi, Angela Gomez Mediavilla, Raul Tonda, Sergi Beltran, Marta Gut, Ainara Pereña Gonzalez, Emanuele d' Ámore, Carlo Visco, Joseph D. Khoury, and Santiago Montes-Moreno. Genetic lesions in MYC and STAT3 drive oncogenic transcription factor overexpression in plasmablastic lymphoma.

Haematologica. 2020;105:xxx

doi:10.3324/haematol.2020.251579

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Genetic lesions in *MYC* and *STAT3* drive oncogenic transcription factor overexpression in plasmablastic lymphoma.

Julia Garcia-Reyero^{1, 2}, Nerea Martinez Magunacelaya², Sonia Gonzalez de Villambrosia³, Sanam Loghavi⁴, Angela Gomez Mediavilla², Raul Tonda⁵, Sergi Beltran⁵, Marta Gut⁵, Ainara Pereña Gonzalez², Emmanuel D'Ámore⁶, Carlo Visco⁷, Joseph D. Khoury⁴ and Santiago Montes-Moreno^{1, 2}.

Running title: Oncogenic somatic mutations in Plasmablastic lymphoma.

1. Anatomic Pathology Service. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL. Universidad de Cantabria. Santander, Spain
2. Translational Hematopathology Lab, IDIVAL. Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC). Santander, Spain
3. Cytogenetics Unit, Department of Hematology, HUMV, Santander, Spain.
4. Hematopathology Department, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA.
5. Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG-CRG). Barcelona Institute of Science and Technology (BIST). Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain.
6. Departments of Pathology and Hematology, San Bortolo Hospital, Vicenza, Italy.
7. Department of Medicine, Section of Hematology, University of Verona, Italy.

WC text 3292, WC abstract 242, 5 figures, 1 table, 34 references.

Author for correspondence: Santiago Montes Moreno MD, PhD.

Anatomic Pathology Service, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Translational Hematopathology Lab. IDIVAL. Universidad de Cantabria.

Avda de Valdecilla s/n, 39010, Santander, Cantabria, España.

Tlf/ FAX: (34) 942-203492. E-mail: santiago.montes@scsalud.es

Acknowledgements: This study was supported by grants from MINECO (PI16/1397, SMM, Principal Investigator) and IDIVAL (NEXTVAL 15/09, SMM, Principal Investigator). NMM was supported by Asociación Española contra el Cancer (AECC). The authors want to acknowledge the Valdecilla Tumor Biobank Unit (Tissue Node, PT13/0010/0024) for their skillful handling and processing of tissue samples and specially all the clinical colleagues and pathologists who provided with clinical data and samples for this research study.

ABSTRACT

Plasmablastic lymphoma mutational profile is undescribed. Here we performed a targeted exonic NGS analysis of 30 plasmablastic lymphoma cases with a B cell lymphoma dedicated panel and FISH for the detection of *MYC* rearrangements. A complete phenotyping of the neoplastic and microenvironment cell populations was also performed. We have identified an enrichment in recurrent genetic events in *MYC* (69% with *MYC* translocation or amplification and 3 cases with missense point mutations), *PRDM1*/Blimp1 and *STAT3* mutations. These gene mutations were more frequent in EBV positive disease. Other genetic events included mutations in *BRAF*, *EP300*, BCR (*CD79A* and *CD79B*), NOTCH pathway (*NOTCH2*, *NOTCH1* and *SGK1*) and *MYD88*pL265P. Immunohistochemical analysis showed consistent *MYC* expression, higher in cases with *MYC* rearrangements together with phospho-*STAT3* (Tyr705) overexpression in cases with *STAT3* SH2 domain mutations. Microenvironment populations were heterogeneous and unrelated with EBV, with an enrichment of Tumor Associated Macrophages (TAM) and PD1 positive T cells. PD-L1 was expressed in all cases in the TAM population but only in 5 cases in the neoplastic cells (4 out of 14 EBV positive cases). HLA expression was absent in the majority of PBL cases. In summary, Plasmablastic lymphoma mutational profile is heterogeneous and related with EBV infection. Genetic events in *MYC*, *STAT3* and *PRDM1*/Blimp1 are more frequent in EBV positive disease. An enrichment in TAM and PD1 reactive T lymphocytes is found in the microenvironment of PBL cases, that express PD-L1 in the neoplastic cells in a fraction of cases.

Key points:

Plasmablastic Lymphomas cases show activating mutations in *MYC*, *STAT3* and *BRAF*, providing a rationale for targeted therapy.

An enrichment in TAM and PD1 reactive T lymphocytes is found in the microenvironment of PBL cases that together with PD-L1 expression by the tumor cells may suggest an option for immune-checkpoint interference.

INTRODUCTION

Plasmablastic lymphoma is an aggressive non-Hodgkin B cell lymphoma type defined as a high grade large B-cell neoplasm with plasma cell phenotype (i.e. loss of B-cell antigens with downregulation of CD20 and PAX5 expression and overexpression of PRDM1/Blimp1 and XBP1s)¹⁻⁴.

Epstein-Barr virus (EBV) infection is found in the majority of the cases but is not required for the development of a plasmablastic phenotype since clear-cut plasmablastic lymphoma can be negative for EBV³⁻⁵. In addition, recent evidence suggests that EBV or human immunodeficiency virus (HIV) status does not influence the gene expression profile patterns of plasmablastic lymphoma⁶. However EBV positivity in plasmablastic lymphoma has been found to be associated with increased PD-L1 protein expression as well as other immune escape markers^{7,8} and decreased expression of MHCII/HLA-DR by the neoplastic cells⁹. This has been recently found to be associated with an increased antiviral cytotoxic immunity involving different immune cell populations⁷.

The genetic landscape of plasmablastic lymphoma with regards to somatic mutations is poorly understood. So far, *MYC-IGH* translocations are the most commonly detected alteration, involving 60% of the cases^{10,11}. Concurrent mutations in *PRDM1/Blimp1* have been found in half of these cases¹². Very recently, exome sequencing of a series of HIV- positive plasmablastic lymphoma cases showed somatic mutations involving components of the non-canonical NFkB pathway as well as genes involved in immune response (meeting abstract¹³) but such data remain limited.

Our aim was to characterize the genetic profile of a series of plasmablastic lymphoma cases using targeted exonic NGS and correlate the findings with EBV infection and the expression status of immune checkpoint proteins in both the neoplastic population and the microenvironment. In addition, we quantified the components of the microenvironment and searched for skewed T cell populations in this tumor. We have found that the mutational profile of PBL is related with EBV infection in the tumor cells and we identified recurrent genetic events in *MYC*, *STAT3* and *PRDM1/Blimp1* that are more frequent in EBV positive disease. In addition, we identified PD-L1 expression on tumor cells in a subset of cases as well as an enrichment in Tumor associated macrophages (TAM) and PD1 reactive T cells in the microenvironment of PBL cases.

METHODS

Case Selection

Twenty-eight new cases were retrieved from the files of the Pathology Department of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 10 samples from the files of the University of Texas MD Anderson Cancer Center (Houston) Hematopathology Department files and 4 cases from the

department of Pathology of San Bortolo Hospital, Vicenza, Italy. Material Transfer Agreements were signed by IDIVAL and the corresponding institutions to share the material in the project. The study and sample collection were approved by the local ethics committee (CEIC Cantabria, IRB code 2016.168) and complies with the Declaration of Helsinki. All cases were diagnosed according to the WHO classification of Hematolymphoid Neoplasms¹⁴. Negativity for pan B cell markers (CD20), HHV-8 and ALK was required in every case to be included. The phenotype of the cases was consistent with a plasma cell differentiation program^{4,15}. The clinical features of the cases were recorded and a summary is available in Supplementary Table 1.

Immunohistochemistry and in situ hybridization.

Immunohistochemical reactions were performed following conventional automated procedures. Chromogenic in situ hybridization for EBV-EBERs and Fluorescent in situ hybridization for the detection of *MYC* rearrangement were also done.

Quantification of the cellular composition of the tumor and transcription factor abundance.

Quantification of different lymphoid and histiocytic/dendritic subpopulations, identified with CD3, CD8, PD1, CD163, PD-L1 and MHCII/HLA DP/DR and absolute quantification of the number of nuclei showing expression of *MYC* and Phospho-STAT3 (Tyr705) were done.

Next Generation Sequencing using amplicon-based library generation.

DNA was extracted from formalin fixed paraffin embedded samples using the PicoPure™ DNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific) and was quantified by Qbit fluorometer (ThermoFisher Scientific). All samples subjected to NGS analysis were required to have >50% of neoplastic cells as identified by morphology (H&E).

A TruSeq® Custom Amplicon Low Input Library containing exonic regions of 35 selected genes of interest was used to isolate the DNA for sequencing (Illumina). The list of genes was *CARD11*, *ARID1A*, *NOTCH1*, *TCF3*, *SMARCA4*, *STAT6*, *EP300*, *CREBBP*, *MLL2*, *BTK*, *NOTCH2*, *TNFRSF14*, *ATM*, *FOXO1*, *B2M*, *PLCG2*, *CD79B*, *TP53*, *STAT3*, *BCL2*, *MEF2B*, *CD79A*, *CXCR4*, *PTPN1*, *MYD88*, *FAT2*, *PRDM1*, *TNFAIP3*, *SGK1*, *CCND3*, *PIM1*, *EZH2*, *BRAF*, *MYC*, *NOTCH2*. Of note, variants occurring in regions outside the coverage of our targeted design, were not explored using this approach. Details about library preparation can be found in supplementary material.

Sequencing on a HiSeq instrument (Illumina, paired end, 2x150) at the National Genomic Analysis Center (CNAG, Barcelona, Spain) was performed.

Sequencing data interpretation and reporting.

In brief only variants in which both libraries had a coverage greater or equal to 300 reads and had the same genotype were selected for downstream analysis. Subsequently only missense, frameshift, and nonsense somatic mutations with variant frequency >10% were considered (supplementary Table 2). SNPs were filtered out using VAF criteria, comparison with dbSNP and with a in house germline variants database. Finally, 34 somatic mutations (31 missense, 3 nonsense) in 14 genes were considered (Table 1).

For further details on the methods here used please see supplementary material.

RESULTS

1. The mutational profile of plasmablastic lymphoma is heterogeneous and correlates with EBV infection in the neoplastic cells.

After targeted NGS with a lymphoma dedicated panel, somatic missense and nonsense mutations were identified in 18 out of 30 plasmablastic lymphoma cases (60%). EBV negative cases tended to show a higher rate of mutations, as compared to EBV positive cases (87.5% vs 54%, respectively, Chi square, $p > 0.05$) (Figure 1).

Interestingly the pattern of mutations was also different between EBV positive and EBV negative cases. Recurrent somatic mutations restricted to EBV positive cases were found in *PRDM1*/Blimp1 in 6 cases and *STAT3*, in 5 cases. Notably, a recurrent *PRDM1*/Blimp1 variant, D203E, was identified in 4 out of 6 cases, involving the PR domain of the protein.

STAT3 mutations were found in 5 out of 30 cases (16%), all EBV positive. Interestingly all but one (*STAT3*pD566Y) of the mutations involved the SH2 domain of *STAT3* protein (*STAT3*pY640F, *STAT3*pM648L, *STAT3*pG618R, *STAT3*pN647I) (Figure 2) and lead to phosphoSTAT3 (Tyr705) protein overexpression (see below).

The majority (16 out of 23 cases tested, 69%) of plasmablastic lymphoma cases harbored structural abnormalities at the *MYC* locus. 14 cases showed *MYC* translocation (60%) using break apart probes. *MYC-IGH* was confirmed in 7 of 9 cases tested (77%). *MYC* was found to be amplified by FISH in 2 additional cases (Figure 1). Thus, in cases with *MYC* rearrangements, *MYC-IGH* is the most frequent alteration. Although there was a clear trend for the association between EBV positivity and *MYC* rearrangement the difference was not statistically significant (Chi square 0.06).

Furthermore, *MYC* was found to be mutated in 3 cases with all but one of the mutations involving exon 2 and consisting of transversions and transitions at C: G pairs (4 out of 7 mutations, see Table

1). Furthermore, *MYC*p79S mutation involves the WRCY consensus motif. All these features are consistent with a mechanism related with aSHM as described in early reports¹⁶.

Common mutations in DLBCL NOS, involving BCR activation, TLR/NFkB, histone modifying genes and NOTCH pathway were found in 8 cases (Table 1 and Figure 1). Those mutations involved *CD79p*AW76*, *CD79Bp*D34N, *MYD88p*L265P, *NOTCH1p*P401L, *NOTCH2p*R2400*, *SGK1Kp*136* and *EP300p*M2010I/*EP300p*R1731H. NOTCH pathway was affected by somatic mutations in NOTCH2 (1 case), NOTCH1 (1 case) and SGK1 (2 cases). Other mutations found were *SMARCA4p*R1005Q and *TP53p*R273H. Of note two cases, both EBV negative, had mutations in BRAF gene, one case with the canonical activating *BRAFp*V600E mutation and the other with the mutation *BRAFp*G469A in the ATP binding site.

2. *STAT3* mutations are associated with constitutive phospho-*STAT3* (Tyr705) activation. *MYC* protein overexpression is related to *MYC* rearrangement status.

Phospho-*STAT3* (Tyr705) protein immunohistochemical expression was quantified in 20 cases with available mutational data. Mean phospho-*STAT3* expression was 48 nuclei per HPF (40x) in these 20 cases. Mean expression for 2 out of 4 SH2 domain mutated cases with available IHC data was 249 nuclei per HPF (40x). Mean phospho-*STAT3* expression for *STAT3* wild type cases was 28 nuclei per HPF (40x). Mean phospho-*STAT3* expression for the single nonSH2 *STAT3* mutated sample was 40 nuclei per HPF (40x). Thus, *STAT3* SH2 domain mutations (*STAT3p*Y640F, *STAT3p*M648L, *STAT3p*G618R, *STAT3p*N647I) were associated with overexpression of phospho-*STAT3* by IHC in the tissue samples (Figure 2B).

MYC protein was consistently expressed in all the cases (range 59-236 nuclei per HPF, mean 236), irrespective of the presence of *MYC* translocation, as previously reported^{12,17}. However, significant differences in the level of *MYC* expression were quantified, according to *MYC* gene status. *MYC* translocated (14 cases) and amplified cases (2 cases) had, as expected, higher *MYC* protein expression than cases without *MYC* rearrangements (7 cases). Mean number of positive nuclei was 109 per HPF in non-rearranged cases vs mean 282 positive nuclei per HPF in *MYC* rearranged cases, Mann-Whitney test p value <0.0001 (Figure 3).

Mean *MYC* protein expression in 22 cases with available data was 236 nuclei per HPF, significantly higher than the mean 48 nuclei per HPF in the cases of phospho-*STAT3* protein expression (Wilcoxon test p 0.001). There was no correlation between the expression levels of both proteins (Pearson non-significant). Due to the high prevalence of *MYC* translocations and amplification in PBL and the relatively low levels of phospho-*STAT3* expression and absence of correlation between both

proteins, it is unlikely that STAT3 activation contributes to MYC overexpression in most PBL cases. However, one of our cases with *STAT3* SH2 domain mutations and absence of *MYC* translocation by FISH showed high levels of both phospho-STAT3 and MYC proteins, without detectable *PRDM1*/Blimp1 mutations, suggesting that MYC overexpression might be related with STAT3 activation by mutations in rare PBL cases.

In sum MYC protein overexpression is due to rearrangements involving *MYC* in a significant proportion of plasmablastic lymphoma cases (69% in these series). Most translocations fuse *MYC* to *IGH* and few cases may show amplifications of the *MYC* gene. Both alterations lead to MYC protein overexpression. Genetic alterations in the *MYC* regulatory domains of *PRDM1*/Blimp1 may also contribute to its overexpression¹². In addition here we show that a fraction of plasmablastic lymphoma cases has STAT3 activation, due to somatic mutations in the *STAT3*-SH2 domain that may increase MYC expression, as previously described in DLBCL¹⁸ (Figure 4).

3. The Immune microenvironment in PBL is characterized by enrichment in TAM and PD1 positive T cells. PD-L1 in neoplastic cells in PBL is expressed in a fraction of cases, independently of EBV infection.

We quantified the expression of CD163 and PD-L1 in histiocytic/dendritic cells within plasmablastic lymphoma cases. The mean expression of PDL1 was 33 nuclei per HPF (range 1.67-61) and the mean expression of CD163 was 38 nuclei per HPF (range 2-84, Figure 5). The correlation between CD163 and PD-L1 expression was significant (Pearson 0.6, p value <0.05), suggesting that PD-L1 positive cells are histiocytes in plasmablastic lymphoma cases. There was not a significant difference in the content and distribution of CD163 and PD-L1 positive histiocytes between EBV positive and EBV negative cases (Mann-Whitney test p>0.05).

CD8 positive and PD1 positive T cell subpopulations were quantified. The mean number of CD8 positive lymphocytes was 52 nuclei per HPF (range 1-117) and the mean number of PD1 positive lymphocytes was 32 nuclei per HFP (range 0-76). There was a significant difference in the distribution of CD8 and PD1 positive cell subset (Wilcoxon test, significant p<0.001) consistent with different cell populations. Pearson correlation value was however significant (Pearson 0.59, p value <0.05). There was no significant difference in the content and distribution of CD8 and PD1 positive lymphocytes between EBV positive and EBV negative cases (Mann-Whitney test p>0.05) (Figure 5).

PDL1 was expressed by tumor cells in 5 out of 24 (20%) cases evaluated (mean 59 nuclei per HPF, range 25-98). Four out of 5 PD-L1 positive cases (in the neoplastic cells) were EBV positive. 14 EBV positive PBL cases were PD-L1 negative in the tumor cells. Thus 4 out of 18 (22%) EBV positive PBL

cases were PD-L1 positive, while one out of 6 (16%) EBV negative cases were PD-L1 positive. Thus, there was no association between EBV infection by tumor cells and PDL1 expression, since most of the EBV positive cases were PD-L1 negative (p value, non-significant, Figure 5). Interestingly one case with *STAT3* SH2 mutations showed concurrent PD-L1 and Phospho-STAT3 (Tyr705) expression. For the other *STAT3* SH2 mutated cases PD-L1 expression data was not available to test this association.

Consistent with previously published data⁹ major histocompatibility class II (MHCII) protein/ HLA (DP,DR) was virtually absent in PBL. Only 3 cases out of 25 tested were positive (12%, mean 349 nuclei per HPF, range 284-440). Two cases showed a membranous and cytoplasmic granular pattern and the other a membranous pattern. All 3 cases were EBV positive. The other 22 cases were completely negative for HLA expression in tumor cells (Figure 5).

DISCUSSION

In this study we characterized the genetic profile of a series of plasmablastic lymphoma cases using targeted exonic NGS and correlate with EBV infection and the expression of immune checkpoint proteins in both the neoplastic population and tumor microenvironment. Our results show that genetic abnormalities (including translocations, amplifications and point mutations) in the *MYC* gene are the most common genetic event in plasmablastic lymphoma. In addition to previously described translocations, involving *IGH* and *MYC*^{10,11}, here we demonstrate that few cases may have *MYC* amplification, confirming our previous observations¹². Both *MYC* translocation and amplification lead to a significantly increased *MYC* protein overexpression. Interestingly we have also identified *MYC* point mutations, mainly consisting of transversions and transitions at C: G pairs and involving exon 2 and, in the case of *MYC*p79S mutation the WRCY consensus motif. All these features are consistent with a mechanism related with aSHM¹⁶. The oncogenic effect of these point mutations remains however unclear.

In addition, we have found, that 16% of our cases (5 cases) carry recurrent somatic mutations in the oncogene *STAT3*, preferentially involving the SH2 domain of the protein. Interestingly these mutations were restricted to EBV positive PBL. Here we demonstrate that these mutations lead to an increased expression of phospho-STAT3 (Tyr705).

STAT3 mutations and phospho-STAT3 overexpression have been found very rarely in DLBCL NOS (6% according to¹⁹). In cases of ALK positive large B cell lymphoma that show commonly a plasmablastic phenotype, phospho-STAT3 expression has been found to be associated with the presence of ALK rearrangements and overexpression²⁰. Importantly, *STAT3* activation, due to somatic mutations in the *STAT3*-SH2 domain may contribute to *MYC* overexpression, as previously described in DLBCL¹⁸. In

addition, one case in our series showed concurrent *STAT3* SH2 mutations and Phospho-STAT3 (Tyr705) expression and PD-L1 overexpression, confirming previous results in other lymphoma types suggesting that STAT3 activation triggers PD-L1 overexpression²¹.

STAT3 somatic mutations in plasmablastic lymphoma have not been previously described so far and may have therapeutic implications for the clinical testing of STAT3 inhibitors in these patients.

Interestingly the pattern of somatic mutations in EBV negative disease was more heterogeneous. Mutations involving BCR activation, TLR/NFkB, histone modifying genes and NOTCH pathway were found in 8 cases (Table 1 and Figure 1). *MYD88*pL265P mutation, involving the TIR domain of the *MYD88* gene has been previously described in ABC-type DLBCL, Primary Central Nervous System Lymphoma and other immune privileged site DLBCL^{22,23} and LPL/WM²⁴ and leads to downstream activation of IRAK4/IRAK1/TRAF6 complex and NFkB activation. The pattern of mutations in *CD79A/B* in PBL cases was distinct than that found in DLBCL NOS. Mutations in *CD79A/B* were found located outside the ITAM domains related with constitutive BCR activation in ABC-type DLBCL²⁵. NOTCH pathway was mutated in *NOTCH2*, *NOTCH1* and *SGK1*. *NOTCH2*pR2400* is a nonsense mutation that truncates the PEST domain of the NOTCH2 protein and has been already described in B-NHL, including DLBCL NOS²⁶. PEST domain truncating mutations have been found present in multiple tumor types and functional studies suggest that this class of mutations can be targeted with Notch inhibitors including gamma secretase inhibitors²⁷. *NOTCH1*pP401L has been already reported in CLL in a previous study²⁸ and lies within the Ca binding EGF-like domains repeat. Mutations in *SGK1*, involved *SGK1*pS451F, *SGK1*pA380V point mutations and *SGK1*pK136* truncating mutations. These mutations have not been previously described in DLBCL NOS cases²⁶. SGK1 has been suggested to be a negative regulator of NOTCH signaling enhancing NOTCH protein degradation and reducing its activation by the gamma-secretase²⁹. Other mutations found were *SMARCA4*pR1005Q and *TP53*pR273H.

Of note MAPK/ERK pathway activating mutations, involving *BRAF* (*BRAF*pV600E, *BRAF*pG469A) were found in two cases, both EBV negative. *BRAF* mutations have been observed, rarely, in related neoplasms such as multiple myeloma. Previous studies have found *BRAF* mutations in 4% of multiple myeloma cases³⁰ and associated with aggressive clinical features, plasmablastic phenotype and clonal evolution^{31,32}, with obvious clinical implications for targeted therapy.

In addition to the genetic profile of the cases we explored further the composition of the tumor microenvironment and the expression of immune-checkpoint markers in both the neoplastic and other lymphoid and histiocytic/dendritic populations. Our results confirm previous studies showing an enrichment in Tumor Associated Macrophages that express CD163 and PD-L1. In addition PBL

cases show a significant population of CD8 positive T cells, irrespective of the almost absent expression of MHCII/HLA by the neoplastic cells⁹. Importantly, together with CD8 positive T cells, PBL shows a distinct population of PD1 positive T cells. In our cases EBV does not influence the immune populations, with regards to the content of TAM, CD8 positive and PD1 positive T cells quantified in the tissue. Furthermore, in our series, PD-L1 expression by the neoplastic cells was found in 20% of the cases analyzed, similar to previously published series⁸ and there was no association between EBV infection by tumor cells and PD-L1 expression, since PD-L1 was found in both EBV positive and negative variants and most of the EBV positive cases were PD-L1 negative. These findings are in agreement with previously published data in plasmablastic lymphoma, with variable expression of PD-L1 by the neoplastic population, ranging 20-44%^{8,33}. In our series, however, we do not confirm an association between EBV infection and PD-L1 expression as suggested by others⁸. These differences might be due to a combination of factors, including different clones used for the detection of PD-L1 expression (22C3 clone in this study, SP142 in others⁸) and different quantification and statistical methods used. In addition another biological factor related to the uncommon PD-L1 expression in PBL cases could be related to the usual latency pattern found in these cases, since PD-L1 expression in EBV positive PTLD has been highly associated with EBV latency patterns 2 and 3³⁴ while PBL cases use to disclose EBV latency pattern 1⁷. Notably one of our cases points to STAT3 activation as a potential cause for PD-L1 overexpression in PBL cases. Collectively our results on the microenvironment and immune-checkpoint expression in PBL may indicate a potential for immune checkpoint interference in patients with plasmablastic lymphoma.

In summary, here we have found that the mutational profile of PBL is related with EBV infection in the tumor cells and identified recurrent genetic events in *MYC*, *STAT3* and *PRDM1*/Blimp1 that are associated with EBV positive disease. Both *MYC* genetic alterations (including translocations and amplification) and SH2 domain *STAT3* mutations lead to *MYC* and Phospho-STAT3 (Tyr705) protein overexpression, respectively. Other somatic mutations including *BRAF*pV600E, *MYD88*pL265P, *NOTCH2*pR2400* and *TP53*pR273H, appear in EBV negative disease, suggesting an overlapping mutational profile with both multiple myeloma and DLBCL NOS. Furthermore, the tumor microenvironment in PBL is characterized by an enrichment in PD-L1 positive TAM and PD1 reactive T lymphocytes with expression of PD-L1 by the neoplastic tumor cells in a fraction of cases. Novel molecular targets derived from the present study include *MYC* and *STAT3* activation, MAPK/ERK and NOTCH2 pathway mutations and immune-checkpoint interference.

Authorship contributions: JGR performed research, analyzed data and approved the paper, NMM performed research, analyzed data and approved the paper, SGV analyzed data and approved the paper, SL performed research, provided clinical data and approved the paper, AGM performed research and approved the paper, RT analyzed data and approved the paper, SB analyzed data and approved the paper, MG analyzed data and approved the paper, AGP performed research and approved the paper, EDA performed research, provided clinical data and approved the paper, CV provided clinical data and approved the paper, JK provided clinical data and approved the paper, SMM designed research, performed research, analyzed data, wrote the paper and approved the paper.

The authors have no potential conflict of interest to disclose related to the content of this work.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008.
2. 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. *Blood*. 2011;117(19):5019-5032.
3. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997;89(4):1413-1420.
4. Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina AR, Rodriguez-Pinilla SM, et al. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica*. 2010;95(8):1342-1349.
5. Colomo L, Loong F, Rives S, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(6):736-747.
6. Chapman J, Gentles AJ, Sujoy V, et al. Gene expression analysis of plasmablastic lymphoma identifies downregulation of B-cell receptor signaling and additional unique transcriptional programs. *Leukemia*. 2015;29(11):2270-2273.
7. Gravelle P, Péricart S, Tosolini M, et al. EBV infection determines the immune hallmarks of plasmablastic lymphoma. *Oncoimmunology*. 2018;7(10):e1486950.
8. Laurent C, Fabiani B, Do C, et al. Immune-checkpoint expression in Epstein-Barr virus positive and negative plasmablastic lymphoma: a clinical and pathological study in 82 patients. *Haematologica*. 2016;101(8):976-984.
9. Schmelz M, Montes-Moreno S, Piris M, Wilkinson ST, Rimsza LM. Lack and/or aberrant localization of major histocompatibility class II (MHCII) protein in plasmablastic lymphoma. *Haematologica*. 2012;97(10):1614-1616.
10. Valera A, Balagué O, Colomo L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(11):1686-1694.
11. Taddesse-Heath L, Meloni-Ehrig A, Scheerle J, Kelly JC, Jaffe ES. Plasmablastic lymphoma with MYC translocation: evidence for a common pathway in the generation of plasmablastic features. *Mod Pathol*. 2010;23(7):991-999.
12. Montes-Moreno S, Martinez-Magunacelaya N, Zecchini-Barrese T, et al. Plasmablastic lymphoma phenotype is determined by genetic alterations in MYC and PRDM1. *Mod Pathol*. 2017;30(1):85-94.
13. Munevver C, Rong HR, Chineke I, et al. Genetic Analysis of Plasmablastic Lymphomas in HIV (+) Patients Reveals Novel Driver Regulators of the Noncanonical NF-Kb Pathway. *Blood*. 2018;132(Suppl 1):1565.
14. Swerdlow SH, CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (Eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (revised 4th edition). IARC. Lyon 2017.
15. Montes-Moreno S, Martinez-Magunacelaya N, Zecchini-Barrese T, et al. Plasmablastic lymphoma phenotype is determined by genetic alterations in MYC and PRDM1. *Mod Pathol*. 2017;30(1):85-94.
16. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 2001;412(6844):341-346.

17. Loghavi S, Alayed K, Aladily TN, et al. Stage, age, and EBV status impact outcomes of plasmablastic lymphoma patients: a clinicopathologic analysis of 61 patients. *J Hematol Oncol*. 2015;8:65.
18. Sarosiek KA, Malumbres R, Nechushtan H, Gentles AJ, Avisar E, Lossos IS. Novel IL-21 signaling pathway up-regulates c-Myc and induces apoptosis of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2010;115(3):570-580.
19. Ohgami RS, Ma L, Monabati A, Zehnder JL, Arber DA. STAT3 mutations are present in aggressive B-cell lymphomas including a subset of diffuse large B-cell lymphomas with CD30 expression. *Haematologica*. 2014;99(7):e105-107.
20. Valera A, Colomo L, Martinez A, et al. ALK-positive large B-cell lymphomas express a terminal B-cell differentiation program and activated STAT3 but lack MYC rearrangements. *Mod Pathol*. 2013;26(10):1329-1337.
21. Tabanelli V, Corsini C, Fiori S, et al. Recurrent PDL1 expression and PDL1 (CD274) copy number alterations in breast implant-associated anaplastic large cell lymphomas. *Hum Pathol*. 2019;90:60-69.
22. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115-119.
23. Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, et al. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood*. 2016;127(7):869-881.
24. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826-833.
25. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
26. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia*. 2018;32(3):675-684.
27. Wang K, Zhang Q, Li D, et al. PEST domain mutations in Notch receptors comprise an oncogenic driver segment in triple-negative breast cancer sensitive to a γ -secretase inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2015;21(6):1487-1496.
28. Sutton LA, Ljungström V, Mansouri L, et al. Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: a high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. *Haematologica*. 2015;100(3):370-376.
29. Mo JS, Ann EJ, Yoon JH, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) controls Notch1 signaling by downregulation of protein stability through Fbw7 ubiquitin ligase. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 1):100-112.
30. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471(7339):467-472.
31. Bohn OL, Hsu K, Hyman DM, Pignataro DS, Giralt S, Teruya-Feldstein J. BRAF V600E mutation and clonal evolution in a patient with relapsed refractory myeloma with plasmablastic differentiation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(2):e65-68.
32. Andrusis M, Lehnert N, Capper D, et al. Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov*. 2013;3(8):862-869.
33. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3462-3473.
34. Veloza L, Teixeira C, Castrejon N, et al. Clinicopathological evaluation of the programmed cell death 1 (PD1)/programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) axis in post-transplant lymphoproliferative

disorders: association with Epstein-Barr virus, PD-L1 copy number alterations, and outcome. *Histopathology*. 2019;75(6):799-812.

TABLE 1

ID	Gene	Location chrom	Domain	Allele	cDNA_ position	Codons	AA Change		Consequence*	Existing_variation
4	STAT3	17	---	A	2009	Gac/Tac	566	D/Y	deleterious	COSM220689
4	EP300	22	---	A	7249	atG/atA	2010	M/I	tolerated	---
11	MYC	8	---	G	578	aCc/aGc	23	T/S	tolerated	---
11	MYC	8	---	A	775	Tac/Aac	89	Y/N	tolerated	---
11	MYC	8	---	C	899	tTc/tCc	130	F/S	deleterious	COSM4171775
11	MYC	8	---	G	945	atC/atG	145	I/M	deleterious	---
14	STAT3	17	SH2	A	2255	Atg/Ttg	648	M/L	tolerated	---
14	STAT3	17	SH2	A	2232	tAc/tTc	640	Y/F	probably_damaging	COSM1155743
17	STAT3	17	SH2	G	2165	Ggc/Cgc	618	G/R	deleterious	COSM1166777
17	PRDM1	6	PR	G	843	gaC/gaG	203	D/E	neutral	rs811925*, COSM4160094
28	PRDM1	6	PR	G	843	gaC/gaG	203	D/E	neutral	rs811925*, COSM4160094
7	MYC	8	---	T	1085	tAc/tTc	192	Y/F	probably_damaging	---
7	CD79B	17	---	T	175	Gac/Aac	34	D/N	tolerated	---
8	SMARCA4	19	---	A	3295	cGa/cAa	1005	R/Q	deleterious	---
8	PRDM1	6	Ac	A	2546	gGc/gAc	771	G/D	tolerated	---
2	STAT3	17	SH2	A	2253	aAc/aTc	647	N/I	deleterious	COSM1155744
2	NOTCH1	9	EGF-like	A	1278	cCc/cTc	401	P/L	deleterious	COSM4745915
5	STAT3	17	SH2	A	2232	tAc/tTc	640	Y/F	probably_damaging	COSM1155743
10	PRDM1	6	Pro-rich	A	1295	aGc/aAc	354	S/N	tolerated	rs143040512, COSM4406870
10	CD79A	19	---	A	413	tgG/tgA	76	W/*	---	COSM5493940
26	PRDM1	6	PR	G	843	gaC/gaG	203	D/E	neutral	rs811925*, COSM4160094
27	PRDM1	6	PR	G	843	gaC/gaG	203	D/E	neutral	rs811925*, COSM4160094
3	ARID1A	1	---	A	762	Ggg/Agg	131	G/R	deleterious	---
3	ARID1A	1	---	C	6526	tGc/tCc	2052	C/S	deleterious	---
3	MYD88	3	TIR	C	794	cTg/cCg	265	L/P	deleterious	COSM85940
15	BRAF	7	ATP binding site	G	1467	gGa/gCa	469	G/A	deleterious	COSM460
18	SGK1	6	---	A	1950	tCc/tTc	451	S/F	deleterious	---
18	SGK1	6	---	A	1737	gCt/gTt	380	A/V	tolerated	---
9	NOTCH2	1	PEST	A	7418	Cga/Tga	240	R/*	deleterious	COSM36210

							0			
1	MYC	8	---	T	747	agC/agT	79	S/	---	---
1	EP300	22	---	A	6411	cGc/cAc	173 1	R/H	deleterious	---
1	BRAF	7	STKc_Raf	T	1860	gTg/gAg	600	V/E	deleterious	COSM476
1	SGK1	6	---	A	1004	Aag/Tag	136	K/*	deleterious	---
13	TP53	17	---	T	1008	cGt/cAt	273	R/H	possibly damaging	COSM10660

Summary of the mutations found in 18 out of 30 cases (60%) analyzed by targeted exonic next generation sequencing. Gene name, exonic location, cDNA position, single nucleotide change observed, and amino acid change predicted, together with predicted consequence using 3 different algorithms is shown. In addition, the dbSNP and the COSMIC id is provided when available.

Figure Legends

FIGURE 1

Summary of the mutations found in 18 out of 30 cases (60%) analyzed by targeted exonic next generation sequencing. EBV positivity by the tumor cells (EBV) and HIV infection by the patient are shown, together with the status of *MYC* gene as determined by interphase FISH. The pattern of somatic mutations is heterogeneous with a trend to a higher rate of mutations in EBV positive disease. Mutations (including translocations, amplifications and point mutations) in *MYC* gene are the most common genetic event in plasmablastic lymphoma. Previously undescribed mutations in plasmablastic lymphoma such as *STAT3* (16% of cases), *BRAF*, *MYD88*, *NOTCH2* and *TP53* were also identified (see detail in Table 1).

FIGURE 2

STAT3 mutations were found in 5 cases (16%), all EBV positive. Interestingly all but one (*STAT3*pD566Y) of the mutations involved the SH2 domain of *STAT3* protein (A. Mean expression for SH2 domain mutated cases (2 cases with available mutational and IHC data) was 249 nuclei per HPF (40x). Mean Phospho-*STAT3* expression for *STAT3* wild type cases was 28 nuclei per HPF (40X) (B). Thus, *STAT3* SH2 domain mutations lead to Phospho-*STAT3* (Tyr705) protein overexpression. Representative microphotographs are shown in C.

FIGURE 3

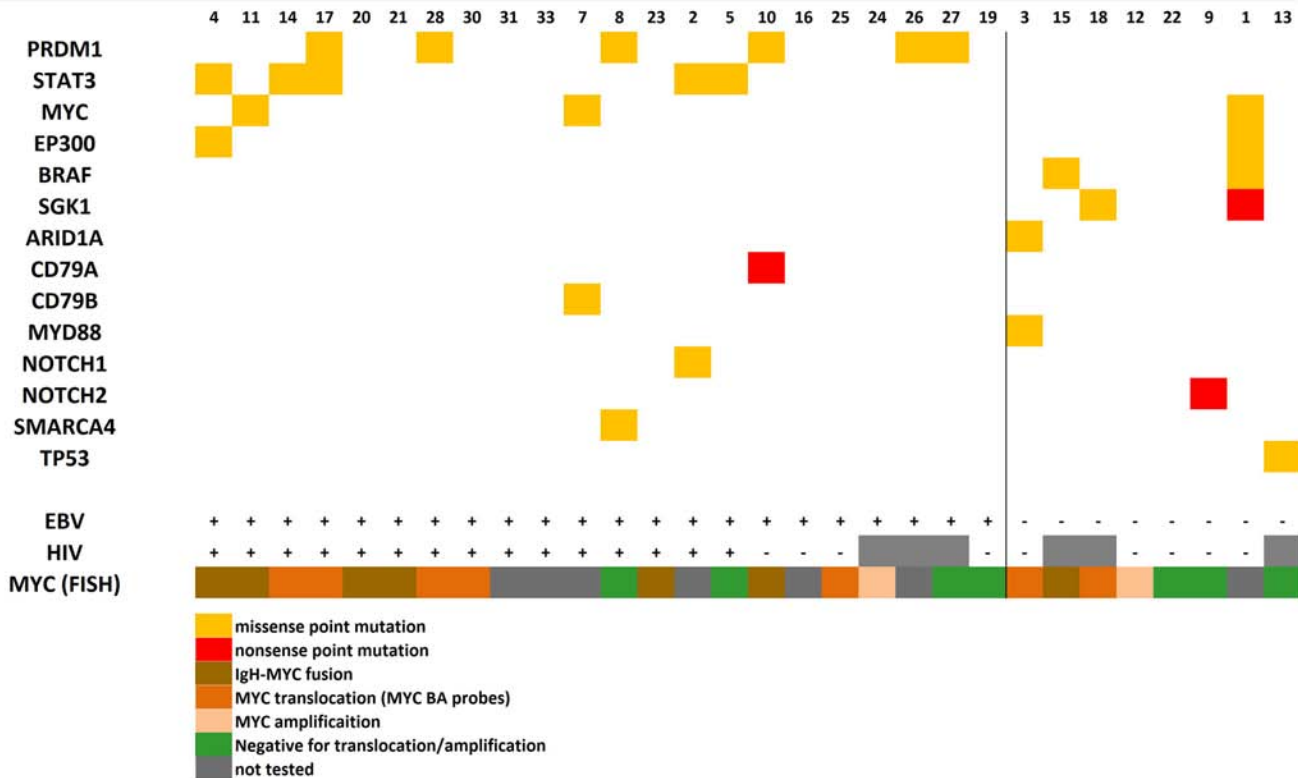
MYC protein was consistently expressed in the cases. Mean *MYC* protein expression in 22 cases with available data was 236 nuclei per HPF, significantly higher than the mean 48 nuclei per HPF in the cases of Phospho-*STAT3* protein expression (Wilcoxon test $p < 0.001$) (A). *MYC* translocated (14 cases) and amplified cases (2 cases) had higher *MYC* protein expression than cases without *MYC* rearrangements (7 cases) (Mann-Whitney test $p < 0.0001$) (B). Representative microphotographs are shown in C.

FIGURE 4

MYC protein overexpression is due to rearrangements involving *MYC* in a significant proportion of plasmablastic lymphoma cases (69% in these series). Most translocations fuse *MYC* to *IGH* and few cases may show amplifications of the *MYC* gene. In addition, here we show that a fraction of plasmablastic lymphoma cases has *STAT3* activation, due to somatic mutations in the *STAT3*-SH2 domain that may increase *MYC* expression.

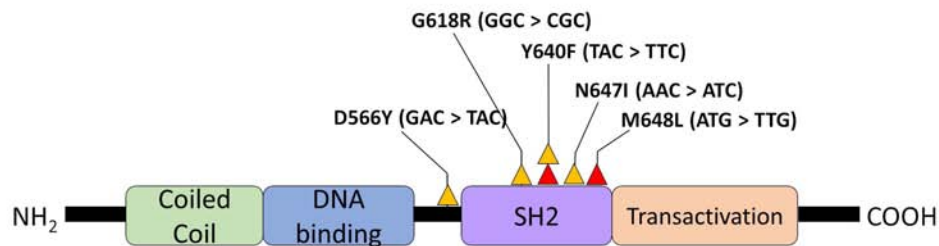
FIGURE 5

A. Scatter gram illustrating the mean and range of expression values after quantification of the IHC expression of CD8, PD1 in lymphocytes and PD-L1 and CD163 in histocyte/dendritic cell populations. B. Representative image of a case with a mean of 36 PD-L1 positive non neoplastic cells. C The same case showed a mean of 37 CD163 positive histiocytes. D. Mean expression of CD8 positive cells in this representative case was 53. E. PD1 identified a different T cell subpopulation (mean of 36 PD1 positive cells in this representative example, case n25). F. PD-L1 expression by neoplastic cells was identified in 5 out of 24 cases evaluated (20%). G. MHCII protein/ HLA (DP, DR) was, in most cases, restricted to histiocyte and endothelial cell populations. H. MHCII protein/ HLA (DP, DR) expression was identified in the neoplastic cells in 3 out of 25 cases tested (12%). 2 out of 3 cases showed a cytoplasmic granular and membranous staining (as shown in the figure) and 1 case had a membranous pattern.



A

STAT3



B

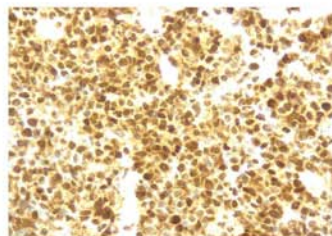
STAT3 Y640F & M648L

STAT3 G618R

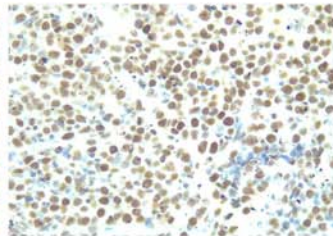
STAT3 wt



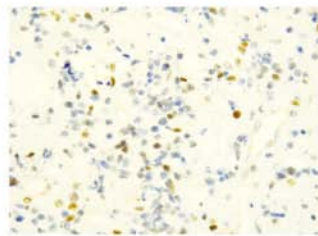
C



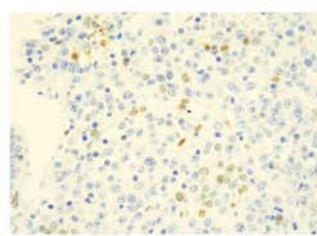
STAT3 Y640F & M648L



STAT3 G618R

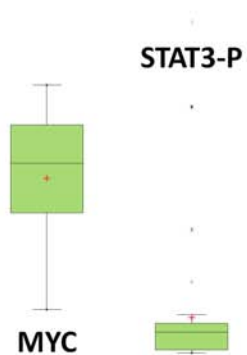


STAT3 D566Y

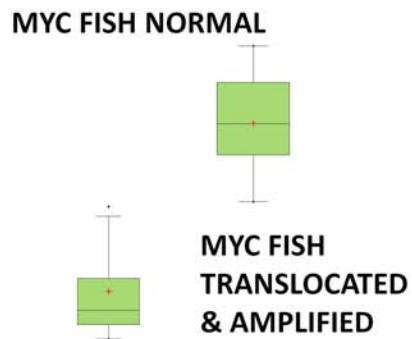


STAT3 wt

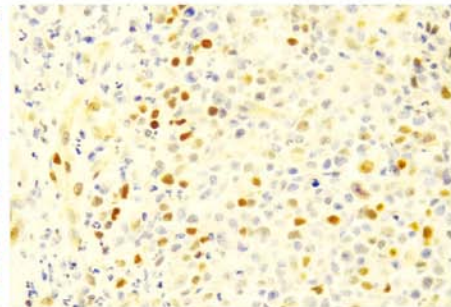
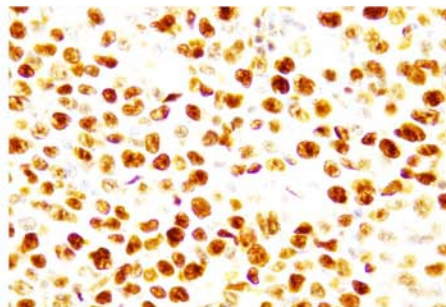
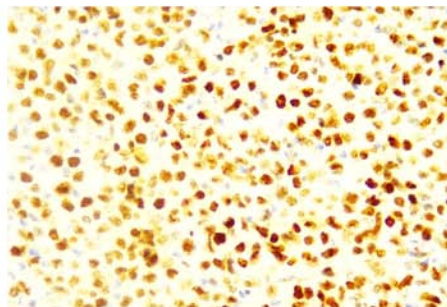
A



B



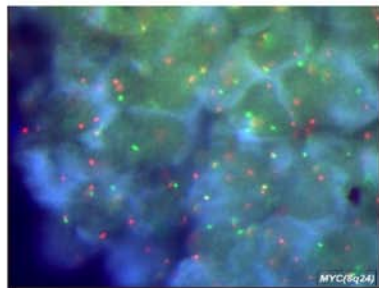
C



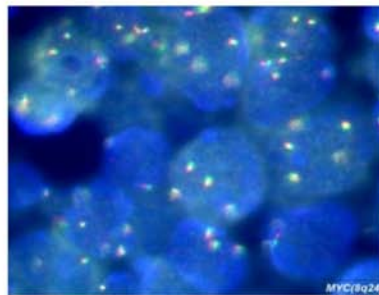
MYC-IgH POSITIVE

MYC-AMPLIFICATION POSITIVE

MYC-NON REARRANGED



**MYC translocation
(60%)**

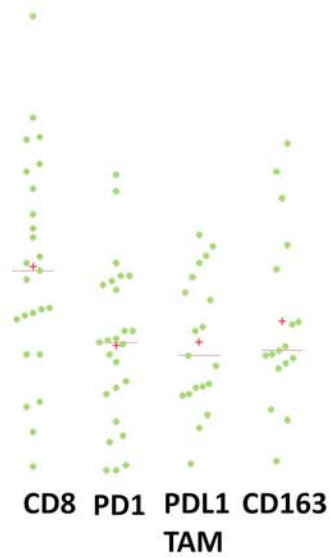
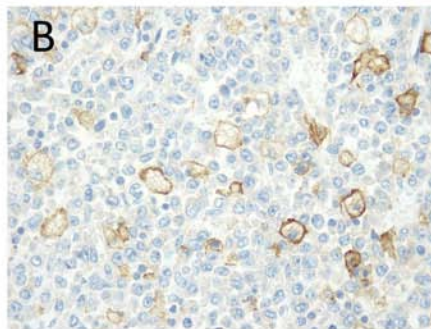
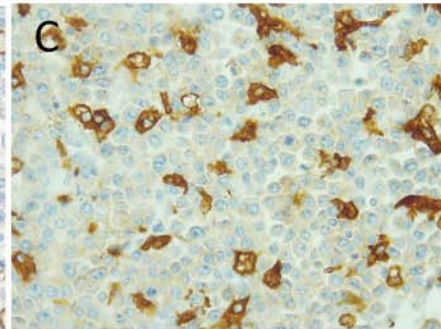
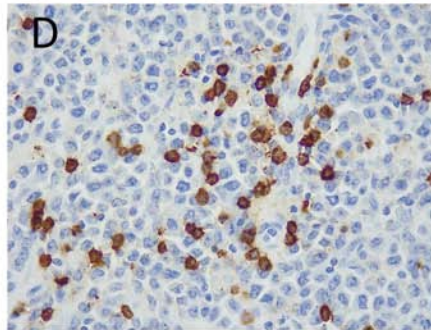
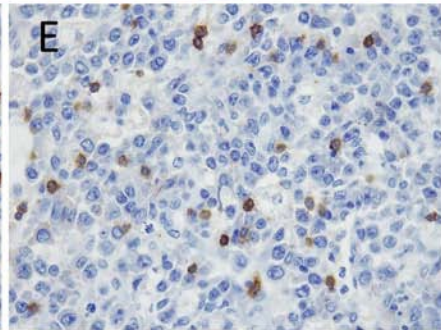
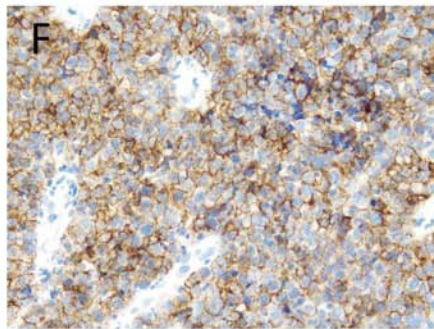
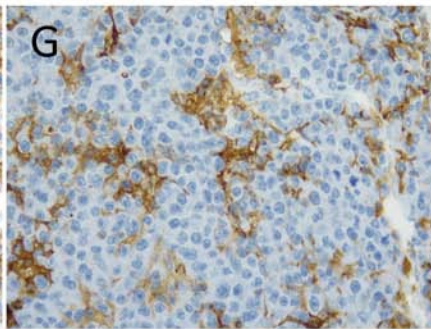
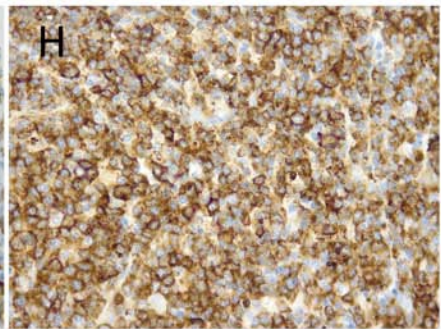


**MYC amplification
(9%)**

**↑MYC
PROTEIN**

↑STAT3-P

← STAT3 SH2 mutations (13%)

A**B****C****D****E****F****G****H**

Supplementary Data

Supplementary Methods.

Case selection and sample collection

Twenty-eight new cases diagnosed as plasmablastic lymphoma were retrieved from the files of the Pathology Department of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Available Clinical data were retrieved. 10 samples were retrieved from the files of the University of Texas MD Anderson Cancer Center (Houston) Hematopathology Department files and 4 cases were received from the department of Pathology of San Bortolo Hospital, Vicenza, Italy. Material Transfer Agreements were signed by IDIVAL and the corresponding institutions to share the material in the project. The study and sample collection were approved by the local ethics committee (CEIC Cantabria, IRB code 2016.168) and complies with the Declaration of Helsinki. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue was available to construct two tissue microarrays, following conventional protocols. Whole sections were used in the rest of the cases to perform the immunohistochemical, chromogenic in situ hybridization and fluorescent in situ hybridization analysis. All cases were diagnosed according to the WHO classification of Hematolymphoid Neoplasms. Specifically, negativity for pan B cell markers (CD20), HHV-8 and ALK was required in every case to be included. The phenotype of the cases was consistent with a plasma cell differentiation program as described previously. The clinical features of the cases including age, gender, anatomic site of the biopsy, HIV status, previous transplantation or other source for immunosuppression, CRAB features, M component and bone marrow biopsy infiltration were recorded and a summary is available in Supplementary Table 1.

Immunohistochemistry and in situ hybridization.

Immunohistochemical reactions were performed following conventional automated procedures (DAKO, Autostainer and Omnis automated platforms).

Primary antibodies against CD20 (DAKO, RTU), PAX-5 (DAKO, RTU), CD138 (DAKO, RTU), CD38 (Leica, 1:200), IRF4/MUM-1 (DAKO, RTU), Blimp-1 (CNIO, 1:5), Kappa (DAKO, RTU), Lambda (DAKO, RTU), BCL-6 (DAKO, RTU), BCL-2 (DAKO, RTU), CD10 (DAKO, RTU), KI67 (DAKO, RTU), CMYC (Abcam, 1:50), HHV-8 (Novus Biologicals, 1:10), EBV-LMP1 (DAKO, RTU), CD30 (DAKO, RTU), ALK (DAKO, RTU), p53 (DAKO, RTU), Phospho-STAT3 (Tyr705) (Clone EP2147Y, Millipore 1:100), PD-L1 (clone 22C3, DAKO), PD1 (clone NAT105, CNIO 1:5), CD3 (DAKO, RTU), CD4 (DAKO, RTU), CD8 (DAKO, RTU), CD163 (DAKO, RTU) and HLA-DP/DR (clone JS76 CNIO, 1:400) were used.

EBV-EBER was considered positive when $\geq 80\%$ of the large atypical cells were positive. Fluorescent in situ hybridization for the detection of *MYC* rearrangement was done using a dual color break apart rearrangement probe set specific for the *MYC* gene locus on chromosome 8q24 (Abbot Molecular). At least 10% of cells with a break apart signal were required for a case to be regarded as positive for *MYC* rearrangements. At least 15% of cells with extra-copies of the *MYC* gene were required to identify a case as positive for copy number gains of the *MYC* gene.

Quantification of the cellular composition of the tumor and transcription factor abundance.

Quantification of different lymphoid and histiocytic/dendritic subpopulations, identified with CD3, CD8, PD1, CD163, PD-L1 and MHCII/HLA DP/DR and absolute quantification of the number of nuclei showing expression of *MYC* and Phospho-STAT3 (Tyr705) was done according to the following method:

Microphotographs of 3 representative high-power fields (40x magnification) were acquired for each case using a Leica photomicroscope (DM2000LED) with an attached camera (LEICA ICC50 W). Hotspots with higher positivity were chosen. All the above referenced immunohistochemistry markers were quantified visually averaging the number of positive cells quantified in triplicate in tissue sections. For nuclear markers we counted the positive and negative nuclei. For cytoplasmic and membrane bound markers we counted separately the positive cells with circumferential staining and the negative nuclei. For specific markers such as PD-L1, the expression was quantified in both neoplastic cells and microenvironment cells.

Nuclear atypia was used to differentiate the neoplastic cells from others (i.e macrophages). MHCII/HLA DP/DR was quantified in neoplastic cells and the pattern of expression was recorded (membrane or cytoplasmic staining).

Next Generation Sequencing using amplicon-based library generation.

A TruSeq® Custom Amplicon Low Input Library containing exonic regions of 35 selected genes of interest was used to isolate the DNA for sequencing (Illumina). The list of genes was *CARD11, ARID1A, NOTCH1, TCF3, SMARCA4, STAT6, EP300, CREBBP, MLL2, BTK, NOTCH2, TNFRSF14, ATM, FOXO1, B2M, PLCG2, CD79B, TP53, STAT3, BCL2, MEF2B, CD79A, CXCR4, PTPN1, MYD88, FAT2, PRDM1, TNFAIP3, SGK1, CCND3, PIM1, EZH2, BRAF, MYC, NOTHC2*.

Of note, variants occurring in regions outside the coverage of our targeted design, were not explored using this approach.

Depending on the availability of DNA, between 6ng and 400ng of DNA were used for libraries preparation. Two different libraries of FFPE samples (one for each DNA strand) were prepared and required per protocol in order to eliminate false C-T mutations that commonly appear during formalin fixation. After library preparation and quantification by Qubit (ThermoFisher Scientific) libraries from 30 out of 42 samples met the quality control criteria and were pooled for sequencing on a HiSeq instrument (Illumina, paired end, 2x150) at the National Genomic Analysis Center (CNAG, Barcelona, Spain).

Sequencing data interpretation and reporting.

Reads were mapped to human genome build hg19 with decoy sequences (hs37d5) using the GEM toolkit (version 3). The Genome Analysis Tool Kit (GATK) was used for local realignment and base quality score recalibration. Variant calling was done using HaplotypeCaller from GATK following the recommended best practices. Functional annotations were added using SnpEff with the GRCh37.75 database. Variants were annotated with SnpSift using population frequencies, conservation scores and deleteriousness predictions from dbNSFP. Other sources of annotations, such as gnomAD and Clinvar were also used.

Only variants with a coverage ≥ 300 reads were selected for downstream analysis. Both DNA strands were available in all 30 cases. Only variants in which both libraries had a coverage greater or equal to 300 reads and had the same genotype were selected for downstream analysis.

Subsequently only missense, frameshift, and nonsense somatic mutations with variant frequency $> 10\%$ were considered (supplementary Table 2). SNPs were filtered out based on the comparison of the VAF of the variant with the estimation of the amount of neoplastic cells by morphology and IHC, after search in dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) and after comparison with a germline variants database collected from an in house analysis of 89 germline DNA from patients with DLBCL. The COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) database was also checked in every case and the COSMIC Id was annotated. Three algorithms were used to predict the functional consequences of the variants found, including SIFT (<http://sift.bii.aster.edu.sg/>), Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and Condel (<http://bg.upf.edu/fannsdb/>). Selected variants were visualized using the Integrative Genomics Viewer (IGV).

Finally, 34 somatic mutations (31 missense, 3 nonsense) in 14 genes were considered (Table 1 in the main text).

Statistical analysis.

XLSTAT Biomed software (version 19.4) was used for statistical analysis. Descriptive statistics were performed.

Supplementary Table 1.

The clinical features of the cases including age, gender, anatomic site of the biopsy, HIV status, previous transplantation or other source for immunosuppression, CRAB features, M component and bone marrow biopsy infiltration are shown.

case ID	Age	Sex	Anatomic Site	HIV	EBV in tumor cells	Transplant	Other immune deficiency	CRAB	M Component	Bone Marrow Biopsy
2	41	M	Maxillary sinus	pos	pos	no	none	no	---	negative
4	57	M	Maxillary sinus	pos	pos	no	none	no	---	---
5	50	M	Oral cavity	pos	pos	no	none	no	---	---
7	38	M	Rectum	pos	pos	no	none	no	---	negative
8	36	M	Lymph node	pos	pos	no	none	---	---	---
11	33	F	Perineal region	pos	pos	no	none	no	negative	negative
14	56	M	Oral cavity	pos	pos	no	none	bone lesions	negative	negative
17	30	M	Rectum	pos	pos	no	none	no	negative	negative
20	29	M	Lymph node	pos	pos	no	none	---	---	---
21	36	M	Soft tissue	pos	pos	no	none	no	positive	negative
23	44	M	Perineal region	pos	pos	no	none	no	negative	negative
28	53	M	Nasopharyngeal area	pos	pos	no	none	no	---	negative
30	37	F	Ovary	pos	pos	no	none	no	negative	negative
31	50	M	Lymph node	pos	pos	no	none	no	negative	negative
33	37	M	Oral cavity	pos	pos	no	none	no	negative	negative
24	66	M	Lymph node	neg	pos	no	none	no	---	---
25	62	F	GI tract	neg	pos	Renal Transplant	none	no	---	---
1	66	M	Lymph node	neg	neg	alloSCT (for relapsed CLL)	none	no	negative	negative
3	64	M	Lymph node	neg	neg	no	none	no	---	---

9	75	M	Lymph node	neg	neg	no	none	no	negative	negative
10	58	M	GI tract	neg	pos	no	none	no	---	negative
12	92	F	Nasal region	neg	neg	no	none	no	---	---
16	62	M	Maxillary sinus	neg	pos	no	none	no	---	negative
19	79	F	Lymph node	neg	pos	no	none	---	---	---
22	76	M	Skin	neg	neg	no	none	no	---	negative
13	75	M	Nasal region	---	neg	---	---	---	---	---
15	82	M	Oral cavity	---	neg	---	---	no	---	---
18	56	F	Small intestine	---	neg	no	none	no	negative	---
26	43	M	Paranasal region	---	pos	---	---	no	---	---
27	76	M	Paranasal region	---	pos	---	---	no	---	---

Supplementary Table 2.

Complete list of variants identified after quality control and annotation. Only missense, frameshift, and nonsense somatic mutations with variant frequency>10% are depicted. This list includes SNPs that were filtered out in a subsequent step.

POS: Genomic position, REF: reference base, ALT: altered base, QUAL: quality score, DP: number of reads for the allele, AF: Variant Allele Frequency.

Id	Gene	CHR	POS	REF	ALT	QUAL	Annotation	DP	AF	cDNA_pos	CDS_pos	Protein_pos	AA	Codons	Existing_variation
8	ARID1A	1	27100181	CGCA	C	2181,4	disruptive_inframe_deletion	597	0,23	4349-4351	3978-3980	1326-1327	PQ/P	ccGCAG/ccg	COSM298325
8	EP300	22	41546030	C	G	10951	missense_variant	917	0,49	3864	2645	882	P/R	cCa/cGa	COSM4385247
8	PRDM1	6	1,07E+08	G	A	9400,4	missense_variant	2090	0,30	2546	2312	771	G/D	gGc/gAc	rs80257572
8	SMARCA4	19	11135047	G	A	436,44	missense_variant	543	0,16	3295	3014	1005	R/Q	cGa/cAa	-
3	ARID1A	1	27023285	G	A	4731,4	missense_variant	380	0,57	762	391	131	G/R	Ggg/Agg	-
3	ARID1A	1	27106544	G	C	4235,4	missense_variant	1915	0,21	6526	6155	2052	C/S	tGc/tCc	-
3	TNFRSF14	1	2488153	A	G	4635,4	missense_variant	786	0,36	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
3	MYD88	3	38182641	T	C	100	missense_variant	250	0,24		794	265	L/P	cTg/cCg	COSM85940
9	EZH2	7	1,49E+08	C	G	19555	missense_variant	4508	0,28	675	553	185	D/H	Gac/Cac	COSM3762469
9	NOTCH2	1	1,2E+08	G	A	1776,4	stop_gained	1784	0,16	7418	7198	2400	R/*	Cga/Tga	COSM36210
9	TNFRSF14	1	2488153	A	G	21798	missense_variant	2336	0,49	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
9	TP53	17	7579472	G	C	48088	missense_variant	1754	0,99	405	215	72	P/R	cCc/cGc	COSM250061
4	EP300	22	41573745	G	A	2213,4	missense_variant	758	0,24	7249	6030	2010	M/I	atG/atA	-
4	STAT3	17	40475330	C	A	2579,4	missense_variant	1239	0,21	2009	1696	566	D/Y	Gac/Tac	COSM220689
10	CD79A	19	42383208	G	A	1076,4	stop_gained	778	0,17	413	228	76	W/*	tgG/tgA	COSM5493940
10	PRDM1	6	1,07E+08	G	A	6990,4	missense_variant	2130	0,22	1295	1061	354	S/N	aGc/aAc	rs143040512
11	MYC	8	1,29E+08	C	G	21143	missense_variant	1598	0,59	578	68	23	T/S	aCc/aGc	-
11	MYC	8	1,29E+08	T	A	7615,4	missense_variant	796	0,48	775	265	89	Y/N	Tac/Aac	-
11	MYC	8	1,29E+08	T	C	5362,4	missense_variant	890	0,37	899	389	130	F/S	tTc/tCc	COSM4171775
11	MYC	8	1,29E+08	C	G	4032,4	missense_variant	1315	0,25	945	435	145	I/M	atC/atG	-

22	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	7845,4	missense_variant	880	0,47	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
23	EP300	22	41548008	A	G	9499,4	missense_variant	1380	0,39	4208	2989	997	I/V	Att/Gtt	rs20551
12	CARD11	7	2962848	G	A	6196,4	missense_variant	602	0,54	2464	2060	687	A/V	gCg/gTg	rs41493047
12	EP300	22	41548008	A	G	8543,4	missense_variant	658	0,65	4208	2989	997	I/V	Att/Gtt	rs20551
12	TNFRSF14	1	2488153	A	G	44442	missense_variant	1795	1,00	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
13	ATM	11	1,08E+08	G	A	31006	missense_variant	5357	0,35	5942	5557	1853	D/N	Gat/Aat	COSM41596
13	EZH2	7	1,49E+08	C	G	170330	missense_variant	5215	1,00	675	553	185	D/H	Gac/Cac	COSM3762469
13	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	8499,4	missense_variant	2632	0,26	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
13	TNFRSF14	1	2488153	A	G	70550	missense_variant	6973	0,52	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
13	TP53	17	7577120	C	T	98089	missense_variant	7897	0,59	1008	818	273	R/H	cGt/cAt	COSM10660
13	TP53	17	7579472	G	C	91137	missense_variant	3400	1,00	405	215	72	P/R	cCc/cGc	COSM250061
24	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	9698,4	missense_variant	932	0,53	277	57	19	C/W	tgC/tgG	COSM132738
24	TNFRSF14	1	2488153	A	G	55725	missense_variant	2190	0,98	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
14	STAT3	17	40474459	T	A	13963	missense_variant	1179	0,59	2255	1942	648	M/L	Atg/Ttg	-
14	STAT3	17	40474482	T	A	13870	missense_variant	1179	0,59	2232	1919	640	Y/F	tAc/tTc	COSM1155743
26	ATM	11	1,08E+08	G	A	48248	missense_variant	5546	0,47	5942	5557	1853	D/N	Gat/Aat	COSM41596
26	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	3762,4	missense_variant	1080	0,26	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
26	PRDM1	6	1,07E+08	C	G	34258	missense_variant	2422	0,58	843	609	203	D/E	gaC/gaG	rs811925
26	TNFRSF14	1	2488153	A	G	48412	missense_variant	4358	0,55	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
27	EP300	22	41548008	A	G	20536	missense_variant	1638	0,58	4208	2989	997	I/V	Att/Gtt	rs20551
27	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	3165,4	missense_variant	577	0,35	277	57	19	C/W	tgC/tgG	COSM132738
27	PRDM1	6	1,07E+08	C	G	31926	missense_variant	3046	0,53	843	609	203	D/E	gaC/gaG	rs811925
27	TP53	17	7579472	G	C	40713	missense_variant	1503	1,00	405	215	72	P/R	cCc/cGc	COSM250061
15	BRAF	7	1,4E+08	C	G	27862	missense_variant	2185	0,62	1467	1406	469	G/A	gGa/gCa	COSM459
15	EP300	22	41548008	A	G	5628,4	missense_variant	655	0,45	4208	2989	997	I/V	Att/Gtt	rs20551
15	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	3181,4	missense_variant	288	0,54	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
5	ATM	11	1,08E+08	A	C	61148	missense_variant	6156	0,51	4747	4362	1454	K/N	aaA/aaC	COSM22501
5	ATM	11	1,08E+08	G	A	54734	missense_variant	5588	0,51	5942	5557	1853	D/N	Gat/Aat	COSM41596

5	EZH2	7	1,49E+08	C	G	58716	missense_variant	5226	0,48	675	553	185	D/H	Gac/Cac	COSM3762469
5	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	2979,4	missense_variant	689	0,30	277	57	19	C/W	tgC/tgG	COSM132738
5	STAT3	17	40474482	T	A	29044	missense_variant	5011	0,35	2232	1919	640	Y/F	tAc/tTc	COSM1155743
16	ATM	11	1,08E+08	T	C	45184	missense_variant	4755	0,48	2504	2119	707	S/P	Tct/Cct	COSM41595
16	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	18815	missense_variant	1928	0,51	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
16	TP53	17	7579472	G	C	66471	missense_variant	2194	1,00	405	215	72	P/R	cCc/cGc	COSM250061
28	PRDM1	6	1,07E+08	C	G	13852	missense_variant	3293	0,26	843	609	203	D/E	gaC/gaG	rs811925
28	TNFRSF14	1	2488153	A	G	24340	missense_variant	2063	0,60	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
17	ATM	11	1,08E+08	T	A	43593	missense_variant	4493	0,51	763	378	126	D/E	gaT/gaA	COSM22498
17	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	1699,4	missense_variant	844	0,21	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
17	PRDM1	6	1,07E+08	C	G	25161	missense_variant	2936	0,46	843	609	203	D/E	gaC/gaG	rs811925
17	STAT3	17	40475058	C	G	21942	missense_variant	1498	0,69	2165	1852	618	G/R	Ggc/Cgc	COSM1166777
17	TNFAIP3	6	1,38E+08	T	G	158181	missense_variant	5806	0,99	446	380	127	F/C	tTc/tGc	COSM1685340
17	TNFRSF14	1	2488153	A	G	24580	missense_variant	2386	0,51	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
30	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	6521,4	missense_variant	699	0,48	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
18	ATM	11	1,08E+08	A	G	115074	missense_variant	4261	1,00	6333	5948	1983	N/S	aAt/aGt	rs659243
18	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	2996,4	missense_variant	1148	0,23	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
18	SGK1	6	1,34E+08	G	A	30903	missense_variant	5213	0,36	1950	1352	451	S/F	tCc/tTc	-
18	SGK1	6	1,34E+08	G	A	40653	missense_variant	6831	0,36	1737	1139	380	A/V	gCt/gTt	-
18	SGK1	6	1,34E+08	C	T	36890		6373	0,35	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
5_prime_UTR_premature_start_codon_gain_variant															
18	TNFRSF14	1	2488153	A	G	45495	missense_variant	5114	0,47	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
18	TP53	17	7579472	G	C	34947	missense_variant	1764	0,86	405	215	72	P/R	cCc/cGc	COSM250061
7	CD79B	17	62008716	C	T	2934,4	missense_variant	963	0,24	175	100	34	D/N	Gac/Aac	-
7	KMT2D	12	49426460	A	G	25817	missense_variant	1772	0,66	12028	12028	4010	S/P	Tct/Cct	rs80132640
7	KMT2D	12	49448463	C	T	14800	missense_variant	1052	0,57	248	248	83	R/Q	cGg/cAg	rs55865069
7	MYC	8	1,29E+08	A	T	2614,4	missense_variant	794	0,26	1085	575	192	Y/F	tAc/tTc	-
31	ATM	11	1,08E+08	A	G	10575	missense_variant	378	1,00	6333	5948	1983	N/S	aAt/aGt	rs659243

31	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	5897,4	missense_variant	348	0,76	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
31	TNFRSF14	1	2488153	A	G	11911	missense_variant	1217	0,51	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870
2	ATM	11	1,08E+08	C	G	16840	missense_variant	1591	0,55	2021	1636	546	L/V	Ctg/Gtg	rs2227924
2	ATM	11	1,08E+08	C	T	24400	missense_variant	3367	0,41	2999	2614	872	P/S	Cct/Tct	rs3218673
2	NOTCH1	9	1,39E+08	G	A	13195	missense_variant	938	0,38	1278	1202	401	P/L	cCc/cTc	COSM4745915
2	STAT3	17	40474461	T	A	5089,4	missense_variant	1930	0,23	2253	1940	647	N/I	aAc/aTc	COSM1155744
2	TNFAIP3	6	1,38E+08	T	G	9057,4	missense_variant	1327	0,39	446	380	127	F/C	tTc/tGc	COSM1685340
33	EP300	22	41546030	C	G	4277,4	missense_variant	538	0,35	3864	2645	882	P/R	cCa/cGa	COSM4385247
1	ATM	11	1,08E+08	G	A	62638	missense_variant	6032	0,50	5942	5557	1853	D/N	Gat/Aat	COSM41596
1	BRAF	7	1,4E+08	A	T	61284	missense_variant	5236	0,58	1860	1799	600	V/E	gTg/gAg	COSM476
1	EP300	22	41572907	G	A	93605	missense_variant	#####	0,45	6411	5192	1731	R/H	cGc/cAc	-
1	MYC	8	1,29E+08	C	T	32277	missense_variant	4424	0,41	747	237	79	S	agC/agT	-
1	NOTCH2	1	1,21E+08	G	C	5784,4	missense_variant	1536	0,31	277	57	19	C/W	tgC/tgG	rs11810554
1	SGK1	6	1,34E+08	G	T	3083,4	missense_variant	395	0,43	1018	420	140	N/K	aaC/aaA	COSM1581714
1	SGK1	6	1,34E+08	T	A	2868,4	stop_gained	395	0,42	1004	406	136	K/*	Aag/Tag	-
1	SGK1	6	1,34E+08	C	T	2884,4	missense_variant	395	0,42	978	380	127	R/K	aGg/aAg	COSM220583
1	TNFAIP3	6	1,38E+08	T	G	61438	missense_variant	5765	0,48	446	380	127	F/C	tTc/tGc	COSM1685340
1	TNFRSF14	1	2488153	A	G	110496	missense_variant	4029	0,97	349	50	17	K/R	aAa/aGa	rs4870