

Tesis doctoral

**Caracterización histopatológica y molecular de procesos
linfoproliferativos B de tipo Castleman y análisis de la
expresión de STAT3 fosforilado mediante
inmunohistoquímica en linfoma B de célula grande**

Laura Rodríguez Merino

Director

Dr. Santiago Montes Moreno

Tesis adscrita al Programa de Doctorado en Medicina y Ciencias de la Salud de la
Universidad de Cantabria

Trabajo realizado en el **Grupo de Hematopatología Traslacional del Instituto de
Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL)**

Santander, 2025

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría mostrar mi agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Santiago Montes Moreno, por haber confiado en mí desde el principio y haberme ofrecido la oportunidad de iniciarme como investigadora. Igualmente, este trabajo no habría sido posible sin la financiación por parte del Instituto de salud Carlos III (PI19/00041).

Gracias a todos los miembros del grupo de Hematopatología Traslacional del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla, particularmente a Patricia Arribas Gutiérrez y José Bernardo Revert Arce, por su paciencia y su excelente trabajo. A Aitana Avendaño Pomares, con quien he compartido a lo largo de este camino alguna de mis alegrías y frustraciones y quien espero que culmine pronto su trabajo con éxito.

A los miembros de la Unidad del Banco de Tumores y los Técnicos de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla por su apoyo en la recolección de muestras.

A todo el equipo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, personal administrativo y de limpieza, técnicos, médicos residentes y adjuntos, por su ayuda, apoyo y motivación todos estos años.

Por último, aunque no menos importante, a mis padres, Rafael y Lucía, a mi marido, Álex, a mi familia y a mis amigas, en especial a Raquel, a quienes he robado tiempo estos últimos años. Ellos creen en mí siempre, me apoyan, me alientan, me animan a superarme en todos los aspectos de mi vida, sin ellos todo, absolutamente todo, sería mucho más complicado y sin duda más triste.

Acrónimos

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

Ac: anticuerpo.

CDF: célula dendrítica folicular.

CMF: citometría de flujo.

EC: enfermedad de Castleman.

ECM: enfermedad de Castleman multicéntrica.

ECM-HHV8: enfermedad de Castleman asociada al herpesvirus humano 8.

ECMi: enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática.

ECMi-NOS: enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática no específica.

ECMi-TAFRO: enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática con trombopenia, ascitis, fibrosis reticulínica, disfunción renal y organomegalia.

ECM-NCP/POEMS: enfermedad de Castleman asociada a neoplasia de células plasmáticas o síndrome POEMS.

ECU: enfermedad de Castleman unicéntrica.

ECU-HV: enfermedad de Castleman hialino-vascular.

FFIP: fijado en formol e incluido en parafina.

H&E: hematoxilina-eosina.

HHV-8: *human herpesvirus* 8, herpesvirus humano 8.

Ig: inmunoglobulina.

IgH: *immunoglobulin heavy chain*, cadena pesada de la inmunoglobulina.

IHQ: inmunohistoquímica.

LBDCG: linfoma B difuso de célula grande.

MM: mieloma múltiple.

NCP: neoplasia de células plasmáticas.

NGS: *next-generation sequencing*, secuenciación de última generación.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCR: *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

TMA: *tissue Microarrays*, micromatriz de tejido.

VEB: virus Epstein-Barr.

VEGF: *vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelial vascular.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema general de la clasificación de la enfermedad de Castleman.....	21
Figura 2: Esquema simplificado de la vía de señalización intracelular JAK/STAT.....	31
Figura 3: Algoritmo de Hans	35
Figura 4: Procedimiento para la elaboración de micromatrices de tejido.....	50
Figura 5: Detalle de la pantalla de análisis del <i>software</i> QuPath.....	51
Figura 6: Gradación de las características histopatológicas en la EC.....	57
Figura 7: Características histopatológicas de la ECU.....	60
Figura 8: Características histopatológicas de la ECM-HHV8.....	61
Figura 9: Características histopatológicas de la ECM-NCP/POEMS.....	62
Figura 10: Características histopatológicas de la ECMi.....	63
Figura 11: Biopsia ganglionar en ECM-POEMS y patrones de infiltración de plasmáticas.....	65
Figura 12: Estudio de clonalidad linfoide B de los casos con ECM-NCP/POEMS.....	66
Figura 13: Biopsia de médula ósea en la ECM-POEMS.....	67
Figura 14: P-STAT3 en la hiperplasia linfoide reactiva asociada a VEB.....	69
Figura 15: P-STAT3 en la ECMi.....	70
Figura 16: P-STAT3 en la ECM-HHV8.....	71-72
Figura 17: P-STAT3 en el LBDCG.....	75
Figura 18: Niveles de expresión de P-STAT3 según subtipo genético.....	78
Figura 19: P-STAT3 en casos con la mutación MYD88L265P y casos <i>wild-type</i>	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios diagnósticos de consenso para la ECMi.....	25
Tabla 2: Criterios diagnósticos del síndrome POEMS.....	29
Tabla 3: Clasificación de los linfomas B de célula grande.....	33
Tabla 4: Características biológicas del LBDCG.....	40
Tabla 5: Marcadores inmunohistoquímicos utilizados.....	49
Tabla 6: Características epidemiológicas e histológicas de la serie de EC.....	58-59
Tabla 7: Resumen de la serie ECM-NCP/POEMS.....	64
Tabla 8: Estudio inmunohistoquímico y de clonalidad linfoide B de ECM-NCP/POEMS.....	66
Tabla 9: Características de la serie de linfadenitis virales/inmunes.....	69
Tabla 10: Resumen de las características de la serie de linfomas.....	76
Tabla 11: Estudio inmunohistoquímico P-STAT3 por entidades diagnósticas de LBDCG.....	77
Tabla 12: Estudio inmunohistoquímico P-STAT3 según el estado mutacional de MYD88 y el fenotipo célula de origen.....	79

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	Resumen.....	17
2.	Introducción	21
2.1	Enfermedad de Castleman.....	21
2.1.1	Enfermedad de Castleman unicéntrica	22
2.1.2	Enfermedad de Castleman multicéntrica.....	24
2.2	La vía JAK/STAT de señalización celular	30
2.3	Linfoma B difuso de célula grande	32
2.3.1	Linfoma B difuso de célula grande no específico	33
2.3.2	Linfoma B difuso de célula grande asociado a infección viral y/o inmunodeficiencia.....	36
2.4	Clasificación genética del linfoma B difuso de célula grande	38
3.	Hipótesis y objetivos	43
3.1	Hipótesis	43
3.2	Objetivos.....	43
4.	Material y métodos.....	47
4.1	Selección de casos.....	47
4.2	Estudio histológico.....	48
4.3	Pruebas auxiliares	48
4.3.1	Estudio inmunohistoquímico	48
4.3.2	Hibridación in situ	50
4.3.3	Cuantificación de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos	50
4.3.4	Estudio de clonalidad linfoide B	52
4.3.5	PCR-alelo específica.....	52
4.3.6	Caracterización genética mediante secuenciación del exoma completo de la serie de casos de LBDCG	52
4.4	Análisis estadístico.....	53
5.	Resultados	57
5.1	Caracterización histopatológica de la enfermedad de Castleman	57
5.1.1	Características de la enfermedad de Castleman unicéntrica	60
5.1.2	Características de la enfermedad de Castleman multicéntrica HHV8 positiva.....	61
5.1.3	Características de la enfermedad de Castleman multicéntrica relacionada con neoplasia de células plasmáticas o síndrome POEMS	61
5.1.4	Características de la enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática	62
5.1.5	Diagnóstico diferencial con la enfermedad relacionada con IgG4	63
5.2	Identificación de células plasmáticas clonales en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a neoplasia de células plasmáticas y síndrome POEMS.....	64
5.2.1	Biopsias de ganglio linfático.....	64
5.2.2	Biopsias de médula ósea	67
5.3	Caracterización de la expresión de proteínas relacionadas con la activación de JAK/STAT en procesos linfoproliferativos.....	68

5.3.1	Linfadenitis virales/inmunes	68
5.3.2	Linfomas B de célula grande	73
6.	Discusión.....	83
6.1	Caracterización histopatológica de la enfermedad de Castleman	83
6.2	Identificación de células plasmáticas clonales en la enfermedad de Castleman asociada a neoplasia de células plasmáticas y síndrome POEMS.....	85
6.3	Caracterización de la expresión de proteínas relacionadas con la activación de JAK/STAT en linfadenitis virales/inmunes y linfomas B difusos de célula grande	86
7.	Conclusiones	91
8.	Bibliografía	95
9.	Anexo: Publicaciones originales.....	111

RESUMEN

1. Resumen

La enfermedad de Castleman se caracteriza por la presencia de proliferaciones ganglionares linfáticas reactivas ricas en células B. Por su parte, el linfoma B difuso de célula grande comprende un espectro de neoplasias con unas características morfológicas, genéticas y clínicas diferentes. La vía de señalización celular JAK/STAT participa en la regulación de múltiples procesos biológicos, y se ha demostrado implicada en neoplasias linfoides B con diferenciación plasmocelular.

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio morfológico y molecular de la enfermedad de Castleman. Además, nos propusimos investigar si la expresión inmunohistoquímica de STAT3 fosforilado se asociaba con algún tipo específico de enfermedad de Castleman y algún fenotipo y/o subtipo genético de linfoma B difuso de célula grande.

Se gradaron las cinco características propuestas en el consenso internacional de diagnóstico de la enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática. Encontramos que la hiperplasia de centros germinales fue un hallazgo relativamente característico de la enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática y, por lo tanto, puede sugerir su diagnóstico, en contraste con otras entidades con cambios de tipo enfermedad de Castleman. Por otra parte, en los casos con asociación de neoplasia de células plasmáticas o síndrome POEMS se llevó cabo un estudio morfológico, inmunofenotípico y de clonalidad linfoides B. El estudio inmunohistoquímico mostró restricción de cadenas ligeras en dos de los seis casos (33%) y puso de manifiesto dos patrones distintos de infiltración de células plasmáticas, mientras que el estudio de clonalidad mostró un patrón clonal en cinco de los seis casos (83%), aumentando así la sensibilidad para la detección de la población clonal de células plasmáticas.

Adicionalmente, los resultados de nuestra serie mostraron sobreexpresión inmunohistoquímica de STAT3 fosforilado en enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV-8 en comparación con la enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática y otras linfadenitis virales.

Respecto a los 205 casos de linfoma B difuso de célula grande, se clasificaron de acuerdo con las 18 entidades clínico-patológicas reconocidas. El 71% (n=146) de los casos se consideraron linfoma B difuso de célula grande NOS. Se estudió el fenotipo de célula de origen mediante inmunohistoquímica, el 64% (n=112) de los casos fueron *GCB* y el 36% (n=63) *no-GCB*. Se valoró, además, la presencia de mutación en MYD88pL265P, encontrándose en 8 de los 44 casos analizados, todos ellos de fenotipo *no-GCB*. También se categorizaron según el subtipo genético, hallando como más prevalente el subtipo ST2, seguido de EZB, BN2 y MCD. Los casos ST2 y EZB fueron en su mayoría *GCB*, mientras que los BN2 y MCD fueron *no-GCB*.

En relación con la sobreexpresión de STAT3 fosforilado, se vio mayor expresión en los linfomas asociados a infección viral, HHV-8 y virus Epstein-Barr. Aunque se observó mayor sobreexpresión de la proteína en los casos *no-GCB* frente a *GCB* y en aquellos que presentaban la mutación en MYD88, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Todos los subtipos genéticos de linfoma B difuso de célula grande mostraron expresión de STAT3 fosforilado, a excepción de los casos BN2. Este hecho indica que existen distintos mecanismos de activación de la vía JAK/STAT en el linfoma B difuso de célula grande. La valoración de la expresión inmunohistoquímica de STAT3 fosforilado puede servir como marcador subrogado de la activación de la vía JAK/STAT.

Abstract

Castleman disease is characterized by reactive lymph node proliferation rich in B cells. Conversely, diffuse large B-cell lymphoma encompasses a spectrum of neoplasms with distinct morphological, genetic, and clinical features. The JAK/STAT signaling pathway regulates multiple biological processes and has been shown to be involved in B-cell lymphoid neoplasms with plasmacytic differentiation.

In this study, a morphological and molecular analysis of Castleman disease was performed. Additionally, we aimed to investigate whether phosphorylated STAT3 immunohistochemical expression was associated with any specific type of Castleman disease or phenotype and/or genetic subtype of diffuse large B-cell lymphoma.

The five characteristics proposed in the international consensus for diagnosing idiopathic multicentric Castleman disease were graded. We found that germinal center hyperplasia was a relatively characteristic finding of idiopathic multicentric Castleman disease and may suggest its diagnosis, in contrast to other entities with Castleman-like changes. In cases associated with plasma cell neoplasia or POEMS syndrome, a morphological, immunophenotypic, and B-cell clonality study was conducted. Immunohistochemical analysis revealed light chain restriction in two of six cases (33%) and demonstrated two distinct patterns of plasma cell infiltration. Clonality studies showed a clonal pattern in five of six cases (83%), increasing sensitivity for detecting the clonal plasma cell population.

Additionally, our series showed significant phosphorylated STAT3 immunohistochemical overexpression in HHV-8-associated multicentric Castleman disease compared to idiopathic multicentric Castleman and other viral lymphadenitis.

Regarding the 205 cases of diffuse large B-cell lymphoma, they were classified according to the 18 recognized clinicopathological entities. 71% (n=146) of the cases were considered diffuse large B cell Lymphoma NOS. The cell of origin phenotype was analyzed: 64% cases (n=112) were GCB, and 36% (n=63) were non-GCB. The MYD88pL265P mutation was identified in 8 of the 44 analyzed cases, all of which were non-GCB. Cases were also categorized by genetic subtype, with ST2 being the most prevalent, followed by EZB, BN2, and MCD. ST2 and EZB cases were predominantly GCB, while BN2 and MCD were non-GCB.

Concerning phosphorylated STAT3 overexpression, higher expression was observed in viral infection-associated lymphomas (HHV-8 and Epstein-Barr virus). Although greater phosphorylated STAT3 overexpression was seen in non-GCB cases compared to GCB and in cases with the MYD88 mutation, the differences were not statistically significant. All genetic subtypes of DLBCL showed P-STAT3 expression, except for BN2 cases.

This finding indicates that different mechanisms of JAK/STAT pathway activation exist in diffuse large B-cell lymphoma. The immunohistochemical evaluation of phosphorylated STAT3 expression may serve as a surrogate marker of JAK/STAT pathway activation.

INTRODUCCIÓN

2. Introducción

2.1 Enfermedad de Castleman

La Enfermedad de Castleman (EC) fue descrita por primera vez por Benjamin Castleman en 1956, a raíz del estudio de una serie de pacientes con adenopatías mediastínicas que se asemejaban a un tumor tímico en aspectos radiológicos, morfológicos e incluso microscópicos. (Castleman B et al., 1956)

Se definieron dos subtipos histológicos de la enfermedad, el patrón hialinovascular, caracterizado por la presencia de folículos linfoides atrésicos e hialinizados con depleción de linfocitos y proliferación vascular, y el patrón plasmocelular, con existencia de centros germinales hiperplásicos y una proliferación difusa de células plasmáticas. (Flendrig JA & Schillings PHM, 1969; Keller et al., 1972)

Dicha enfermedad no es un trastorno único, sino que se corresponde con varias enfermedades de diferente etiología. En términos generales, se caracteriza por la presencia de proliferaciones ganglionares reactivas ricas en células B con distorsión de la arquitectura normal del ganglio linfático y, en algunos casos, con células atípicas que simulan un linfoma, por lo que debe considerarse en su diagnóstico diferencial. (Ferry, 2024)

La EC se puede clasificar según el número de regiones ganglionares afectadas en unicéntrica (ECU), cuando se limita a un único ganglio linfático o a una sola estación ganglionar, o multicéntrica (ECM), si por el contrario involucra a varias estaciones ganglionares. Además, cada subtipo presenta unas características histológicas y patológicas diferenciadas y abarca una serie de trastornos subyacentes distintos, tal y como se representa en la Figura 1. (Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020)

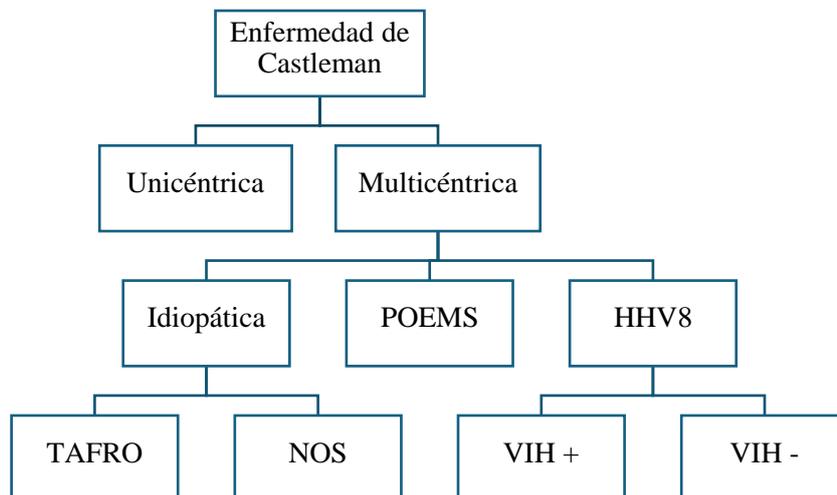


Figura 1. Esquema general de la clasificación de la enfermedad de Castleman.

2.1.1 Enfermedad de Castleman unicéntrica

2.1.1.1 Epidemiología y etiología

La ECU representa el 50-70% de todos los casos de EC. Afecta a individuos de cualquier edad, con una edad media de 33,8-46 años (*Nishimura et al., 2021*) y posee ligera predilección por el sexo femenino. (*Chadburn et al., 2024b*)

A pesar de que su etiología sigue estando en estudio, los datos en la actualidad sugieren que su origen más probable se debe a un proceso clonal de las células dendríticas foliculares. (*Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020*)

En este sentido, un estudio reciente que utiliza secuenciación de última generación del exoma completo de pacientes con EC revela la existencia de mutaciones somáticas del receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas altamente específicas de ECU. Estas mutaciones confieren ventajas en términos de proliferación y supervivencia a células posiblemente estromales CD45 negativas. (*Z. Li et al., 2019*)

2.1.1.2 Características clínicas

Los pacientes con ECU suelen ser asintomáticos por lo que las lesiones se detectan en su mayoría de forma incidental en el contexto de un examen físico por otra causa. Sin embargo, en ocasiones, pueden presentar síntomas relacionados con el tamaño de la adenopatía y, en el caso del subtipo mixto/plasmacítico es más frecuente la aparición de sudoración nocturna, fiebre, anorexia o pérdida de peso; así como alteraciones analíticas véase anemia, elevación de la tasa de sedimentación eritrocítica o de la proteína C reactiva, hipoalbuminemia o hipergammaglobulinemia. (*Chadburn et al., 2024b; van Rhee et al., 2020*)

Las adenopatías alteradas pueden localizarse en numerosas regiones, tradicionalmente se ha considerado como sitio más común el mediastino, sin embargo, un estudio reciente describe la cavidad abdominal como localización más frecuente, en concreto el mesenterio. (*Nishimura et al., 2021*) El tamaño medio de las adenopatías es mayor que en la ECM. (*van Rhee et al., 2020*)

2.1.1.3 Aspecto macroscópico e histopatología

Para el diagnóstico adecuado de ECU es preferible la biopsia escisional (*Nishimura et al., 2021; van Rhee et al., 2020*) Asimismo, es importante realizar estudios de imagen, con el fin de establecer el número de ganglios linfáticos afectados y su localización, y estudios de laboratorio, incluyendo el análisis de marcadores de respuesta inflamatoria, niveles de hemoglobina o de albúmina, entre otros. (*van Rhee et al., 2020*)

La arquitectura del ganglio linfático generalmente está distorsionada con alteración variable de los distintos compartimentos de este. Podemos encontrar dos subtipos histológicos, hialino-vascular (ECU-HV), que corresponde al 70-80% de los casos de ECU, y mixto/plasmacítico. (*Chadburn et al., 2024b*)

Los ganglios linfáticos con ECU-HV tienden a ser grandes y con una superficie de corte firme, blanquecina y nodular, con posible presencia de calcificaciones. Por el contrario, aquellos con ECU mixto/plasmacítico suelen ser más pequeños y de menor consistencia. (*Chadburn et al., 2024b*)

En el subtipo hialino-vascular los folículos linfoides están aumentados en número y en tamaño y sus centros germinales se encuentran empobrecidos en linfocitos y presentan prominencia de células dendríticas foliculares (CDF). (*Chadburn et al., 2024b; Nishimura et al., 2021*)

Además, estas CDF pueden tener signos de atipia y cumplir criterios para el diagnóstico de tumor/sarcoma de CDF; esta variante de ECU se ha denominado hialino-vascular rica en estroma. (*Danon et al., 1993*)

Existen varios hallazgos característicos de la histología hialino-vascular como el llamado *lollipop*, en el cual se aprecian vasos sanguíneos hialinizados o escleróticos penetrando radialmente en los centros germinales, *onion skin*, caracterizado por la expansión de la zona del manto con disposición concéntrica de los linfocitos, y *twinning*, debido a la presencia de dos o más centros germinales rodeados por un único manto. En el espacio interfolicular y en la cápsula podemos encontrar fibrosis, en el primero, además, puede apreciarse hipervascularización. Igualmente, puede observarse obliteración de los sinusoides. (*Chadburn et al., 2024b; van Rhee et al., 2020*)

El estudio inmunohistoquímico muestra unos centros germinales deplecionados con linfocitos B positivos para CD10 y BCL6 y negativos para BCL2. Las zonas del manto expandido se componen de células B positivas para inmunoglobulina D y para BCL2, pudiendo expresar débilmente CD5. Las células dendríticas plasmocitoides son positivas para CD68, CD123 y TCL1. Las células plasmáticas interfoliculares suelen ser polipáticas. Además, pueden estar presentes células TdT positivas, aunque rara vez son numerosas, así como hiperplasia de CDF positivas para CD21 y CD35 o células fusiformes actina de músculo liso positivas. El antígeno nuclear asociado a la latencia (LANA) de KSHV/HHV8 es negativo, así como la hibridación in situ para el ácido ribonucleico (ARN) pequeño codificado por el virus Epstein-Barr (VEB) (EBER). (*Chadburn et al., 2024b*)

El diagnóstico diferencial de la ECU-HV incluye la hiperplasia folicular, linfomas como el linfoma folicular, linfoma del manto o linfoma de la zona marginal, y el tumor/sarcoma de CDF (*Chadburn et al., 2024b; Piris et al., 2018*)

Por su parte, en el subtipo mixto/plasmacítico la arquitectura ganglionar suele preservarse, aunque puede existir hiperplasia de centros germinales y en el espacio interfolicular es característico observar un aumento en el número de células plasmáticas maduras y de vasos sanguíneos. (*Nishimura et al., 2021*)

El diagnóstico diferencial de este subtipo de ECU incluye enfermedades autoinmunes, trastornos infecciosos, linfoma de Hodgkin y plasmocitoma. (*Chadburn et al., 2024b*)

2.1.1.4 Pronóstico y tratamiento

La esperanza de vida de los pacientes con ECU no se altera tras el diagnóstico. No obstante, se ha observado que estos pacientes tienen mayor riesgo de padecer algunas enfermedades tales como pénfigo paraneoplásico, bronquiolitis obliterante, amiloidosis secundaria (AA), neoplasias vasculares o linfomas. (*van Rhee et al., 2020*)

En la decisión terapéutica influyen la localización y reseccabilidad de la adenopatía y la presencia o no de síntomas. La mayoría de los pacientes se benefician de la escisión quirúrgica como único tratamiento curativo con rara recurrencia. En ocasiones, debido al tamaño de la adenopatía y a la característica hipervascularización, puede preferirse realizar una embolización previa a la cirugía para disminuir el sangrado perioperatorio. (*van Rhee et al., 2020*)

Sin embargo, en algunos pacientes, la adenopatía puede ser irreseccable por lo que en ese caso el tratamiento dependerá de la existencia o no de sintomatología. Si el paciente es asintomático y no presenta alteraciones analíticas se recomienda seguimiento clínico con tomografía computarizada (TC), examen físico y de laboratorio cada 12 meses. En caso de que el paciente presente síntomas compresivos puede tratarse con rituximab o esteroides; si los síntomas predominantes son inflamatorios, es preferible el uso de anticuerpos monoclonales anti-IL6. Otras alternativas de tratamiento a valorar son la embolización y la radioterapia. (*van Rhee et al., 2020*)

2.1.2 Enfermedad de Castleman multicéntrica

La enfermedad de Castleman multicéntrica se divide en idiopática (ECMi), asociada al herpesvirus humano 8 (ECM-HHV8) y asociada al síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalía, endocrinopatía, componente M y afecciones cutáneas). Por su parte, la ECMi se puede subclasificar en ECMi-TAFRO (trombopenia, ascitis, fibrosis reticulínica, disfunción renal y organomegalia) o ECMi-NOS (no específica). (*Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020*)

2.1.2.1 Enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática

Epidemiología y etiología

Se estima que entre un tercio y la mitad de todos los casos de ECM son idiopáticos. (*Fajgenbaum et al., 2017a*) La ECMi afecta por igual a ambos sexos y puede ocurrir a cualquier edad y en cualquier etnia, aunque ECMi-TAFRO parece ser más prevalente en Japón. (*Chadburn et al., 2024a*)

Se desconoce la causa subyacente de la enfermedad, sin embargo, los datos apuntan a múltiples etiologías, tales como enfermedades autoinmunes, trastornos paraneoplásicos o infección viral por un virus diferente al HHV-8. (*Fajgenbaum et al., 2017a*)

Igualmente, su patogénesis es compleja y en gran parte desconocida, sin embargo, muchas de las manifestaciones parecen estar relacionadas con la elevación de citoquinas como IL-6 y diversos estudios han demostrado la existencia de anomalías que incluyen un aumento en la activación de células T, un incremento sérico del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y alteraciones en vías como PIK3/AKT/mTOR, MAPK, JAK/STAT y en la señalización por interleucinas. (*Chadburn et al., 2024a*)

Características clínicas

La enfermedad involucra dos o más estaciones ganglionares, encontrándose con mayor frecuencia en el cuello, el mediastino, la axila o el abdomen, aunque también puede afectar al bazo. (*Chadburn et al., 2024a*)

Clínicamente se caracteriza por la presencia de síntomas inflamatorios sistémicos, disfunción orgánica secundaria a hipercitoquinemia y trastorno linfoproliferativo policlonal. (*Fajgenbaum et al., 2017a*)

Por tanto, los principales hallazgos clínicos y de laboratorio son fiebre, sudoración nocturna, adenopatías, ascitis, hepatoesplenomegalia, proteína C reactiva elevada, anemia e hipoalbuminemia. (*Chadburn et al., 2024a; Fajgenbaum et al., 2017*) La trombocitopenia y los edemas son más frecuentes en ECMi-TAFRO, mientras que la trombocitosis y la hipergammablobulinemia policlonal se encuentran más a menudo en ECMi-NOS. Además, en general los pacientes con ECMi-TAFRO tienen más probabilidades de padecer disfunción multiorgánica, siendo la enfermedad más agresiva y, por tanto, con menor esperanza de vida. (*Chadburn et al., 2024a*)

Aspecto macroscópico e histopatología

El diagnóstico de la ECMi se realiza por exclusión una vez que se descartan otros trastornos con características clínicas similares. Este hecho puede suponer un reto tanto para médicos clínicos como para patólogos, debido al gran número de imitadores de la enfermedad, por ello Fajgenbaum et al. proponen una serie de criterios diagnósticos, los cuales se resumen en la Tabla 1.

Criterios diagnósticos de ECMi-NOS	
I. Criterios mayores (ambos obligatorios)	
1. Características histopatológicas compatibles con ECMi (es necesario, como mínimo, un Grado 2 de centros germinales regresivos o plasmocitosis): <ul style="list-style-type: none"> - Centros germinales atróficos/atrésicos/regresivos, habitualmente con zonas del manto expandidas con anillos concéntricos de linfocitos (<i>onion skinning</i>). - Prominencia de células dendríticas foliculares. - Vascularización, endotelios prominentes en el espacio interfolicular o penetrando en los centros germinales (<i>lollipop</i>). - Plasmocitosis polítipica en nidos en el espacio interfolicular. - Hiperplasia de centros germinales. 	
2. Adenopatías (>1 cm en el eje corto) en más de una estación ganglionar.	
II. Criterios menores (al menos 2 de los 11, con mínimo 1 de laboratorio)	
Laboratorio <ol style="list-style-type: none"> 1. Proteína C reactiva elevada 2. Anemia 3. Trombocitopenia 4. Hipoalbuminemia 5. Disfunción renal o proteinuria 6. Hipergamma globulinemia policlonal 	Clínico <ol style="list-style-type: none"> 7. Síndrome constitucional 8. Hepatomegalia o esplenomegalia 9. Edema, anasarca, ascitis o derrame pleural 10. Hemangiomatosis eruptiva en cereza o pápulas violáceas 11. Neumonía intersticial linfocítica
III. Criterios de exclusión	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Enfermedades infecciosas 2. Enfermedades autoinmunes 3. Neoplasias linfoides 	
IV. Respaldan el diagnóstico, pero no son necesarias: <ul style="list-style-type: none"> - Elevación de IL-6, sIL-R2, VEGF, IgA, IgE, LDH y/o B2M. - Fibrosis reticulínica de la médula ósea - Diagnóstico de trastornos asociados con ECMi: pénfigo paraneoplásico, bronquiolitis obliterante, citopenias autoinmunes, polineuropatía (no síndrome POEMS), nefropatía glomerular, tumor miofibroblástico inflamatorio. 	

Tabla 1. Criterios diagnósticos de consenso para la ECMi. Traducción y adaptación de Fajgenbaum et al., 2017.

En el estudio histológico de las biopsias de ganglio linfático con cambios de EC se recomienda evaluar y gradar de 0 a 3 cinco características morfológicas: regresión de centros germinales, prominencia de células dendríticas foliculares, vascularización, hiperplasia de centros germinales y plasmocitosis. Para establecer el diagnóstico de ECMi por definición el tamaño de los ganglios linfáticos debe ser mayor o igual a 1 cm en el eje corto y se requiere un Grado 2 o 3 de regresión de centros germinales o de plasmocitosis. (*Chadburn et al., 2024a; Fajgenbaum et al., 2017*)

En ambos subtipos clínico-patológicos (ECMi-TAFRO y ECMi-NOS), los hallazgos histológicos se mueven en un espectro entre hipervascular y mixto/plasmacítico. Sin embargo, los casos de ECMi-TAFRO tienden a mostrar más folículos atróficos con menos células plasmáticas interfoliculares y más vascularización, mientras que los casos de ECMi-NOS se aproximan más a la histología de plasmocelular. (*Wu et al., 2018*)

En aquellos casos con un deterioro clínico mayor debemos considerar el subtipo de ECMi-TAFRO. Para el diagnóstico de esta entidad es aconsejable seguir los criterios diagnósticos de Iwaki et al. de 2016 o, sobre todo si no es posible realizar una biopsia de ganglio linfático, los de Masaki et al. de 2019. Además, en estos pacientes es recomendable realizar una biopsia de

médula ósea para evaluar la presencia de depósitos de reticulina y de hiperplasia megacariocítica. (Montes-Moreno, et al., 2023)

La médula ósea de los pacientes con ECMi a menudo muestra cambios que se caracterizan por plasmocitosis e hiperplasia de megacariocitos en el subtipo NOS y por hiperplasia megacariocítica, hipercelularidad y aumento de las fibras de reticulina en el subtipo TAFRO. En este último se puede observar también emperipolesis en megacariocitos. (Chadburn et al., 2024a; Wang et al., 2016; Wu et al., 2018)

Además, en los pacientes con sospecha de ECMi-TAFRO se debe hacer despistaje de coagulación intravascular y fibrinólisis. (Lang & van Rhee, 2024)

El estudio inmunohistoquímico en las muestras de ganglio linfático muestra unos centros germinales atróficos sin células B y las células plasmáticas interfoliculares no presentan restricción de cadenas ligeras. Además, las técnicas para la detección de HHV-8 y VEB deben ser negativas. (Chadburn et al., 2024a)

El diagnóstico diferencial de la ECMi es diverso y heterogéneo, atendiendo a las diferencias entre ECMi-NOS y ECMi-TAFRO, sin embargo, de forma general deben tenerse en cuenta la ECM-HHV8, ECM-POEMS, linfadenopatía asociada al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o a enfermedades autoinmunes, enfermedad relacionada con IgG4, linfoma de Hodgkin y linfomas no Hodgkin. (Chadburn et al., 2024a; Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020)

Pronóstico y tratamiento

El pronóstico de la enfermedad es variable. Los datos indican que el 35% de los pacientes mueren a los cinco años del diagnóstico y a los 10 años la cifra se eleva al 60%. Además, no solo implica mortalidad sino también morbilidad, el número de ingresos hospitalarios aumenta y se sugiere que en pacientes con ECMi el riesgo de neoplasias malignas hematolinfoides y sólidas se incrementa. (Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020; Fajgenbaum et al., 2017a; Lang & van Rhee, 2024)

En cuanto al manejo terapéutico de la enfermedad, este va a diferir en función de la gravedad de los síntomas y el subtipo de ECMi (NOS o TAFRO). El tratamiento quirúrgico no está indicado, a diferencia de en la ECU.

De este modo, el régimen terapéutico en ECMi-NOS se basa principalmente en bloqueadores de IL-6 y eliminación citotóxica de las células responsables de la hiperproducción de citoquinas. Así, el tratamiento de primera línea sería con siltuximab (anticuerpo monoclonal anti-IL6) en combinación con dosis variables de esteroides, en función de la gravedad del paciente. En caso de que este tratamiento no esté disponible o el paciente no responda, se valoraría utilizar tocilizumab (anticuerpo contra el receptor de IL-6) o rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20). Nuevos estudios respaldan el uso de inhibidores de mTOR, como sirolimus, o de JAK, como ruxolitinib, sin embargo, sigue siendo necesario explorar terapias dirigidas adicionales. (Carbone et al., 2021; Hoffmann et al., 2022; Lang & van Rhee, 2024; Pierson et al., 2021)

2.1.2.2 Enfermedad de Castleman multicéntrica asociada al herpesvirus humano 8 Epidemiología y etiología

El agente etiológico de la EC asociada a HHV-8, como su nombre indica, es el herpesvirus humano 8, que se transmite por la saliva, generalmente en la infancia, o por vía sexual. El HHV-8 además está implicado en otras condiciones como el sarcoma de Kaposi, que es la complicación más frecuente secundaria al virus en los pacientes trasplantados de órgano sólido, el linfoma

primario de cavidades, el síndrome hemofagocítico y el fallo medular. (*Pellett Madan et al., 2019; Vijgen et al., 2016*)

Un 80% de los pacientes con ECM-HHV8 son VIH positivos, situándose la media de edad de estos pacientes en la cuarta década de la vida y siendo ocho veces más frecuente en hombres que en mujeres. El 20% restante corresponde con pacientes que no son VIH positivos, pero se encuentran en un estado de inmunosupresión adquirida que favorece la infección. La media de edad en este caso es de 65 años y la proporción de hombres y mujeres afectados es de 2,4:1. (*Chadburn, et al., 2024*)

La patogénesis de la enfermedad es compleja y aun no se entiende completamente, aunque la hipercitoquinemia y la proliferación de células B juegan un papel clave en la clínica de estos pacientes. (*Carbone et al., 2021; Wang et al., 2016*)

Características clínicas

Los pacientes presentan adenopatías múltiples y difusas y aunque el diagnóstico histológico suele darse en biopsias de ganglio linfático también pueden verse afectados sitios extraganglionares. (*Wang et al., 2016*)

La variedad de signos y síntomas es amplia, e incluye fiebre, sudoración, fatiga, caquexia, pérdida ponderal, mialgias, hepatoesplenomegalia, edema o derrames, citopenia e hipoalbuminemia. Estos síntomas se correlacionan con elevaciones de la carga viral de HHV-8 y de los niveles de citoquinas, particularmente interleucina-6 humana, IL-10 y vIL-6. (*Wang et al., 2016*)

La mayoría de los sujetos tienen sarcoma de Kaposi asociado y entre un 10% y un 20% un diagnóstico simultáneo o posterior de linfoma, a menudo asociado a HHV-8. (*Chadburn et al., 2024*)

Aspecto macroscópico e histología

Macroscópicamente las linfadenopatías de la ECM-HHV8 son similares a las que podemos encontrar en la ECMi. Histológicamente también poseen características superponibles, exhibiendo en su mayoría patrones plasmocelulares o mixtos, con ganglios linfáticos de arquitectura preservada caracterizados por folículos linfoides atresicos o hialinizados, plasmocitosis politípica interfolicular y grados variables de proliferación vascular interfolicular. (*Wu et al., 2018*)

Adicionalmente y a diferencia de en la ECMi, en la ECM-HHV8 se observan plasmablastos, células de tamaño intermedio o grande con uno o dos nucléolos y citoplasma anfófilo, que se localizan preferentemente en la capa del manto, aunque también se pueden apreciar en el espacio interfolicular o, incluso, intrafolicular. Dichos plasmablastos son positivos mediante estudio inmunohistoquímico para el antígeno nuclear asociado a la latencia (LANA-1), IRF4/MUM1, Blimp1, OCT2 y CD79a. Sin embargo, carecen de expresión para CD138 y presentan una positividad tenue con CD20, PAX5, CD10 y BCL6. Generalmente son negativas para VEB. (*Wang et al., 2016; Wu et al., 2018*)

Aunque mediante estudio inmunohistoquímico los plasmablastos infectados son IgM con restricción de cadena ligera lambda, por estudios moleculares resultan ser policlonales. Esto es debido a la pérdida de inmunoglobulina (Ig) kappa por un proceso de regulación positiva de la recombinación V(D)J hacia Ig lambda, mediada por la proteína RAG. (*Totonchy et al., 2018*)

En cuanto a las agregaciones de células plasmáticas politípicas interfoliculares, estas son negativas para KSHV/HHV-8 y generalmente también para IgM. (*Chadburn et al., 2024*)

Debido a la característica monotipia de los plasmablastos en el estudio inmunohistoquímico de cadenas ligeras, para realizar un buen diagnóstico diferencial es útil, además de una adecuada correlación clínica, realizar un estudio de reordenamientos de genes de la Ig. También, algunos autores recomiendan el despistaje del virus en todos los pacientes con enfermedades linfoproliferativas, especialmente si son inmunodeprimidos y en el contexto de infección por VIH (*Gonzalez-Farre et al., 2017; Wu et al., 2018*)

El principal diagnóstico diferencial es el linfoma B difuso de célula grande, aunque se deben excluir también la ECMi, ECM-POEMS, linfadenopatía asociada al VIH o a trastornos autoinmunes, así como otros linfomas. (*Chadburn et al., 2024; Wu et al., 2018*) Además, ha de tenerse en cuenta otra entidad poco frecuente que al inicio puede parecer una leucemia/linfoma plasmablástico, se trata de la linfocitosis B policlonal IgM lambda. (*Oksenhendler et al., 2013*)

Pronóstico y tratamiento

La sobrevida de los pacientes con ECM-HHV8 ha mejorado notablemente en los últimos años gracias al tratamiento con rituximab, de modo que la supervivencia global a los cinco años ha pasado de un 33% a un 90%. Aunque estos pacientes pueden desarrollar un linfoma, entre ellos un linfoma B difuso de célula grande (LBDCG), se ha visto que la terapia con rituximab se asocia con un menor riesgo de aparición de enfermedades linfoproliferativas. En los pacientes con VIH positivo también juega un papel importante la terapia antirretroviral. (*Chadburn et al., 2024; Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020*)

A pesar de sus ventajas, en un tercio de los pacientes con sarcoma de Kaposi se puede producir un empeoramiento clínico con el uso de rituximab, que puede atenuarse con la combinación de doxorubicina liposomal. En algunos casos de alto riesgo se asocia rituximab con etopósido. (*Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020*)

2.1.2.3 Enfermedad de Castleman multicéntrica asociada al síndrome POEMS

Epidemiología y etiología

El síndrome POEMS es un tipo de síndrome paraneoplásico raro asociado a gammapatía monoclonal. Aunque se desconoce su prevalencia exacta, parece ser más frecuente en el continente asiático. (*Dispenzieri, 2021; Lim M et al., 2024*)

La media de edad de aparición del síndrome se encuentra en la quinta década de la vida y es ligeramente más común en varones que en mujeres (1,5:1). Aproximadamente el 15% de los pacientes con síndrome POEMS presentan histología de EC en la biopsia de ganglio linfático, siendo uno de los criterios diagnósticos de esta entidad (Tabla 2). (*Dispenzieri, 2021; Lim M et al., 2024*)

En cuanto a la etiología y a la patogénesis por ahora no están bien caracterizadas, aunque el factor de crecimiento endotelial vascular parece desempeñar un papel importante. (*Dispenzieri, 2021; Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020; Lim M et al., 2024*) Igualmente, IL-12 parece tener correlación con la actividad de la enfermedad. Más aun, en los pacientes con EC asociada a POEMS se observa un aumento de IL-6 e hipergammaglobulinemia policlonal. (*Dispenzieri, 2021*)

Criterios diagnósticos de síndrome POEMS	
Criterios mayores mandatorios	1. Polineuropatía (desmielinizante) 2. Discrasia monoclonal de células plasmáticas
Otros criterios mayores (se requiere 1)	3. Enfermedad de Castleman 4. Lesiones óseas osteoescleróticas 5. Elevación de VEGF
Criterios menores (se requiere 1)	6. Organomegalia 7. Sobrecarga de líquidos 8. Endocrinopatía 9. Alteraciones cutáneas 10. Papiledema 11. Trombocitosis/policitemia
Otros signos y síntomas	Hipocratismo digital, pérdida de peso, hiperhidrosis, hipertensión o enfermedad pulmonar restrictiva, diátesis trombótica, diarrea, hipovitaminosis B12

Tabla 2. Criterios diagnósticos del síndrome POEMS. Traducida y adaptada de Dispenzieri, 2021.

Características clínicas

Los pacientes con síndrome POEMS presentan una neuropatía sensitivo-motora distal y simétrica y gammapatía monoclonal. Otros hallazgos característicos, aunque no obligatorios para el diagnóstico, son la presencia de organomegalia, que afecta al hígado, bazo y/o ganglios linfáticos, endocrinopatía, papiledema, poliglobulia, trombocitosis, sobrecarga de volumen, anormalidad de las pruebas de función pulmonar, predisposición a la trombosis y cambios en la piel, como hiperpigmentación o hemangiomas. Además, la mayoría de los pacientes presentan lesiones osteoescleróticas, en lugar de las lesiones osteolíticas más características del mieloma múltiple, afectando más frecuentemente a la pelvis, vértebras torácicas y lumbares y las costillas. Como hallazgos de laboratorio, encontramos paraproteinemia IgA o IgG con restricción de cadena ligera lambda y niveles elevados de VEGF que, aunque también están incrementados en la ECMi, en la ECM-POEMS este aumento es más acusado tanto en plasma como en suero y, además, se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. (*Lim et al., 2024*)

En el momento del diagnóstico es fundamental realizar una serología para despistaje de VIH y evaluar la presencia de HHV-8 en las biopsias de ganglio linfático, dado que la serología en este caso no es ni sensible ni específica. Para determinar si existe concurrencia o no de EC con síndrome POEMS, en caso de sospecha clínica, deberán incluirse en el estudio una electroforesis de proteínas en suero y orina, evaluación neurológica, pruebas de función pulmonar, analítica para descartar alteraciones endocrinas, estudio por imagen con TC y tomografía de emisión de positrones (PET), en busca de lesión óseas escleróticas, y biopsia de médula ósea, para valorar la existencia de una población clonal de células plasmáticas e hiperplasia de megacariocitos. (*Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020; Hoffmann et al., 2022*)

Aspecto macroscópico e histología

Alrededor de un 15% de los pacientes con síndrome POEMS presentan características de EC plasmocelular en la biopsia de ganglio linfático, sin embargo, algunos autores estiman que el porcentaje podría ser mayor debido a la falta de toma de muestras ganglionares en estos pacientes. (*Wang et al., 2016*)

Asimismo, dos tercios de los pacientes muestran infiltración de la médula ósea por células plasmáticas clonales, la mayoría lambda (95% de los casos). El tercio restante de los pacientes presentan plasmocitomas solitarios o múltiples sin afectación de la médula ósea. Otros hallazgos sugestivos de POEMS en las muestras de médula ósea son la hiperplasia de megacariocitos y los

agregados linfoides rodeados por células plasmáticas. (Dao et al., 2011; Fajgenbaum et al., 2017a; Wang et al., 2016)

Pronóstico y tratamiento

En aquellos pacientes con lesiones óseas y sintomatología neurológica predominante, está indicado el tratamiento estándar del mieloma múltiple (MM) con altas dosis de quimioterapia y, en menores de 65 años, el trasplante autólogo de células madre. En los casos en los que no se pueda llevar a cabo el trasplante, se puede considerar el tratamiento con otras terapias disponibles para el mieloma múltiple, como el bortezomib, el daratumumab, el melfalán, la dexametasona o la talidomida. La combinación de talidomida con dexametasona ha demostrado mayor efectividad en ECM-POEMS que en POEMS clásico no asociado a EC. (Carbone et al., 2021; Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020; Hoffmann et al., 2022)

En lesiones óseas localizadas sin afectación de la médula ósea, puede estar indicado el uso de radioterapia. Respecto a los pacientes sin lesiones óseas, los estudios son más limitados, pero pueden utilizarse rituximab o siltuximab si los niveles de IL-6 están aumentados. (Carbone et al., 2021; Dispenzieri & Fajgenbaum, 2020; Hoffmann et al., 2022)

2.2 La vía JAK/STAT de señalización celular

La vía de señalización celular JAK/STAT (Figura 2) es un mecanismo altamente conservado y crucial en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos, desde el desarrollo embrionario hasta la respuesta inmune o la homeostasis tisular. Es por ello por lo que la vía JAK/STAT se ha convertido en un área de investigación de gran interés, dada su implicación en multitud de procesos patológicos, que incluyen neoplasias, enfermedades autoinmunes e inflamatorias o trastornos del desarrollo. (Harrison, 2012; Hu et al., 2021)

JAK/STAT se compone por tres proteínas principales: receptor de superficie/membrana celular, JAKs (quinasas) y STATs (factores de transcripción). Su función principal es transferir señales desde los receptores de membrana, los cuales se clasifican en receptores de interleucinas, de interferón o de factor estimulante de colonias, hasta el núcleo celular y así, estimular la hematopoyesis, el desarrollo del sistema inmunológico o la respuesta inflamatoria, entre otros procesos. (Agashe et al., 2022; Harrison, 2012)

La activación de la vía se produce por más de 50 citoquinas y factores de crecimiento, las cuales se clasifican en clase I y clase II dependiendo de su configuración. Los cuatro miembros de la familia JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y tirosin quinasa 2 (TYK2), se encuentran inactivados previa a la unión de las citoquinas/factores de crecimiento. La unión del ligando al receptor de superficie celular provoca la dimerización de este y la activación de las quinasas JAK vinculadas estructuralmente al receptor mediante uniones no covalentes. La activación de JAK conduce a su autofosforilación y a la fosforilación de residuos de tirosina en los receptores, creando sitios de unión para las proteínas STAT. (Agashe et al., 2022; Harrison, 2012; X. Hu et al., 2021) JAK1, JAK2 y TYK2 se expresan comúnmente en todos los tipos celulares, sin embargo, la expresión de JAK3 suele limitarse a las células linfoides. (Luo et al., 2021)

La familia STAT está compuesta por siete miembros, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6, que actúan como factores de transcripción. JAK conduce a la fosforilación de los STAT localizados en los receptores, lo que produce su dimerización y traslocación al núcleo celular. En el núcleo los dímeros de STAT se unen a secuencias específicas de ADN en los promotores de genes regulados por JAK/STAT, activando o reprimiendo la expresión de determinados genes. (Agashe et al., 2022; Harrison, 2012)

La duración y la magnitud de la señalización a través de la vía JAK/STAT están finamente reguladas por una variedad de mecanismos de retroalimentación negativa. Estos incluyen la

acción de proteínas inhibidoras de la señalización de JAK, la degradación de receptores activados, y la acción de proteínas fosfatasa que desfosforilan a las proteínas STAT activadas, entre otros. (Agashe *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2021)

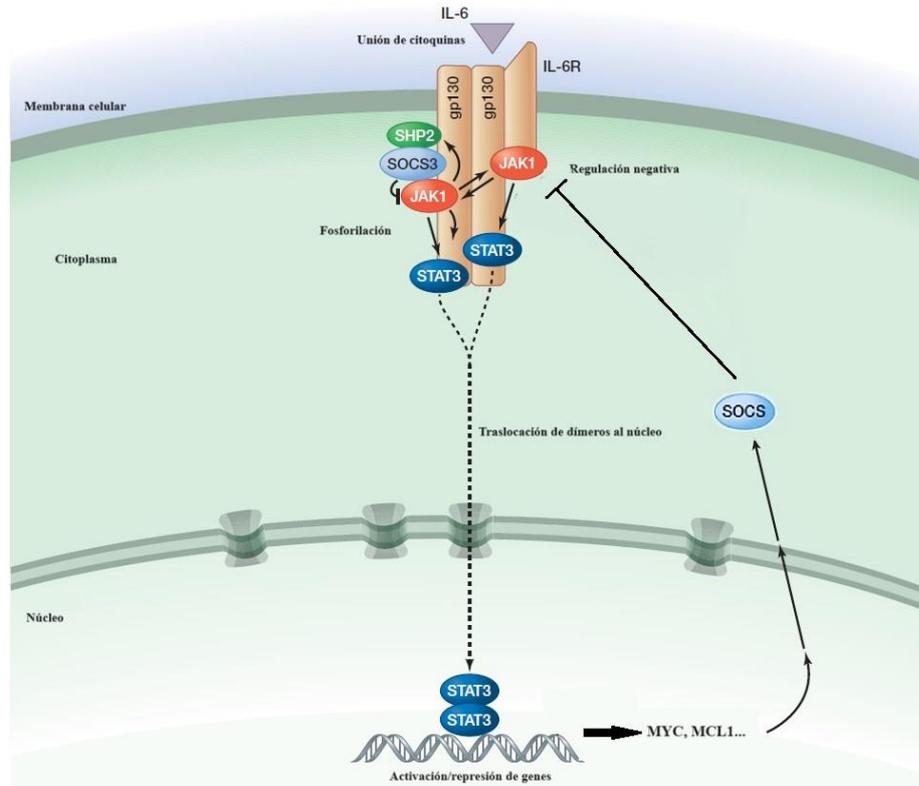


Figura 2. Esquema simplificado de la vía de señalización intracelular JAK/STAT. Figura adaptada de Harrison, 2012.

Como hemos señalado, la vía JAK/STAT desempeña un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune, la diferenciación, proliferación y supervivencia celular y el desarrollo embrionario. Alteraciones en esta vía pueden tener consecuencias graves, en concreto, algunas mutaciones o fusiones activadoras pueden conducir a la desregulación de JAK y asociarse al desarrollo de neoplasias malignas, principalmente hematológicas. (Agashe *et al.*, 2022)

Para conocer más en profundidad esta vía nos centraremos en STAT3, que se activa como bien sabemos por la unión de miembros de la familia de IL-6, pero también de IL-10, IL-21 o IL-27, entre otros. Además, posee dos isoformas (STAT3 α y STAT3 β) con funciones diferentes. STAT3 α dispone de un dominio completo y se activa cuando se fosforilan Y705 o S727. Por su parte, STAT3 β carece en el extremo C-terminal de 55 aminoácidos y tan solo se activa cuando Y705 está fosforilado, poseyendo, comparado con STAT3 α , una mayor especificidad de unión al ADN, pero menor actividad de transcripción. (Hu *et al.*, 2021)

Una activación excesiva de STAT3 promueve la inmunosupresión y la tumorigénesis. Sin embargo, en este último aspecto, STAT3 α parece favorecer la supervivencia de las células

cancerígenas mientras que STAT3 β es considerado un factor supresor de tumores. (X. Hu et al., 2021) Se ha descrito la existencia de una activación aberrante de proteínas STAT en numerosos cánceres, así STAT3 ha sido implicada en la patogénesis del linfoma B difuso de célula grande y en algunos carcinomas. (O'Shea et al., 2015) Investigaciones previas de nuestro grupo han permitido describir la presencia de mutaciones activantes en STAT3 en el linfoma plasmablastico, una variante agresiva de LBDCG. (Garcia-Reyero et al., 2020)

Otros grupos han descrito alteraciones adicionales en diferentes puntos de la vía JAK/STAT, la cual continúa siendo objeto de estudio para la comunidad científica. Así, (Chapman et al., 2021) han descrito la activación de dicha vía molecular en el linfoma B difuso de célula grande convencional VEB positivo asociado a VIH. Otros investigadores han definido alteraciones en el linfoma B difuso de célula grande convencional, debido a la pérdida de función de la proteína tirosina-fosfatasa no receptora 6 (PTPN6) que es causante de una desregulación de JAK3/STAT3, o en linfomas B difusos de alto grado, en los que BCL6 puede actuar como un factor de transcripción que se une directamente a JAK2. Además, se ha visto que la vía de señalización JAK/STAT podría ser impulsada por MALT1, MYD88, HSP90 y SOD a través de mecanismos aún no descritos. (Li et al., 2021)

Asimismo, Patel et al, 2017 han hallado la existencia de una mutación activadora de JAK1 en la enfermedad de Castleman en pacientes con ausencia de niveles elevados de IL6. Este hecho puede explicar la excepcional respuesta de estos pacientes a siltuximab, dado que la mutación en JAK1 puede inducir un cambio de conformación con un efecto de activación funcional que conduce a una mayor sensibilidad al ligando de IL-6.

Cuando fallan los mecanismos de regulación negativa de la vía JAK/STAT, esta puede ser inhibida mediante fármacos que actúan en los tres niveles de la vía, anticuerpos anti-citoquina o anti-receptor, inhibidores de JAK e inhibidores de STAT. El uso de estos fármacos tiene aplicación terapéutica en varios cánceres y enfermedades autoinmunes. Muchos de estos fármacos se encuentran en estudios preclínicos o clínicos para el tratamiento de, entre otras patologías, linfomas de células B. Otros fármacos de este grupo, como los anticuerpos bloqueadores de la interleucina-6 tienen indicación clínica en la enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática. (Hu et al., 2021)

2.3 Linfoma B difuso de célula grande

El linfoma B difuso de célula grande es la forma más común de linfoma no Hodgkin en nuestro medio y supone el 80% de los linfomas agresivos. Su incidencia en Europa se estima en 3,13/100.000/año (Sant et al., 2010), afectando con mayor frecuencia al sexo masculino en la séptima década de la vida. Algunos factores de riesgo para su desarrollo son los antecedentes familiares de LBDCG, enfermedades autoinmunes o infección por virus, como por ejemplo el VIH. (Tilly et al., 2015)

Dicha neoplasia comprende un espectro de entidades con características morfológicas, genéticas y clínicas diferentes.

En la Tabla 3 se recogen las 18 entidades clínico-patológicas específicas de LBDCG, recogidas en la 5ª edición del libro azul de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de neoplasias hematolinfoides. (Ott G et al., 2024)

Neoplasias de células B maduras: Linfomas B de célula grande
Linfoma B difuso de célula grande, NOS
Linfoma B rico en células T e histiocitos
Linfoma B de célula grande/Linfoma B de alto grado con reordenamientos en c-MYC y BCL2
Linfoma B de célula grande ALK positivo
Linfoma B de célula grande con reordenamiento IRF4
Linfoma B de célula grande con alteración en 11q
Granulomatosis linfomatoide
Linfoma B de célula grande VEB* positivo
Linfoma B de célula grande asociado con inflamación crónica
Linfoma B de célula grande asociado a fibrina
Linfoma B de célula grande asociado a sobrecarga de líquidos
Linfoma plasmablastico
Linfoma B difuso de célula grande de órganos inmunológicamente privilegiados
Linfoma B difuso de célula grande cutáneo primario, tipo pierna
Linfoma B de célula grande intravascular
Linfoma B de célula grande primario mediastínico
Linfoma mediastínico de la zona gris
Linfoma B de células de alto grado, NOS

Tabla 3. Clasificación de los linfomas B de célula grande según el libro azul de la OMS (WHO, *blue books*) de clasificación de Tumores Hematolinfoides (5ª edición).

*VEB: virus Epstein-Barr.

2.3.1 Linfoma B difuso de célula grande no específico

2.3.1.1 Epidemiología y etiología

El LBDCG-NOS es la entidad, dentro de la familia de linfomas B difusos de célula grande, que engloba el mayor número de casos. Supone un diagnóstico de exclusión, de modo que solo los casos que no cumplen los criterios diagnósticos para el resto de las entidades del grupo serán clasificados como NOS. (Kurz et al., 2023)

La edad media de presentación se sitúa alrededor de la sexta década de la vida, siendo un 30% de los pacientes diagnosticados mayores de 75 años. (Sehn & Salles, 2021)

La etiología es multifactorial y en gran parte desconocida en la mayoría de los casos, aunque se han identificado algunos factores de riesgo genéticos, clínicos e inmunes, así como ambientales. Generalmente la enfermedad aparece de novo, si bien puede presentarse como una transformación de un linfoma de células B de bajo grado previo. (Kurz et al., 2023; Sehn & Salles, 2021)

2.3.1.2 Características clínicas

La mayoría de los pacientes presentan enfermedad ganglionar, unifocal o multifocal, no obstante, entre el 30-40% tienen compromiso extraganglionar y entre un 15-20% de los pacientes presentan infiltración de la médula ósea. Los sitios extraganglionares más frecuentes son el tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, huesos, hígado, riñón y glándula suprarrenal. Puede existir extensión de la enfermedad al sistema nervioso central. (Kurz et al., 2023; Rosenwald et al., 2024)

Los síntomas pueden estar relacionados con la localización de la adenopatía, sin embargo, muchos pacientes pueden ser asintomáticos. Otras manifestaciones incluyen la pérdida de peso, sudoración nocturna o fiebre, los denominados síntomas B. (Rosenwald et al., 2024)

2.3.1.3 Aspecto macroscópico e histología

En el diagnóstico de cualquiera de las entidades clasificadas como LBDCG y con el fin de poder realizar una evaluación completa del caso, es preferible la biopsia escisional de ganglio linfático frente a la biopsia por aguja fina. Esto es así puesto que además del análisis morfológico se requieren otros estudios complementarios de inmunohistoquímica, citometría de flujo (CMF), hibridación fluorescente in situ (*FISH*, por sus siglas en inglés) y técnicas moleculares. (*Sehn & Salles, 2021*)

Macroscópicamente los ganglios linfáticos se encuentran agrandados con obliteración del hilio y una superficie de corte blanquecina con posibles áreas más grisáceas correspondientes a necrosis. (*Rosenwald et al., 2024*)

El LBDCG-NOS morfológicamente consta de una proliferación de linfocitos B de tamaño grande a mediano, es decir, el núcleo de una célula neoplásica es al menos dos veces el de un linfocito normal o mayor que el núcleo de un macrófago, con un patrón de crecimiento difuso. Se puede observar infiltración interfolicular, intrasinusoidal o del tejido periganglionar. Las muestras contienen numerosas mitosis e incluso apoptosis. Igualmente pueden apreciarse macrófagos de cuerpo tingible. (*Kurz et al., 2023*)

Asimismo, citológicamente se describen distintos subtipos morfológicos. Principalmente se distinguen tres subtipos que son el centroblástico, el inmunoblástico y el anaplásico, si bien es cierto que se han descrito otros subtipos menos frecuentes que se engloban bajo el nombre de subtipos raros. (*Cunningham & Harrington, 2019; Rosenwald A et al., 2024*) Dichos subtipos morfológicos se definen en detalle a continuación:

- Centroblástico: representa aproximadamente el 80% de los casos. Los casos monomórficos están compuestos predominantemente por centroblastos, que son linfocitos grandes con cantidades variables de citoplasma y núcleos redondos u ovalados con cromatina fina vesicular y varios nucleolos. Por su parte, los polimórficos consisten en una mezcla de centroblastos, centrocitos e inmunoblastos. La diferenciación plasmacítica se observa en raras ocasiones.
- Inmunoblástico: representa alrededor del 8% de los casos y se define por la presencia de más de un 90% de inmunoblastos. Estas células se caracterizan por ser linfocitos grandes con citoplasma basófilo de moderado a abundante y un único nucleolo central. En algunos casos se puede observar diferenciación plasmacítica. Esta variante posee un pronóstico más desfavorable y se caracteriza por la aparición de traslocaciones IGH/c-MYC.
- Anaplásico: es el subtipo menos frecuente con tan solo un 3% de frecuencia. Las células, denominadas anaplásicas, son grandes con núcleos pleomórficos, citoplasma abundante y crecimiento cohesivo en láminas con afectación sinusoidal frecuente. A menudo expresan CD30 y poseen mutaciones en TP53.
- Subtipos morfológicos raros: suponen menos del 1% de los casos y se caracterizan por la presencia de células en anillo de sello o células fusiformes.

El estudio estándar de un LBDCG debe incluir inmunohistoquímica frente a CD20 y CD5, análisis de célula de origen, que veremos más adelante, estudio citogenético de c-MYC, y si es positivo de BCL-2 y BCL-6, e hibridación in situ para la detección de virus Epstein-Barr. (*Cunningham & Harrington, 2019*)

En el LBDCG-NOS las células tumorales expresan CD45 (ALC) y marcadores de células B, como CD19, CD20, CD79a y PAX5. La mayor parte de los casos expresan BCL2 y c-MYC de forma variable. La sobreexpresión inmunohistoquímica conjunta de c-MYC y BCL2 se produce en el 30% de los casos. (*S. Hu et al., 2013*) Por su parte c-MYC se sobreexpresa en el 45% de los

casos, mientras que BCL2 aparece sobreexpresado en el 65%. Otro marcador inmunohistoquímico que nos indica la necesidad de buscar activamente reordenamientos en c-MYC y BCL2 es TdT, que generalmente es negativo pero en caso de ser positivo puede asociarse con mutaciones en los genes anteriormente citados. (Sehn & Salles, 2021)

Otras tinciones positivas posibles son ciclina D1, aun en ausencia de translocación CCND1, CD30 y p53. Es preciso señalar que esta última no constituye un buen marcador para las mutaciones de TP53. Por otro lado, las células neoplásicas son generalmente negativas para SOX10 y CD138. (Rosenwald A et al., 2024)

Tal y como señalamos anteriormente en el examen inicial del LBDCG se ha de incluir un análisis de la célula de origen. Los estudios del perfil genético en el LBDCG-NOS han permitido definir dos subtipos moleculares, células B derivadas del centro germinal (GCB, por sus siglas en inglés) y células B activadas (ABC, por sus siglas en inglés), sin embargo, entre el 10-15% de los casos son inclasificables. (Sehn & Salles, 2021)

Aunque el estándar de oro para la subtipificación del LBDCG-NOS según el fenotipo de la célula de origen es el estudio del perfil genético, este método no suele estar disponible en la práctica clínica por lo que ha sido necesario crear algoritmos utilizando marcadores inmunohistoquímicos. En este sentido, el algoritmo de Hans (Figura 3) utiliza como marcadores CD10, BCL6 e IRF4/MUM1 para distinguir el subtipo GCB del subtipo no-centro germinal (no-GCB, por sus siglas en inglés), comprendiendo este último la mayor parte de los casos ABC e inclasificables. Sin embargo, la concordancia de los resultados de dicho algoritmo con la expresión genética oscila entre el 72% y el 86%. (Cunningham & Harrington, 2019; Rosenwald A et al., 2024)

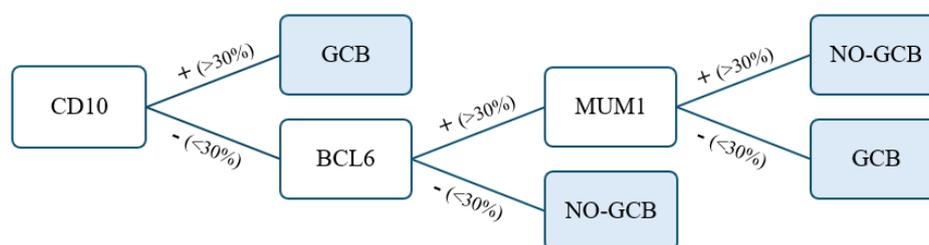


Figura 3. Algoritmo de Hans para la clasificación fenotípica del LBDCG según marcadores inmunohistoquímicos.

El diagnóstico diferencial del LBDCG-NOS incluye una gran variedad de neoplasias malignas de patrón difuso con células medianas a grandes, desde otras neoplasias hematológicas B o T, sarcoma histiocítico y sarcoma mieloides, hasta algunas neoplasias no hematológicas como el carcinoma metastásico pobremente diferenciado, el melanoma metastásico o el seminoma. En pacientes jóvenes con enfermedad localizada en cabeza y cuello y expresión inmunohistoquímica fuerte y uniforme de IRF4/MUM1 debe evaluarse la presencia de reordenamiento de IRF4, pues sugiere un linfoma de células B grandes con reordenamiento de IRF4. La expresión de VEB, por FISH o estudio inmunohistoquímico, debe llevarnos al diagnóstico de LBDCG-VEB positivo. (Rosenwald A et al., 2024)

2.3.1.4 Pronóstico y tratamiento

El pronóstico de los pacientes con este tipo de linfoma varía considerablemente y depende de varios factores, que incluyen la etapa en la que se encuentre el cáncer en el momento del diagnóstico, la edad del paciente, la existencia de síntomas sistémicos, como fiebre, pérdida de peso y sudores nocturnos, la presencia de reordenamientos en c-MYC y/o BCL2 y la respuesta inicial al tratamiento. *(Rosenwald A et al., 2024)*

El estadio de la enfermedad y la respuesta al tratamiento se valoran teniendo en cuenta los criterios de clasificación de Lugano y la clasificación de Ann Arbor. Por su parte, el índice pronóstico internacional (IPI) se utiliza como herramienta para estratificar a los pacientes y predecir los resultados en ensayos clínicos. *(Sehn & Salles, 2021)*

La clasificación por fenotipo de célula de origen, comentada en el apartado anterior, permite distinguir diferentes entidades biológicas con cursos pronósticos distintos. En general, los pacientes con un LBDCG-NOS *GCB* poseen un mejor pronóstico con una respuesta mayor al régimen de tratamiento estándar. Por su parte, los pacientes clasificados como no-*GCB* poseen una menor supervivencia. *(Cunningham & Harrington, 2019)*

El régimen de tratamiento estándar de los pacientes con LBDCG se basa en ocho ciclos de quimioterapia con R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Anteriormente no se utilizaba la combinación con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab), sin embargo, su uso dio como resultado un considerable aumento en la esperanza de vida de los pacientes. *(Sehn & Salles, 2021)*

Han sido propuestas otras terapias, aunque solo una de ellas basada en R-ACVBP (rituximab, doxorubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina y prednisona) demostró superioridad frente a la terapia estándar. Sin embargo, la aparición de toxicidad ha restringido su uso en la clínica. El uso de radioterapia o trasplante de células madre tampoco ha reportado beneficios claros. *(Sehn & Salles, 2021)*

Entre el 20% y el 25% de los pacientes no son subsidiarios de terapia intensiva R-CHOP debido a la presencia de comorbilidades. En estos pacientes se indican ciclos cortos de R-CHOP y, con el fin de reducir los efectos adversos, se asocian glucocorticoides al tratamiento. *(Sehn & Salles, 2021)*

Evaluar la utilización de nuevas terapias en los pacientes con LBDCG es una prioridad. Aunque en los últimos tiempos se han descrito diferentes subtipos genéticos (Apartado 2.4), aun es preciso realizar más estudios, puesto que no existe consenso sobre la implicación de estos subtipos en la decisión terapéutica. Además, la heterogeneidad biológica del LBDCG nos hace suponer que las terapias dirigidas podrían beneficiar únicamente a algunos de los subgrupos y, por tanto, es preciso explorar la existencia de marcadores biológicos.

2.3.2 Linfoma B difuso de célula grande asociado a infección viral y/o inmunodeficiencia

La implicación de la vía JAK/STAT se ha demostrado en varios tipos de linfomas, principalmente en aquellos relacionados con infecciones virales (VEB y HHV-8) y/o estados de inmunodeficiencia adquirida por VIH o iatrogénica. La comprensión de la implicación de esta vía en estos contextos ha llevado al desarrollo de inhibidores específicos de JAK/STAT como potenciales terapias. Estos inhibidores pueden ayudar a interrumpir las señales de proliferación y supervivencia en las células malignas, ofreciendo nuevas opciones de tratamiento para los LBDCG asociados a etiologías virales y a inmunodeficiencia.

2.3.2.1 Linfoma B difuso de célula grande VEB positivo

El LBDCG VEB positivo es un linfoma de células B grandes en el que la mayoría de las células neoplásicas albergan infección por dicho virus, lo cual puede demostrarse mediante estudio inmunohistoquímico o hibridación in situ.

Es más frecuente en varones y presenta un pico de incidencia en la séptima u octava década de la vida. Los pacientes afectados no poseen antecedentes de linfoma ni deficiencia o disregulación inmunitaria subyacente, sin embargo, la existencia de una mayor prevalencia de esta entidad en pacientes ancianos condujo al concepto de inmunosenescencia. (*Anagnostopoulos et al., 2024*)

Histológicamente puede subdividirse en tipo polimórfico y tipo monomórfico. El tipo polimórfico se caracteriza por la presencia de inmunoblastos dispersos en un fondo reactivo con linfocitos pequeños, células plasmáticas e histiocitos. Por su parte, los casos monomórficos, menos comunes, muestran láminas de células linfoides grandes y atípicas indistinguibles del LBDCG VEB negativo sin el uso de pruebas auxiliares. (*Anagnostopoulos I et al., 2024; Montes-Moreno et al., 2012*)

En estos linfomas la activación de la vía JAK/STAT es común. El VEB puede inducir la activación de esta vía a través de la expresión de proteínas virales, como LMP1 (*Latent Membrane Protein 1*), que mimetizan las señales de receptores de citoquinas y activan JAK3/STAT3. Esta activación promueve la proliferación y supervivencia de las células B infectadas. (*Luo et al., 2021*)

Además, existe evidencia de la presencia de mutaciones en la vía JAK/STAT en LBDCG VEB positivo. Un estudio reciente de nuestro grupo describió un perfil de mutaciones distintas en linfoma plasmablástico VEB positivo y negativo. Así, el 16% de los casos de linfoma plasmablástico VEB positivo presentaron mutaciones somáticas recurrentes en el oncogén STAT3, que afectaban preferentemente al dominio SH2 de la proteína y conducían a la sobreexpresión de STAT3 fosforilado. (*Garcia-Reyero et al., 2020*) Otros autores han descrito alteraciones genéticas altamente recurrentes en las vías de apoptosis, NFκB, WNT, IL6/JAK/STAT, MYC y RHOA en LBDCG VEB positivo en comparación con LBDCG VEB negativo. (*Gebauer et al., 2021; Zhou et al., 2019*)

2.3.2.2 Linfoma B difuso de célula grande HHV8 positivo

Por su parte, el LBDCG asociado al HHV-8 es un linfoma extremadamente agresivo que generalmente se presenta en pacientes con una inmunodeficiencia profunda, si bien puede presentarse en pacientes inmunocompetentes. La mayoría de las personas afectas son hombres de entre 30 y 40 años, VIH positivos. (*Vega F et al., 2024*)

Morfológicamente se caracteriza por la presencia de láminas coalescentes de células linfoides de tamaño intermedio a grande que borran la arquitectura ganglionar y poseen núcleos vesiculares con uno o dos nucléolos y citoplasma anfófilo. Dichas células son monoclonales, expresan IgM citoplasmática y poseen restricción de cadenas ligeras lambda, además se puede demostrar la infección por HHV-8 mediante estudios complementarios. Aunque de forma rara, algunos casos poseen coinfección de VEB. (*Vega F et al., 2024*)

La activación de STAT3 en estos linfomas, principalmente debido a la expresión de proteínas como v-IL6, contribuye a la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis. Además, la señalización JAK/STAT en el contexto de HHV-8 puede inducir la expresión de genes antiapoptóticos, favoreciendo la supervivencia de las células malignas. (*Cheng et al., 1997; Wang et al., 2016*)

2.3.2.3 Linfomas asociados con inmunodeficiencia y desregulación inmunitaria

Los trastornos linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencia y desregulación inmunitaria forman un conjunto heterogéneo, tanto desde el punto de vista clínico como etiológico. Pueden presentarse en cualquier contexto de inmunodeficiencia o desregulación inmunitaria y abarcan un espectro de morfologías que incluyen el linfoma de células B pequeñas, linfoma B difuso de célula grande, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin clásico y linfomas de células T y NK, así como varias entidades específicas. Con frecuencia se asocian con el VEB, HHV-8 y VIH, y también surgen de otros contextos como inmunodeficiencias primarias estado postrasplante y otras inmunodeficiencias iatrogénicas. (Naresh et al., 2024)

El linfoma plasmablastico, entidad que se engloba dentro del LBDCG, es una neoplasia linfoide agresiva compuesta por células grandes B atípicas con morfología plasmablastica o inmunoblastica. Aunque se desconoce su etiología, generalmente se produce en un contexto de deficiencia o desregulación inmunitaria y se asocia con el VEB. Se presenta con mayor frecuencia en pacientes masculinos y en edad adulta, usualmente en localizaciones extraganglionares. (Montes-Moreno S et al., 2024)

La infección por VEB y el microambiente tumoral enriquecido en citoquinas y factores de crecimiento puede llevar a la activación de JAK/STAT. Por su parte, el VIH, igualmente asociado con el linfoma plasmablastico, puede alterar la vía JAK/STAT modificando la producción o la acción de citoquinas para evadir el sistema inmune y facilitar su replicación. Concurrente con la infección por VEB, se encuentran traslocaciones de MYC, usualmente con IgH, en cerca del 60% de los casos de linfoma plasmablastico, asociadas con mutaciones en PRDM1/Blimp1 y mutaciones en el dominio STAT3 SH2, que se relacionan con la activación constitutiva de STAT3 fosforilado. (Montes-Moreno et al, 2017, Garcia-Reyero et al., 2020)

2.4 Clasificación genética del linfoma B difuso de célula grande

El aumento de la potencia y la reducción de los costes han dado lugar a una enorme variedad de aplicaciones de la tecnología de secuenciación de última generación (NGS, por sus siglas en inglés). La NGS se basa en la lectura en paralelo de millones de secuencias de nucleótidos del genoma y se puede utilizar para secuenciar genomas enteros o limitarlos a áreas específicas de interés o un pequeño número de genes individuales. Esta técnica ha demostrado su coste-efectividad en el diagnóstico de distintas entidades neoplásicas. (Behjati & Tarpey, 2013)

Podemos distinguir tres estrategias diferentes de diagnóstico molecular empleando secuenciación masiva:

- Secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés), que incluye regiones exónicas, intrónicas y reguladoras.
- Secuenciación del exoma completo (WES, por sus siglas en inglés), que cubre las regiones codificantes o exones de todos los genes.
- Secuenciación dirigida del exoma, en la que tan solo se secuencian una serie de genes que han demostrado ser relevantes en la patogénesis de una determinada enfermedad.

En los últimos años, los avances en secuenciación genómica han proporcionado una comprensión más profunda de la biología subyacente del LBDCG. Así, el análisis genómico, que incluye el estudio de mutaciones genéticas y ganancias o pérdidas del número de copias, ha revelado una serie de alteraciones genéticas recurrentes que contribuyen a la patogénesis de esta enfermedad, incluyendo aberraciones en genes que regulan la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación celular y la señalización del receptor de células B.

Estas aberraciones genéticas, que producen subtipos únicos y genéticamente definidos más allá del fenotipo de la célula de origen (Tabla 4), han dado lugar a propuestas de nuevas taxonomías del LBDCG. Además, pueden tener implicaciones pronósticas y terapéuticas, ya que algunos subtipos de LBDCG pueden responder de manera diferente a determinadas terapias dirigidas. Por lo tanto, comprender el perfil genético del LBDCG es fundamental para el desarrollo de estrategias de tratamiento más efectivas y personalizadas para los pacientes con esta enfermedad.

Gracias a estas herramientas en el LBDCG se han descrito seis subtipos genéticos, a saber, MCD, BN2, EZB, ST2, A53 y N1. Igualmente, se han definido asociaciones entre los subtipos moleculares o fenotipo de la célula de origen y estas nuevas entidades genómicas. Así, se ha visto que existe una asociación robusta entre el grupo *GCB* y el subtipo EZB, así como entre *ABC* y N1 y MCD. (Sehn & Salles, 2021; Wright et al., 2020)

Los tumores MCD se caracterizan por mutaciones en MYD88pL265P y CD79B, que activan cooperativamente el factor nuclear κ B ($N\kappa$ - κ B). Igualmente suelen eliminar el locus supresor de tumores CDKN2A, que codifica inhibidores del ciclo celular p16INK4A y p15INK4B, así como p19ARF, que estabiliza p53. BCL2 se regula mediante la ganancia o amplificación del número de copias permitiendo la viabilidad celular. Además, estos tumores poseen mecanismos de evasión del sistema inmunitario. (Wright et al., 2020) Se ha informado de que la presencia de VEB es excluyente con las mutaciones en MYD88 y CD79B, es decir que es poco probable que estas características coincidan en un mismo caso. (Vermaat et al., 2020)

Por su parte, BN2 destaca por poseer mutaciones activadoras de NOTCH2 o que inactivan el antagonista de NOTCH, SPEN. La mayoría de los casos BN2 poseen una translocación de BCL6. Los mecanismos que ayudan a la supervivencia de estos tumores implican a la vía NF- κ B, deleciones de CD70, disminuyendo su interacción con componentes del sistema inmunitario, y mutaciones de CCND3. (Wright et al., 2020)

El atributo definitorio del subtipo genético EZB es la desregulación epigenética, fruto de la inactivación de varios reguladores epigenéticos, entre ellos CREBBP, y de la mutación de EZH2. En este subtipo se ven alterados genes con implicaciones en las interacciones entre las células tumorales y las células del sistema inmune (EZH2, CIITA, HLA-DMB), el metabolismo y la proliferación celular (REL) o la migración y señalización (S1PR2/GNA13). Los LBDCG *doble hit* (c-MYC y BCL2) se encuentran en su mayoría dentro de este subtipo. (Wright et al., 2020)

En cuanto al subtipo ST2, este toma su nombre de las mutaciones recurrentes en SGK1 y TET2. Otras alteraciones comprenden a la vía de señalización intracelular JAK/STAT, mediante inactivación de SOCS1 y DUSP2 y activación de STAT3, así como la vía NF- κ B, por inactivación de I κ B α . (Wright et al., 2020)

A su vez, A53 adquiere mutaciones y deleciones de TP53 y TP53BP1, un sensor de daño del ADN que previene aneuploidía. Además, se han descrito otras anomalías cromosómicas tales como deleción de 6q, ganancia/amplificación de 3q, amplificación de NFKBIZ, CNPY3 y BCL2, deleciones en p73 e ING1 y deleción o inactivación de la β 2-microglobulina. Estas alteraciones se dirigen a supresores de tumores o proporcionan un mecanismo de evasión del sistema inmunitario. (Wright et al., 2020)

Por último, N1 posee mutaciones de ganancia de función en NOTCH1, similares a las de la leucemia linfocítica crónica. También se caracteriza por la presencia de mutaciones dirigidas a los reguladores de diferenciación de células linfoides B (ID3, BCOR) y I κ B quinasa β (IKBKB), incluida la isoforma V203I que activa constitutivamente la vía NF- κ B. (Wright et al., 2020)

Célula de origen	GCB Alteraciones genéticas: t(14,18), BCL2, PTEN, miR-17-92, GNA13, EZH2, KMT2D, CREBBP, EP300...		Inclasificable	-	ABC Alteraciones genéticas: CARD11, CD79A/B, TNFAIP3 (activación constitutiva de NF-κB), PRDM1, BCL2, CDKN2A, MYD88...	
LymphGen	EZB	ST2	BN2	A53	N1	MCD
Marcadores genéticos	BCL2, EZH2, TNFSR14, CREBBP, KMT2D, c-MYC (casos DH/TH)	TET2, SGK1, DUSP2, ZFP36L1, ACTG1, ACTB, ITPKB, NFKBIA	BCL6, NOTCH2, TNFARP3, DTX1	TP53, aneuploidía	NOTCH1, IRF2BP2	MYD88, CD79B, PIM2, HLA-B, BTG1, CKDN2A, ETV6, SPIB, OSBPL10
Desregulación vías moleculares	Epigenética, PI3K, migración celular, interacciones de células inmunes	JAK/STAT	NOTCH2, evasión del sistema inmune	Inestabilidad genética, evasión del sistema inmune	NF-κB	NF-κB, receptor de células B
Pronóstico	Favorable Desfavorable si EZB/MYC o LBAG DH/TH	Favorable	Intermedio	Desfavorable	Desfavorable	Desfavorable
Similitudes genéticas con otros linfomas	Linfoma folicular	Linfoma de la zona marginal	Linfoma de Hodgkin predominio linfocitario nodular Linfoma B rico en células T e histiocitos		Leucemia linfocítica crónica	Linfoma linfoplasmacítico LBDCG primario extranodal (SNC, piel, testículos)

Tabla 4. Características biológicas del LBDCG (tabla adaptada de Sehn & Salles, 2021). LBAG: linfoma b de alto grado. DH/TH: doble *hit* (c-MYC y BCL2) y *triple hit* (c-MYC, BCL2 y BCL6). SNC: Sistema nervioso central.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

La sobreexpresión de proteínas de la vía JAK/STAT se encuentra en procesos linfoproliferativos de células B y se puede asociar con fenotipos específicos, incluyendo patología inmune relacionada con infección viral/autoinmune y diferentes entidades y subtipos de linfoma B de célula grande.

3.2 Objetivos

El objetivo principal es caracterizar los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con la vía JAK/STAT en procesos linfoproliferativos B, específicamente en linfomas B difusos de célula grande y en linfadenitis virales e inmunes, como la hiperplasia linfoide reactiva asociada al virus Epstein-Barr, la enfermedad de Castleman asociada al HHV-8 y la enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática.

Los objetivos secundarios son:

- Caracterizar las alteraciones histopatológicas propias de la enfermedad de Castleman. Con el objetivo específico de encontrar diferencias entre la enfermedad de Castleman unicéntrica, la enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática y la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV-8 y asociada a neoplasia de células plasmáticas o síndrome POEMS.
- Analizar el papel del estudio de reordenamiento de inmunoglobulina en biopsias de ganglio linfático con cambios de tipo enfermedad de Castleman asociados a neoplasia de células plasmáticas o síndrome POEMS en la detección de poblaciones de células plasmáticas neoplásicas.
- Caracterizar el fenotipo y el perfil genético de los casos de linfoma B difuso de célula grande y encontrar asociaciones entre la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la vía de JAK/STAT y entidades específicas de LBDCG.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. Material y métodos

4.1 Selección de casos

Todos los procedimientos del estudio se han llevado a cabo conforme a la legislación vigente, los principios de la Declaración de Helsinki y las guías de buena práctica clínica.

Se obtuvo consentimiento informado escrito previo a la inclusión de las muestras en el Biobanco Valdecilla y/o ensayo clínico correspondiente para el uso de las muestras de tejido en investigación biomédica. Se obtuvo la aprobación del proyecto por parte del comité de ética local (CEIC, Cantabria; Código de la Junta de Revisión Institucional 2019.218). Adicionalmente, los datos recogidos y derivados de la realización de este proyecto fueron anonimizados y tratados de un modo confidencial, de acuerdo con la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales.

✓ Caracterización histológica y molecular de la enfermedad de Castleman

Para el estudio de la caracterización histológica y molecular de la enfermedad de Castleman se realizó una recogida retrospectiva de casos con tejido disponible desde el año 2012 al 2022. En total se dispuso de 55 casos provenientes de consultas de hematopatología a nivel nacional y casos propios del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Finalmente, de los 55 casos, se tuvieron en cuenta para el estudio 42 debido a la falta de información en el volante de petición o en los formularios clínicos sobre datos esenciales para el diagnóstico.

Se recogieron y analizaron todos aquellos datos clínicos y de laboratorio pertinentes de acuerdo con los criterios diagnósticos de la ECMi. Igualmente, se gradaron y evaluaron las características histopatológicas en las muestras disponibles de ganglio linfático.

✓ Identificación de células plasmáticas clonales en la enfermedad de Castleman

Para este fin, en total se dispuso de 18 casos provenientes de consultas de hematopatología a nivel nacional y casos propios del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla con tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFIP) de ganglio linfático disponible.

Se recogieron y valoraron los datos clínicos y de laboratorio pertinentes para el diagnóstico de la neoplasia de células plasmáticas con cambios tipo enfermedad de Castleman.

De estos 18 casos, dos estaban diagnosticados de mieloma múltiple, cuatro casos cumplían criterios de síndrome POEMS y 12 casos de enfermedad de Castleman, siendo cuatro de ellos idiopáticos y los ocho restantes asociados al HHV-8.

✓ Caracterización de la expresión de proteínas relacionadas con la activación de JAK/STAT en linfomas B difusos de célula grande y linfadenitis virales/inmunes

Disponíamos de una cohorte de biopsias de 212 casos de linfoma B procedente de ensayos clínicos y estudios retrospectivos y 16 casos de linfadenitis virales/reactivas provenientes de consultas de hematopatología a nivel nacional y casos propios del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Los casos con diagnóstico de linfoma se distribuían de la siguiente forma: 146 casos (69%) de linfoma B difuso de célula grande NOS, 18 casos (8%) de linfoma plasmablastico, 15 (6%) de linfoma B de célula grande VEB positivo, ocho (4%) de linfoma B de alto grado NOS, siete (3%) de linfoma B de célula grande doble *hit*, tres (2%) de linfoma B de alto grado doble *hit*, tres (2%) de linfoma mediastínico primario de células B grandes, dos (1%) de linfoma B de célula grande NOS HHV-8 positivo, dos (1%) de linfoma B de célula grande rico en células T e

histiocitos, uno (0,5%) de linfoma cutáneo primario B difuso de célula grande-tipo pierna, seis (3%) de linfoma B folicular y, por último, uno (0,5%) de linfoma de Burkitt.

En cuanto a los casos de linfadenitis virales/reactivas, seleccionamos cuatro casos (25%) con diagnóstico de enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática, 10 casos (63%) correspondientes a enfermedad de Castleman asociada al HHV-8 y, finalmente, dos casos (12%) de hiperplasia linfoide reactiva asociada al VEB.

4.2 Estudio histológico

Para el estudio histológico se realizó la tinción de los cortes del tejido fijado en formol e incluido en parafina mediante dos colorantes, hematoxilina y eosina (H&E), lo que permite una mejor visualización y diferenciación de las distintas estructuras que componen los tejidos. El diagnóstico histopatológico de todos los casos se estableció de acuerdo con los criterios diagnósticos vigentes en la OMS, mediante el estudio morfológico, fenotípico y molecular.

En los casos incluidos con diagnóstico de enfermedad de Castleman, dicho análisis morfológico se guió según los criterios de consenso para el diagnóstico de ECMi, que estudia la existencia o ausencia de cinco características histológicas, a saber, la hiperplasia o regresión de centros germinales, la plasmocitosis, la hipervascularización y la prominencia de células dendríticas foliculares. Estos hallazgos fueron gradados del 0 al 3, siendo el 0 la ausencia y el 3 el grado máximo de aparición de cada una de las características histopatológicas relevantes. (*Fajgenbaum et al., 2017a; Rodriguez Merino et al., 2023*)

Además, en estos casos en la muestra de ganglio linfático se estudió el espacio interfolicular en busca de una población de células plasmáticas que pudiera resultar atípica o indicativa de una neoplasia de células plasmáticas, con presencia por ejemplo de cuerpos de Russel (inclusiones intracitoplasmáticas) o de Duchter (inclusiones intranucleares) o binucleaciones. Por su parte, en las muestras de médula ósea disponibles igualmente se buscaron características definitorias o sugerentes de discrasia de células plasmáticas. En condiciones normales la población de células plasmáticas no supera el 10% y se distribuyen alrededor de pequeños vasos. El hallazgo de grandes agregados de células plasmáticas sin asociación a vasos suele ser patológico, además la presencia de agregados linfoides rodeados de células plasmáticas o cambios en los megacariocitos, tales como hiperplasia, acúmulos o hiperlobulación, están asociados con el síndrome POEMS. (*Dao et al., 2011*)

4.3 Pruebas auxiliares

4.3.1 Estudio inmunohistoquímico

El estudio inmunohistoquímico (IHQ) es un método que permite marcar una serie de proteínas (antígenos) relevantes para el diagnóstico y, así, poder evaluar su expresión. Se basa en la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos monoclonales para reconocer las proteínas y unirse a ellas.

El procedimiento parte de secciones finas de tejido previamente fijado y se utiliza el método de conjugación indirecto. En líneas generales este proceso se caracteriza por el uso de dos anticuerpos, uno primario y otro secundario unido a un cromógeno marrón. La primera etapa consiste en la aplicación de un anticuerpo primario que se une específicamente al antígeno diana. Posteriormente, los anticuerpos secundarios reconocen al anticuerpo primario y se unen a él, de modo que podemos reconocer la existencia del antígeno diana gracias al cromógeno.

La Tabla 5 recoge un listado de los marcadores inmunohistoquímicos utilizados en el presente estudio.

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Dilución	Recuperación antigénica
CD20	L26	DAKO	RTU	EDTA
CD3	Policlonal	DAKO	RTU	EDTA
CD138	MI15	DAKO	RTU	EDTA
CD10	56C6	DAKO	RTU	EDTA
PAX5	DAK-Pax5	DAKO	RTU	EDTA
BCL6	PG-B6p	DAKO	RTU	EDTA
BCL2	124	DAKO	RTU	EDTA
IRF4/MUM1	MUM1p	DAKO	RTU	EDTA
c-MYC	Y69	DAKO	1:50	EDTA
P-STAT3	Tyr705	<i>Cell-signaling</i>	1:200	EDTA
IgG	Policlonal	DAKO	RTU	EDTA
IgG4	HP6025	<i>BIOCARE MEDICAL</i>	1:100	EDTA
IgA	Policlonal	DAKO	RTU	EDTA
IgM	Policlonal	DAKO	RTU	EDTA
IgD	Policlonal	DAKO	RTU	Citrato
Kappa	Policlonal	DAKO	RTU	EDTA
Lambda	Policlonal	DAKO	RTU	EDTA
EBER RNA CISH	Sonda EBV*	DAKO	RTU	Solución de pretratamiento (Dako Omnis)
EBV-LMP1	CS. 1-4	DAKO	RTU	EDTA
HHV-8	LN53	GENNOVA	1:25-1:50	EDTA

Tabla 5. Marcadores inmunohistoquímicos: clones de anticuerpos, dilución y método de recuperación antigénica. RTU: *ready to use*, solución prediluida lista para utilizar. EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. * Sonda basada en oligonucleótidos que se une al ARN nuclear de EBER1 y EBER2.

STAT3 se activa por fosforilación en Tyr705, que induce dimerización, translocación nuclear y unión al ADN. El anticuerpo monoclonal de conejo P-STAT3 (Try705) detecta niveles de STAT3 fosforilado en la tirosina 705 y en el estudio inmunohistoquímico muestra una expresión nuclear. IRF4/MUM1 es un marcador nuclear que normalmente se expresa en células B y T activadas, células plasmáticas y melanocitos. c-MYC es un oncogén que codifica un factor de transcripción implicado en la regulación del crecimiento y la proliferación celular. BCL6 es un regulador transcripcional que juega un papel crucial en la formación de centros germinales y se sobreexpresa en una variedad de linfomas, incluyendo LBDCG. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-HHV8 LNA-1 se expresa en las células infectadas por el virus. EBV-LMP1 es un marcador de membrana o citoplasmático que permite la detección de la proteína latente de membrana del virus Epstein Barr. Por último, las tinciones de IHQ para cadenas ligeras kappa y lambda se utilizan para establecer la naturaleza clonal o policlonal de las células plasmáticas o los linfocitos.

En los casos diagnosticados de EC, para llevar a cabo el recuento de células plasmáticas positivas para IgG4 y calcular la ratio IgG4/IgG, se realizaron por cada caso seis fotos al 40x, tres de los *hot spot* de IgG4 y tres de esas mismas áreas de IgG. Posteriormente, se llevó a cabo un conteo manual de las células positivas para cada uno de los marcadores.

Por otro lado, para el estudio inmunohistoquímico de los casos de linfoma se utilizó la técnica de micromatrices de tejido (*TMA*, por sus siglas en inglés), la cual consiste en seleccionar una sección cilíndrica de interés de diferentes muestras tisulares e incluirlas en un único bloque de parafina, para su posterior corte y realización de tinciones.

El uso de micromatrices de tejido (ver esquema de su elaboración en la Figura 4) permite mejorar el rendimiento diagnóstico. Aporta la ventaja de poder analizar el perfil de expresión de un anticuerpo en múltiples tejidos simultáneamente, de modo que se asegura la homogeneidad de la técnica y se facilita su comparación. Además, es una técnica costo-efectiva pues supone un ahorro de tiempo y de material. En los casos en los que no se disponía de material suficiente para

la obtención de TMA, el estudio IHQ se realizó en secciones completas del bloque fijado en formol e incluido en parafina (FFPI) original.

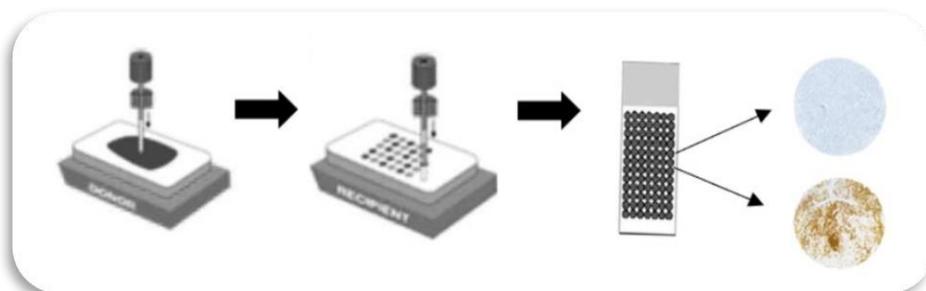


Figura 4. Procedimiento para la elaboración de micromatrices de tejido. Se obtienen muestras cilíndricas de zonas relevantes de cada caso y se incorporan en un único bloque de parafina receptor, de modo que este pueda ser cortado y nos permita realizar las técnicas inmunohistoquímicas pertinentes de forma homogénea.

4.3.2 Hibridación in situ

Para la detección del VEB se utilizó una técnica denominada hibridación in situ cromogénica (*CISH*, por sus siglas en inglés). En este proceso se utilizan sondas marcadas con haptenos que son detectadas por métodos inmunohistoquímicos y producen una reacción coloreada que es visible al microscopio óptico. Se utilizó una sonda anti-ARN viral de VEB (EBER) y un KIT de detección PNA ISH (*Dako Cytomation*).

Igualmente, se utilizó la hibridación in situ, en este caso fluorescente (*FISH*, por sus siglas en inglés), para el estudio de reordenamientos en *BCL6*, *BCL2* y *c-MYC*. Para el estudio de reordenamientos en estos genes se dispone de dos tipos de sondas, sondas de fusión y sondas tipo *break apart*. En nuestro estudio, con el fin de detectar traslocaciones cromosómicas, utilizamos estas últimas que se componen de dos sondas de diferente color, una roja y la otra verde, que se hibridan en regiones adyacentes al gen de interés, en el extremo 5' y 3' del gen. En caso de que exista reordenamiento del gen aparecerá una señal amarilla de fusión correspondiente al gen intacto y una señal roja y otra verde correspondiente al gen traslocado. En cambio, en caso de que no exista reordenamiento ambas sondas estarán colocalizadas y el patrón de señal será de dos puntos amarillos. Se utilizaron las sondas *dual-color, break-apart rearrangement* (Vysis) para *BCL6* y *BCL2* y *dual-color, break-apart*, específica de locus (Vysis) para *MYC*. El umbral para considerar un caso como positivo es del 10%.

4.3.3 Cuantificación de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos

Se llevó a cabo una valoración y cuantificación de la expresión inmunohistoquímica de *CD10*, *BCL6*, *IRF4/MUM1* y *BCL2*, con el fin de establecer el diagnóstico y valorar el fenotipo.

Además, se valoró la sobreexpresión de *STAT3* fosforilado (P-*STAT3*). Para ello, se realizó una cuantificación semicuantitativa, visual, en porcentajes del 10% en todos los casos con diagnóstico de linfoma, considerando como no valorables aquellos que no disponían de control interno (por ejemplo, positividad nuclear en células endoteliales) o que no disponían de una población de células tumorales suficiente (menos de 50 células tumorales).

Adicionalmente, se utilizó un software de análisis de muestras histológicas, *QuPath* (Figura 5), para realizar una cuantificación absoluta y automática de la expresión de P-*STAT3*.

Dicho software es de acceso gratuito y puede descargarse en el siguiente enlace, en el cual también tenemos acceso a los tutoriales y guías de manejo del programa: <https://qupath.github.io/>

QuPath es un programa de código abierto para el análisis de bioimágenes desarrollado por el Doctor Pete Bankhead de la Universidad de Edimburgo y pensado para su aplicación en patología digital. Este programa cuenta con potentes herramientas de anotación y visualización de imágenes, algoritmos para la detección de tejido y células, *machine learning* interactivo para la clasificación de píxeles y objetos y es compatible con distintas herramientas de código abierto (como *ImageJ*, por ejemplo), a la vez que puede trabajar con una gran variedad de formatos de imagen.

Para empezar con la cuantificación automática se crearon varios proyectos, en función del subtipo genético, con todas las imágenes que se querían analizar. Se fueron abriendo las imágenes de una en una y seleccionando las áreas a estudio, en los TMA toda la circunferencia correspondiente a cada caso y por duplicado y en los casos de secciones de tejido completas, áreas con un número de células similar a los TMA. A continuación, desde *Analyze > Cell detection > Positive cell detection*, se determinaron los parámetros que el programa iba a utilizar para la detección de células, canal, resolución, tamaño, intensidad y otra serie de valores. Con el fin de determinar el porcentaje de células tumorales con tinción positiva respecto al total de células tumorales, se utilizó la herramienta de *machine learning*. Así, se realizaron anotaciones empleando las categorías *tumor*, *immune cells*, *stroma* y *other*, esta última para marcar las células endoteliales. Posteriormente desde *Classify > Object classification > Train object classification*, se pudo obtener una clasificación de los distintos tipos celulares o áreas del tejido y así obtener los porcentajes de positividad por grupos.

De los 212 casos con diagnóstico de linfoma, la tinción para la detección de P-STAT3 fue valorable en 198 casos y en todos ellos se realizó la cuantificación visual. Por su parte, la cuantificación automática se realizó en 56 casos, 20 casos del subtipo genético ST2, otros 20 *Other*, cinco casos BN2, ocho EZB y tres MCD.

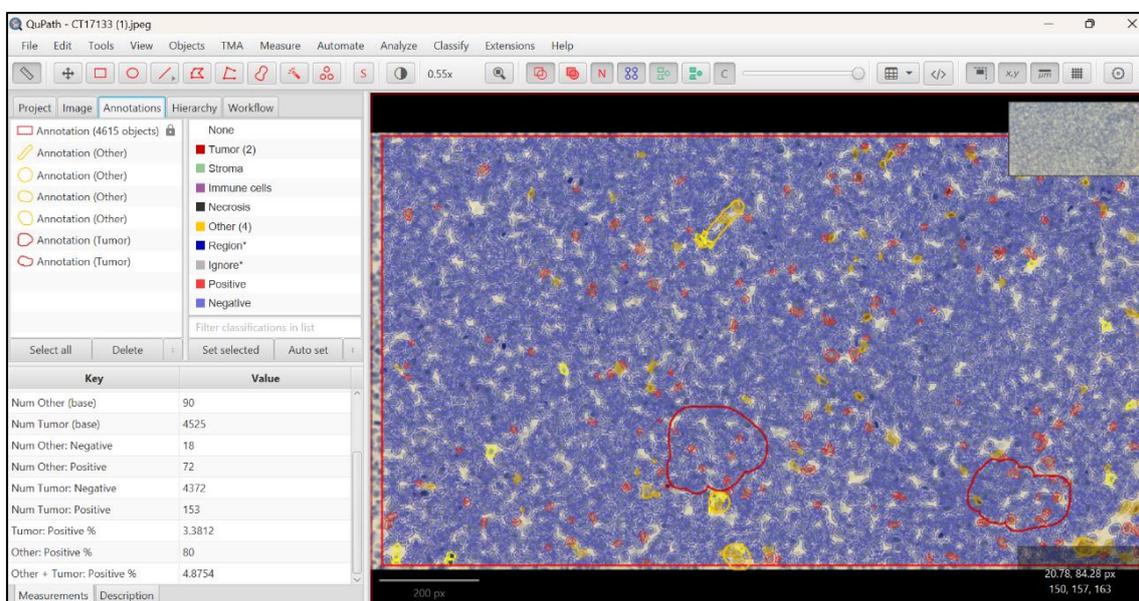


Figura 5. Imagen que muestra los resultados obtenidos al aplicar el clasificador entrenado para detectar tejido tumoral y no tumoral. En este caso aparecen células endoteliales y células tumorales, las células endoteliales positivas (control interno) se muestran en color mostaza, por su parte las células tumorales positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. Abajo a la izquierda de la imagen se pueden ver los detalles de la cuantificación.

4.3.4 Estudio de clonalidad linfoide B

El estudio clonalidad linfoide B se basa en la detección de reordenamientos específicos de los genes de las cadenas pesadas (IgH) y cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (IgK, IgKde e IgL), las cuales son responsables del reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos B.

En condiciones normales, las células B muestran una gran diversidad en estos reordenamientos debido a la recombinación V(D)J durante su desarrollo. Como norma general las poblaciones reactivas de linfocitos serán policlonales, mientras que el linfoma se caracteriza por una expansión monoclonal, con un único reordenamiento V(D)J dominante. Para detectar esta clonalidad se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las regiones de los genes de la Ig, seguida de electroforesis capilar para analizar los patrones de reordenamiento. Se utiliza la metodología *EuroClonality*/BIOMED-2 para estandarizar estos análisis, pues proporciona un conjunto de protocolos y reactivos validados internacionalmente que mejoran la reproducibilidad y la precisión de los resultados. Adicionalmente, el análisis de los datos se realiza mediante *Genemapper* que permiten una interpretación precisa de los datos de clonalidad facilitando la identificación de patrones clonales a partir de las secuencias amplificadas, mediante la representación gráfica de los resultados. (*Langerak et al., 2012*)

En nuestro estudio se extrajo ADN genómico de tejido de ganglio linfático FFPI y, posteriormente, se utilizó una PCR múltiple para amplificar los reordenamientos de inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera (FR1-JH, FR2-JH y FR3-JH, IgK, IgKde e IgL) con cebadores IVS. Después, se realizó una electroforesis capilar en ABI3500 y los fragmentos resultantes se analizaron con el software 5 Applied Biosystems GeneMapper™ de acuerdo con protocolos estandarizados. (*Langerak et al., 2012*)

4.3.5 PCR-alelo específica

Se realizó una PCR-alelo específica para la detección de la mutación MYD88pL265P. El gen MYD88 codifica una proteína que desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune innata y adaptativa. La mutación de MYD88 debida a un cambio de la leucina en la posición 256 por prolina, se encuentra en el 90% de los casos de linfoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström y en un número de casos significativo de LBDCG ABC y de gammapatía monoclonal IgM de significado incierto. (*Lee et al., 2017; Yu et al., 2018*)

El estudio de PCR-alelo específica es una técnica de biología molecular utilizada para detectar mutaciones específicas en genes, como la mutación L265P en el gen MYD88. Este enfoque se puede optimizar utilizando sondas *TaqMan*, que son sondas fluorescentes diseñadas para unirse específicamente a la secuencia mutada o a la secuencia *wild type* del gen diana. Durante la amplificación, solo se replicará el ADN que coincida exactamente con los cebadores y la sonda *TaqMan* específica, permitiendo la diferenciación entre el alelo mutado y el no mutado (*wild type*). Las sondas *TaqMan* emiten una señal fluorescente cuando se hidrolizan durante la amplificación, lo que permite una cuantificación en tiempo real de la cantidad de ADN amplificado.

4.3.6 Caracterización genética mediante secuenciación del exoma completo de la serie de casos de LBDCG

Se utilizaron los datos producidos en nuestro laboratorio de caracterización genética de 109 casos de linfoma B de célula grande, previamente comunicados (*Montes-Moreno, et al., 2023*).

Recuperamos muestras de tejido FFIP de los casos y realizamos confirmación histopatológica, pruebas FISH y secuenciación completa del exoma mediante NGS. Se generó una librería del exoma completo a partir del ADN tumoral tisular y del ADN genómico de línea

germinal extraído de granulocitos de sangre periférica (*Sureselect XT Human All Exon v6 Agilent Technologies*), que se secuenció en un instrumento Novaseq 6000 (*Illumina, paired end 2 x100*) en el Centro Nacional de análisis Genómico (CNAG, Barcelona).

Los datos de secuenciación y los datos de fusión disponibles para BCL2 y BCL6 se utilizaron para clasificar los casos según *Lymphgen* (<https://lmpp.nih.gov/lymphgen/index.php>). Los conjuntos de datos generados y analizados durante el estudio actual se han puesto disponibles en el repositorio de *European Genome-Phenome Archive* (EGA), en el siguiente enlace: <https://ega-archive.org/studies/EGAS50000000371>

Las solicitudes de acceso a los datos pueden dirigirse directamente al Comité de acceso a los datos: <https://ega-archive.org/dacs/EGAC50000000261>

4.4 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo incluyendo media, mediana, valor máximo, valor mínimo y desviación estándar. Igualmente se realizaron test estadísticos, *t-student* para muestras pareadas y chi-cuadrado.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Caracterización histopatológica de la enfermedad de Castleman

Atendiendo a las características clínicas e histopatológicas (Tabla 6) de los 42 casos seleccionados con cambios de tipo EC en las muestras de ganglio linfático, 14 (33%) de ellos afectaban a un único ganglio linfático o a una región ganglionar, correspondiendo por tanto al tipo unicéntrico. Además, estos 14 casos mostraron en su totalidad un patrón hialino-vascular. Por su parte, 27 de los casos (64%) se englobaron en el subtipo plasmocelular y el caso restante tenía características mixtas. De entre esos 27 casos, 15 (55%) estaban relacionados con la infección por el HHV-8, siete (26%) con neoplasia de células plasmáticas o síndrome POEMS y cinco (19%) cumplieron criterios de ECMi. Finalmente, el caso con morfología mixta fue considerado como linfadenopatía compatible con lupus eritematoso sistémico (LES).

La Figura 6 muestra un histograma con la gradación de las características histopatológicas de los criterios de consenso en las distintas entidades de la serie, que iremos desglosando y describiendo en los siguientes apartados.

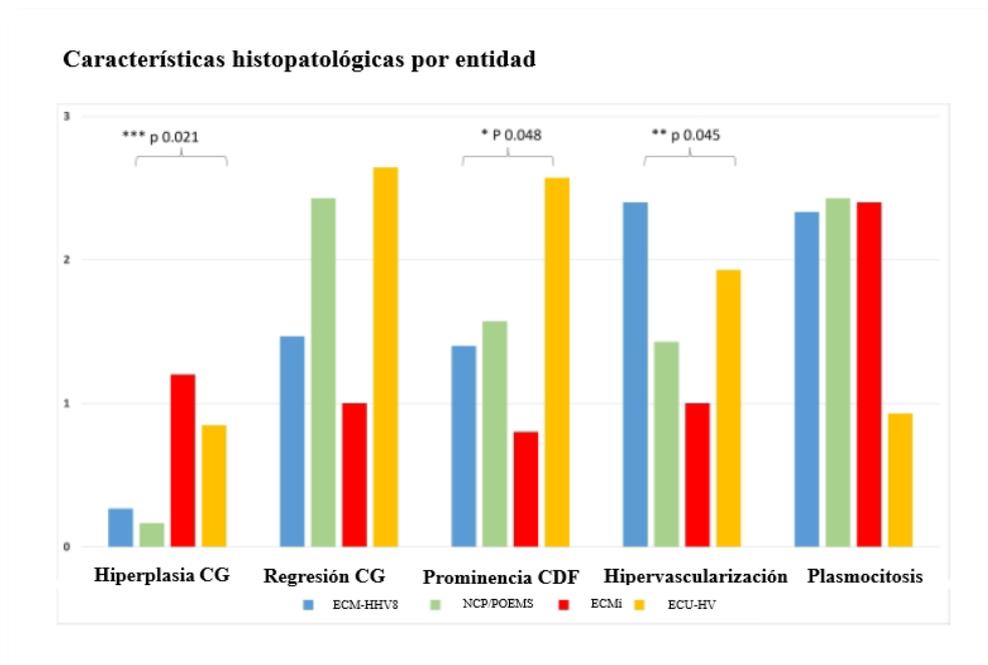


Figura 6. Detalle de la gradación de las características histopatológicas por entidad.

	Edad	Sexo	Sitio afecto	Tamaño	HCG	RCG	CDF	HV	PI	Isotipo Ig	IgG4	IgG4/IgG
ECU-HV	70-75	M	Retroperitoneal	11,5 cm	0	3	3	2	0	IgG politépicas	-	-
	30-35	F	Mesentérica	2,3 cm	0	3	3	1	1	IgG politépicas	-	-
	30-35	F	Desconocido	6,5 cm	0	3	2	2	2	IgG politépicas	-	-
	20-25	F	Mesentérica	3,2 cm	0	3	3	2	0	IgG politépicas	-	-
	30-35	M	Mediastínica	1,7 cm	0	3	3	2	1	IgG politépicas	-	-
	20-25	F	Supraclavicular	1,4 cm	1	3	3	2	1	IgG politépicas	-	-
	15-20	F	Laterocervical	2 cm	3	2	2	2	0	IgG politépicas	-	-
	40-45	F	Desconocido	4,4 cm	0	3	2	2	0	IgG politépicas	-	-
	40-45	F	Retroperitoneal	5 cm	3	2	2	1	1	IgG politépicas	-	-
	35-40	M	Axilar	8 cm	1	3	3	2	0	IgG politépicas	-	-
	35-40	F	Submandibular	2 cm	1	2	3	2	2	IgG politépicas	-	-
	20-25	F	Cervical	1,7 cm	2	2	2	3	2	IgG politépicas	-	-
	20-25	F	Laterocervical	2,4 cm	0	2	3	2	2	IgG politépicas	-	-
	40-45	F	Axilar	1,2 cm	3	3	2	2	1	IgG politépicas	-	-
ECM HHV8+	80-85	M	Inguinal izquierda	0,7 cm	3	1	1	0	1	IgM politépicas	-	-
	55-60	F	Inguinal izquierda	0,7 cm	2	1	1	0	2	IgM politépicas	8	0,054
	55-60	M	Cervical derecha	1 cm	3	1	2	0	2	IgM politépicas	2	0,022
	75-80	M	Desconocida	1,2 cm	2	1	0	0	3	IgM lambda	41	0,140
	60-65	Desconocido	Desconocida	1,4 cm	3	1	3	0	3	IgM lambda	-	-
	40-45	Desconocido	Desconocida	2,2 cm	2	2	2	2	3	IgM lambda	3	0,014
	55-60	M	Desconocida	1,3 cm	3	1	1	0	3	IgM lambda	5	0,086
	45-50	M	Laterocervical	1,2 cm	1	1	2	0	3	IgM lambda	1	0,009
	50-55	M	Desconocida	1 cm	3	1	0	0	1	IgM lambda	17	0,099
	70-75	Desconocido	Desconocida	1,2 cm	3	2	2	1	2	IgM lambda	6	0,041
	30-35	M	Desconocida	2 cm	0	2	2	1	3	IgM lambda	3	0,053
	30-35	M	Desconocida	1 cm	3	1	0	0	1	IgM lambda	39	0,189
	55-60	M	Laterocervical	1,1 cm	2	3	3	0	3	IgM lambda	-	-
	80-85	M	Inguinal	1,3 cm	3	1	0	0	3	IgM lambda	25	0,078
65-70	M	Axilar	1 cm	1	3	2	0	2	IgM lambda	30	0,099	

NCP/POEMS	75-80	M	Desconocida	1,2 cm	2	0	0	0	3	IgG politépicas	-	-
	50-55	F	Inguinal	2 cm	3	3	2	0	1	IgG politépicas	96	0,248
	55-60	F	Axilar izquierda	2 cm	2	3	2	0	1	IgG politépicas	3	0,039
	60-65	Desconocido	Desconocida	1,2 cm	1	2	1	0	3	IgA politépicas	-	-
	70-75	M	Supraclavicular	1,6 cm	1	3	2	0	3	IgG lambda	5	0,074
	65-70	F	Axilar	2 cm	0	3	1	1	3	IgA lambda	25	0,296
	55-60	F	Retroperitoneal	1,2 cm	1	3	3	1	3	IgA lambda	12	0,235
ECMI	60-65	M	Femoral	2 cm	1	1	1	1	3	IgG politépicas	37	0,127
	60-65	M	Cervical	2 cm	0	0	0	1	2	IgG politépicas	11	0,104
	60-65	M	Inguinal	1,7 cm	2	0	0	2	2	IgG politépicas	28	0,122
	55-60	F	Inguinal	0,6 cm	1	2	2	1	2	IgG politépicas	13	0,075
	45-50	F	Desconocida	1,7 cm	2	2	1	1	3	IgG politépicas	27	0,179
LES	20-25	F	Axilar, retropectoral	1,9 cm	2	2	2	1	3	IgG politépicas	-	-

Tabla 6. Resumen de las características epidemiológicas e histológicas de nuestra serie retrospectiva de 42 casos con cambios tipo EC en biopsia de ganglio linfático. En las dos últimas dos columnas se muestra la media de células plasmáticas IgG4 positivas, calculada a partir de la cuantificación de células en tres campos de 40x, y la ratio IgG4/IgG calculada a partir de ambas medias, células positivas para IgG4 y positivas para IgG, igualmente cuantificando en tres campos de gran aumento. M: masculino. F: femenino. HCG: hiperplasia de centros germinales. RCG: regresión de centros germinales. CDF: prominencia de células dendríticas foliculares. HV: hipervascularización. Pl: plasmocitosis. NV: no valorado.

5.1.1 Características de la enfermedad de Castleman unicéntrica

Las adenopatías con diagnóstico de ECU se localizaron en regiones periféricas (siete casos), que incluían el cuello y la axila, el retroperitoneo o mesenterio (cuatro casos) y el mediastino (un caso). Esta distribución coincide con los hallazgos descritos en la literatura, que definen como localizaciones más frecuentes el mediastino (29%), el cuello (23%), el abdomen (21%) y el retroperitoneo (17%). (Talat *et al.*, 2012) Igualmente, puede hallarse en las regiones axilar e inguinal, la órbita, la nasofaringe y el intestino delgado. (Nishimura *et al.*, 2021)

De acuerdo con la evaluación y gradación de las cinco características histopatológicas propuestas en los criterios diagnósticos de consenso de la ECMi, se observó que la prominencia de CDF era más sobresaliente en los casos de ECU (Figura 7), la hipervascularización era una característica más destacada en los casos de ECM-HHV8 y la hiperplasia de centros germinales era propia de los casos de ECMi.

Así, los casos con diagnóstico de ECU mostraron predominantemente regresión de centros germinales y prominencia de CDF (Figura 7) con valores medios, teniendo en cuenta el sistema de gradación, de $2,64 (\pm 0,83)$ y $2,57 (\pm 0,82)$, respectivamente. Por su parte, la gradación de la presencia de hipervascularización fue de media de un $1,92 (\pm 0,67)$. Como cabe esperar en los casos con patrón hialino-vascular, la hiperplasia de centros germinales y la plasmocitosis no resultaron características histológicas llamativas.

En comparación con otros grupos de EC, los casos de ECU y patrón hialino-vascular mostraron grados significativamente mayores grados de prominencia de CDF ($p 0,048$). Esta característica se define como la aparición de una expansión de la red de CDF, la cual se identifica mejor mediante estudio inmunohistoquímico con marcadores como CD23, y una proliferación de células dendríticas interfoliculares con presencia de esclerosis. Esta esclerosis se aprecia como bandas densas y eosinofílicas de colágeno y frecuentemente se asocia con la presencia de células dendríticas interfoliculares con ligera atipia. En estos casos no se observaba dilatación sinusoidal. Es importante destacar que los casos con diagnóstico concurrente de sarcoma de CDF fueron excluidos de este estudio. (Piris *et al.*, 2018)

Por otra parte, la regresión de centros germinales fue también prominente en los casos de EC relacionada con NCP/POEMS.

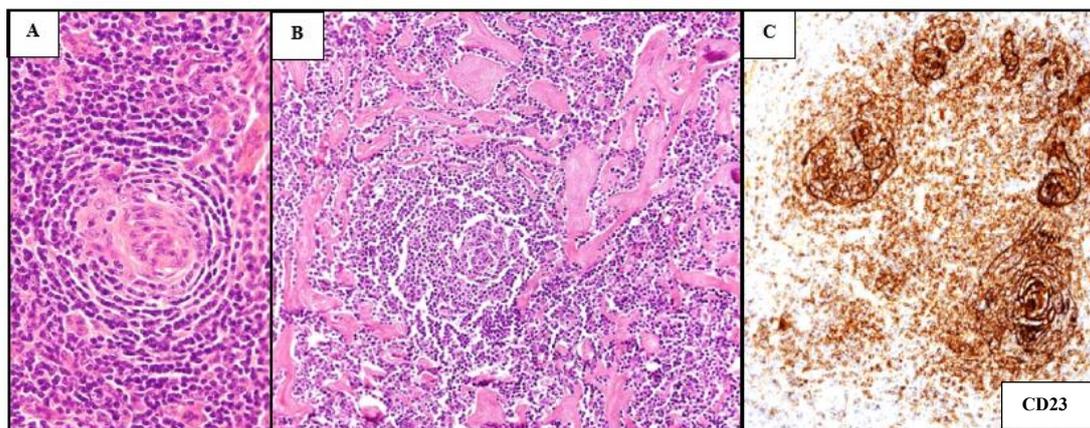


Figura 7. Detalle de un caso de ECU de la serie. **A y B.** H&E. Puede apreciarse la regresión de centros germinales con hiperplasia de células dendríticas foliculares y la presencia de depósito de colágeno denso en el espacio interfolicular, con calcificación distrófica focal. **C.** La inmunotinción con marcadores de células dendríticas foliculares, en este caso CD23, resalta mejor la expansión de la red de dichas células.

5.1.2 Características de la enfermedad de Castleman multicéntrica HHV8 positiva

En cuanto a los casos de ECM-HHV8, en todas las muestras se realizó inmunohistoquímica contra LANA-1 para verificar la infección por HHV8. En uno de los casos se halló positividad para LANA-1 en CDF lo que sugiere que dichas células intervienen en el procesamiento antigénico. (Chadburn *et al.*, 2017)

Otros hallazgos histológicos incluyeron regresión de centros germinales, proliferación de vénulas en el área paracortical y la presencia de células plasmablásticas o plasmocitoides IgM lambda en la zona del manto (Figura 8). Además, en tres de los 15 casos relacionados con el virus se observó una proliferación de células fusadas correspondientes a sarcoma de Kaposi y en un caso se apreció la existencia de grandes grupos de plasmablastos HHV8 positivos, hallazgo que anteriormente se describía como microlinfoma. (Chadburn *et al.*, 2017)

De acuerdo con las cinco características histopatológicas del consenso internacional para el diagnóstico de la ECMi, la ECM-HHV8 mostró un mayor grado de hipervascularización (Figura 8) respecto al resto de casos (p 0,045). La plasmocitosis también fue una característica prominente, sin embargo, la hiperplasia de centros germinales fue prácticamente ausente.

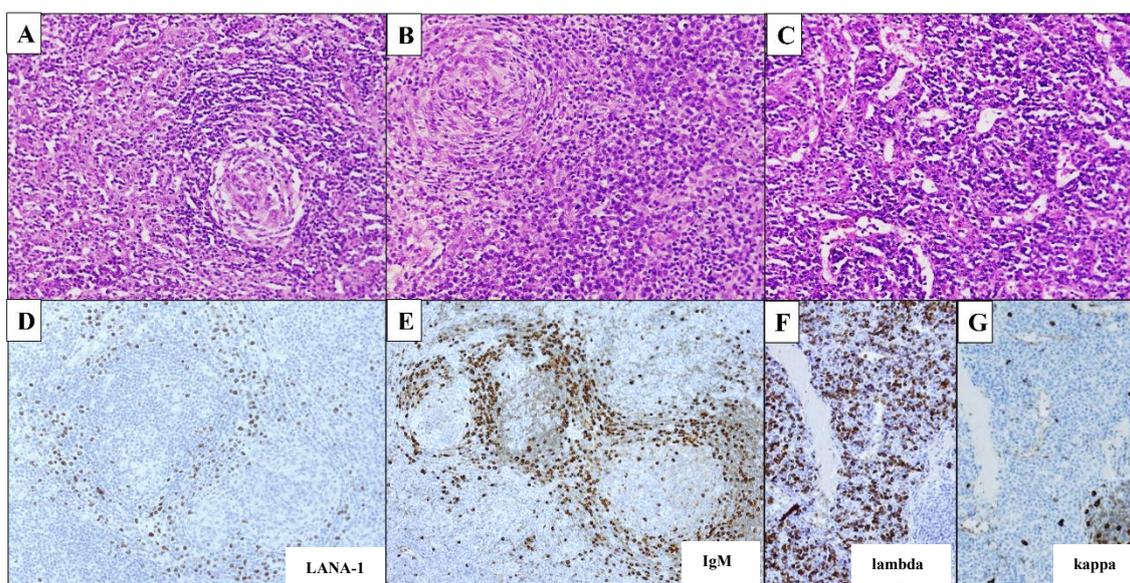


Figura 8. Características histopatológicas de la ECM-HHV8. **A, B y C.** Los casos con ECM-HHV8 se caracterizaron por presentar regresión prominente de centros germinales, plasmocitosis en grados altos en el área interfolicular y presencia de proliferación de vénulas de endotelio alto en la zona paracortical. **D.** La demostración inmunohistoquímica del HHV-8 es clave para el diagnóstico de esta entidad. **E, F y G.** Esta población de plasmablastos o células plasmocitoides presentes en el manto presenta restricción IgM lambda.

5.1.3 Características de la enfermedad de Castleman multicéntrica relacionada con neoplasia de células plasmáticas o síndrome POEMS

Siete de los 27 casos (25%) de EC plasmocelular presentaban una neoplasia de células plasmáticas, incluyendo tres casos con síndrome POEMS. En tres (43%) de los casos de ECM-NCP/POEMS se pudo observar la presencia de una población de células plasmáticas monotípicas con restricción de cadena ligera lambda, siendo dos de ellos IgA y uno IgG.

Por el contrario, en los cuatro casos restantes no fue posible identificar una población monotípica de células plasmáticas mediante el estudio inmunohistoquímico. El isotipo de Ig

predominante en estos casos fue IgG. Uno de ellos mostraba en la biopsia de ganglio linfático un plasmocitoma, sin clínica o datos de laboratorio que indicaran un mieloma múltiple concurrente. Otro caso cumplía criterios de mieloma múltiple y respecto a los dos restantes no disponíamos de información clínica o analítica para confirmar el diagnóstico de mieloma múltiple.

Los casos con diagnóstico de ECM-NCP/POEMS presentaron mayor grado de regresión de centros germinales (Figura 9) en comparación con otras entidades de EC plasmocelular, pero esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p > 0,05$). La hiperplasia de centros germinales no fue una característica atribuible a esta entidad, a diferencia de los casos autoinmunes, como ECMi o LES.

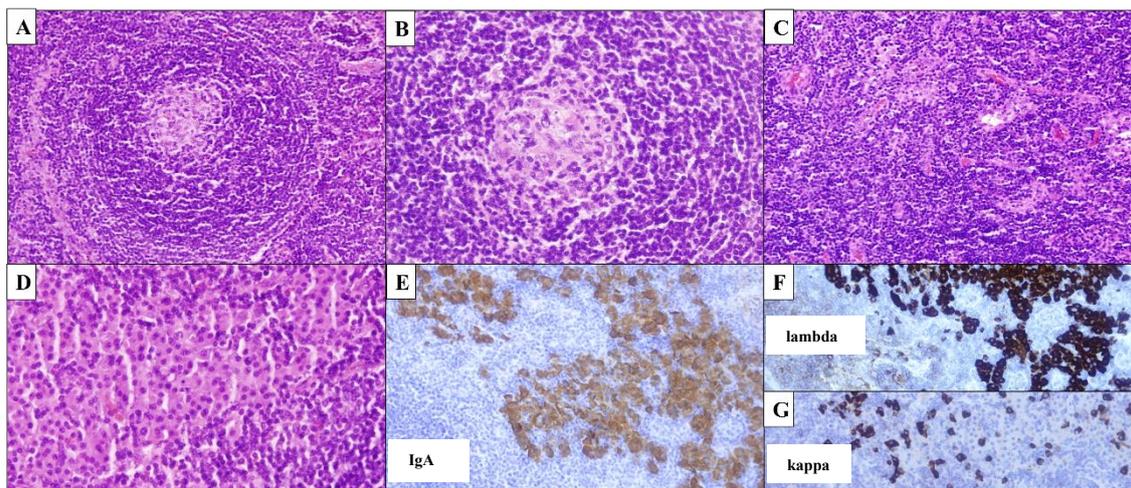


Figura 9. Detalle de un caso de ECM-NCP/POEMS con restricción de cadenas ligeras mediante estudio inmunohistoquímico. **A, B, C y D.** Mediante H&E se pueden apreciar las características morfológicas del caso que consisten en regresión de centros germinales con prominencia de células dendríticas, la hipervascularización no es una característica destacable, no así la plasmocitosis interfolicular que corresponde a un Grado 3. **E.** Dichas células plasmáticas dispuestas en grandes grupos o láminas en el espacio interfolicular son positivas para IgA. **F y G.** La población resultó monotípica lambda mediante estudio inmunohistoquímico.

5.1.4 Características de la enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática

Por otro parte, cinco de los 27 casos (18%) cumplían criterios clínicos, histopatológicos y de laboratorio para el diagnóstico de ECMi, basándonos en los criterios de consenso. La subclasificación en ECMi-NOS y ECMi-TAFRO se realizó atendiendo a los datos disponibles y los criterios publicados. (*Fajgenbaum et al., 2017*)

Los casos con diagnóstico de ECMi se caracterizaron por grados altos de hiperplasia de centros germinales respecto a otros subgrupos ($p 0,021$). El resto de las características, véase regresión de centros germinales, prominencia de CDF o hipervascularización, no fueron inherentes a este subtipo. La hiperplasia de centros germinales junto a la dilatación de sinusoides fueron hallazgos consistentes en estos casos (Figura 10).

Los cinco casos de ECMi presentaron una plasmocitosis polítipica en la inmunohistoquímica, a diferencia de aquellos con diagnóstico de ECM-HHV8 que presentaban una población de células plasmáticas IgM lambda.

Respecto a la biopsia de ganglio linfático con diagnóstico de LES tras la evaluación de los datos clínicos, presentó un Grado 3 de plasmocitosis, 2 de regresión de centros germinales, hiperplasia de CDF e hipervascularización y 1 de hiperplasia de centros germinales (Figura 10). Debido a la ausencia de otros hallazgos característicos de adenopatía secundaria a lupus, tales

como necrosis o depósitos de ácido desoxirribonucleico (ADN) como cuerpos de hematoxilina, solo se pudo alcanzar el diagnóstico gracias a los datos clínicos. Este caso es un ejemplo de que el LES puede presentar características de EC en la biopsia de ganglio linfático.

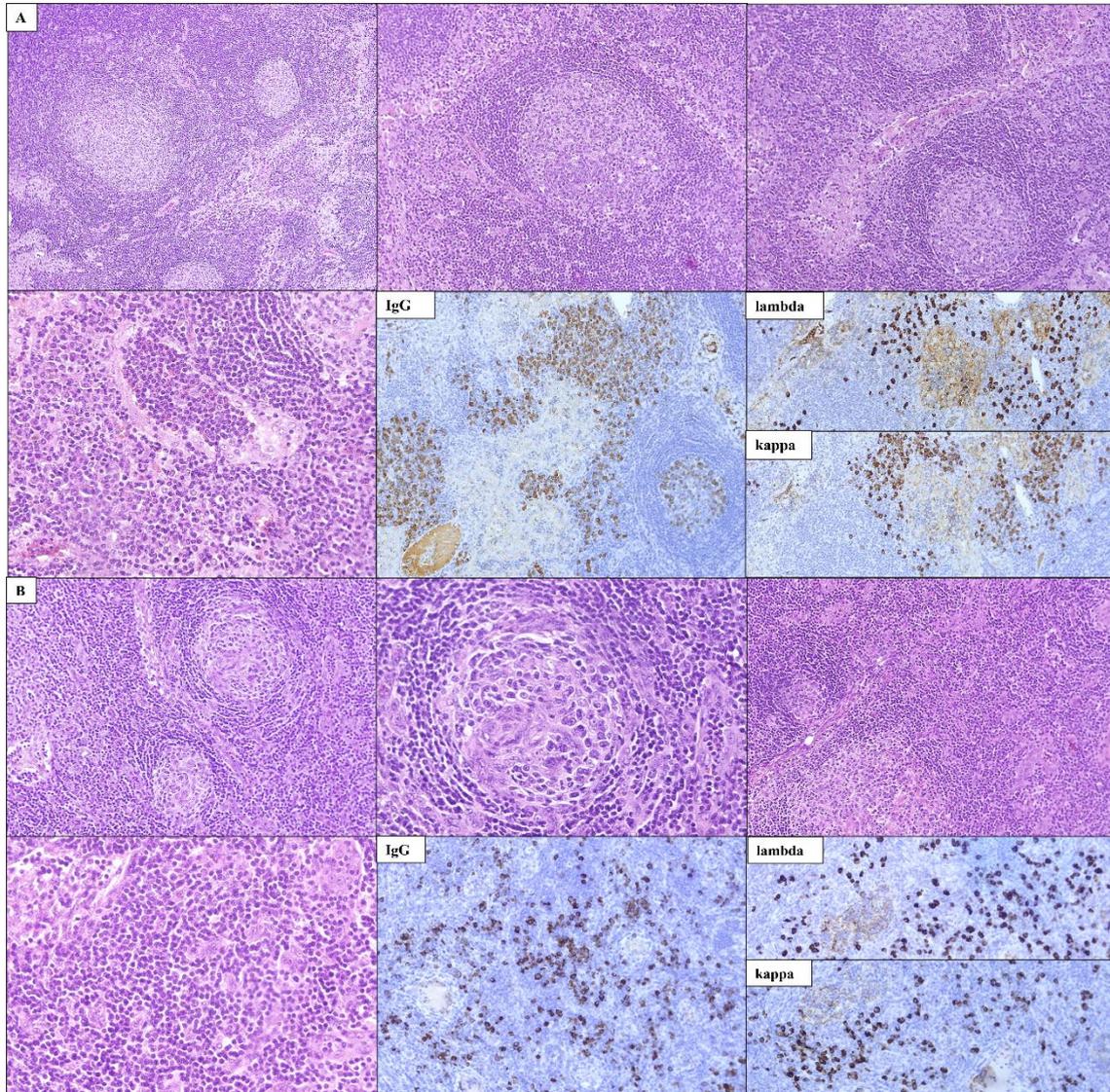


Figura 10. Detalle de las características histopatológicas de un caso de ECMi (A) y el caso con diagnóstico de linfadenopatía relacionada con LES (B), ambos casos con una población de células plasmáticas politípicas IgG. En el caso de ECMi podemos ver hiperplasia de centros germinales, dilatación sinusoidal y nidos de células plasmáticas en el área interfolicular. Por su parte, el caso de LES presenta mezcla de centros germinales regresivos e hiperplásicos. Alguno de los centros germinales regresivos muestra además prominencia de CDF.

5.1.5 Diagnóstico diferencial con la enfermedad relacionada con IgG4

El incremento de células plasmáticas Ig4 no fue homogéneo y tan solo cinco casos de los 23 evaluados (22%) presentaron 30 o más células plasmáticas IgG4. Tres de los cinco casos fueron ECM-HHV8, un caso ECM-POEMS y otro caso ECMi. Ninguno de ellos mostró más de 100 células positivas, con una mediana de 14 y una ratio IgG4/IgG menor de 0,4 en todos los casos. Por lo tanto, tan solo un porcentaje pequeño de los casos presentó un incremento de células plasmáticas IgG4 y en ninguno de ellos se cumplían los criterios para el diagnóstico de enfermedad relacionada con IgG4.

5.2 Identificación de células plasmáticas clonales en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a neoplasia de células plasmáticas y síndrome POEMS

Se incluyeron en el estudio seis casos (Tabla 7) con neoplasia de células plasmáticas asociada a cambios tipo enfermedad de Castleman en la biopsia de ganglio linfático. De estos seis casos, tres correspondían a mujeres con síndrome POEMS y los otros tres a hombres, uno de ellos con síndrome POEMS y los otros dos con neoplasia de células plasmáticas con amiloidosis AL y mieloma múltiple, respectivamente. La mediana de edad fue de 59 años (rango 49-79).

E/S	Datos clínicos	Laboratorio	Componente M (suero)	Tamaño y morfología GL	Médula ósea	Diagnóstico
79/M	Fiebre, pérdida de peso, lesiones osteolíticas, amiloidosis AL	Proteinuria, anemia, hipoalbuminemia proteína C reactiva elevada, trombopenia	Indetectable	1,2 cm, PC	>10% células plasmáticas lambda Amiloidosis AL	NCP/MM, amiloidosis AL
49/F	Polineuropatía, hepatoesplenomegalia edema, papiledema, lesiones osteoescleróticas	Proteinuria, trombocitosis	IgA lambda (0,54 g/dl)	2 cm, HV	>10% células plasmáticas IgA lambda	POEMS
57/F	Polineuropatía desmielinizante, tetraparesia, poliadenopatía, hipertricosis, eritrodermia	Trombocitosis	Indetectable	2 cm, HV	Plasmocitosis reactiva (<10%), hiperplasia megariocitos	EC variante POEMS
59/M	Plasmocitoma (cavum), poliadenopatía, hipotiroidismo, amiloidosis AL	VSG elevada	IgG lambda (0,2 g/dl)	1,2 cm, HV	Plasmocitosis reactiva (<10%)	NCP, amiloidosis AL
70/M	Polineuropatía desmielinizante, poliadenopatía	VEGF elevado	IgG lambda (0,38 g/dl)	1,6 cm, PC	Plasmocitosis reactiva (<10%), hiperplasia megariocitos	POEMS
62/F	Lesiones osteoblásticas, poliadenopatía, polineuropatía	Trombocitosis	IgA lambda (0,59 g/dl)	2 cm, PC	Linfoplasmocitoide >10% IgA lambda hiperplasia megacariocitos	POEMS

Tabla 7. Resumen serie ECM-NCP/POEMS. E/S: edad/sexo. M: masculino. F: femenino. VSG: velocidad de sedimentación globular. VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. PC: plasmocelular. HV: hipervascular.

5.2.1 Biopsias de ganglio linfático

Se analizaron seis muestras de pacientes (Figura 11) con diagnóstico confirmado de síndrome POEMS (n=4) o neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple (n=2). Tres de los seis casos mostraron un patrón rico en plasmáticas, mientras que los otros tres fueron hipervasculares, anteriormente patrón hialino-vascular. Por ende, en tres de los casos se observó una expansión de la paracorteza y de la médula del ganglio linfático a expensas de una proliferación de células plasmáticas (Grado 3) dispuestas en nidos. Por otro lado, los tres casos restantes mostraron grados altos de regresión de centros germinales y prominencia de células dendríticas (Grado 3 y Grado 2, respectivamente) con plasmocitosis limitada (Grado 1). La hiperplasia de centros germinales no fue una característica presente en estos casos (Grado 0 en cinco casos y Grado 1 en un caso). Además, en casos aislados se observó atipia citológica y binucleación de células plasmáticas.

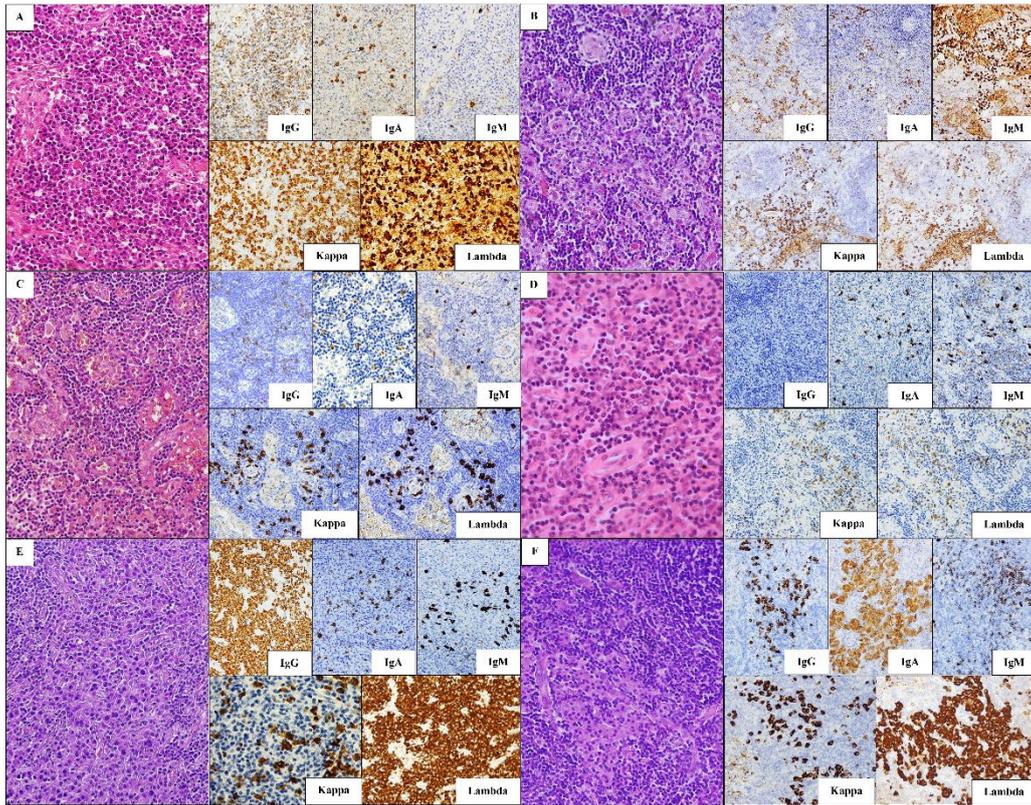


Figura 11. Biopsia ganglionar de los seis casos con ECM-POEMS. Obsérvese como el estudio inmunohistoquímico revela dos patrones de infiltración de células plasmáticas.

Mediante estudio inmunohistoquímico se detectó la existencia de una población de células plasmáticas monotípicas en dos de los seis casos (33%). Ambos con restricción de cadena ligera lambda y con isotipo de la inmunoglobulina IgA e IgG. Los otros cuatro no presentaron una monotipia evidente y el isotipo predominante fue IgG. El estudio inmunohistoquímico permitió identificar dos patrones de infiltración de células plasmáticas. Los casos clasificados como monotípicos presentaron láminas o sábanas de células plasmáticas, mientras que en aquellos considerados como politépicos las células plasmáticas se encontraban dispersas.

Por su parte, el estudio de clonalidad linfoide B mostró una población clonal de células plasmáticas en cinco de los seis casos estudiados (83%), de modo que se observó un patrón policlonal en un único caso.

Así, se identificaron reordenamientos de la cadena pesada de la inmunoglobulina en cuatro casos y clonalidad de cadenas ligeras (IgK, IgKde e IgL) en tres casos. De estos cinco casos, dos de ellos mostraron ambos reordenamientos, tanto de cadena pesada como de cadena ligera, los otros tres presentaron reordenamiento o bien de cadena pesada o bien de cadena ligera (Figura 12, Tabla 8).

En definitiva, el análisis de clonalidad detectó una población clonal de células plasmáticas en tres de los casos considerados como politépicos por inmunohistoquímica. Por tanto, el estudio de clonalidad linfoide B mejoró la detección de la neoplasia subyacente en tres de los cuatro casos politépicos mediante inmunohistoquímica (75%).

A modo de comparación, se sometió a un análisis de clonalidad un conjunto de casos de ECMi (4 casos) y ECM-HHV8 (8 casos). Los 12 casos mostraron patrones policlonales para IgH y cadenas ligeras, consistentes con los hallazgos inmunohistoquímicos (Tabla 8).

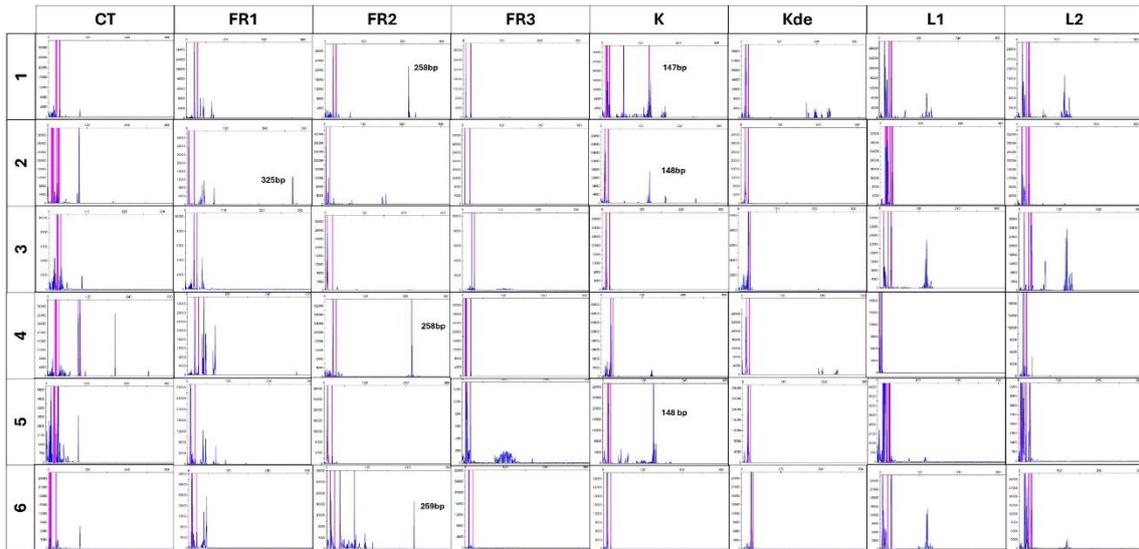


Figura 12. Resultados del estudio de clonalidad linfóide B de los seis casos con ECM-NCP/POEMS. En la primera columna se observa el control de talla (CT) importante para valorar la calidad del ADN. Como se puede apreciar se estudiaron reordenamientos en la cadena pesada de la Ig (FR1, FR2 y FR3) y en las cadenas ligeras (IgK, IgKde, IgL1 e IgL2). Se siguió el protocolo *Euroclonality/Biomed2*.

Diagnóstico	IHQ	IgH	IgK-IgKde	IgL	Conclusión
NCP/MM amiloidosis AL	IgG politípica	FR2 CLONAL (258bp)	IgK CLONAL (147 bp)	Policlonal	CLONAL
POEMS	IgG politípica	FR1 CLONAL (325bp)	IgK CLONAL (148 bp)	-	CLONAL
EC variante POEMS	IgG politípica	-	-	Policlonal	POLICLONAL
NCP/amiloidosis AL	IgG politípica	FR2 CLONAL (258bp)	-	-	CLONAL
POEMS	IgG lambda	Policlonal	IgK CLONAL (148 bp)	-	CLONAL
POEMS	IgA lambda	FR2 CLONAL (259bp)	-	Policlonal	CLONAL
ECMi	Polítípica	Policlonal	-	-	POLICLONAL
ECMi	Polítípica	Policlonal	Policlonal	-	POLICLONAL
ECMi	Polítípica	-	Policlonal	Policlonal	POLICLONAL
ECMi	Polítípica	Policlonal	Policlonal	-	POLICLONAL
HHV-8	IgM lambda	Policlonal	-	-	POLICLONAL
HHV-8	IgM lambda	-	Policlonal	-	POLICLONAL
HHV-8	IgM lambda	Policlonal	Policlonal	Policlonal	POLICLONAL
HHV-8	IgM lambda	Policlonal	-	-	POLICLONAL
HHV-8	IgM lambda	Policlonal	-	Policlonal	POLICLONAL
HHV-8	IgM lambda	Policlonal	Policlonal	-	POLICLONAL
HHV-8	IgM lambda	Policlonal	Policlonal	-	POLICLONAL
HHV-8	IgM lambda	Policlonal	Policlonal	Policlonal	POLICLONAL

Tabla 8. Resumen de los hallazgos del estudio inmunohistoquímico y de clonalidad linfóide B de los 18 casos.

5.2.2 Biopsias de médula ósea

Dispusimos de muestras de médula ósea (Figura 13) en los seis casos de ECM-NCP/POEMS. Tres de ellos presentaron un infiltrado significativo (>10%) de células plasmáticas monotípicas; dos de estos tres casos cumplían criterios de síndrome de POEMS y el caso restante fue categorizado como mieloma múltiple con amiloidosis primaria (AL) asociada.

Mediante estudio inmunohistoquímico, los tres casos presentaron una restricción de cadena ligera lambda con expresión de IgA en dos de ellos, lo que coincide con el componente M y las células plasmáticas monotípicas en la biopsia de ganglio linfático correspondiente.

En los otros tres casos restantes no se evidenció una población monotípica de células plasmáticas. Todos ellos correspondían a síndrome POEMS y presentaron hiperplasia megacariocítica, planteando en uno de los casos el diagnóstico diferencial con trombocitemia esencial.

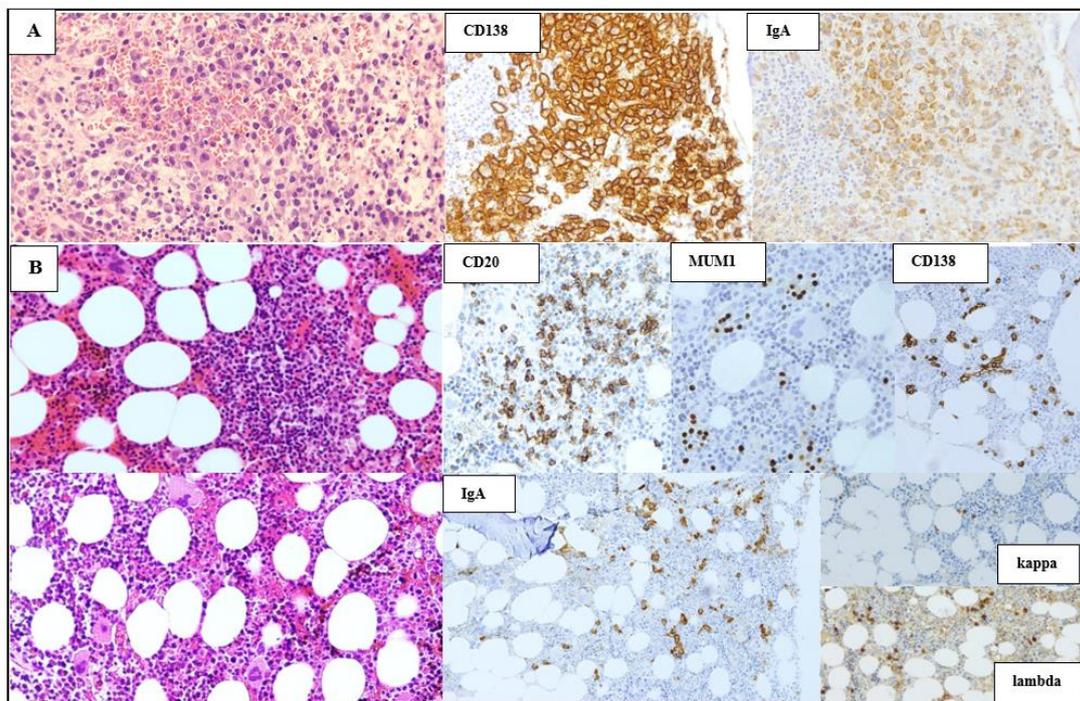


Figura 13. Médula ósea dos casos con ECM-POEMS. **A)** Caso 2. Se observan agregados nodulares e intersticiales (>10%) de plasmáticas CD138, IgA lambda. Mediante CMF se identificó un 0,18% de plasmáticas lambda con expresión de CD138 y CD56. **B)** Caso 6. Se evidenció un infiltrado linfoplasmocitoide intersticial y nodular (>10%) con expresión de CD20, CD138, MUM1, IgA y restricción lambda. Además, hiperplasia megacariocítica. Por CMF un 0,04% de células plasmáticas lambda con expresión de CD45 disminuido y CD19 negativo.

5.3 Caracterización de la expresión de proteínas relacionadas con la activación de JAK/STAT en procesos linfoproliferativos

Con el fin de categorizar la expresión de proteínas relacionadas con la activación de JAK/STAT, se incluyeron en el estudio 16 casos correspondientes a linfadenitis virales/inmunes y 212 casos con diagnóstico de LBDCG.

5.3.1 Linfadenitis virales/inmunes

En cuanto a los casos de linfadenitis virales/reactivas (Tabla 9), en todos ellos se valoraron tanto los hallazgos histológicos como los datos clínicos y de laboratorio pertinentes para el diagnóstico. Finalmente se seleccionaron para el estudio cuatro casos (25%) con diagnóstico de enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática, 10 casos (63%) correspondientes a enfermedad de Castleman asociada al HHV-8 y dos casos (12%) de hiperplasia linfoide reactiva asociada al VEB. La edad promedio de estos pacientes era de 58 años, situándose la edad mínima en 30 años y la máxima en 82 años. La mayoría de ellos era hombres, con una relación 3:1, siendo 12 hombres y cuatro mujeres.

Hallazgos histopatológicos

Morfológicamente en conjunto los casos de ECMi presentaron centros germinales mayoritariamente atróficos o hiperplásicos, con prominencia de CDF y plasmocitosis interfolicular politípica de predominio IgG. Todos los pacientes, de acuerdo con los criterios diagnósticos (Tabla 3), presentaban adenopatías en más de una localización y alteraciones clínicas, como la presencia de edemas o síndrome constitucional, es decir asociación de astenia, anorexia y pérdida significativa de peso, o de laboratorio, como anemia, trombopenia o insuficiencia renal.

Respecto a los casos de ECM-HHV8, estos mostraban una población de células plasmáticas, dispuestas en sábana en el espacio interfolicular, sin atipias citológicas ni restricción de cadenas ligeras. Además, en la capa del manto se apreciaba la existencia de inmunoblastos que resultaban positivos para HHV8, con restricción de cadenas ligeras lambda e isotipo IgM. Todos los pacientes presentaban enfermedad multicéntrica. Adicionalmente, en tres de los casos se observó en la periferia del ganglio linfático, en el área subcapsular, una proliferación vascular con hendiduras ocupadas por hematíes, cuyas células eran de aspecto fusiforme con citoplasma eosinófilo y núcleo alargado e hiper cromático, que diseccionaba las fibras colágenas. Estos hallazgos son consistentes con sarcoma de Kaposi.

Histológicamente los ganglios linfáticos en estos casos, hallazgos encontrados en las dos muestras de la serie de linfadenitis asociadas a VEB, se caracterizan por presentar una arquitectura con folículos linfoides prominentes y, típicamente, en el área paracortical una proliferación de células mononucleares con cromatina vesicular y un nucleolo central basófilo, correspondientes a inmunoblastos reactivos. Igualmente, no así en nuestra cohorte, puede observarse necrosis y células aisladas tipo Hodgkin o Redd-Sternberg. Asimismo, se observa expresión de EBV-EBER en blastos. (*Aguilera & Auerbach, 2018*)

Hallazgos inmunohistoquímicos

En relación con la expresión de P-STAT3, se buscó primeramente que existiese control interno, con positividad en células endoteliales. Posteriormente, se evaluó su expresión considerando el número de células plasmocitoides o plasmablastos positivos respecto a la totalidad de dicha celularidad, analizando su localización en los distintos compartimentos del ganglio linfático y la expresión de otros marcadores como CD138, HHV-8 o EBV-LMP1.

Las muestras correspondientes a enfermedad de Castleman asociada a HHV8 presentaban expresión significativa de P-STAT3 (Tabla 9, Figuras 15 y 16), observándose positividad en células plasmáticas interfoliculares, plasmablastos intrafoliculares y células HHV-8 positivas. En los casos de hiperplasia linfoide reactiva asociada a VEB (Figura 14) y de enfermedad de Castleman multicéntrica idiopática el porcentaje de células positivas para P-STAT3 fue menor del 5% (Tabla 9).

Linfadenitis virales/inmunes	
Número de pacientes	16
Hiperplasia linfoide reactiva VEB+	2
ECMi	4
ECM-HHV8+	10
Edad (promedio, mín-máx) (30-82)	58
Sexo	
Mujeres	4 (25%)
Hombres	12 (75%)
Expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 (casos con positividad >5% en células plasmocitoides y plasmablastos/casos valorados)	
Hiperplasia linfoide reactiva VEB+	0/2
ECMi	0/4
ECM-HHV8+	8/9

Tabla 9. Resumen de las características epidemiológicas y de la expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 de la serie de linfadenitis virales/inmunes.

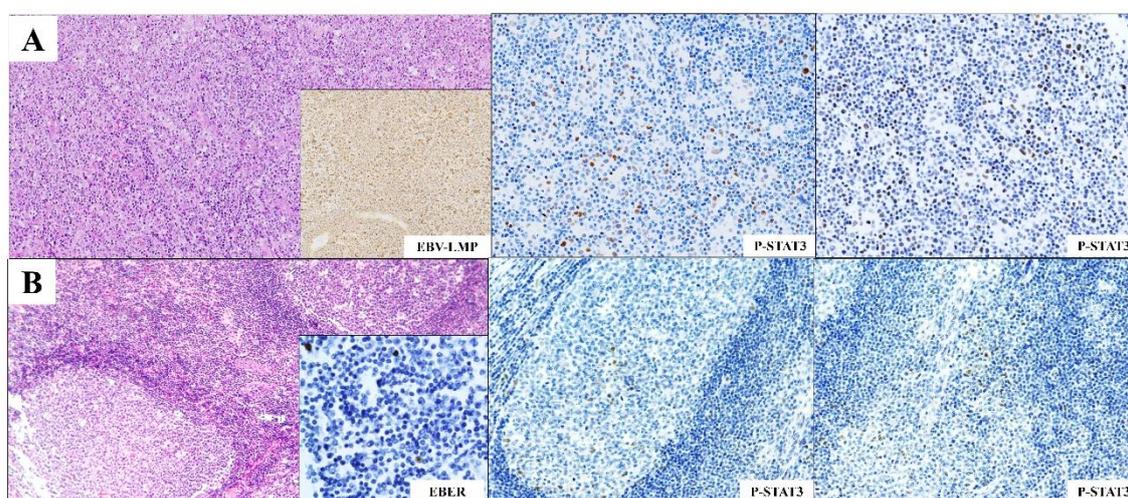


Figura 14. Detalle morfológico (H&E) de ambos casos con hiperplasia linfoide reactiva asociada a VEB. **A)** Este caso mostraba una expansión del área interfolicular por inmunoblastos B y T, positivos para CD20 y CD30, EBV-LMP1 y MUM1, sin restricción de cadenas ligeras. En el espacio interfolicular, se observan aislados blastos positivos para P-STAT3 (<5%). **B)** Morfológicamente se observó una expansión masiva de los centros germinales, parcheada con áreas de células B monocitoides localizadas en los senos medulares y focos de hiperplasia paracortical con macrófagos y focal eritrofagocitosis. Existe positividad frente a EBER en el estudio inmunohistoquímico. La expresión de P-STAT3 se da en macrófagos y células endoteliales.

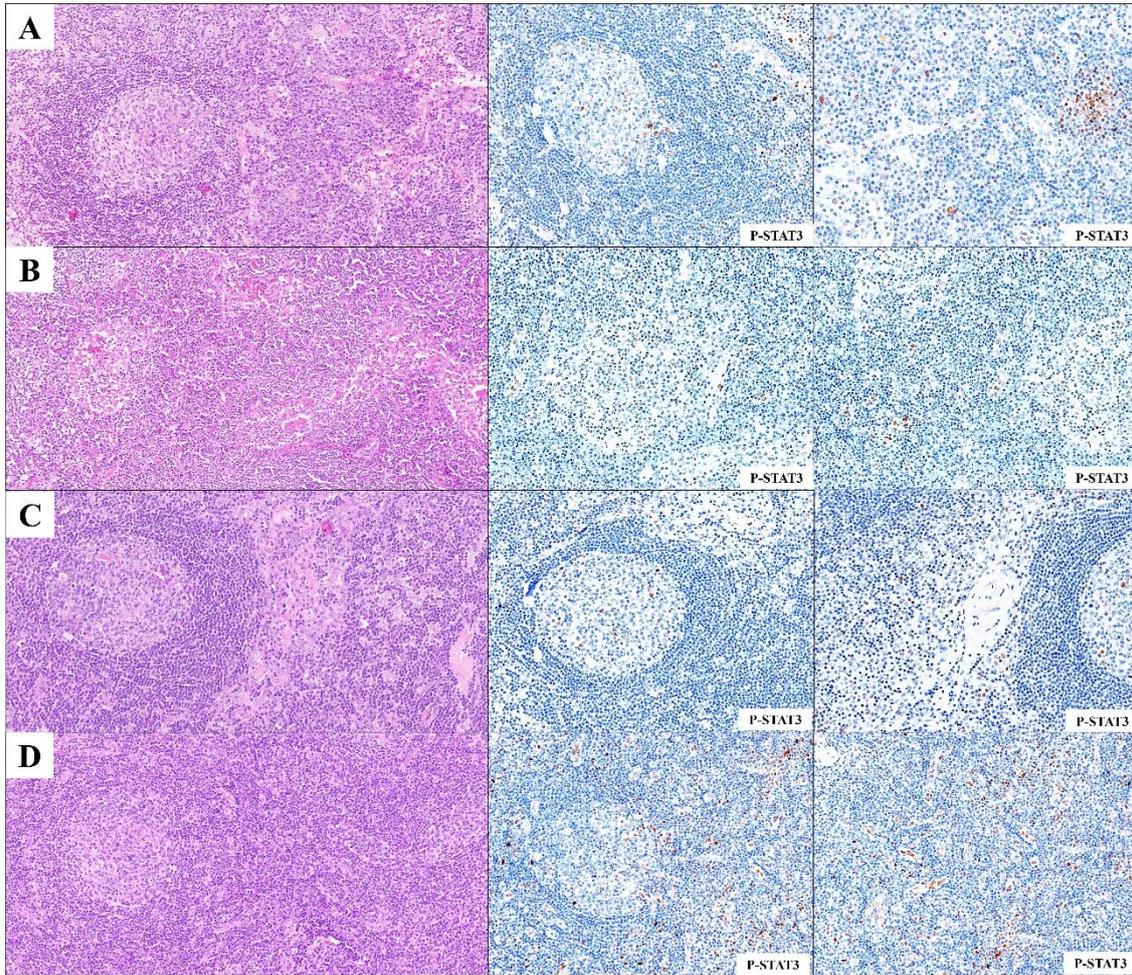


Figura 15. Detalle morfológico (H&E) de los casos con diagnóstico de ECMi. Los casos **A**, **B** y **D**, se consideraron positivos presentando aisladas células plasmocitoides o plasmablastos positivos para P-STAT3. El caso **A** presentaba pequeños agregados de células positivas, así como positividad citoplasmática en células plasmáticas maduras. Respecto al caso **C**, fue considerado negativo al presentar positividad en macrófagos.

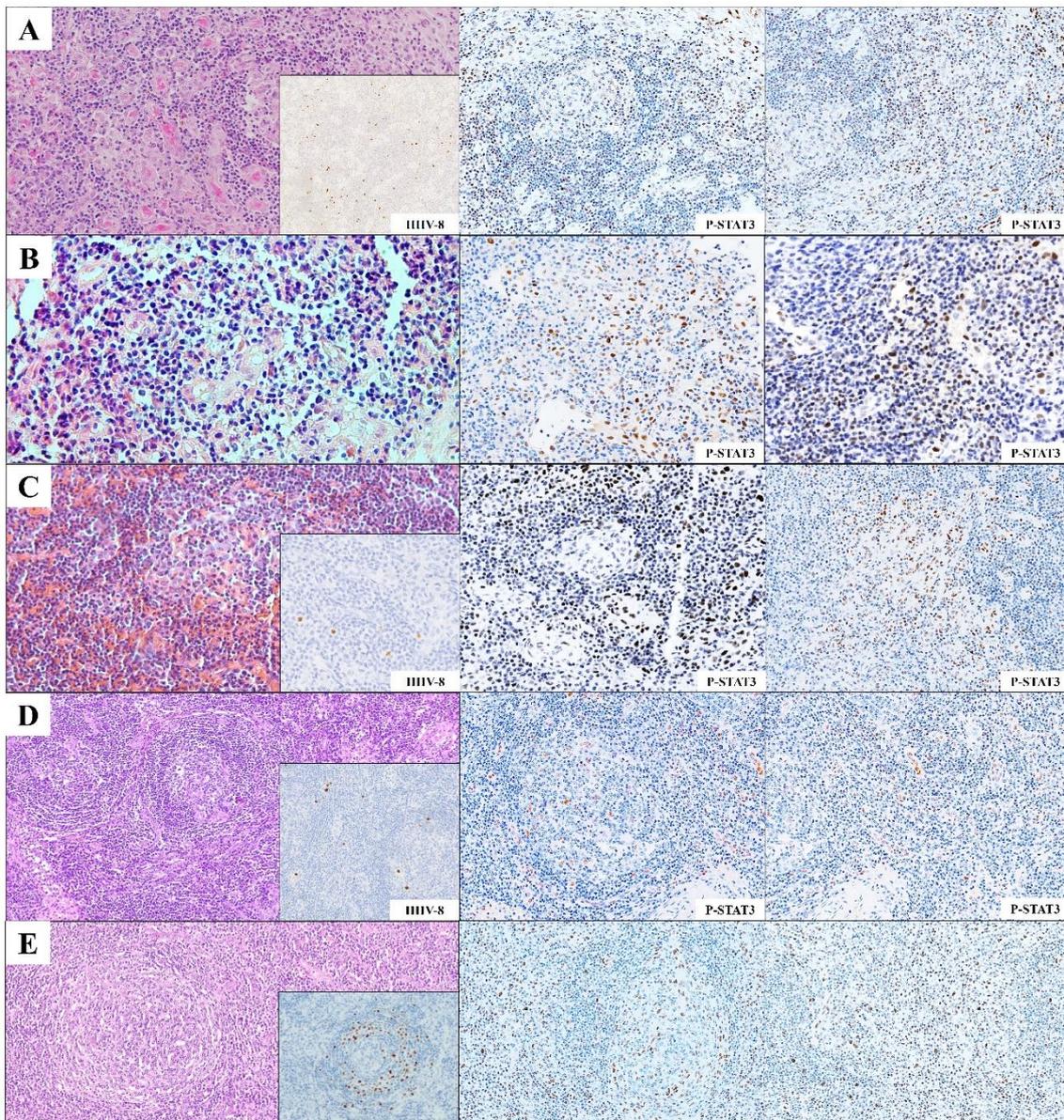


Figura 16 (continúa en la página siguiente). Detalle morfológico (H&E) de los casos con diagnóstico de ECM-HHV8 (continúa en la siguiente página). Respecto al caso **B** no se pudo recuperar la laminilla correspondiente a la tinción HHV-8, por lo que no se dispone de la fotografía. Los casos **C** y **D** asociaban sarcoma de Kaposi. Los cuatro primeros casos mostraban celularidad aislada positiva para HHV-8, siendo más numerosa y en la localización típica en el manto del folículo linfoide en caso **E**. Todos los casos presentaban grados variables pero elevados de hipervascularización, siendo importante distinguir la celularidad endotelial para establecer la valoración. En todos ellos se encontraban células plasmocitoides o plasmablastos positivos para P-STAT3 en el área intrafolicular o interfolicular, siendo, como se puede apreciar, más acusada esta población en los casos **A** y **E**.

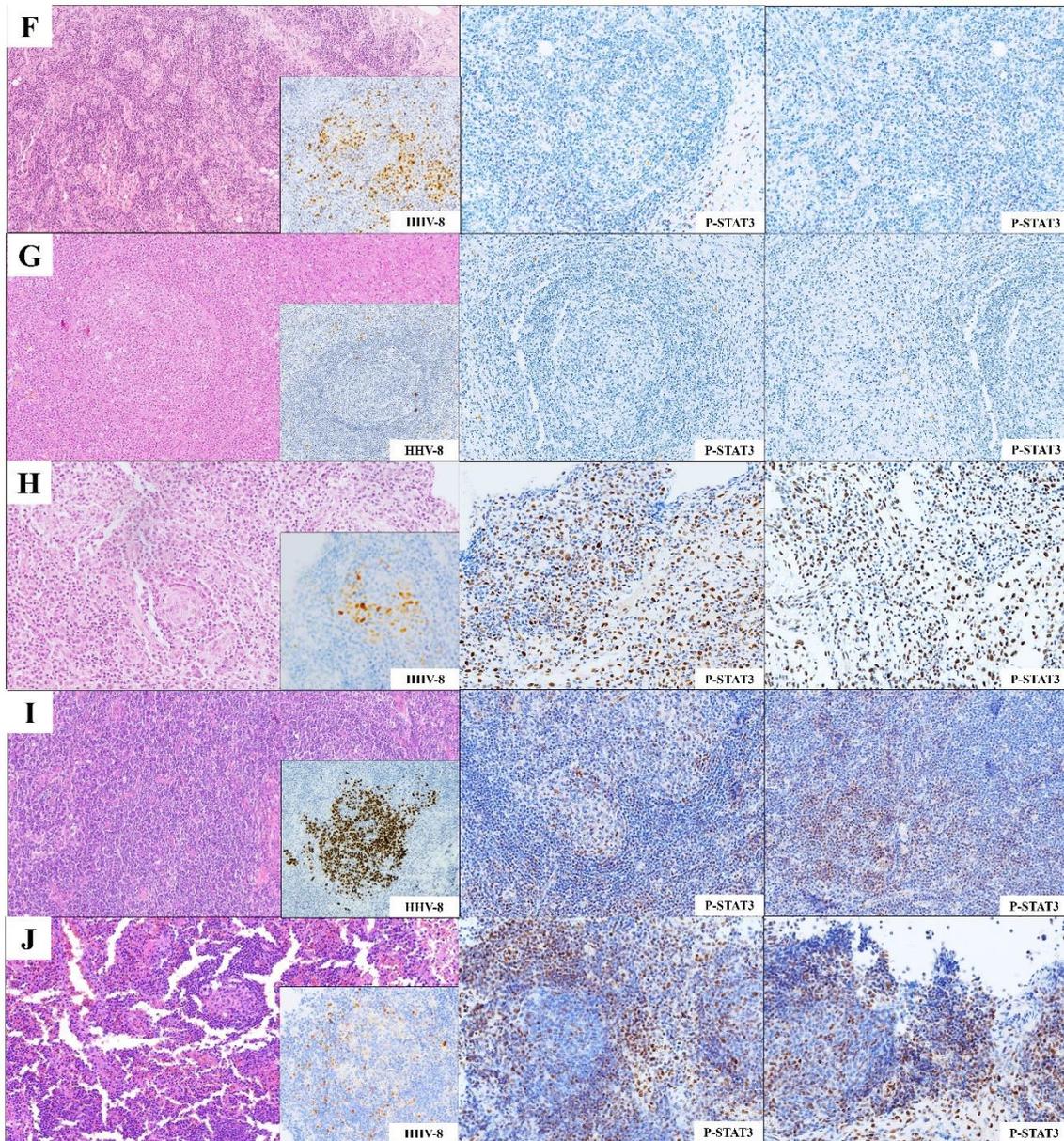


Figura 16, continuación. Detalle morfológico (H&E) de los casos con diagnóstico de ECM-HHV8. De este panel los casos **G** e **I** presentaban sarcoma de Kaposi asociado. Obsérvese en los casos **F**, **H** e **I**, la ocupación casi completa del folículo linfoide por inmunoblastos positivos para HHV8, a diferencia de en los dos casos restantes en los que la celularidad positiva es mucho más discreta. De este panel, el caso **F** fue considerado negativo y el caso **G** no pudo valorarse al no existir control interno positivo. Los tres últimos casos (**H**, **I** y **J**) presentaron positividad difusa en células plasmocitoides o plasmablastos en la zona del manto, interfolicular o incluso intrafolicular.

5.3.2 Linfomas B de célula grande

Datos epidemiológicos y diagnósticos de la serie

En el análisis histopatológico de los casos de linfoma se siguieron los criterios diagnósticos vigentes en la OMS, realizándose el estudio morfológico, fenotípico y molecular pertinente en cada caso y clasificándolos de acuerdo con las 18 entidades reconocidas de linfoma B difuso de célula grande.

La distribución por entidades de los 205 casos diagnosticados de LBDCG fue 146 casos (71%) de linfoma B difuso de célula grande NOS, 18 casos (9%) de linfoma plasmablastico, 15 (7%) de linfoma B de célula grande VEB positivo, ocho (4%) de linfoma B de alto grado NOS, 10 (5%) de linfoma B de célula grande/de alto grado doble *hit* (MYC y BCL2), tres (2%) de linfoma mediastínico primario de células B grandes, dos (1%) de linfoma B de célula grande HHV-8 positivo, dos (1%) de linfoma B de célula grande rico en células T e histiocitos y uno (0,5%) de linfoma cutáneo primario B difuso de célula grande-tipo pierna (Tabla 10).

Distribución por fenotipo según la célula de origen

En 175 de los 205 casos se obtuvieron los datos para valorar el fenotipo de célula de origen mediante estudio inmunohistoquímico y conforme al algoritmo de Hans (Figura 3), que incluye el análisis de tres marcadores, a saber, CD10, BCL6 e IRF4/MUM1. Por este método, el 64% (n=112) de los casos fueron *GCB* y el 36% (n=63) *no-GCB*.

Análisis de mutaciones en MYD88L265P y reordenamientos de MYC, BCL2 y BCL6

Se realizó *FISH* de c-MYC, BCL2 y BCL6. Así, de los 87 casos en los que se estudió la existencia de reordenamientos de c-MYC, 26 casos (30%) resultaron positivos. Por su parte, el reordenamiento de BCL2 fue analizado en 73 casos, obteniéndose un resultado positivo en 18 (24%) de ellos. La presencia de reordenamientos concurrentes en c-MYC y BCL2 se dio en 10 casos, por lo que fueron clasificados como doble *hit*. BCL6 se analizó en 60 casos y resultó reordenado en 24 (40%) de ellos. Un total de 17 casos presentaron reordenamientos de BCL6 y uno de los otros dos genes estudiados, siete de BCL2 y BCL6 y 10 de c-MYC y BCL6.

Desde el punto de vista genético, se estudió en 44 casos y mediante PCR-alelo específica la mutación somática L265P en el gen MYD88 (MYD88pL265P). Se detectó mutación de MYD88 en ocho casos de 44 analizados (18%), todos ellos con diagnóstico de LBDCG-NOS y fenotipo de célula de origen *no-GCB*.

Distribución por subtipo genético

Se realizó secuenciación del exoma completo de 70 muestras y se obtuvo un subtipo genético según *Lymphgen 2.0*. El 51% de los casos analizados (n=36) fueron asignados a un subtipo específico, mientras que el 49% (n=34) fueron considerados no clasificados, es decir subtipo *Other*.

El subtipo genético más prevalente fue ST2 y combinados de ST2 (20/70, 29%), EZB o combinados de EZB (8/70, 11%), BN2 (5/70, 7%) y, por último, MCD (3/70, 4%).

Un total de 13 casos (19%) resultaron en subtipos combinados, siendo el más común ST2/EZB con seis casos. La distribución del resto de subtipos combinados se describe a

continuación: ST2/BN2 (n=2), ST2/BN2/EZB (n=1), ST2/EZB/MCD (n=1), ST2/EZB/BN2/MCD (n=1) y, finalmente, EZB/MYC (n=2).

Asociación entre fenotipo y subtipo genético

Por otra parte, se puede valorar la asociación entre el fenotipo según célula de origen y el subtipo genético.

Así, se vio que los subtipos genéticos BN2 y MCD resultaron ser en su mayoría *no-GCB*, con porcentajes del 80% y el 67%, respectivamente.

Respecto a ST2 y combinados en global, el 55% fueron *GCB*.

En relación con el subtipo genético EZB, un 83% de los casos (5/6 muestras) fueron *GCB*. El único caso EZB y *no-GCB* se diagnosticó de LBDCG VEB positivo. Por su parte, los dos casos combinados EZB/MYC, igualmente *GCB*, fueron clasificados como linfoma B de alto grado doble *hit*, al poseer reordenamientos de *c-MYC* y *BCL2*.

Caracterización de los niveles de expresión inmunohistoquímica de P-STAT3

La cuantificación visual resultó valorable en un total de 198 casos (90%, 198/212). En los casos analizados sobre TMA, se cuantificó por duplicado, en dos muestras cilíndricas diferentes, y se halló la media de ambos valores, obteniendo finalmente una mediana de porcentaje de expresión del 10% con un mínimo del 0% y un máximo del 90%.

En la Figura 17 se muestran microfotografías de la tinción inmunohistoquímica para P-STAT3, donde se pueden apreciar distintos niveles de expresión, de los casos de LBDCG. La Tabla 10 resume los hallazgos en la serie de linfomas.

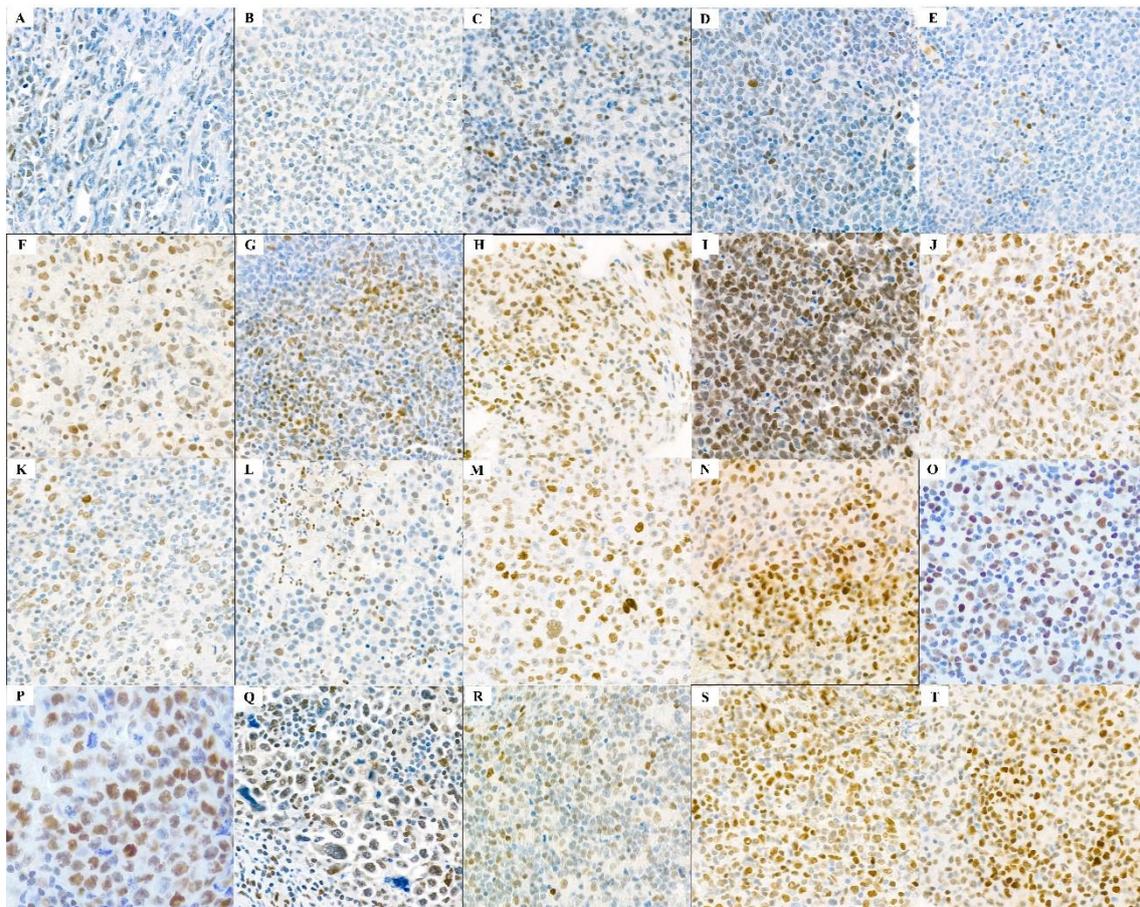


Figura 17. Expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 (40x), en porcentajes variables cuantificados visualmente. **A, B, C y D)** Casos de linfoma B difuso de célula grande (LBDCG NOS) con expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 en células tumorales en porcentajes que varían entre menos del 10% y el 10%, y subtipo genético ST2; en el caso C el subtipo es combinado ST2/EZB. **E)** LBDCG NOS EZB con nivel de expresión del 10%. **F)** Linfoma plasmablástico (PBL, por sus siglas en inglés) con positividad para HHV-8 y expresión de P-STAT3 del 30%. **G)** LBDCG NOS, ST2/BN2 que muestra una positividad nuclear en las células tumorales de alrededor del 50%. **H, I y J)** Todos ellos LBDCG NOS con subtipos genéticos diferentes combinados de ST2, respectivamente serían ST2/EZB, ST2/BN2/MCD y ST2/BN2. Los porcentajes de positividad de P-STAT3 se situarían entre el 80-90%. **K y L)** PBL negativo y positivo para VEB, respectivamente, con expresión del 10% de P-STAT3. **M)** LBDCG NOS subtipo genético *Other* con un 30% de positividad para P-STAT3. **N)** LBDCG subtipo genético *Other* con un 60% de expresión de P-STAT3. **O y P)** LBDCG VEB positivo y LBDCG HHV-8 positivo con un 70% de expresión. **Q y R)** Los porcentajes de positividad en estos casos se sitúan alrededor del 70%, se corresponden con LBDCG NOS subtipo genético MCD y linfoma B de alto grado (LBAG NOS) subtipo genético *Other*. Por último, **S y T)** Son casos de LBDCG NOS subtipo genético *Other*, con una expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 de alrededor del 80-90%.

Tabla 10. Resumen de las características de la serie de linfomas	
Edad	61 (26-96) ^a
Sexo (mujeres/hombres)	16 (35%) /30 (65%) ^b
Diagnóstico	N.º total de pacientes: 212
Linfoma B difuso de célula grande NOS	146 (69%)
Linfoma plasmablastico	18 (8%)
Linfoma B difuso de célula grande VEB +	15 (6%)
Linfoma B de alto grado NOS	8 (4%)
Linfoma B difuso de célula grande DH (c-MYC & BCL2)	7 (3%)
Linfoma B de alto grado DH (c-MYC & BCL2)	3 (2%)
Linfoma mediastínico primario de células B grandes	3 (2%)
Linfoma B difuso de célula grande NOS HHV8 +	2 (1%)
Linfoma B de célula grande rico en células T e histiocitos	2 (1%)
Linfoma cutáneo primario B difuso de célula grande-tipo pierna	1 (0,5%)
Linfoma B folicular	6 (3%)
Linfoma de Burkitt	1 (0,5%)
Fenotipo célula de origen (HANS)	Total valorables: 175/212
GCB	112 (64%)
NO-GCB	63 (36%)
Mutación MYD88pL265P (PCR-AE)	Total valorados: 44/212
Mutado	8/44 (18%)
<i>Wild-type</i>	NO-GCB 8/8 (100%) 36/44 (82%) GCB 24/36 (67%) / NO-GCB 11/36 (31%)
Subtipos genéticos	Total valorados: 70/212
ST2	9/70 (13%) GCB 6/9 (67%) / NO-GCB 3/9 (33%)
EZB	6/70 (9%) ^c GCB 4/6 (67%) / NO-GCB 1/6 (17%)
BN2	5/70 (7%) GCB 1/5 (20%) / NO-GCB 4/5 (80%)
MCD	3/70 (4%) ^c NO GCB 2/3 (67%)
ST2/EZB	6/70 (9%) ^c GCB 4/6 (67%) / NO-GCB 1/6 (17%)
EZB/MYC	2/70 (3%) GCB 2/2 (100%)
ST2/BN2	2/70 (3%) NO GCB 2/2 (100%)
ST2/BN2/MCD	1/70 (1%) NO GCB 1/1 (100%)
ST2/EZB/MCD	1/70 (1%) GCB 1/1 (100%)
ST2/EZB/BN2/MCD	1/70 (1%) NO-GCB 1/1 (100%)
<i>Other</i>	34/70 (49%) ^c GCB 14/34 (41%) / NO-GCB 15/34 (44%)
Expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 (Total valorables: 198/212)	Mediana (mínimo-máximo)
Cuantificación semicuantitativa (n=198)	10% (0-90%)
Cuantificación automática (QuPath)	
Subgrupo ST2 (n=20)	7,70% (0,35-90,03%)
Subgrupo Other (n=20)	17,42% (0,05-85,16%)
Subgrupo EZB (n=8)	13,68% (1,74-42,25%)
Subgrupo BN2 (n=5)	2,50% (1,26-6,50%)
Subgrupo MCD (n=3)	6,18% (5,78-54,15%)

^a Edad promedio, mínima y máxima calculada sobre los 87 pacientes de los que se dispone de dato. ^b Porcentaje calculado sobre los 46 pacientes de los que se dispone de dato. ^c No se dispone del dato de fenotipo de célula de origen en todos los casos, es por ello por lo que la suma de GCB y no-GCB no coincide con el total.

Realizando un desglose de la expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 por entidades diagnósticas (Tabla 11) y considerando como casos positivos aquellos con una expresión mayor del 10%, se obtuvieron los siguientes resultados:

- De los 146 casos con diagnóstico de LBDCG NOS la tinción resultó valorable en 138 casos. La IHQ resultó positiva en un 51% de los casos. La mediana de expresión, mediante cuantificación visual, fue del 10%.
- Respecto a los 10 casos que presentaron reordenamiento de c-MYC y BCL2, (LBDCG/alto grado doble *hit*) globalmente presentaron resultados similares al LBDCG NOS, con un 50% de casos positivos.
- Los ocho casos diagnosticados de LBDCG de alto grado NOS presentaron una mediana de expresión del 10% y el 63% de los casos fue considerado positivo.
- En cuanto a los casos de linfoma plasmablástico, ocho de los 18 casos fueron positivos (44%). En 15 de los 18 casos se realizó estudio de la presencia de infección por VEB, resultando ocho de ellos positivos. De esos ocho casos, cinco (63%) presentaron sobreexpresión de P-STAT3. Respecto a los siete casos negativos para VEB, en dos de ellos la tinción para P-STAT3 no resultó valorable, en otros dos resultó positiva y en los tres restantes negativa. Al comparar los resultados de la expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 en este grupo de casos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,24$) entre plasmablásticos VEB positivos y VEB negativos.
- Los casos con mayor porcentaje de células tumorales positivas para P-STAT3 fueron, además de las muestras con morfología de alto grado, aquellos relacionados con infección viral, ya sea por VEB o HHV-8. En cuanto al LBDCG VEB positivo, presentaron sobreexpresión nueve de 15 casos (60%). Por su parte, los dos linfomas asociados con infección por HHV-8 presentaron un porcentaje de expresión del 90% y 70%.
- En este sentido, un 64% (16/25 casos) de la totalidad de los linfomas asociados a infección viral (VEB o HHV-8) y un 55% (86/161 casos) de todos los linfomas sin enfermedad vírica concomitante, presentaron expresión de P-STAT3. Sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Chi cuadrado, $p = 0,32$).

Tabla 11. Estudio inmunohistoquímico P-STAT3 por entidades diagnósticas de LBDCG	
	Nº casos positivos ($\geq 10\%$)
Linfoma B difuso de célula grande NOS	74/146 (51%)
Linfoma B de alto grado NOS	5/8 (63%)
Linfoma B difuso de célula grande/de alto grado DH (c-MYC & BCL2)	5/10 (50%)
Linfoma plasmablástico	8/18 (44%)
VEB positivo	5/8 (63%)
VEB negativo	2/7 (29%)
Linfoma B difuso de célula grande VEB +	9/15 (60%)
Linfoma B difuso de célula grande NOS HHV8 +	2/2 (100%)
Linfomas asociados a infección viral	16/25 (64%)

Por otro lado, se contrastaron los resultados obtenidos en el estudio inmunohistoquímico de P-STAT3 en los 112 casos con fenotipo por célula de origen *GCB* y 63 con fenotipo *no-GCB*. De los 112 casos *GCB*, el estudio fue valorable en 105 muestras, por su parte de los 63 casos *no-GCB* se pudieron valorar 61 pacientes. El número de casos con fenotipo *GCB* y considerados positivos para P-STAT3 fue de 55 (52%). Por su parte, 38 (62%) de los casos con fenotipo *no-*

GCB mostraron sobreexpresión de P-STAT3 (Tabla 12). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,088$).

La cuantificación automática se realizó mediante el *software QuPath*, calculando el porcentaje de células tumorales positivas respecto al total de células tumorales sobre secciones completas de TMA y por duplicado o sobre secciones equivalentes en muestras de mayor tamaño. Esta se efectuó en un total de 56 casos seleccionados a partir de los 70 casos clasificados por subtipo genético, 20 casos *Other*, 20 casos ST2, ocho EZB, cinco BN2 y tres MCD.

La mediana, valor mínimo y valor máximo por subgrupo genético se expresa a continuación:

- *Other*: 17,42% (0,05-85,16%).
- EZB y combinados de EZB: 13,68% (1,74-42,25%).
- ST2 y combinados de ST2: 7,70% (0,35-90,03%).
- MCD: 6,18% (5,78-54,15%).
- BN2: 2,50% (1,26-6,50%).

Las diferencias en los niveles de expresión de P-STAT3 entre subtipos genéticos fueron no significativas, excepto para el subtipo BN2 que mostró una expresión significativa reducida en comparación con el resto de los subtipos moleculares ($p < 0.001$).

En conclusión, la expresión de P-STAT3 es relativamente homogénea entre subtipos moleculares de LBDCG y diferentes fenotipos según la célula de origen. El subtipo BN2, sin embargo, no presenta expresión significativa de P-STAT3, sugiriendo ausencia de activación de la vía JAK/STAT3 en esta entidad molecular (Figura 18).

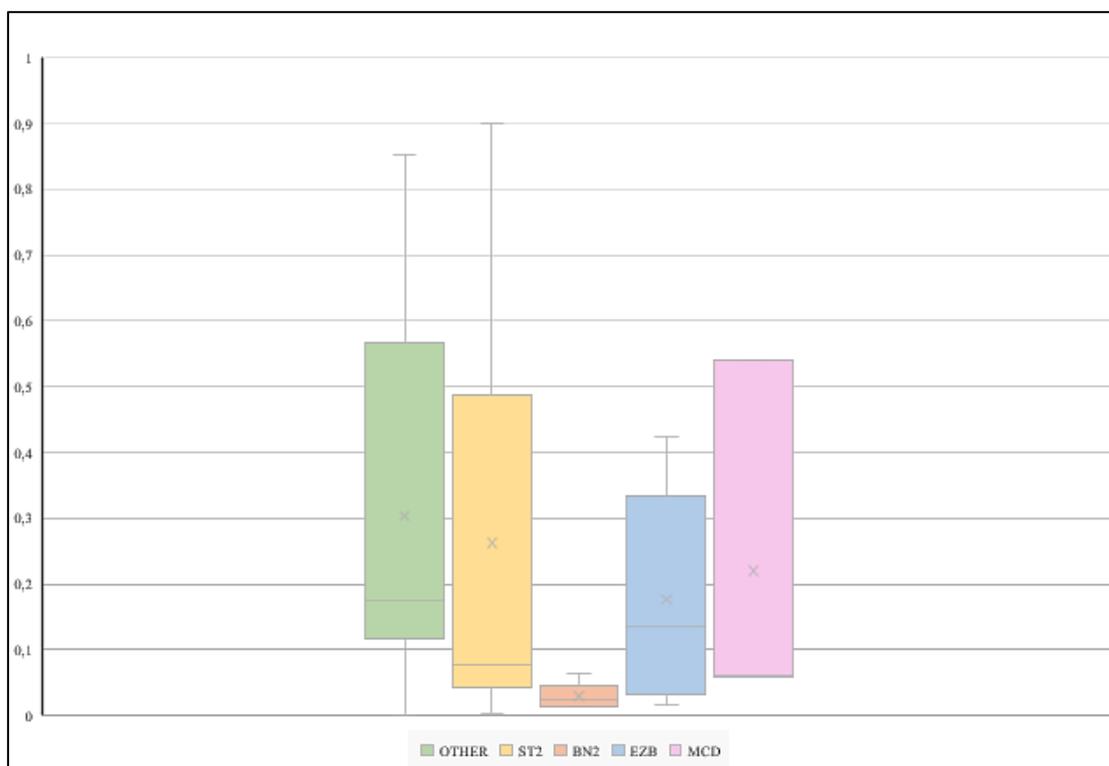


Figura 18. Gráfico comparativo de los niveles de expresión de P-STAT3 según subtipo genético.

Además, se realizó una comparación de los niveles de expresión de P-STAT3 entre los casos con mutación en el MYD88 (MYD88pL265P) y los casos *wild type*. Así, se vio que la mediana de expresión era mayor cuando existía la mutación, siendo de un 45% en los casos mutados y de un 10% en los no mutados, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,5$) (Figura 19, Tabla 12).

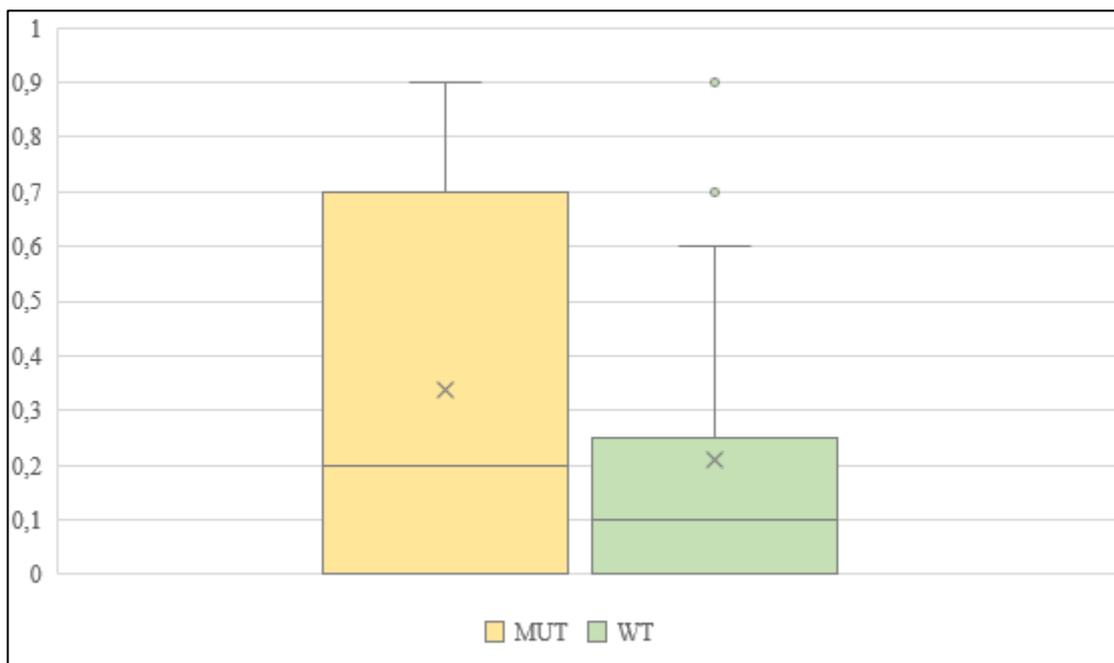


Figura 19. Gráfico comparativo de los porcentajes de expresión de P-STAT3 en casos con la mutación MYD88pL265P (MUT) y *wild type* (WT).

Tabla 12. Estudio inmunohistoquímico P-STAT3 según el estado mutacional de MYD88 y el fenotipo célula de origen

	Nº casos positivos ($\geq 10\%$)
Estado mutacional de MYD88	
MYD88pL265P	5/8 (63%)
Mediana (mínimo-máximo)	45% (0-90%)
MYD88 <i>wild type</i>	22/36 (61%)
Mediana (mínimo-máximo)	10% (0-90%)
Fenotipo célula de origen	
GCB	55/105 (52%)
no-GCB	38/61 (62%)

DISCUSIÓN

6. Discusión

6.1 Caracterización histopatológica de la enfermedad de Castleman

Nuestro conocimiento acerca de la EC ha evolucionado en los últimos tiempos. Así, en un principio se definía desde el punto de vista histopatológico (*Keller et al., 1972*) y actualmente se entiende como un patrón morfológico de afectación de los ganglios linfáticos asociado a diferentes entidades patológicas, que incluyen la ECU, la ECM-HHV8, ECM-NCP/POEMS o enfermedades autoinmunes con características de EC. Además, gracias al desarrollo de criterios de consenso para el diagnóstico, se reconoce la ECMi. (*Fajgenbaum et al., 2017a*)

En la definición y el diagnóstico de la EC son fundamentales las características histopatológicas en las biopsias de ganglio linfático. (*Oksenhendler et al., 2013*)

En el presente trabajo hemos aplicado los criterios histopatológicos recomendados para el diagnóstico de la ECMi en una serie de casos con EC, definidos de acuerdo con las características histológicas y clasificados en entidades concretas tras una adecuada correlación clínico-patológica.

De este modo, encontramos que la ECU, la ECM-HHV8 y la ECM-NCP/POEMS constituyen los imitadores más frecuentes de la ECMi. Teniendo en cuenta las características histopatológicas la hiperplasia de centros germinales fue un hallazgo relativamente característico de la ECMi y, por lo tanto, puede sugerir su diagnóstico, en contraste con otras entidades de EC plasmocelular.

Otras características histopatológicas también pueden ayudar en el diagnóstico diferencial, al ser prominentes en entidades específicas. Es así como la proliferación de CDF fue una característica constante en la ECU y además se presentó en grados significativamente más altos que en el resto de las entidades. La proliferación de CDF no es exclusiva de los centros germinales, sino que puede afectar igualmente a la región interfolicular y su asociación con esclerosis es específica de ECU. Es preciso destacar que en la mayoría de los casos de ECU se visualizaron zonas del manto con células dispuestas en capas de cebolla (*onion skin*), regresión de centros germinales y proliferación e hialinización de la vasculatura.

Aunque para este estudio excluimos los casos con tumor/sarcoma de CDF concurrente, es importante destacar que estos casos pueden presentar atipia de CDF y por tanto cumplir los criterios diagnósticos de tumor/sarcoma de CDF. Este patrón con hiperplasia prominente de células accesorias en la región interfolicular, se ha definido como variante rica en estroma (*Danon et al., 1993*) y puede ser consecuencia de una proliferación anormal de células dendríticas foliculares, conduciendo en algunos casos a una neoplasia franca. (*Lin & Frizzera, 1997; Piris et al., 2018*) Recientemente se ha sugerido que mutaciones somáticas en PDGFRB N666S pueden tener un papel patogénico en el desarrollo de esta neoplasia. Estas mutaciones han sido descritas en una fracción significativa de casos ECU-HV (17%) y se ha demostrado su restricción a células estromales, en línea con la creencia de que las células dendríticas foliculares neoplásicas son la base para el desarrollo de la ECU. (*Z. Li et al., 2019*)

Los casos de ECM-HHV8 presentaron grados significativamente elevados de hipervascularización respecto a otros subtipos de EC ($p < 0,05$). Sin embargo, la hiperplasia de centros germinales se mostró casi ausente, a diferencia de la plasmacitosis y la regresión de centros germinales que igualmente fueron características prominentes.

En todos los casos diagnosticados de ECM-HHV8 se demostró la existencia del virus HHV-8 en las muestras de ganglio linfático mediante estudio inmunohistoquímico contra el antígeno LANA-1. Asimismo, otros requerimientos para establecer el diagnóstico de ECM-HHV8 son la existencia de enfermedad multicéntrica y la positividad para IgM con restricción de cadenas ligeras lambda en plasmablastos o células plasmocitoides. El diagnóstico diferencial en estos casos debe incluir la hiperplasia ganglionar HHV-8 positiva, dado que puede tener implicaciones clínicas. (*Gonzalez-Farre et al., 2017*)

Adicionalmente, excepto en uno de los casos, en todos los demás pacientes con ECM-HHV8 se confirmó la infección por VIH. Además, uno de los casos estaba asociado con trasplante de órgano sólido. Por este motivo, se ha sugerido la necesidad de hacer *screening* y monitorización de la infección por HHV-8 en pacientes con trasplante de órgano sólido y por tanto bajo tratamiento inmunosupresor, (*Vijgen et al., 2016*) dado que esta asociación tiene un pronóstico fatal. (*Pellett Madan et al., 2019*)

Por otra parte, en un número considerable de los casos de EC plasmocelular, encontramos asociación con NCP. En este aspecto, es importante conocer que la EC forma parte de los criterios mayores para el diagnóstico del síndrome de POEMS. (*Dispenzieri, 2021*)

Los seis casos de ECM-NCP/POEMS, tres ellos con un patrón rico en plasmáticas y otros tres con un patrón hipervascular, se caracterizaron por presentar unos centros germinales regresivos y proliferación de células plasmáticas.

Respecto a los casos de ECMi, estos se caracterizaron por presentar hiperplasia de centros germinales, además de plasmacitosis. Algunos casos presentaron patrones mixtos con hiperplasia y regresión de centros germinales, así como dilatación sinusoidal.

Se han descrito casos con una histopatología equivalente, que incluyen poblaciones de células plasmáticas dispuestas en láminas y centros germinales hiperplásicos, como linfadenopatías plasmáticas idiopáticas. (*Nishikori et al., 2022; Takeuchi, 2022; Wang et al., 2016*) Actualmente, esta entidad se considera parte del espectro de ECMi-NOS, aunque algunas características clínicas y de laboratorio, como su curso indolente, la aparición menos frecuente de derrame pleural o ascitis, la hipergammaglobulinemia o la trombocitosis, pueden en un futuro hacer que se clasifiquen aparte. (*Nishikori et al., 2022; Takeuchi, 2022*)

Así, para el diagnóstico de ECMi deben excluirse la ECM-HHV8, mediante inmunohistoquímica contra LANA-1, y la existencia de una población monotípica de células plasmáticas que sugiera una NCP/POEMS subyacente. Además, morfológicamente estas dos últimas entidades poseen centros germinales regresivos a diferencia de la ECMi.

En nuestra serie, un caso de linfadenopatía relacionada con LES mostró características histopatológicas indistinguibles de la ECMi. Se sabe que el 15% de los pacientes con linfadenopatías asociadas a LES pueden presentar hallazgos similares a EC en la biopsia ganglionar, a pesar de que lo característico es encontrar áreas de necrosis junto a hiperplasia de centros germinales. (*Kojima et al., 2007*)

En este sentido y conforme a los criterios de consenso, el LES y otras enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide, la enfermedad de Still de inicio en la edad adulta y la artritis idiopática juvenil, pueden presentar solapamiento clínico y patológico con la ECMi por lo que deben ser incluidos en el diagnóstico diferencial. (*Fajgenbaum et al., 2017a*)

Además, en dicho diagnóstico diferencial igualmente ha de considerarse la enfermedad asociada a IgG4; que posee unos criterios histopatológicos e inmunofenotípicos definidos, además de dos patrones morfológicos diferenciados en la biopsia ganglionar, con expansión intrafolicular o interfolicular por una población de células plasmáticas. Asimismo, se pueden observar centros germinales progresivamente transformados. (*Sato et al., 2012*)

En relación con esto, es bien conocido que la ECMi puede presentar un incremento sutil de células IgG4 positivas. Sin embargo, en nuestra serie tan solo el 22% de los casos analizados mostró un ligero aumento de células plasmáticas IgG4, correspondiente uno de ellos con el diagnóstico de ECMi. Es importante destacar que ninguno de los casos cumplió con los criterios diagnósticos de la enfermedad relacionada con IgG4, consistentes en la aparición de más de 100 células plasmáticas politípicas IgG4 o una ratio aumentada de IgG4/IgG. (*Deshpande et al., 2012*)

6.2 Identificación de células plasmáticas clonales en la enfermedad de Castleman asociada a neoplasia de células plasmáticas y síndrome POEMS

Realizamos una descripción de los patrones histopatológicos en biopsias de ganglio linfático de seis pacientes con diagnóstico clínico de neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple o síndrome POEMS.

Se encontraron características similares a la enfermedad de Castleman consistentes en ambos patrones, plasmocelular e hipervascular, anteriormente hialino-vascular. En dos de los seis casos, se identificaron sábanas de células plasmáticas con restricción de cadenas ligeras.

Por otro lado, mediante el análisis de clonalidad linfoide B se demostró la existencia de una población clonal de células plasmáticas en tres casos adicionales, de tal modo que este estudio aumentó la sensibilidad para la detección de dichas poblaciones en casos sin células plasmáticas monotípicas morfológicamente identificables.

La observación histopatológica detallada de los patrones de infiltración de las células plasmáticas y la presencia de atipia citológica pueden sugerir la existencia de poblaciones monotípicas, hecho que se confirma con el uso de un panel ampliado de anticuerpos para demostrar los patrones de expresión de cadenas ligeras y pesadas.

En la mayoría de los casos aquí analizados se encontró una expansión significativa del área paracortical por células plasmáticas, tres casos mostraron plasmocitosis de alto grado (Grado 3) y dos de esos casos combinaron atipia citológica con láminas de células plasmáticas monotípicas. Ambos casos mostraron restricción de cadena ligera lambda, un caso con restricción IgA y el otro con expresión de IgG.

Se ha descrito que la restricción de cadena ligera lambda es un hallazgo frecuente en el síndrome de POEMS asociado a cambios tipo enfermedad de Castleman y en la correspondiente neoplasia en la médula ósea (*Dispenzieri, 2019*), mientras que son raros los casos con restricción kappa. (*Ikeda et al., 2019*)

Es importante señalar que la CMF en las muestras de ganglio linfático, cuando está disponible, también puede facilitar la identificación de dichas poblaciones monotípicas de células plasmáticas en aquellos casos con una afectación morfológicamente sutil. La aplicación del análisis de clonalidad de Ig a los casos con características histopatológicas de EC, ha sido utilizada en informes recientes coincidiendo en su utilidad para identificar una población clonal concomitante, ya sea gammapatía monoclonal o linfoma de células B. (*Pelliccia et al., 2024*)

Es de destacar que los casos que cumplían criterios de ECMi carecían de una población monotípica en el estudio inmunohistoquímico. Además, todos ellos mostraron, en el área paracortical y alrededor de los sinusoides, células plasmáticas de predominio IgG.

La médula ósea se vio afectada por la existencia de una población de células plasmáticas clonales en tres de los seis casos de ECM-NCP/POEMS con muestra disponible. En los tres casos, se identificó dicha población tanto por CMF como por IHQ. Sin embargo, el porcentaje de células plasmáticas clonales por CMF fue menor del 2% (rango 0,04-1,16%). Uno de los casos mostró un infiltrado linfoplasmocitoide con células clonales IgA y tres casos presentaron la habitual hiperplasia megacariocítica ya descrita en el síndrome POEMS.

Aunque la mayoría de los pacientes con síndrome POEMS presentan una población clonal de células plasmáticas identificable en la biopsia de médula ósea, la cantidad suele ser baja por lo que la CMF puede mejorar la detección en estos casos. (*Ikeda et al., 2019*)

El análisis de clonalidad linfoide B nos permitió identificar tres casos adicionales en los que el análisis morfológico y de inmunohistoquímica no pudo demostrar la existencia de una población de células plasmáticas neoplásicas. En dos de estos tres casos, la biopsia de médula ósea disponible confirmó la presencia de neoplasia clonal de células plasmáticas, ya sea por IHQ

o CMF. El otro caso mostró componente IgG lambda M en el suero y otras características clínicas de neoplasia de células plasmáticas/amiloidosis AL.

Respecto al único caso en el cual no se identificó una población de células plasmáticas clonales, ni en la biopsia de ganglio linfático ni en la de médula ósea, este podría mostrar características clínicas de la EC variante de síndrome POEMS, pero sin proteína monoclonal identificable. (Dispenzieri, 2019; Dispenzieri et al., 2012) En pacientes con polineuropatía, enfermedad de Castleman multicéntrica y otras características paraneoplásicas consistentes con el síndrome POEMS, pero sin proteína monoclonal identificable, los criterios diagnósticos actualizados sugieren su clasificación como variante de enfermedad de Castleman del síndrome POEMS. En contraste con la variante de mieloma osteoesclerótico del POEMS, en la cual el VEGF es la citoquina más elevada, en la EC la IL-6 es la citoquina dominante. Los pacientes con EC a menudo tienen una hipergammaglobulinemia policlonal intensa. (Dispenzieri, 2019)

En resumen, en los casos con características tipo EC en biopsia de ganglio linfático, una evaluación morfológica detallada junto a marcadores inmunohistoquímicos para la identificación de restricción de cadenas ligeras o pesadas puede ayudar en el diagnóstico de ECM-NCP/POEMS.

El análisis de clonalidad linfocitoide B proporciona resultados positivos en hasta el 84% de estos casos. Con el fin de verificar una discrasia de células plasmáticas subyacente, se recomienda el examen histológico de la médula ósea, idealmente junto con CMF multiparamétrica, estudio inmunohistoquímico e inmunoelectroforesis sérica.

6.3 Caracterización de la expresión de proteínas relacionadas con la activación de JAK/STAT en linfadenitis virales/inmunes y linfomas B difusos de célula grande

Los resultados de nuestra serie mostraron sobreexpresión inmunohistoquímica franca de P-STAT3 en ECM-HHV8 en comparación con ECMi y linfadenitis virales.

Esta sobreexpresión inmunohistoquímica puede explicarse debido a la inducción de citoquinas en la enfermedad de Castleman, que hace que se altere la vía de señalización JAK/STAT y que puede estar presente tanto en la ECMi como en la ECM-HHV8.

Sin embargo, la ECM-HHV8 tiende a tener una activación más directa y constante de la vía, debido a la presencia de vIL-6 y otras citoquinas inducidas por el virus. Además, la activación de STAT3 es un sello distintivo debido a la acción de esta citoquina, expresada en niveles elevados en los plasmablastos que rodean los folículos linfocitos en la ECM-HHV8. (Neipel et al., 1997; Polizzotto et al., 2013; Staskus et al., 1999; Xiang et al., 2022)

Otro punto es la confirmación de una mayor expresión de P-STAT3 en linfomas asociados a infección viral, LBDCG HHV-8 positivos y VEB positivos. Igualmente, los casos de linfoma B de alto grado NOS mostraron sobreexpresión de P-STAT3 en un porcentaje similar a los casos de LBDCG VEB positivo.

En este contexto también se ha descrito la activación de la vía JAK/STAT en LBDCG VEB positivos (Luo et al., 2021), en neoplasias de células linfocitos T y *natural-killer* (NK) (Ohgami et al., 2014; Seffens et al., 2019) y en la enfermedad de Castleman. (Sumiyoshi et al., 2022) Esta activación puede promover la proliferación celular, la supervivencia y la resistencia a la apoptosis.

En los linfomas positivos para el virus de Epstein-Barr, la vía JAK/STAT puede activarse a través la expresión de la proteína viral LMP1 (*Latent Membrane Protein 1*). LMP1 puede activar directamente la vía JAK/STAT al interactuar con proteínas adaptadoras como *TRAFs* (factores asociados al receptor de TNF) y activar la quinasa JAK3, lo que lleva a la fosforilación de STATs. Otros mecanismos de activación de la vía JAK/STAT en estos linfomas pueden incluir la sobreexpresión de citoquinas, como IL-10, IL-6 o IL-21. (Luo et al., 2021)

Teniendo en cuenta la evidencia previa de la asociación de mutaciones en el dominio SH2 de STAT3 y la sobreexpresión de la proteína STAT3 fosforilada (*Garcia-Reyero et al., 2020*), así como de la sobreexpresión de la vía JAK/STAT3 en linfomas plasmablasticos demostrada mediante análisis de expresión de ARNm (*Liu et al., 2020*), nos propusimos investigar si la expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 se asociaba con algún fenotipo específico y/o subtipo genético de LBDCG NOS.

Considerando la clasificación por fenotipo de célula de origen y la expresión de P-STAT3, en nuestra serie, como en otros estudios, este análisis reveló que los casos clasificados como *no-GCB* obtuvieron mayores porcentajes de expresión, aunque en nuestro análisis las diferencias no fueron estadísticamente significativas. (*Hardee et al., 2013; Kwon et al., 2018; Lam et al., 2008; Ok et al., 2014*)

Este hecho se ha intentado explicar en otras series debido a la baja expresión de BCL6 por parte de los linfomas *no-GCB*, que actúa como inhibidor de la vía JAK/STAT. Como resultado, la activación de la vía JAK/STAT en estos linfomas puede contribuir a su peor pronóstico, promoviendo la proliferación celular, la angiogénesis, y la evasión de la apoptosis y contribuyendo a un comportamiento más agresivo del linfoma. De hecho, se ha observado que los pacientes con LBDCG positivos para P-STAT3 poseen un pronóstico clínico más desfavorable (*Kwon et al., 2018; Ok et al., 2014*)

Además, la mayor parte de los linfomas clasificados como *no-GCB* mediante algoritmos basados en marcadores inmunohistoquímicos se corresponden con linfomas *ABC* y como sabemos la vía de señalización JAK/STAT se activa mediante la producción autocrina de IL-6 e IL-10 como resultado de mutaciones en MYD88, característica de los LBDCG con subtipo genético MCD y de los LBDCG *ABC*. (*Chen et al., 2022; Zhu et al., 2019*)

En nuestra serie se observó una tendencia no significativa en este sentido, con mayor expresión de P-STAT3 en casos con MYD88L265P.

Además, en la literatura se recogen hallazgos de sobreexpresión de P-STAT3 en distintas entidades de LBDCG, así como en otras neoplasias malignas de células B. Algunos estudios describen la asociación entre la morfología de alto grado y la existencia de sobreexpresión de STAT3, que resulta en mayor anaplasia, proliferación y supervivencia celular (*Chiarle et al., 2008; Ok et al., 2014*) También se ha definido su asociación con un estadio avanzado, múltiples sitios extraganglionares de afectación, subtipo similar a célula B activada (*ABC*), expresión de CD30, expresión de MYC y expresión de MYC/BCL2. (*Ok et al., 2014*)

En relación con la expresión inmunohistoquímica de P-STAT3 y los distintos subtipos genéticos, los casos con genotipo *Other*, MCD, ST2 y combinados de ST2 y EZB y combinados de EZB mostraron una expresión homogénea de la proteína.

De forma llamativa los casos con subtipo genético BN2 carecen de sobreexpresión de P-STAT3 en comparación con el resto de los subtipos genéticos, lo cual indica que la vía JAK/STAT no se encuentra activa en los casos con esta firma genética.

Estos tumores poseen otras alteraciones y mecanismos, distintos de la vía JAK/STAT, que ayudan a su supervivencia, como mutaciones activadoras de NOTCH2 o que implican a la vía NF-κB. Además, la mayoría poseen alteraciones en el gen BCL6, el cual está sobreexpresado o activado. (*Wright et al., 2020*) Este hecho podría inhibir la activación de STAT3, lo que explica por qué no se observa sobreexpresión de P-STAT3 en los casos con genotipo BN2.

De este modo, los hallazgos sugieren que existen varios mecanismos que pueden conducir a la sobreexpresión de P-STAT3 en los diferentes subtipos genéticos, sean mutaciones puntuales en la vía JAK/STAT o mutaciones activantes en MYD88 (i.e. MYD88L265P), así como señalización mediante interleucinas derivada de las interacciones con el microambiente tumoral, la alteración del gen PDL-1 (*Kwon et al., 2018*) o la inhibición de SOCS-1.

CONCLUSIONES

7. Conclusiones

1. La gradación de las características histopatológicas puede ser de utilidad para discriminar la Enfermedad de Castleman Multicéntrica idiopática de sus principales imitadores.
2. El estudio de clonalidad linfoide B aumenta la sensibilidad para la detección de células plasmáticas clonales en los casos con neoplasia de células plasmáticas o síndrome POEMS asociado a enfermedad de Castleman.
3. La sobreexpresión inmunohistoquímica de P-STAT3 podría servir como marcador subrogado de la activación multifactorial de JAK/STAT, con potenciales implicaciones terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografia

- Agashe, R. P., Lippman, S. M., & Kurzrock, R. (2022). JAK: Not Just Another Kinase. *Molecular cancer therapeutics*, 21(12), 1757-1764. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-22-0323>
- Aguilera, N., & Auerbach, A. (2018). Epstein-Barr Virus (EBV) associated reactive and indeterminate lymphoid proliferations in the lymph node. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 35(1), 54-60. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2017.11.005>
- Anagnostopoulos I, Medeiros LJ, Klapper W, de Jong D, Miles RR, Lenz G, Asano N, Chapman JR, & Steidl C. (2024). B-cell lymphoid proliferations. Mature B-cell neoplasms. Large B-cell lymphomas. EBV positive diffuse large B-CELL lymphoma. En *WHO clasifications of Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 98(6), 236-238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Carbone, A., Borok, M., Damania, B., Gloghini, A., Polizzotto, M. N., Jayanthan, R. K., Fajgenbaum, D. C., & Bower, M. (2021). Castleman disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, 7(1), 84. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00317-7>
- Castleman B, Iverson L, & Menendez VP. (1956). *Localized mediastinal lymph-node hyperplasia resembling thymoma*. 9(4), 822-830. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195607/08\)9:4<822::aid-cnrcr2820090430>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195607/08)9:4<822::aid-cnrcr2820090430>3.0.co;2-4)
- Chadburn A, Cesarman E, Elenitoba-Johnson K, Natkunam Y, Fajgenbaum DC, Bower M, Iwaki N, Meignin V, & van Rhee F. (2024). B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. Tumor-like lesions with B-cell predominance. KSHV/HHV8-associated multicentric Castleman disease. En *WHO clasifications of Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Chadburn A, Medeiros JF, Cesarman E, Elenitoba-Johnson K, Natkunam Y, Fajgenbaum DC, Bower M, Iwaki N, Meignin V, & van Rhee F. (2024a). B-cell lymphoid proliferations

- and lymphomas. Tumor-like lesions with B-cell predominance. Idiopathic multicentric Castleman disease. En *WHO clasifications of Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Chadburn A, Medeiros JF, Cesarman E, Elenitoba-Johnson K, Natkunam Y, Fajgenbaum DC, Bower M, Iwaki N, Meignin V, & van Rhee F. (2024b). B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. Tumor-like lesions with B-cell predominance. Unicentric Castleman disease. En *WHO clasifications of Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Chadburn, A., Said, J., Gratzinger, D., Chan, J. K. C., de Jong, D., Jaffe, E. S., Natkunam, Y., & Goodlad, J. R. (2017). HHV8/KSHV-Positive Lymphoproliferative Disorders and the Spectrum of Plasmablastic and Plasma Cell Neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology*, *147*(2), 171-187. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw218>
- Chapman, J. R., Bouska, A. C., Zhang, W., Alderuccio, J. P., Lossos, I. S., Rimsza, L. M., Maguire, A., Yi, S., Chan, W. C., Vega, F., & Song, J. Y. (2021). EBV-positive HIV-associated diffuse large B cell lymphomas are characterized by JAK/STAT (STAT3) pathway mutations and unique clinicopathologic features. *British Journal of Haematology*, *194*(5), 870-878. <https://doi.org/10.1111/bjh.17708>
- Chen, R., Zhou, D., Wang, L., Zhu, L., & Ye, X. (2022). MYD88L265P and CD79B double mutations type (MCD type) of diffuse large B-cell lymphoma: Mechanism, clinical characteristics, and targeted therapy. *Therapeutic Advances in Hematology*, *13*, 20406207211072839. <https://doi.org/10.1177/20406207211072839>
- Cheng, E. H.-Y., Nicholas, J., Bellows, D. S., Hayward, G. S., Guo, H.-G., Reitz, M. S., & Hardwick, J. M. (1997). A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(2), 690-694.

- Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R., & Inghirami, G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 8(1), 11-23. <https://doi.org/10.1038/nrc2291>
- Cunningham, A. M., & Harrington, A. M. (2019). Ancillary Studies in the Diagnostic Evaluation of Large B-Cell Lymphoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 143(12), 1464-1471. <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0331-RA>
- Danon, A. D., Krishnan, J., & Frizzera, G. (1993). Morpho-immunophenotypic diversity of Castleman's disease, hyaline-vascular type: With emphasis on a stroma-rich variant and a new pathogenetic hypothesis. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, 423(5), 369-382. <https://doi.org/10.1007/BF01607150>
- Dao, L. N., Hanson, C. A., Dispenzieri, A., Morice, W. G., Kurtin, P. J., & Hoyer, J. D. (2011). Bone marrow histopathology in POEMS syndrome: A distinctive combination of plasma cell, lymphoid, and myeloid findings in 87 patients. *Blood*, 117(24), 6438-6444. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-316935>
- Deshpande, V., Zen, Y., Chan, J. K., Yi, E. E., Sato, Y., Yoshino, T., Klöppel, G., Heathcote, J. G., Khosroshahi, A., Ferry, J. A., Aalberse, R. C., Bloch, D. B., Brugge, W. R., Bateman, A. C., Carruthers, M. N., Chari, S. T., Cheuk, W., Cornell, L. D., Castillo, C. F.-D., ... Stone, J. H. (2012). Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Modern Pathology*, 25(9), 1181-1192. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.72>
- Dispenzieri, A. (2019). POEMS Syndrome: 2019 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 94(7), 812-827. <https://doi.org/10.1002/ajh.25495>
- Dispenzieri, A. (2021). POEMS syndrome: 2021 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 96(7), 872-888. <https://doi.org/10.1002/ajh.26240>
- Dispenzieri, A., Armitage, J. O., Loe, M. J., Geyer, S. M., Allred, J., Camoriano, J. K., Menke, D. M., Weisenburger, D. D., Ristow, K., Dogan, A., & Habermann, T. M. (2012). The clinical

- spectrum of Castleman's disease. *American Journal of Hematology*, 87(11), 997-1002.
<https://doi.org/10.1002/ajh.23291>
- Dispenzieri, A., & Fajgenbaum, D. C. (2020). Overview of Castleman disease. *Blood*, 135(16), 1353-1364. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000931>
- Fajgenbaum, D. C., Uldrick, T. S., Bagg, A., Frank, D., Wu, D., Srkalovic, G., Simpson, D., Liu, A. Y., Menke, D., Chandrakasan, S., Lechowicz, M. J., Wong, R. S. M., Pierson, S., Paessler, M., Rossi, J.-F., Ide, M., Ruth, J., Croglia, M., Suarez, A., ... Lim, M. S. (2017a). International, evidence-based consensus diagnostic criteria for HHV-8-negative/idiopathic multicentric Castleman disease. *Blood*, 129(12), 1646-1657. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-746933>
- Fajgenbaum, D. C., Uldrick, T. S., Bagg, A., Frank, D., Wu, D., Srkalovic, G., Simpson, D., Liu, A. Y., Menke, D., Chandrakasan, S., Lechowicz, M. J., Wong, R. S. M., Pierson, S., Paessler, M., Rossi, J.-F., Ide, M., Ruth, J., Croglia, M., Suarez, A., ... Lim, M. S. (2017b). International, evidence-based consensus diagnostic criteria for HHV-8-negative/idiopathic multicentric Castleman disease. *Blood*, 129(12), 1646-1657. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-746933>
- Ferry JA. (2024). B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. Tumor-like lesions with B-cell predominance: Introduction. En *WHO classifications of Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Flendrig JA & Schillings PHM. (1969). *Benign giant lymphoma: The clinical signs and symptoms and the morphological aspects*. 12, 119-120.
- Garcia-Reyero, J., Magunacelaya, N. M., de Villambrosia, S. G., Loghavi, S., Mediavilla, A. G., Tonda, R., Beltran, S., Gut, M., Gonzalez, A. P., D'Ámore, E., Visco, C., Khoury, J. D., & Montes-Moreno, S. (2020). Genetic lesions in MYC and STAT3 drive oncogenic transcription factor overexpression in plasmablastic lymphoma. *Haematologica*, 106(4), 1120-1128. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.251579>
- Gebauer, N., Künstner, A., Ketzer, J., Witte, H. M., Rausch, T., Benes, V., Zimmermann, J., Gebauer, J., Merz, H., Bernard, V., Harder, L., Ratjen, K., Gesk, S., Peter, W., Busch, Y.,

- Trojok, P., von Bubnoff, N., Biersack, H., Busch, H., & Feller, A. C. (2021). Genomic insights into the pathogenesis of Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma by whole-genome and targeted amplicon sequencing. *Blood Cancer Journal*, *11*(5), 102. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00493-5>
- Gonzalez-Farre, B., Martinez, D., Lopez-Guerra, M., Xipell, M., Monclus, E., Rovira, J., Garcia, F., Lopez-Guillermo, A., Colomo, L., Campo, E., & Martinez, A. (2017). HHV8-related lymphoid proliferations: A broad spectrum of lesions from reactive lymphoid hyperplasia to overt lymphoma. *Modern Pathology*, *30*(5), 745-760. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.233>
- Hardee, J., Ouyang, Z., Zhang, Y., Kundaje, A., Lacroute, P., & Snyder, M. (2013). STAT3 targets suggest mechanisms of aggressive tumorigenesis in diffuse large B-cell lymphoma. *G3 (Bethesda, Md.)*, *3*(12), 2173-2185. <https://doi.org/10.1534/g3.113.007674>
- Harrison, D. A. (2012). The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(3), a011205. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011205>
- Hoffmann, C., Hentrich, M., Tiemann, M., Rosenwald, A., Weber, F., Willenbacher, W., & Hübel, K. (2022). Recent Advances in Castleman Disease. *Oncology Research and Treatment*, *45*(11), 693-704. <https://doi.org/10.1159/000526640>
- Hu, S., Xu-Monette, Z. Y., Tzankov, A., Green, T., Wu, L., Balasubramanyam, A., Liu, W., Visco, C., Li, Y., Miranda, R. N., Montes-Moreno, S., Dybkaer, K., Chiu, A., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Richards, K. L., Hsi, E. D., Choi, W. W. L., ... Young, K. H. (2013). MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: A report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*, *121*(20), 4021-4031. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-460063>
- Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: From bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 1-33. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>

- Ikeda, S., Kobayashi, T., Saito, M., Komatsuda, A., Ubukawa, K., Kameoka, Y., & Takahashi, N. (2019). Multiparameter Flow Cytometry for the Identification of Neoplastic Plasma Cells in POEMS Syndrome with IgG-kappa Gammopathy: Successful Treatment Using Lenalidomide and Dexamethasone. *Internal Medicine*, 58(23), 3461. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2882-19>
- Keller, A. R., Hochholzer, L., & Castleman, B. (1972). Hyaline-vascular and plasma-cell types of giant lymph node hyperplasia of the mediastinum and other locations. *Cancer*, 29(3), 670-683. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197203\)29:3<670::aid-cncr2820290321>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197203)29:3<670::aid-cncr2820290321>3.0.co;2-#)
- Kojima, M., Motoori, T., Asano, S., & Nakamura, S. (2007). Histological diversity of reactive and atypical proliferative lymph node lesions in systemic lupus erythematosus patients. *Pathology - Research and Practice*, 203(6), 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2007.03.002>
- Kurz, K. S., Ott, M., Kalmbach, S., Steinlein, S., Kalla, C., Horn, H., Ott, G., & Staiger, A. M. (2023). Large B-Cell Lymphomas in the 5th Edition of the WHO-Classification of Haematolymphoid Neoplasms—Updated Classification and New Concepts. *Cancers*, 15(8), 2285. <https://doi.org/10.3390/cancers15082285>
- Kwon, H. J., Yang, J. M., Lee, J.-O., Lee, J. S., & Paik, J. H. (2018). Clinicopathologic implication of PD-L1 and phosphorylated STAT3 expression in diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Translational Medicine*, 16, 320. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1689-y>
- Lam, L. T., Wright, G., Davis, R. E., Lenz, G., Farinha, P., Dang, L., Chan, J. W., Rosenwald, A., Gascoyne, R. D., & Staudt, L. M. (2008). Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 111(7), 3701-3713. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-111948>
- Lang, E., & van Rhee, F. (2024). Idiopathic multicentric Castleman disease: An update in diagnosis and treatment advances. *Blood Reviews*, 64, 101161. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2023.101161>

- Langerak, A. W., Groenen, P. J. T. A., Brüggemann, M., Beldjord, K., Bellan, C., Bonello, L., Boone, E., Carter, G. I., Catherwood, M., Davi, F., Delfau-Larue, M.-H., Diss, T., Evans, P. A. S., Gameiro, P., Garcia Sanz, R., Gonzalez, D., Grand, D., Håkansson, Å., Hummel, M., ... van Dongen, J. J. M. (2012). EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*, *26*(10), 2159-2171. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.246>
- Lee, J.-H., Jeong, H., Choi, J.-W., Oh, H., & Kim, Y.-S. (2017). Clinicopathologic significance of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma: A meta-analysis. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01998-5>
- Li, B., Wan, Q., Li, Z., & Chng, W.-J. (2021). Janus Kinase Signaling: Oncogenic Criminal of Lymphoid Cancers. *Cancers*, *13*(20), 5147. <https://doi.org/10.3390/cancers13205147>
- Li, Z., Lan, X., Li, C., Zhang, Y., Wang, Y., Xue, W., Lu, L., Jin, M., Zhou, Z., Wang, X., Li, L., Zhang, L., Li, X., Fu, X., Sun, Z., Wu, J., Zhang, X., Yu, H., Nan, F., ... Zhang, M. (2019). Recurrent PDGFRB mutations in unicentric Castleman disease. *Leukemia*, *33*(4), 1035-1038. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0323-6>
- Lim M, Gupta R, & Baughn LB. (2024). B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. Plasma cell neoplasms and other diseases with paraproteins. Plasma cell neoplasms with associated paraneoplastic syndrome. En *WHO clasifications of Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Lin, O., & Frizzera, G. (1997). Angiomyoid and Follicular Dendritic Cell Proliferative Lesions in Castleman's Disease of Hyaline-Vascular Type: A Study of 10 Cases. *The American Journal of Surgical Pathology*, *21*(11), 1295.
- Liu, Z., Filip, I., Gomez, K., Engelbrecht, D., Meer, S., Laloo, P. N., Patel, P., Perner, Y., Zhao, J., Wang, J., Pasqualucci, L., Rabadan, R., & Willem, P. (2020). Genomic characterization of HIV-associated plasmablastic lymphoma identifies pervasive mutations in the JAK-STAT pathway. *Blood Cancer Discovery*, *1*(1), 112-125. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-20-0051>

- Luo, Y., Liu, Y., Wang, C., & Gan, R. (2021). Signaling pathways of EBV-induced oncogenesis. *Cancer Cell International*, *21*, 93. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01793-3>
- Montes-Moreno, S., Climent, F., Fraga, M., Luis Patier, J., Robles-Marhuenda, Á., García-Sanz, R., Ocio, E. M., González García, A., & Navarro, J.-T. (2023). Expert consensus on the integrated diagnosis of idiopathic multicentric Castleman disease. *Revista Espanola De Patologia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Anatomia Patologica Y De La Sociedad Espanola De Citologia*, *56*(3), 158-167. <https://doi.org/10.1016/j.patol.2022.12.003>
- Montes-Moreno S, Leoncini L, Miranda R, Louissaint A, & Sengar M. (2024). B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. Mature B-cell neoplasms. Large B-cell lymphomas. Plasmablastic lymphoma. En *WHO classifications of Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Montes-Moreno, S., Odqvist, L., Diaz-Perez, J. A., Lopez, A. B., de Villambrosía, S. G., Mazorra, F., Castillo, M. E., Lopez, M., Pajares, R., García, J. F., Mollejo, M., Camacho, F. I., Ruiz-Marcellán, C., Adrados, M., Ortiz, N., Franco, R., Ortiz-Hidalgo, C., Suarez-Gauthier, A., Young, K. H., & Piris, M. A. (2012). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-kB activation. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *25*(7), 968-982. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.52>
- Montes-Moreno, S., Sr., Avendaño, A., Gonzalez De Villambrosia, S., Rodriguez-Merino, L., Morata, J., Tonda, R., Carrillo-Cruz, E., Grande, C., Roncero, J. M., Perez De Oteyza, J., Nicolas, C., Rey Búa, B., Abrisqueta, P., Gutierrez, A., Ramirez, A., Martin Garcia-Sancho, A., & Gonzalez Barca, E. M. (2023). Genetic Subtyping Using Whole Exome Sequencing across Large B Cell Lymphoma Entities in a Series of 109 DLBCL and Plasmablastic Lymphoma Cases. *Blood*, *142*(Supplement 1), 6092. <https://doi.org/10.1182/blood-2023-179150>

- Naresh KN, Bhagat A, Chadburn A, Natkunam Y, Chan J, Michelow P, Sato A, Sato Y, Bower M, Gratzinger D, & Dierickx D. (2024). B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. Mature B-cell neoplasms. Lymphoid proliferations and lymphomas associated with immune deficiency and dysregulation. En *WHO clasifications of Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Neipel, F., Albrecht, J. C., Ensser, A., Huang, Y. Q., Li, J. J., Friedman-Kien, A. E., & Fleckenstein, B. (1997). Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6. *Journal of Virology*, *71*(1), 839-842. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.1.839-842.1997>
- Nishikori, A., Nishimura, M. F., Nishimura, Y., Otsuka, F., Maehama, K., Ohsawa, K., Momose, S., Nakamura, N., & Sato, Y. (2022). Idiopathic Plasmacytic Lymphadenopathy Forms an Independent Subtype of Idiopathic Multicentric Castleman Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(18), 10301. <https://doi.org/10.3390/ijms231810301>
- Nishimura, M. F., Nishimura, Y., Nishikori, A., Maekawa, Y., Maehama, K., Yoshino, T., & Sato, Y. (2021). Clinical and Pathological Characteristics of Hyaline-Vascular Type Unicentric Castleman Disease: A 20-Year Retrospective Analysis. *Diagnostics*, *11*(11), 2008. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11112008>
- Ohgami, R. S., Ma, L., Monabati, A., Zehnder, J. L., & Arber, D. A. (2014). STAT3 mutations are present in aggressive B-cell lymphomas including a subset of diffuse large B-cell lymphomas with CD30 expression. *Haematologica*, *99*(7), e105. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.101543>
- Ok, C. Y., Chen, J., Xu-Monette, Z. Y., Tzankov, A., Manyam, G. C., Li, L., Visco, C., Montes-Moreno, S., Dybkær, K., Chiu, A., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Richards, K. L., Hsi, E. D., Choi, W. W. L., Han van Krieken, J., Huh, J., Zhao, X., ... Young, K. H. (2014). Clinical Implications of Phosphorylated STAT3 Expression in de novo Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *20*(19), 5113-5123. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0683>

- Oksenhendler, E., Boutboul, D., Beldjord, K., Meignin, V., de Labarthe, A., Fieschi, C., Dossier, A., Agbalika, F., Parravicini, C., Tosato, G., Gérard, L., & Galicier, L. (2013). Human herpesvirus 8+ polyclonal IgM λ B-cell lymphocytosis mimicking plasmablastic leukemia/lymphoma in HIV-infected patients. *European Journal of Haematology*, *91*(6), 497-503. <https://doi.org/10.1111/ejh.12191>
- O'Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annual review of medicine*, *66*, 311-328. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>
- Ott G, Siebert R, Alaggio R, de Jong D, Naresh KN, & Dave SS. (2024). B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. Mature B-cell neoplasms. Large B-cell lymphomas: Introduction. En *WHO clasifications of Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Pellett Madan, R., Hand, J., & Practice, the A. I. D. C. of. (2019). Human herpesvirus 6, 7, and 8 in solid organ transplantation: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical Transplantation*, *33*(9), e13518. <https://doi.org/10.1111/ctr.13518>
- Pelliccia, S., Rogges, E., Cardoni, A., Lopez, G., Conte, E., Faccini, A. L., De Vito, R., Girardi, K., Bianchi, A., Annibali, O., Fratoni, S., Remotti, D., De Angelis, G., Giordano, C., Palumbo, G., Scarpino, S., Del Porto, F., Bianchi, M. P., Di Gregorio, F., ... Di Napoli, A. (2024). The application of a multidisciplinary approach in the diagnosis of Castleman disease and Castleman-like lymphadenopathies: A 20-year retrospective analysis of clinical and pathological features. *British Journal of Haematology*, *204*(2), 534-547. <https://doi.org/10.1111/bjh.19171>
- Pierson, S. K., Shenoy, S., Oromendia, A. B., Gorzewski, A. M., Langan Pai, R.-A., Nabel, C. S., Ruth, J. R., Parente, S. A. T., Arenas, D. J., Guilfoyle, M., Reddy, M., Weinblatt, M., Shadick, N., Bower, M., Pria, A. D., Masaki, Y., Katz, L., Mezey, J., Beineke, P., ... Fajgenbaum, D. C. (2021). Discovery and validation of a novel subgroup and therapeutic

- target in idiopathic multicentric Castleman disease. *Blood Advances*, 5(17), 3445-3456.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020004016>
- Piris, M. A., Aguirregoicoa, E., Montes-Moreno, S., & Celeiro-Muñoz, C. (2018). Castleman Disease and Rosai-Dorfman Disease. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 35(1), 44-53.
<https://doi.org/10.1053/j.semmp.2017.11.014>
- Polizzotto, M. N., Uldrick, T. S., Wang, V., Aleman, K., Wyvill, K. M., Marshall, V., Pittaluga, S., O'Mahony, D., Whitby, D., Tosato, G., Steinberg, S. M., Little, R. F., & Yarchoan, R. (2013). Human and viral interleukin-6 and other cytokines in Kaposi sarcoma herpesvirus-associated multicentric Castleman disease. *Blood*, 122(26), 4189-4198.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-519959>
- Rodriguez Merino, L., Pomares, A. A., Arce, J. R., & Montes-Moreno, S. (2023). From Castleman disease histopathological features to idiopathic multicentric Castleman disease: A multiparametric approach to exclude potential iMCD histopathological mimickers. *Journal of Clinical Pathology*, jcp-2022-208696. <https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208696>
- Rosenwald A, Delabie J, Medeiros LJ, Klapper W, Gujral S, Naresh KN, Calaminici M, Lenz G, Gopal A, Nair R, Corboy GP, Sabattini E, Farinha P, Slack GW, Dunleavy K, Barrans SL, Wang Z, & Davies AJ. (2024). B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. Mature B-cell neoplasms. Large B-cell lymphomas. Diffuse large B-cell lymphoma NOS. En *WHO clasifications of Tumours* (5th ed.).
<https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., Marcos-Gragera, R., Maynadié, M., Simonetti, A., Lutz, J.-M., Berrino, F., & HAEMACARE Working Group. (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: Results of the HAEMACARE project. *Blood*, 116(19), 3724-3734.
<https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-282632>
- Sato, Y., Inoue, D., Asano, N., Takata, K., Asaoku, H., Maeda, Y., Morito, T., Okumura, H., Ishizawa, S., Matsui, S., Miyazono, T., Takeuchi, T., Kuroda, N., Orita, Y., Takagawa, K.,

- Kojima, M., & Yoshino, T. (2012). Association between IgG4-related disease and progressively transformed germinal centers of lymph nodes. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 25(7), 956-967. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.54>
- Seffens, A., Herrera, A., Tegla, C., Buus, T. B., Hymes, K. B., Ødum, N., Geskin, L. J., & Koralov, S. B. (2019). STAT3 Dysregulation in Mature T and NK Cell Lymphomas. *Cancers*, 11(11), 1711. <https://doi.org/10.3390/cancers11111711>
- Sehn, L. H., & Salles, G. (2021). Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine*, 384(9), 842-858. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2027612>
- Staskus, K. A., Sun, R., Miller, G., Racz, P., Jaslowski, A., Metroka, C., Brett-Smith, H., & Haase, A. T. (1999). Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Journal of Virology*, 73(5), 4181-4187. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.4181-4187.1999>
- Sumiyoshi, R., Koga, T., & Kawakami, A. (2022). Candidate biomarkers for idiopathic multicentric Castleman disease. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology : JCEH*, 62(2), 85-90. <https://doi.org/10.3960/jslrt.22010>
- Takeuchi, K. (2022). Idiopathic plasmacytic lymphadenopathy: A conceptual history along with a translation of the original Japanese article published in 1980. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology: JCEH*, 62(2), 79-84. <https://doi.org/10.3960/jslrt.22011>
- Talat, N., Belgaumkar, A. P., & Schulte, K.-M. (2012). Surgery in Castleman's Disease: A Systematic Review of 404 Published Cases. *Annals of Surgery*, 255(4), 677. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318249dcdc>
- Tilly, H., Silva, M. G. da, Vitolo, U., Jack, A., Meignan, M., Lopez-Guillermo, A., Walewski, J., André, M., Johnson, P. W., Pfreundschuh, M., & Ladetto, M. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 26, v116-v125. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv304>

- Totonchy, J., Osborn, J. M., Chadburn, A., Nabiee, R., Argueta, L., Mikita, G., & Cesarman, E. (2018). KSHV induces immunoglobulin rearrangements in mature B lymphocytes. *PLoS Pathogens*, *14*(4), e1006967. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006967>
- van Rhee, F., Oksenhendler, E., Srkalovic, G., Voorhees, P., Lim, M., Dispenzieri, A., Ide, M., Parente, S., Schey, S., Streetly, M., Wong, R., Wu, D., Maillard, I., Brandstadter, J., Munshi, N., Bowne, W., Elenitoba-Johnson, K. S., Fössa, A., Lechowicz, M. J., ... Fajgenbaum, D. C. (2020). International evidence-based consensus diagnostic and treatment guidelines for unicentric Castleman disease. *Blood Advances*, *4*(23), 6039-6050. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003334>
- Vega F, Chadburn A, Said JW, Cesarman E, Du MQ, & Bower M. (2024). B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. Mature B-cell neoplasms. KSHV/HHV8-associated B-cell lymphoid proliferations and lymphomas. KSHV/HHV8-positive diffuse large B-cell lymphoma. En *Haematolymphoid Tumours* (5th ed.). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Vermaat, J. S., Somers, S. F., de Wreede, L. C., Kraan, W., de Groen, R. A. L., Schrader, A. M. R., Kerver, E. D., Scheepstra, C. G., Berenschot, H., Deenik, W., Wegman, J., Broers, R., de Boer, J.-P. D., Nijland, M., van Wezel, T., Veelken, H., Spaargaren, M., Cleven, A. H., Kersten, M. J., & Pals, S. T. (2020). MYD88 mutations identify a molecular subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with an unfavorable prognosis. *Haematologica*, *105*(2), 424-434. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.214122>
- Vijgen, S., Wyss, C., Meylan, P., Bisig, B., Letovanec, I., Manuel, O., Pascual, M., & de Leval, L. (2016). Fatal Outcome of Multiple Clinical Presentations of Human Herpesvirus 8–related Disease After Solid Organ Transplantation. *Transplantation*, *100*(1), 134. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000801>
- Wang, H.-W., Pittaluga, S., & Jaffe, E. S. (2016). Multicentric Castleman Disease: Where are we now? *Seminars in diagnostic pathology*, *33*(5), 294-306. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2016.05.006>

- Wright, G. W., Huang, D. W., Phelan, J. D., Coulibaly, Z. A., Roulland, S., Young, R. M., Wang, J. Q., Schmitz, R., Morin, R. D., Tang, J., Jiang, A., Bagaev, A., Plotnikova, O., Kotlov, N., Johnson, C. A., Wilson, W. H., Scott, D. W., & Staudt, L. M. (2020). A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell*, 37(4), 551. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.015>
- Wu, D., Lim, M. S., & Jaffe, E. S. (2018). Pathology of Castleman Disease. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 32(1), 37-52. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.09.004>
- Xiang, Q., Yang, Z., & Nicholas, J. (2022). STAT and Janus kinase targeting by human herpesvirus 8 interferon regulatory factor in the suppression of type-I interferon signaling. *PLoS Pathogens*, 18(7), e1010676. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010676>
- Yu, X., Li, W., Deng, Q., Li, L., Hsi, E. D., Young, K. H., Zhang, M., & Li, Y. (2018). MYD88 L265P Mutation in Lymphoid Malignancies. *Cancer Research*, 78(10), 2457-2462. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0215>
- Zhou, Y., Xu, Z., Lin, W., Duan, Y., Lu, C., Liu, W., Su, W., Yan, Y., Liu, H., Liu, L., Zhong, M., Zhou, J., & Zhu, H. (2019). Comprehensive Genomic Profiling of EBV-Positive Diffuse Large B-cell Lymphoma and the Expression and Clinicopathological Correlations of Some Related Genes. *Frontiers in Oncology*, 9, 683. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00683>
- Zhu, F., Wang, K. B., & Rui, L. (2019). STAT3 Activation and Oncogenesis in Lymphoma. *Cancers*, 12(1), 19. <https://doi.org/10.3390/cancers12010019>

ANEXO

9. Anexo: Publicaciones originales

1. **Título:** From Castleman disease histopathological features to idiopathic multicentric Castleman disease: a multiparametric approach to exclude potential iMCD histopathological mimickers.

Autores: Laura Rodríguez Merino, Aitana Avendaño Pomares, Jose Revert Arce, Santiago Montes-Moreno.

Revista: J Clin Pathol. 2023 Jan 23; jcp-2022-208696. doi: 10.1136/jcp-2022-208696.

Rodríguez Merino L, Pomares AA, Arce JR, Montes-Moreno S. From Castleman disease histopathological features to idiopathic multicentric Castleman disease: a multiparametric approach to exclude potential iMCD histopathological mimickers. *J Clin Pathol.* 2024 Apr 18;77(5):318-323. doi: [10.1136/jcp-2022-208696](https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208696). PMID: 36690434.

2. **Título:** Castleman disease-type histopathological patterns of lymph nodes in patients with plasma cell neoplasia and POEMS syndrome

Autores: Laura Rodríguez Merino, Santiago Montes-Moreno.

Revista: Ann Diagn Pathol. 2024 Nov 26; 74:152414. doi:
10.1016/j.anndiagpath.2024.152414.



Contents lists available at ScienceDirect

Annals of Diagnostic Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anndiagpath

Castleman disease-type histopathological patterns of lymph nodes in patients with plasma cell neoplasia and POEMS syndrome

Laura Rodríguez-Merino, Santiago Montes-Moreno^{*}

Pathology Department and Translational Hematopathology Lab, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, UNICAN, Santander, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Castleman disease
POEMS syndrome
Plasma cell neoplasia
Clonality

ABSTRACT

Plasma cell neoplasia and POEMS syndrome patients may present Castleman disease (CD)-type features in lymph nodes. Our aim was to better characterize the histopathological patterns found in plasma cell neoplasia associated CD and to improve the detection of clonal plasma cell populations in the lymph node biopsies of these patients.

Lymph node and bone marrow samples from six cases with plasma cell neoplasia associated CD, including POEMS syndrome and multiple myeloma were analyzed. A complete analysis including morphology, IHC and PCR-based clonality detection in the lymph node biopsies and morphology, IHC and FCM in the bone marrow biopsies was done. Correlation with clinical and laboratory features was performed.

Both plasma cell rich and hyper vascular Castleman disease like histopathological features were found. In two out of six cases, sheets of plasma cells with light chain and isotype restriction were identified in the lymph nodes. B cell clonality analysis provided evidence of clonal populations in 5 out of 6 cases, increasing the sensitivity for the detection in cases without morphologically identifiable monotypic plasma cells. None of the twelve control cases with iMCD and HHV-8 positive CD showed clonal populations.

In conclusion, the combination of morphology, complete immunophenotyping and B cell clonality analysis in the lymph node biopsy may provide evidence of clonal populations in up to 83 % of cases with plasma cell neoplasia/POEMS syndrome associated Castleman disease. Clinical work-up for the confirmation of plasma cell dyscrasia is advisable in such cases.

1. Introduction

Lymph node Castleman Disease (CD) histopathological features are well described in patients with unicentric CD, POEMS syndrome, HHV-8 positive multicentric Castleman disease (HHV8 + MCD) as well as other autoimmune/autoinflammatory disorders and paraneoplastic syndromes, including idiopathic multicentric Castleman Disease (iMCD) [1,2]. Histopathological and detailed phenotypic analysis of lymph node biopsies may provide a specific disease diagnosis in many cases, although in some instances careful clinic-pathological evaluation is required to identify the underlying condition [3]. An underlying plasma cell neoplasia is found in a significant fraction of patients with lymph node biopsies showing CD features [4] and up to 15 % of patients with POEMS syndrome may show CD type features in their lymph nodes and multicentric CD [5]. The final diagnosis in these patients requires bone marrow examination and correlation with other clinical and laboratory

features that provide criteria for the diagnosis of the underlying plasma cell neoplasia [3,5].

Some histopathological features have been shown to be associated with plasma cell neoplasia associated CD, including high grade germinal center regression and significantly reduced germinal center hyperplasia, when compared with cases of idiopathic MCD [4]. High grade plasmacytosis however is not always found, nor specific since can be found in other entities with plasma cell rich CD features.

In this paper we ought to better characterize the histopathological patterns found in plasma cell neoplasia associated CD and to improve the detection of clonal plasma cell populations in the lymph node biopsies of these patients to provide clues for the segregation of these cases from iMCD and other entities with Castleman disease histopathological features.

^{*} Corresponding author at: Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Translational Hematopathology Laboratory, Avda. de Valdecilla s/n, 39010 Santander, Cantabria, Spain.

E-mail address: Santiago.montes@ucsalud.es (S. Montes-Moreno).

<https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2024.152414>

Available online 26 November 2024

1092-9134/© 2024 Elsevier Inc. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

2. Material and methods

2.1. Case selection

Cases derive from nation-wide hematopathology consultation cases as well as institutional cases from our center (Valdecilla) were filtered to retrieve a retrospective series of eighteen cases with available FPPE lymph node biopsies.

Clinical and laboratory criteria pertinent for the diagnosis of plasma cell dyscrasia and the differential diagnosis of entities with CD histopathological features were collected. Six cases were included with plasma cell neoplasia associated with Castleman disease, including two cases with a diagnosis of multiple myeloma and four cases with a clinical diagnosis of POEMS syndrome. Available bone marrow core biopsy and corresponding bone marrow aspirate and FCM data were reviewed. Four idiopathic MCD cases and eight HHV-8 associated MCD were also included for comparison.

This study and sample collection were approved by the local ethics committee (CEIC Cantabria, Institutional Review Board code 2016.168) and complied with the Declaration of Helsinki. Written informed consent for biomedical research with patient samples was obtained from every patient prior to the inclusion of the sample in the Biobank facility. Patient clinical metadata was anonymized, according to internal Biobank regulations.

2.2. Morphological evaluation and immunohistochemistry

Morphological evaluation of the lymph node tissue and bone marrow core biopsies was done using hematoxylin and eosin-stained slides. Histopathological features were graded in the available lymph node samples, according to accepted criteria [3,4].

Immunohistochemistry (IHC) with antibodies against CD20, CD3, CD138, HHV-8, MUM1, CD56, Ig isotype (IgG, IgG4, IgA, IgM, IgD), kappa and lambda were performed in all cases. FCM data and morphological data from bone marrow aspirate and biopsy were retrieved (see supplementary material for details of immunophenotyping).

2.3. Immunoglobulin gene rearrangements

B cell clonality analysis was performed according to the Euroclonality/BIOMED-2 protocol. In brief, genomic DNA was extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded lymph node tissue and multiplex PCR was used to amplify heavy and light chain immunoglobulin rearrangements (FR1-JH, FR2-JH, and FR3-JH, IgK, IgKde and IgL with IV5 primers). Subsequent capillary electrophoresis in ABI3500 was done and the resulting fragments were analyzed with Applied Biosystems GeneMapper™ Software 5 according to current guidelines [6].

3. Results

A detail of clinical, laboratory and pathological features of the six cases with plasma cell neoplasia associated with Castleman disease can be found in Table 1. Three females with POEMS syndrome and three males with either POEMS syndrome (1 case) and plasma cell neoplasia with AL amyloidosis or multiple myeloma were included. Median age at diagnosis was 59-year-old (range 49–79). All six cases showed multicentric lymphadenopathy with Castleman-like features.

3.1. Lymph nodes

Six lymph nodes samples from patients with confirmed POEMS syndrome (n = 4) or plasma cell neoplasia/multiple myeloma (n = 2) were analyzed.

Three cases had plasma cell rich Castleman disease features and three cases hyper vascular (formerly hyaline-vascular type) CD features.

Table 1
Summary of the clinical and laboratory features.

	Age	Gender	Clinical data	Laboratory	M component (serum)	Adenopathic involvement	Lymph node region	Lymph node size, subtype	Bone marrow biopsy	Final diagnosis
1	79	M	Fever, weight loss and osteolytic lesions, AL amyloidosis	Proteinuria, hypofibrinemia, increased CRP, anemia, thrombopenia	undetectable	Multicentric	Mediastinic	1.2 cm, PC type CD	Plasma cells (>10%) lambda restricted, AL Amyloidosis.	PCN/MM, AL amyloidosis.
2	49	F	Polineuropathy, hepatosplenomegaly, edemas, papilledema, osteoclastic lesions	Proteinuria, thrombocytosis	IgA lambda (0.54 g/dl)	Multicentric	Axillary	2 cm, HV type CD	Plasma cells (>10%) IgA lambda restricted	POEMS
3	57	F	Demyelinating polyneuropathy, tetraparesis, polyadenopathy, hypertrichosis, erythroderma	Thrombocytosis	undetectable	Multicentric	Axillary	2 cm, HV type CD	Megakariocytic hyperplasia, reactive plasmacytosis (<10%)	POEMS type CD
4	59	M	Extremidular plasmacytoma in nasopharynx, bilateral cervical and supraclavicular polyadenopathy, AL amyloidosis. Hypothyroidism	Elevated VSG	IgG lambda (0.2 g/dl)	Multicentric	Cervical bilateral and supraclavicular	1.2 cm, HV type CD	Reactive plasmacytosis (<10%).	PCN/Plasmacytoma, AL amyloidosis
5	70	M	Demyelinating polyneuropathy, axillary and mediastinal polyadenopathy	Increase of VEGF	IgG lambda (0.38 g/dl)	Multicentric	Axillary	1.6 cm, PC type CD	Reactive Plasmacytosis (<10%). Megakariocytic hyperplasia.	POEMS
6	62	F	Osteoblastic lesions, polyadenopathy, Polineuropathy	Thrombocytosis	IgA lambda (0.59 g/dl)	Multicentric	Axillary	2 cm, PC type CD	Lymphoplasmacytoid infiltrate (>10%), CD20+/CD138+ IgA lambda restricted, Megakariocytic hyperplasia.	POEMS

M: male, F: female, CRP: c-reactive protein, VEGF: vascular endothelial growth factor, PCN: plasma cell neoplasia, MM: multiple myeloma, POEMS: polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, and skin changes.

Accordingly, an expansion of paracortex and lymph node medulla by sheets of plasma cells (grade 3) was observed in three cases and prominent germinal center regression (grade 3) and FDC prominence (grade 2) in three cases, with limited plasmacytosis (grade 1). Overall germinal center hyperplasia was not a feature of these cases (grade 0 in five cases and grade 1 in one case) [4] (Figs. 1 and 2). Plasma cell cytological atypia with binucleation were found in isolated cases (case five, Fig. 2).

Monotypic plasma cells by IHC were detected in two of six cases (33 %). All two cases had lambda light chain restriction with IgA and IgG isotypes. In the other four cases light chain restriction was not evident and IgG was the predominant isotype among the plasma cell populations.

Interestingly two plasma cell infiltration patterns were evident with the use of IHC. Cases classified as monotypic showed a monotypic pattern (two out of six cases) when combined isotype and light chain analysis was performed. In three out of six cases, however, clonal plasma cells were scattered among the polytypic plasma cell population and thus unrecognizable (Fig. 1 and Table 2).

B cell clonality analysis showed clonal plasma cell populations in five out of six cases (83 %). Heavy chain clonal rearrangements were

identified in four cases and light chain clonality (IgK, IgK λ e and IgL) in three cases. Two cases showed both heavy and light chain clonal rearrangements and three cases showed either heavy chain or light chain rearrangements. A sole case showed a polyclonal pattern by IgH and light chain analysis (Table 2 and supplementary material). In three cases considered polytypic by IHC, Ig clonal populations were identified by clonality analysis. In summary, clonality analysis improved the detection of the underlying neoplasia in cases with polytypic results by IHC in three out of four cases (75 %) with plasma cell neoplasia/POEMS associated Castleman disease.

For comparison, a set of cases of iMCD (4 cases) and HHV-8 positive MCD (8 cases) were subjected to clonality analysis. All twelve cases showed polyclonal patterns for IgH and light chains, consistent with the immunohistochemical findings.

3.2. Bone marrow

Bone marrow biopsy data were available in all six cases. Three out of these 6 cases showed significant (>10 %) monotypic plasma cell infiltrates. One of these cases featured AL amyloidosis in the bone marrow

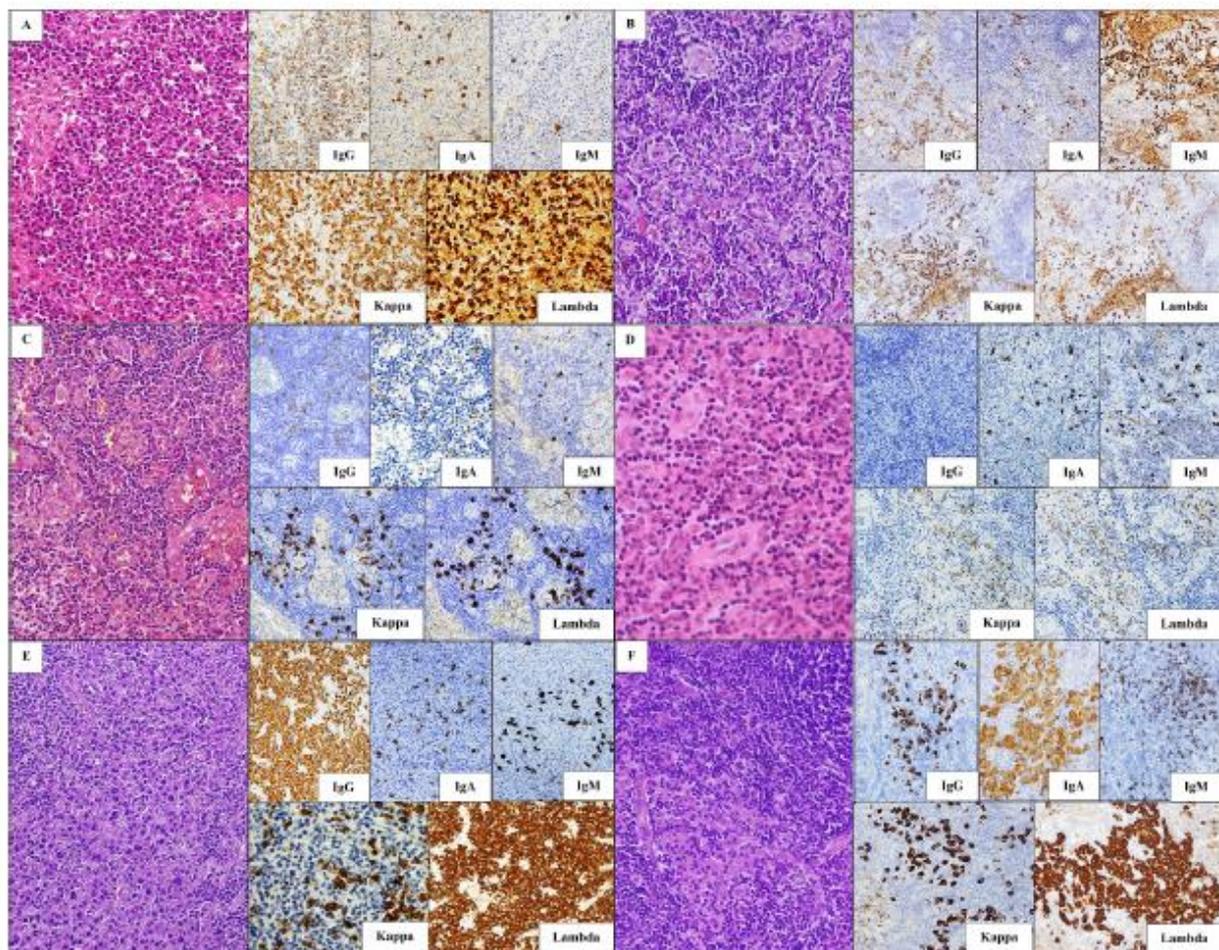


Fig. 1. Summary of morphological and immunohistochemical patterns in six cases of plasma cell neoplasia associated Castleman Disease.

A. Case 1 plasma cell type CD features with grade 3 IgG isotype plasmacytosis in a patient with multiple myeloma. B. Case 2, Hyper vascular type CD features with grade 3 GC regression and grade 1 plasmacytosis in a patient with POEMS syndrome. C. Case 3, Hyper vascular type CD features with grade 3 GC regression and grade 1 plasmacytosis in a patient with POEMS syndrome. D) Case 4 Hyper vascular type CD features with grade 1 plasmacytosis in a patient with plasma cell neoplasia/AL amyloidosis. E) Case five plasma cell type CD features with grade 3 IgG isotype lambda chain restricted plasmacytosis in a patient with POEMS syndrome. F) Case six plasma cell type CD features with grade 3 IgA isotype lambda chain restricted plasmacytosis in a patient with POEMS syndrome.

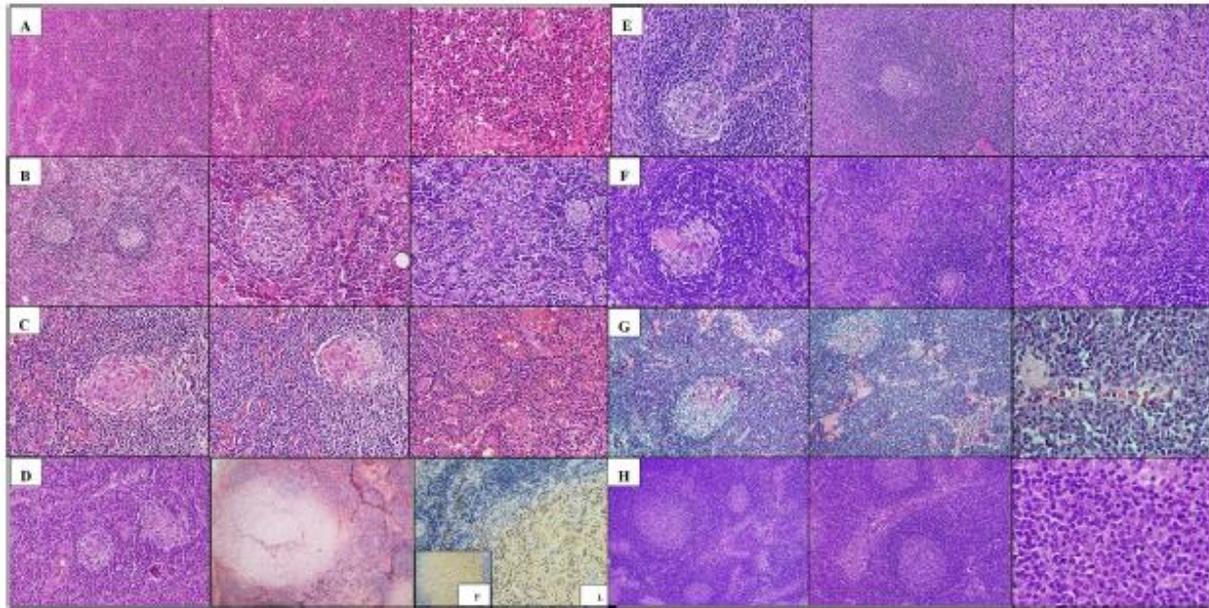


Fig. 2. Morphological grading of Castleman disease histopathological features in the lymph node of six cases of plasma cell neoplasia associated Castleman disease. A. Case 1 (plasma cell type CD features) shows grade 3 plasmacytosis with grade 1 hypervascularization. Absent germinal center hyperplasia/regression and FDC prominence (grade 0). B. Case 2 (hyper vascular type CD features) with grade 3 germinal center regression, grade 2 FDC prominence and hypervascularization and absent germinal center hyperplasia (grade 0) and grade 1 plasmacytosis. C. Case 3 ((hyper vascular type CD features) with grade 3 germinal center regression, grade 3 hypervascularization, grade 2 FDC prominence, absent germinal center hyperplasia (grade 0) and grade 1 plasmacytosis. D. Case 4 (hyper vascular type CD features) shows grade 1 plasmacytosis and grade 3 germinal center regression with grade 1 FDC prominence. Absent germinal center hyperplasia (grade 0) and grade 2 hypervascularization. AL amyloid deposits were found, positive for P protein and Lambda light chains. E. Case 5 (plasma cell type CD features) featured grade 3 plasmacytosis and germinal center regression, with grade 2 prominence of follicular dendritic cells. Absent germinal center hyperplasia and grade 1 hypervascularization. F. Case 6 (plasma cell type CD features) shows grade 3 plasmacytosis and germinal center regression with grade 1 FDC prominence, hypervascularization and germinal center hyperplasia. Note cytological atypia. G and H. Two representative examples of iMCD (Cases 7 and 8) with plasma cell type features and germinal center hyperplasia for comparison.

Table 2
Results of immunohistochemistry and B cell clonality in lymph node biopsies of the eighteen analyzed cases.

	Diagnosis	IHC	IgH clonality	IgK-IgK κ c clonality	IgI clonality	Conclusion
1	PCN/MM AL amyloidosis	Polytypic IgG	FR2 CLONAL (258 bp)	IgK CLONAL (147 bp)	Polyclonal	CLONAL
2	POEMS	Polytypic IgG	FR1 CLONAL (325 bp)	IgK CLONAL (148 bp)	-	CLONAL
3	POEMS type CD	Polytypic IgG	-	-	Polyclonal	POLYCLONAL
4	PCN/AL amyloidosis	Polytypic IgG	FR2 CLONAL (258 bp)	-	-	CLONAL
5	POEMS	IgG lambda	Polyclonal	IgK CLONAL (148 bp)	-	CLONAL
6	POEMS	IgA lambda	FR2 CLONAL (259 bp)	-	Polyclonal	CLONAL
7	iMCD	Polytypic	Polyclonal	-	-	POLYCLONAL
8	iMCD	Polytypic	Polyclonal	Polyclonal	-	POLYCLONAL
9	iMCD	Polytypic	-	Polyclonal	Polyclonal	POLYCLONAL
10	iMCD	Polytypic	Polyclonal	Polyclonal	-	POLYCLONAL
11	HHV-8	IgM lambda	Polyclonal	-	-	POLYCLONAL
12	HHV-8	IgM lambda	-	Polyclonal	-	POLYCLONAL
13	HHV-8	IgM lambda	Polyclonal	Polyclonal	Polyclonal	POLYCLONAL
14	HHV-8	IgM lambda	Polyclonal	-	-	POLYCLONAL
15	HHV-8	IgM lambda	Polyclonal	-	Polyclonal	POLYCLONAL
16	HHV-8	IgM lambda	Polyclonal	Polyclonal	-	POLYCLONAL
17	HHV-8	IgM lambda	Polyclonal	Polyclonal	-	POLYCLONAL
18	HHV-8	IgM lambda	Polyclonal	Polyclonal	Polyclonal	POLYCLONAL

PCN: plasma cell neoplasia. MM: multiple myeloma. POEMS polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal protein, and skin changes. iMCD: idiopathic multicentric Castleman disease. HHV-8: human herpesvirus 8. bp: base pair.

biopsy (case 1). Two of these three cases showed criteria for POEMS syndrome and case one was considered Multiple myeloma with associated AL amyloidosis. Monotypic plasma cells were lambda light chain restricted in all three cases with IgA expression demonstrated in two

cases, consistent with the M component and monotypic plasma cells in the corresponding lymph node biopsy (case 2 and 6) (Fig. 3, Table 1, and supplementary material). Three cases (2 POEMS and one case of PCN/AL amyloidosis) showed no evidence of monotypic/clonal plasma cells

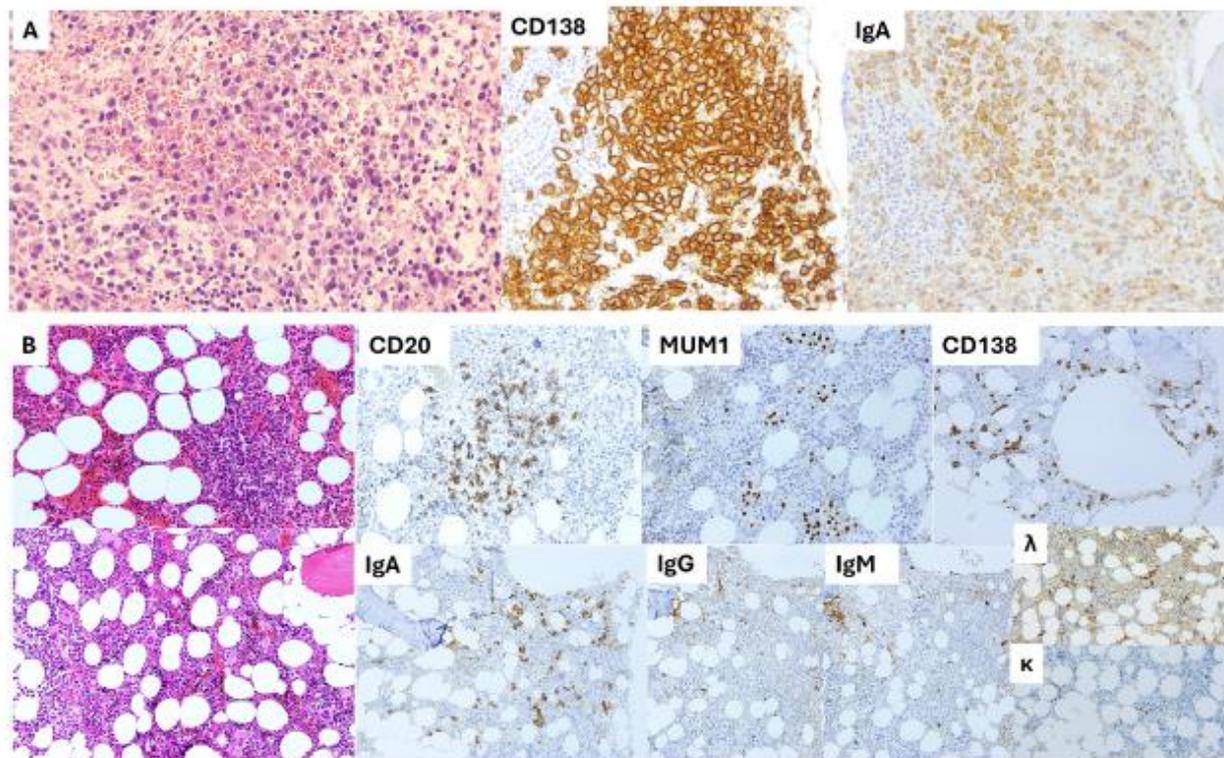


Fig. 3. Bone marrow findings in POEMS syndrome.

A. Bone marrow biopsy specimen in a patient with POEMS syndrome (case 2) showing interstitial nodular plasma cell aggregates (>10 %) with CD138 and IgA expression. Plasma cells were lambda restricted. By FCM 0.18 % of clonal lambda plasma cells with CD138 and CD56 expression were identified.

B. Bone marrow biopsy specimen in a patient with POEMS syndrome (case 6). A nodular interstitial lymphoplasmacytic infiltrate (>10 %) with CD20, CD138, MUM1, IgA and lambda light chain restriction was evident. Note megakaryocytic hyperplasia. By FCM, 0.04 % clonal lambda plasma cells with decreased CD45 and negative CD19 were identified. MYD88L265P mutation was not detected by AS-PCR.

in the bone marrow specimen. Three cases with POEMS syndrome featured megakaryocytic hyperplasia raising in one case (case 6) the differential diagnosis with essential thrombocythemia.

4. Discussion

Here we performed a description of the histopathological patterns in the lymph node biopsies of six patients with a clinical diagnosis of plasma cell neoplasia/Multiple Myeloma or POEMS syndrome. Both plasma cell rich and hyper vascular Castleman disease like features were found. In two cases, morphologically identifiable sheets of plasma cells with light chain and isotype restriction by immunohistochemistry were identified in the lymph nodes. In three additional cases, immunoglobulin gene analysis demonstrated clonal B cell populations, increasing the sensitivity for the detection of such populations in cases without morphologically identifiable monotypic plasma cells.

Detailed histopathological observation of plasma cell infiltration patterns and cytological atypia may suggest the presence of monotypic populations, best confirmed in three cases with the use of an expanded panel of antibodies to demonstrate light chain and heavy chain expression patterns. Although significant expansion of the paracortical area by plasma cells was found in most cases here analyzed, three cases showed high grade (grade 3) plasmacytosis and two of such cases combined cytological atypia with sheets of monotypic plasma cells.

Both monotypic cases showed lambda light chain restriction, one case with IgA restriction and one case with IgG heavy chain expression. Lambda light chain restricted plasma cells have been already identified

as preferentially found in POEMS associated CD and corresponding bone marrow neoplasia [1,7] with rare instances of kappa light chain restricted neoplasia [8]. Of note, iMCD cases lacked any identifiable monotypic populations by IHC and all cases showed an IgG predominant reactive plasma cell population in the paracortex and surrounding the sinuses. Cases of HHV-8 positive MCD showed, as already described, variable amounts of HHV-8 positive IgM-lambda populations, usually surrounding regressive germinal center-like structures.

Clonality analysis enabled us to identify three additional cases in which morphological and IHC analysis failed to prove a neoplastic plasma cell population. In two out of three of these cases the available bone marrow biopsy confirmed the presence of clonal plasma cell neoplasia either by IHC or FCM. The other case (case 4) showed IgG lambda M component in the serum and other clinical features of plasma cell neoplasia /AL amyloidosis (Table 1). Interestingly, the single case without identifiable clonal plasma cells in lymph nodes or bone marrow (case 3), may show clinical features of Castleman disease variant of POEMS syndrome, yet without identifiable monoclonal protein [1,9]. In patients with polyneuropathy, multicentric Castleman disease and other *paraneoplastic* features consistent with POEMS syndrome but without identifiable monoclonal protein, updated diagnostic criteria suggest its classification as CD variant of POEMS syndrome. In contrast to the osteoclasterotic myeloma variant of POEMS in which VEGF is the most consistently elevated cytokine, in Castleman disease IL-6 is the dominant aberrantly overexpressed cytokine. Castleman disease patients often have a brisk polyclonal hypergammaglobulinemia [1].

Application of Ig clonality analysis to cases with CD

histopathological features has been used in recent reports, concurring in its utility to identify a concomitant clonal population, either monoclonal gammopathy or B cell lymphoma (reviewed in [7]). Recently national multidisciplinary consensus guidelines have been developed to recommend a detailed histopathological work-up of lymph node biopsies with CD features in patients with suspected IMCD and related conditions [10], including POEMS syndrome.

Of note FCM analysis and/or light chain in situ hybridization of lymph node biopsies, when available, may also facilitate the identification of such monotypic populations, in cases with morphologically subtle lymph node involvement. The use of other ancillary techniques to demonstrate light chain clonality was not however analyzed nor compared to light chain IHC and PCR-based B cell clonality in our series of cases but this topic may deserve further research.

Bone marrow involvement by clonal plasma cells was confirmed in three out of six cases with available data. In all three cases, monotypic plasma cells were identified by both FCM and IHC. Interestingly clonal plasma cells by FCM were below 2 % in these cases (range 0.04–1.16 %). One case showed a lymphoplasmacytic infiltrate with clonal IgA cells and three cases featured megakaryocytic hyperplasia. Although it is well described that the majority of patients with POEMS syndrome may show identifiable clonal plasma cells in the bone marrow, the amount of such populations is usually low [11] and multiparametric FCM may enhance the detection in such cases [9].

In summary, detailed morphological evaluation, and application of an extended panel of IHC markers for the identification of light and heavy chain restricted plasma cells in lymph node biopsies with CD-like features can suggest a diagnosis of plasma cell neoplasia associated CD in 33 % of cases. Additional work up with B cell clonality analysis in the lymph node provides evidence of clonal populations in up to 84 % of such cases. Thus, in plasma cell neoplasia associated CD, including POEMS syndrome, clonal plasma cells may be undetectable by conventional immunophenotyping. Bone marrow examination, ideally with multiparametric FCM and immunohistochemistry as well as serum immunoelectrophoresis is advisable for the verification of the underlying plasma cell dyscrasia in these patients.

CRedit authorship contribution statement

Laura Rodríguez-Merino: Writing – review & editing, Writing – original draft, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Santiago Montes-Moreno:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Financial support

PI19/00041/ISCIII.

Declaration of competing interest

SMM has received honoraria from Roche, Recordati and Janssen for speaker bureau activities.

Acknowledgements

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.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2024.152414>.

References

- [1] Dispenzieri A. POEMS syndrome: 2019 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2019;94(7):812–27.
- [2] Du MQ, Liu H, Diss TC, Ye H, Hamoudi RA, Dupin N, et al. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infects monotypic (IgM lambda) but polyclonal naive B cells in Castleman disease and associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 2001;97(7):2130–6.
- [3] Falgenbaum DC, Uldrick TS, Bagg A, Frank D, Wu D, Srikalovic G, et al. International, evidence-based consensus diagnostic criteria for HHV-8-negative/idiopathic multicentric Castleman disease. *Blood* 2017;129(12):1646–57.
- [4] Rodríguez Merino L, Pomares AA, Arce JR, Montes-Moreno S. From Castleman disease histopathological features to idiopathic multicentric Castleman disease: a multiparametric approach to exclude potential IMCD histopathological mimickers. *J Clin Pathol* 2024;77(5):318–23.
- [5] Dispenzieri A. POEMS syndrome: 2021 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2021;96(7):872–88.
- [6] Langerak AW, Groenen FJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012;26(10):2159–71.
- [7] Pelliccia S, Rogges E, Cardoni A, Lopez G, Conte E, Faccini AL, et al. The application of a multidisciplinary approach in the diagnosis of Castleman disease and Castleman-like lymphadenopathies: a 20-year retrospective analysis of clinical and pathological features. *Br J Haematol* 2024;204(2):534–47.
- [8] Ikeda S, Kobayashi T, Saito M, Komatsuda A, Ubukawa K, Kameoka Y, et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of neoplastic plasma cells in POEMS syndrome with IgG-kappa gammopathy: successful treatment using lenalidomide and dexamethasone. *Intern Med* 2019;58(23):3461–8.
- [9] Dispenzieri A, Armitage JO, Loe MJ, Geyer SM, Alired J, Camoriano JK, et al. The clinical spectrum of Castleman's disease. *Am J Hematol* 2012;87(11):997–1002.
- [10] Montes-Moreno S, Climent F, Praga M, Luis Patier J, Robles-Marbuenda A, Garcia-Sanz R, et al. Expert consensus on the integrated diagnosis of idiopathic multicentric Castleman disease. *Rev Esp Patol* 2023;56(3):158–67.
- [11] Dao LN, Hanson CA, Dispenzieri A, Morice WG, Kurtin PJ, Hoyer JD. Bone marrow histopathology in POEMS syndrome: a distinctive combination of plasma cell, lymphoid, and myeloid findings in 87 patients. *Blood* 2011;117(24):6438–44.

