

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Villamizar-Rivera N, Olaya N. Experiencia en el uso de protocolos Biomed-2 para el estudio de reordenamientos de TCR e inmunoglobulinas en proliferaciones linfoides en el Instituto Nacional De Cancerología, Colombia. *Biomédica*. 2022;42 (1).

Recibido: 10-12-20

Aceptado: 01-10-21

Publicación en línea: 06-10-21

Experiencia en el uso de protocolos Biomed-2 para el estudio de reordenamientos de TCR e inmunoglobulinas en proliferaciones linfoides en el Instituto Nacional De Cancerología, Colombia

Experience with the BIOMED-2 standardized polymerase chain reaction protocol for immunoglobulin and T- cell receptor clonality analysis in the INC -Colombia

Rearreglos de TCR e inmunoglobulinas en proliferaciones linfoides en Colombia

Nicolás Villamizar-Rivera ^{1,2}, Natalia Olaya ^{1,3}

¹ Grupo Patología Oncológica, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

² Maestría Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

³ Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

Correspondencia:

Natalia Olaya, Grupo Patología Oncológica, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

Tel: 3167635518.

natolaya@gmail.com

Contribución de los autores:

Nicolás Villamizar-Rivera: realizó los experimentos y escritura del manuscrito.

Natalia Olaya: concepción de la idea, análisis de resultados y escritura del manuscrito.

Introducción. El consorcio europeo BIOMED – 2 se creó para determinar si una población linfoide de difícil clasificación patológica es clonal. En Colombia la implementación de estas pruebas comenzó en el 2015 en el Instituto Nacional de Cancerología E.S.E, Bogotá, INC.

Objetivos. Determinar el comportamiento de las pruebas de reordenamientos para clonalidad linfoide y conocer las dificultades para su realización en nuestro medio, a través de la descripción de la adaptación local y los resultados en una serie de casos retrospectiva y consecutiva de proliferaciones linfoides sometidas a los protocolos BIOMED – 2.

Materiales y métodos. Se recolectaron de la historia clínica los datos clínicos, histológicos y los resultados de los análisis de reordenamientos de todos los casos de proliferaciones linfoides sometidas a los protocolos BIOMED 2 entre febrero de 2015 y mayo de 2019.

Resultados. Se recuperaron 132 casos, de los cuales 47 se clasificaron gracias a Biomed 2 como hiperplasias linfoides reactivas, 62 a linfomas T, 19 a linfomas B y 3 a neoplasias linfoides de linaje no establecido. En solo un caso falló la extracción de ADN. La mayor dificultad diagnóstica para el patólogo, según estos resultados, es el análisis de los infiltrados linfoides T, la mayor parte de los cuales (44) son lesiones cutáneas.

Conclusiones. Las pruebas de clonalidad son pruebas que pueden usarse en tejidos de diversa calidad en nuestro medio, y contribuye al diagnóstico de proliferaciones linfoides de difícil clasificación. Por último, es importante realizarlas e interpretarlas de manera interdisciplinaria, considerando cada caso por separado.

Palabras clave: linfoma; reordenamiento génico de linfocito T;
inmunoglobulinas; genes codificadores de los receptores de linfocitos T;
electroforesis en gel de poliacrilamida.

Introduction: The European BIOMED - 2 consortium was created to evaluate clonality in lymphoproliferations of difficult diagnosis. In Colombia, the implementation of these tests began in 2015 at the Instituto Nacional de Cancerología ESE, Bogotá, INC.

Objectives: To determine the behavior of the rearrangement tests for lymphoid clonality and to know the difficulties for its implementation in our environment, a series of retrospective and consecutive cases of lymphoid proliferation subjected to the BIOMED-2 protocols is described.

Materials and methods: Clinical and histological data and the results of the rearrangement analysis of all cases of lymphoid proliferation subjected to the BIOMED 2 protocols between February 2015 and May 2019 were collected from the clinical history.

Results: 132 samples were recovered, of which 47 corresponded to reactive lymphoid hyperplasias, 62 to T lymphomas, 19 to B lymphomas and 3 to lymphoid neoplasms of not established lineage. In only one case did DNA extraction fail. The greatest diagnostic difficulty for the pathologist, according to these results, is the analysis of T lymphoid infiltrates, most of which (44) are skin lesions.

Conclusions: Clonality tests are tests that can be used in tissues of different quality in our environment, and they contribute to the diagnosis of lymphoid proliferations that are difficult to classify. Finally, it is important to carry them out and interpret them in an interdisciplinary way, considering each case separately.

Keywords: Lymphoma; gene rearrangement, T-lymphocyte; immunoglobulins; genes, T-cell receptor; electrophoresis, polyacrylamide gel.

Los linfomas son neoplasias malignas que surgen de cualquier célula del linaje linfoide, y corresponden a alrededor del 10% de los cánceres registrados en el Instituto Nacional de Cancerología (1,2); para el año 2015 se registraron 588 nuevos casos de tumores de los tejidos hematopoyético y linfoide, según el anuario estadístico del INC Colombia, 2015 (3). El diagnóstico de estas enfermedades se realiza mediante la correlación de los hallazgos clínicos, la morfología de las células, la inmunohistoquímica, la citometría de flujo (4) y actualmente de la biología molecular (5).

Según Van Dongen et al (6), incluso en centros de alto nivel, alrededor del 15% de las proliferaciones linfoides no pueden ser diagnosticadas con estas herramientas. Creemos que este valor es un estimado de los autores, pues no hay estudios encaminados a determinar cuál es el grado de dificultad que experimenta un hematopatólogo para incluir una muestra en una de las dos categorías fundamentales: maligno o benigno.

En cada linfocito, la recombinación somática elabora un exón que codificará para la región variable a partir de la selección de un segmento variable (V), un segmento de unión (J) y un segmento de diversidad (D) y la adición de nucleótidos N y P, que posteriormente serán transcritos en ARNm y finalmente traducidos y madurados en una proteína funcional (figura 1). El segmento D solo está presente en los loci de las cadenas pesadas de Ig y los loci β y δ son exclusivos de las del TCR. La recombinación alélica ocurre cuando se unen los fragmentos variables, de diversidad y unión, llamada recombinación V(D)J que se regula por medio de exclusión alélica; una vez que un alelo se ha reordenado, se envía una señal al otro para interrumpir el proceso (7).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los segmentos reordenados de la región variable (**V**), de diversidad (**D**) y de unión (**J**), de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y del receptor de células T (TCR) permite, en general, discriminar si una población celular pertenece a un proceso reactivo (policlonal) o es una neoplasia maligna (monoclonal) (8). En la mayoría de los casos los linfomas de células B evidencian reordenamientos de las Ig mientras que los linfomas de precursores T evidencian rearrreglos en el TCR (9).

Sin embargo, hay excepciones a la correlación de malignidad con clonalidad de los reordenamientos de estos genes; por ejemplo, gracias al proceso de recombinación somática, algunos linfomas maduros del centro germinal, pueden mostrar reordenamientos policlonales. Igualmente, algunas lesiones reactivas, de origen autoinmune en particular, pueden mostrar reordenamientos clonales (10).

Hasta el año 2003 el análisis de estos reordenamientos se realizaba mediante *Southern blot*; sin embargo, este método requería grandes cantidades de ADN (11). Posteriormente se desarrollaron protocolos basados en PCR que buscaban aumentar la sensibilidad de la prueba pero se obtenían falsos negativos (12,13).

En el año 2003 se conformó un consorcio europeo de laboratorios denominado BIOMED – 2 (actualmente EuroClonality) el cual estandarizó los protocolos para la detección de la clonalidad mediante PCR multiplex tanto de Ig como de TCR (14). Los protocolos permitieron obtener una mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad para la detección de clonalidad en neoplasias linfoides (15-17). Además se desarrollaron guías para la correcta interpretación

y los posibles inconvenientes que se podrían generar (18). Esta metodología se ha convertido en una regla de oro utilizada en todo el mundo para la determinación de la clonalidad linfoide (6) y es la base de los protocolos de biología molecular para evaluación de enfermedad mínima residual linfoide propuestos por el consorcio europeo EuroMRD (19).

Los laboratorios del mundo han adaptado la técnica a diferentes tipos de tejido como biopsias decalcificadas de médula ósea (20), tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFEP), biopsias de piel (21) y biopsias por aspiración con aguja fina (22). Los resultados han sido variables. Según la literatura, es ideal utilizar tejido fresco.

Las patologías en las cuales se ha aplicado el ensayo de clonalidad son muy variables: leucemia linfoblástica aguda de precursores B (23), linfoma Hodgkin clásico (24), linfoma folicular (25), linfoproliferaciones cutáneas (26), linfomas anaplásicos de células T (27), micosis fungoides (28), entre otros.

El objetivo de nuestro estudio es describir el comportamiento de los reordenamientos de receptor de antígeno en una serie consecutiva de proliferaciones linfoides de difícil clasificación en pacientes del Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá – Colombia, evaluada por medio de una adaptación local de los protocolos BIOMED 2.

Materiales y métodos

Obtención de los datos

Se analizaron todos los casos consecutivos de proliferaciones linfoides atípicas en las cuales se solicitó estudio de reordenamientos de receptor de antígeno entre febrero de 2015 y junio de 2019. Se examinó la historia clínica y se elaboró una base de datos con los datos clínicos, histológicos,

inmunohistoquímicos. De la base de datos de laboratorio se examinaron las características de las muestras recibidas para estudio, la calidad y concentración de ADN y los resultados de clonalidad.

Indicaciones para estudio de clonalidad linfoide

La prueba se solicitaba de acuerdo a los criterios de los hemato-oncólogos como dermatólogos oncólogos y patólogos, en general, los casos fueron aquellos en los cuales no fue posible en que clínicos y patólogos llegaran a un consenso acerca del potencial maligno de la proliferación linfoide, mediante el estudio morfológico, de inmunohistoquímica, genético y de citometría de flujo.

Preparación de los tejidos

Médula ósea y sangre. Se realizó la separación de leucocitos por gradiente de densidad mediante gradiente de densidad Histopaque®-1077 (Sigma – Aldrich, St Louis, Missouri, USA). **Tejido fresco.** Este tejido fue embebido en resina de congelación *Tissue Freezing Medium* (Leica biosystems, Wetzlar, Alemania), se procedía a congelar y hacer cortes representativos del tejido con un grosor de 3 micras. Se realizaba coloración de rutina para evaluar el porcentaje de células problema y su distribución. **Tejido FFEP** (Fijado en formalina y embebido en parafina). Se evaluaron las láminas H&E de cada caso y se seleccionaron aquellas que tuviera más del 10% de población linfoide problema; en los casos que no cumplían con se sugería tomar una nueva biopsia y procesarla en fresco.

Extracción de ADN

De los tejidos en FFEP, se realizaron 4 cortes a 10 µm del bloque y se colocaron en un tubo eppendorft de 1.5ml; se realizó una desparafinización con 1 ml de xileno y 1ml de etanol, repitiendo dos veces cada paso. Las células

separadas por gradiente de densidad, el tejido fresco y el recién desparafinado, se dejaban en digestión en proteinasa K con un buffer de incubación (SDS 2%, NaCl 250mM, EDTA 1mM, Tris 1mM) durante 48hrs a 56°C. Luego se adicionó perclorato de sodio (3M) y Cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1 (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) se mezcla homogéneamente y se centrifuga. Se toma la fase acuosa y se adiciona una sal fuerte (NaCl 3M) y etanol para precipitar el ADN. Se mantiene a 4 °C por 1 hora, se centrifuga y el precipitado se lava con etanol al 100% y 70%, finalmente el ADN se diluye en Buffer de dilución (Tris 10mM, EDTA 1mM).

Selección de blancos

De acuerdo con el consorcio Biomed – 2/EuroClonality, los tejidos en parafina se deben evaluar teniendo en cuenta la calidad del tejido, esto permite evitar falsos negativos o errores en la amplificación. Además, los protocolos deben ser estandarizados de acuerdo con los medios de cada centro diagnóstico. Adicionalmente, la prueba es costosa para los estándares nacionales y no está contemplada en el Plan Obligatorio de Salud, por esta razón, cada vez que se solicita una prueba se debe tener en cuenta la pregunta clínica y la premura con la cual el médico tratante requiere los resultados. Es por estos motivos que se debe elegir con precisión que grupos de genes se van a utilizar dependiendo los genes y los tamaños esperados.

PCR

El ADN se cuantificó en el equipo Nanodrop2000c (Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y se utilizó una concentración final de 20ng/ul. La PCR múltiplex se realizó de acuerdo con los protocolos diseñados en el consorcio BIOMED-2 (29), utilizando IdentiClone™ IGH + IGK & TCRB + TCRG

Gene Clonality Assay (Invivoscribe, San Diego, California, USA). Se evaluó la calidad de los tejidos en parafina utilizando una PCR control incluida en el mismo kit. Se asumió que todos los tejidos en fresco eran de óptima calidad. Todas las PCR para amplificar TCR e inmunoglobulinas se realizaron por duplicado y los productos se analizaron, por electroforesis en gel de acrilamida o por análisis de fragmentos en secuenciador capilar, según disponibilidad y recomendaciones del consorcio EuroClonality / Biomed – 2 (figura 2) (14).

Electroforesis en gel de acrilamida

Para favorecer la formación de heterodupletas se realizó calentamiento y luego un choque térmico a 0°C, posteriormente se realizó la migración en geles TBE Novex 6% (Life Technologies, Invitrogen, Grand Island, NY, USA), utilizando buffer de corrido BlueJuice Gel Loading Buffer (10X) (Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), en relación 1:3 con el producto de PCR. En cada montaje se utilizó como referente marcador de peso VC 100bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia). El corrido se realizó en una cámara de electroforesis XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), a 110V constantes durante 80 minutos. Se reveló sumergiendo los geles en Bromuro de Etidio diluido (0,5µg/1ml) en agua destilada durante 10 minutos, posteriormente en agua grado biología molecular 2 veces durante 10 minutos cada una. Los geles se revelaron en el equipo Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (Bio Rad, Hercules, California, USA) y se tomó registro fotográfico de cada gel.

Análisis de fragmentos

Se formaron heterodupletas por calentamiento y luego se estabilizaron por medio de un choque término a 0°C, De cada ensayo de PCR se realizó un

duplicado y se visualizó por medio del analizador genético ABI PRISM® 310. Se realizaba un mix de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems™, Hampton, Nuevo Hampshire, Estados Unidos) (15µl), GeneScan™ 500 ROX™ dye Size Standard (Applied Biosystems™, Hampton, Nuevo Hampshire, Estados Unidos) 0.4µl) y el producto de PCR (1µl) por cada muestra. Se realizaba el corrido estándar con POP – 6 POP-6™ Polymer (Applied Biosystems™, Hampton, Nuevo Hampshire, Estados Unidos) en un capilar de 47 cm. Cada muestra fue corrida durante 50 minutos para evitar errores en la lectura. Cada blanco fue analizado individualmente comparándolo con el control clonal y policlonal.

Interpretación de resultados

Los resultados se examinaron independientemente por el biólogo molecular y el médico patólogo. Todas las muestras que presentaron una banda o pico definido en el rango establecido para cada tubo fueron consideradas como clonales para ese blanco; las muestras que no mostraban producto específico y solo se veía un barrido de ADN o una distribución tipo campana de Gauss se determinaron como policlonales. En caso de que las bandas fueran inespecíficas o no concluyentes se repetía nuevamente la PCR y la electroforesis bajo las mismas condiciones. Cada caso se interpretó con base en hallazgos clínicos y anatomopatológicos y se reportó siguiendo las recomendaciones de Langerak, 2012 (6)

Resultados

Pacientes y muestras

En total se evaluaron 122 pacientes, de los cuales 58 fueron mujeres (Edad: 12 – 90, \bar{x} : 52.25 años) y 64 hombres (Edad: 7 – 94, \bar{x} : 52.09 años). De algunos

de ellos se obtuvieron varias muestras de tejidos diferentes. En total se evaluaron 142 muestras de estos pacientes, en 1 de estos no fue posible obtener suficiente ADN los casos no se logró obtener ADN y tampoco tomar una nueva muestra (0.7%) por lo que se procesaron en total 131 muestras.

- **La prueba permite el uso de cualquier tipo de tejido**

Se utilizaron todos los tipos de tejido, pero principalmente tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina n = 81 (61.83%); también se procesaron tejidos no parafinados, distribuidos así: biopsia de piel en solución salina n = 31 (23.66%), sangre periférica n = 11 (8.39%), aspirado líquido de médula ósea n = 5 (3.81%), ganglio en solución salina n = 2 (1.52%) y biopsia de hueso n = 1 (0.76%).

Los tejidos FFEP que se utilizaron tenían menos de un año de procesados; se obtuvo en promedio 152.6 ng/μl de ADN y 1.81 de pureza, en comparación con los tejidos no parafinados que se obtuvo 294.2 ng/μl de ADN con 1.93 de pureza.

El ADN extraído de los tejidos en parafina amplificó al menos 300pb de la PCR control desarrollado por el mismo protocolo BIOMED – 2, siendo una calidad que permite evaluar la mayoría de los reordenamientos sin error de falsos negativos.

- **La prueba de clonalidad permite definir un diagnóstico patológico**

En diagnóstico final de los casos después de que los tratantes y los patólogos conocieran el resultado de los reordenamientos correspondió a 19 proliferaciones de células B (12.5%), 62 proliferaciones de células T (43.75%),

3 proliferaciones de linaje incierto (2.68%), y 47 hiperplasias linfoides reactivas (35.87%).

De las 47 proliferaciones reactivas, 46 fueron hiperplasias linfoides reactivas (95.8%) y 1 prurigo (4.2%).

En tres casos analizados para proliferaciones T se vieron reordenamientos pseudoclonales, y en algunas hiperplasias linfoides se observó distribución irregular de los picos al analizarlo por análisis de fragmentos, este problema se solucionó analizando más reordenamientos disponibles que permitieran dar un análisis concluyente.

Dependiendo de la pregunta clínica y la calidad del ADN se realizó la elección de los reordenamientos que podrían contribuir al diagnóstico. En el caso mostrado en la figura 3, una paciente con antecedente de linfoma cutáneo presenta linfadenopatías. Por medio del análisis de reordenamiento, en la piel y el ganglio linfático se resuelve la duda clínica de si se trata de la misma proliferación linfoide, o son completamente diferentes (figura 3).

Clonalidad en proliferaciones B

En total se diagnosticaron 19 neoplasias B, 6 linfomas B de alto grado (linfomas B difuso de célula grande) y 13 linfomas B de bajo grado (Linfomas asociados a cualquier tejido, linfoma primario cutáneo de la zona marginal, linfoma de la zona marginal, primario cutáneo de la zona marginal, desorden linfoproliferativo asociado a IDP de tipo polimorfo con rearreglo clonal de IGH, linfoma no Hodgkin primario [del sistema nervioso central asociado con inmunodeficiencia y leucemias B NOS) (figura 4A).

En los linfomas B difuso de célula grande. El 100% (6/6) mostraron clonalidad en al menos 1 reordenamiento de IgH, mientras que el 83% (5/6) mostraron

clonalidad en Igk Vk – Jk; dos casos reordenaron TCRβ Vβ – Jβ 2 (TCRβ Vβ – Jβ 2 & TCRβ Dβ – Jβ) (figura 5).

De los linfomas asociados a cualquier tejido (BALT y MALT), se analizaron los reordenamientos de las cadenas pesadas de las Ig, y se observó que IgH VH – FR2 – JH reordenó en el 100% de los casos analizados (5/5) mientras que VH – FR1 – JH solo reordenó en el 60% (3/5) y VH – FR3 – JH en el 66 % (4/6).

Solamente 1 caso de los analizados reordenó IgK. Adicionalmente uno de los casos analizados, que tuvo los reordenamientos IgH, también reordenó TCRβ Vβ – Jβ 2 (figura 5).

En un linfoma de la zona marginal y un linfoma cutáneo de la zona marginal se analizaron los reordenamientos de TCRβ Vβ – Jβ ½ & 2 los cuales fueron clonales. El linfoma de la zona marginal, la leucemia B Nos y los linfomas asociados a alguna inmunodeficiencia primaria mostraron reordenamientos en al menos una región de IgH.

La distribución de los reordenamientos clonales de las inmunoglobulinas para las neoplasias B fueron un 40% para IgH VH FR1 – JH (4/10), 92% para IgH VH FR2 – JH (11/12), 70% para IgH VH FR3 – JH (12/17), 64% para Igk Vk – Jk (9/14) y 22% para Igk Vk/intron – Kde (2/9) . En el caso de los reordenamientos de TCR los resultados fueron 50% para TCRβ Vβ – Jβ ½ (2/4), 50% para TCRβ Vβ – Jβ 2 (4/5), 25% para TCRβ Dβ – Jβ (1/4), 0% para TCRγ Vγ 1 – 8, Vγ10 + Jγ (0/10) y 0% para TCRγ Vγ 9, Vγ11 + Jγ (0/9) (figura 3).

Clonalidad en proliferaciones T

En total se analizaron 63 linfomas de células T, de los cuales 44 correspondieron a linfomas cutáneos (Micosis fungoides, linfomas cutáneos de

células T y linfomas cutáneos NOS) y 18 a linfomas de otro origen (Leucemia de linfocitos T grandes granulares, linfoma T periférico, síndrome de Sezary, linfoma T anaplásico, linfoma T doble positivo, papulomatosis linfomatoide, leucemia T NOS, leucemia T CD8+, leucemia/Linfoma de células T del adulto) (figura 4B).

De los linfomas cutáneos se analizaron 25 micosis fungoide, 14 linfomas cutáneos de células T y 5 linfomas cutáneos NOS. En total los linfomas evidenciaron reordenamientos en el 54% para TCR γ V γ 1 – 8, V γ 10 + J γ (21/44), 47 para TCR β V β – J β 2 (18/38), 44% para TCR β V β – J β 1/2 (16/36), 40% para TCR γ V γ 9, V γ 11 + J γ (17/42) y 12% TCR β D β – J β (3/25); además se evidenciaron reordenamientos en 33% para IgH VH FR3 – JH (3/9), 28% para IgH VH FR2 – JH (2/7), 14% para IgH VH FR1 – JH (1/7), no se observaron reordenamientos de Igk para ninguna de estas neoplasias (figura 5).

Los linfomas no cutáneos evidenciaron reordenamientos en un 83% para TCR γ V γ 1 – 8, V γ 10 + J γ (15/18), 55% para TCR β V β – J β 2 (10/18), 46% para TCR β V β – J β 1/2 (7/15), 37% para TCR γ V γ 9, V γ 11 + J γ (6/16) y 18% TCR β D β – J β (2/11). No se evidenció ningún reordenamiento para Ig (figura 5).

La distribución de los reordenamientos clonales del TCR para las neoplasias T fueron un 44% para TCR β V β – J β 1/2 (23/52), 50% para TCR β V β – J β 2 (28/56), 13% para TCR β D β – J β (5/36), 58% para TCR γ V γ 1 – 8, V γ 10 + J γ (36/62) y 39% para TCR γ V γ 9, V γ 11 + J γ (23/58). En el caso de los reordenamientos de Ig los resultados fueron 14% para IgH VH FR1 – JH (1/7), 28% para IgH VH FR2 – JH (2/7), 23% para IgH VH FR3 – JH (3/13) y 0% para Igk V k – J k (0/9) e Igk V k /intron – Kde (0/4) (figura 5).

Clonalidad en proliferaciones indeterminadas

Las proliferaciones indeterminadas eran dos sarcomas histiocítico derivado de linfoma, uno de ellos no tuvo ningún reordenamiento, el otro reordenó Igk V_k – J_k y TCRβ V_β – J_β ½. Y un sarcoma NOS de hueso reordenó Igk V_k – J_k y TCRγ V_γ 1 – 8, V_γ10 + J_γ.

Discusión

Esta es la primera experiencia en Colombia con el uso de reordenamientos de receptor de antígeno para determinar clonalidad linfoide. Se describe una serie consecutiva de proliferaciones linfoides de diagnóstico difícil en la cual se utilizaron los protocolos BIOMED 2 para evaluar los reordenamientos que ocurren en las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas y en las cadenas beta y gamma del Receptor de células T.

Los protocolos BIOMED – 2 utilizados en el estudio son considerados actualmente la norma de oro para definir si una proliferación es clonal , superando la inmunofenotipificación (30). Aunque es posible realizar este análisis por secuenciación de nueva generación, todavía se encuentra en validación, y el protocolo de mayor utilización en el mundo sigue siendo el de PCR múltiplex.

La adaptación que se logró de la prueba es robusta y permite utilizar todo tipo de tejidos; en particular, fue muy exitosa con los parafinados, de los cuales, al ser el INC un centro de referencia, se desconocen muchas veces sus condiciones preanalíticas. Atribuimos los buenos resultados a nuestro protocolo para la extracción orgánica de ADN.

Nuestros resultados muestran que las proliferaciones linfoides que los patólogos consideran de diagnóstico y clasificación más difícil son los linfomas

cutáneos y los linfomas B difuso de célula grandes. En general, los reordenamientos obtenidos para cada lesión son los esperados en la literatura (27,31,32).

Un hallazgo interesante fue la presencia de reordenamientos del TCR en linfomas B difuso de célula grande, linfomas de la zona marginal y sarcoma histiocítico. Esto podría explicarse por dos razones principales. Los linfocitos acompañantes del microambiente tumoral son clonas de linfocitos T o las características aberrantes de las células tumorales permiten que reordene los genes del TCR sin necesidad de expresarlos (27,33). Faltan más estudios para aclarar estos mecanismos. Por esta razón, los casos en los que se considere utilizar la prueba para determinar el linaje, siempre deben interpretarse con precaución.

Las pruebas para evaluar reordenamientos en linfoproliferaciones sospechosas desarrolladas por el consorcio BIOMED – 2/EuroClonality, son robustas y permiten concluir el análisis diagnóstico de casos difíciles en la mayoría de los casos y en varios tipos de tejido, incluyendo parafinado y hueso, lo cual es importante en nuestro medio en el que no se controla con precisión las condiciones preanalíticas.

Los análisis de reordenamientos fueron útiles para el diagnóstico, pero no para definir el linaje de la población problema, pues encontramos que los reordenamientos del TCR pueden aparecer en proliferaciones linfoides B y los de inmunoglobulinas en proliferaciones linfoides de células T.

Es necesario el análisis multidisciplinario caso por caso con el fin de optimizar el uso de reactivos y responder adecuadamente a cada uno de los requerimientos clínicos.

Agradecimientos

Al Grupo de Patología del Instituto Nacional de Cancerología, y al laboratorio de Patología Molecular; también agradecemos al grupo de Hemato-oncología y en especial al Consorcio Europeo BIOMED-2 por su acompañamiento y asesoramiento con algunos casos.

Conflicto de intereses

Los autores de esta investigación, declaramos que no existe comercial o asociativo que presente un conflicto de interés en el manuscrito presentado.

Financiación

La presente investigación se llevó a cabo en el grupo de patología oncológica del Instituto Nacional de Cancerología. Los análisis posteriores y discusión de resultados no recibieron ningún tipo de financiación adicional.

Referencias

1. **Instituto Nacional de Cancerología.** Anuario Estadístico 2010. 1st Edition. Bogotá: Buenos y creativos S.A.S.; 2012.
2. **Basso K, Dalla-Favera R.** Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:172–84.
<https://doi.org/10.1038/nri3814>
3. **Instituto Nacional de Cancerología.** Anuario Estadístico 2015. 1st Edition. Bogotá: Buenos y creativos S.A.S.; 2018.
4. **Sandberg Y, van Gastel-Mol EJ, Verhaaf B, Lam KH, van Dongen JJM, Langerak AW, et al.** BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace southern blot analysis in routine clonality diagnostics. *J Mol Diagnostics.* 2005;7:495-503. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60580-6](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60580-6)

5. **Hoeve MA, Krol AD, Philippo K, Derksen PW, Veenendaal RA, Schuurin E, et al.** Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. *Mol Pathol.* 2000;53:194-200.
<https://doi.org/10.1136/mp.53.4.194>
6. **Langerak AW, Groenen PJ, 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;26:2159-71.
<https://doi.org/10.1038/leu.2012.246>
7. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** Cellular and molecular immunology, 8th ed. Amsterdam: Elsevier: 2014. p. 544.
8. **Malcolm TIM, Hodson DJ, Macintyre EA, Turner SD.** Challenging perspectives on the cellular origins of lymphoma. *Open Biol.* 2016;6:160232. <https://doi.org/10.1098/rsob.160232>
9. **Kim Y, Choi YD, Choi C, Nam J-H.** Diagnostic utility of a clonality test for lymphoproliferative diseases in Koreans using the BIOMED-2 PCR assay. *Korean J Pathol.* 2013;47:458-65.
<https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2013.47.5.458>
10. **Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, et al.** Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia .* 2007;21:222-9. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404482>
11. **Davey DD, Kamat D, Zaleski S, Goeken J, Dick FR.** Analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement in cytologic

- specimens. *Acta Cytol.* 1989;33:583-90.
12. **Davis TH, Yockey CE, Balk SP.** Detection of clonal immunoglobulin gene rearrangements by polymerase chain reaction amplification and single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol.* 1993;142:1841-7.
 13. **Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA.** Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood.* 1991;78:192-6.
 14. **van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al.** Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17:2257-317. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202>
 15. **Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, et al.** Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2007;21:222-9. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404482>
 16. **Evans PA, Pott C, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, et al.** Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia.* 2007;21:207-14. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404479>
 17. **Brüggemann M, White H, Gaulard P, Garcia-Sanz R, Gameiro P,**

- Oeschger S, et al.** Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia*. 2007;21:215-21.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404481>
18. **Groenen PJTA, Langerak AW, van Dongen JJM, van Krieken JHJM.** Pitfalls in TCR gene clonality testing: teaching cases. *J Hematop*. 2008;1:97-109. <https://doi.org/10.1007/s12308-008-0013-9>
19. **Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béne MC, Buccisano F, Cloos J, et al.** Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131:1275-91. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-801498>
20. **Lassmann S, Gerlach U V, Technau-Ihling K, Werner M, Fisch P.** Application of BIOMED-2 primers in fixed and decalcified bone marrow biopsies: analysis of immunoglobulin H receptor rearrangements in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Mol Diagn*. 2005;7:582-91.
[https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60591-0](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60591-0)
21. **Berget E, Helgeland L, Molven A, Vintermyr OK.** Detection of clonality in follicular lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples and BIOMED-2 immunoglobulin primers. *J Clin Pathol*. 2011;64:37-41. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.081109>
22. **Zhang S, Abreo F, Lowery-Nordberg M, Veillon DM, Cotelingam JD.** The role of fluorescence in situ hybridization and polymerase chain reaction in the diagnosis and classification of lymphoproliferative disorders on fine-needle aspiration. *Cancer Cytopathol*. 2010;118:105-12.
<https://doi.org/10.1002/cncy.20070>

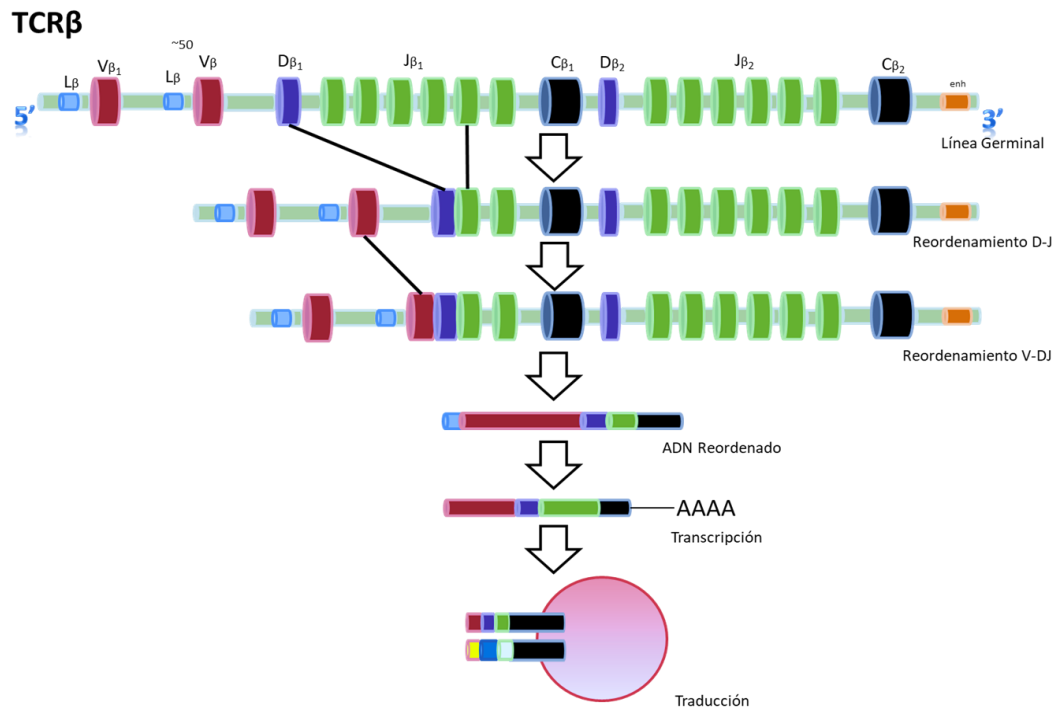
23. **Dawidowska M, Jółkowska J, Szczepański T, Derwich K, Wachowiak J, Witt M.** Implementation of the standard strategy for identification of Ig/TCR targets for minimal residual disease diagnostics in B-cell precursor ALL pediatric patients: Polish experience. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008;56:409-18. <https://doi.org/10.1007/s00005-008-0045-y>
24. **Burack WR, Laughlin TS, Friedberg JW, Spence JM, Rothberg PG.** PCR assays detect B-lymphocyte clonality in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of classical hodgkin lymphoma without microdissection. *Am J Clin Pathol*. 2010;134:104-11. <https://doi.org/10.1309/AJCPK6SBE0XOODHB>
25. **Payne K, Wright P, Grant JW, Huang Y, Hamoudi R, Bacon CM, et al.** BIOMED-2 PCR assays for IGK gene rearrangements are essential for B-cell clonality analysis in follicular lymphoma. *Br J Haematol*. 2011;155:84-92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08803.x>
26. **Sandberg Y, Heule F, Lam K, Lugtenburg PJ, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM, et al.** Molecular immunoglobulin/T- cell receptor clonality analysis in cutaneous lymphoproliferations. Experience with the BIOMED-2 standardized polymerase chain reaction protocol. *Haematologica*. 2003;88:659-70.
27. **Tan BT, Seo K, Warnke RA, Arber DA.** The frequency of immunoglobulin heavy chain gene and T-cell receptor γ -chain gene rearrangements and Epstein-Barr virus in ALK+ and ALK- anaplastic large cell lymphoma and other peripheral T-cell lymphomas. *J Mol Diagn*. 2008;10:502-12. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080054>
28. **Sufficool KE, Lockwood CM, Abel HJ, Hagemann IS, Schumacher**

- JA, Kelley TW, et al.** T-cell clonality assessment by next-generation sequencing improves detection sensitivity in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73:228-236.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.04.030>
29. **van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al.** Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17:2257-317. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202>
30. **Gazzola A, Mannu C, Rossi M, Laginestra MA, Sapienza MR, Fuligni F, et al.** The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies. *Ther Adv Hematol.* 2014;5:35-47.
<https://doi.org/10.1177/2040620713519729>
31. **Kokovic I, Novakovic BJ, Cerkovnik P, Novakovic S.** Clonality analysis of lymphoid proliferations using the BIOMED-2 clonality assays: a single institution experience. *Radiol Oncol.* 2014;48:155-62.
<https://doi.org/10.2478/raon-2013-007>
32. **Rout ED, Burnett RC, Yoshimoto JA, Avery PR, Avery AC.** Assessment of immunoglobulin heavy chain, immunoglobulin light chain, and T-cell receptor clonality testing in the diagnosis of feline lymphoid neoplasia. *Vet Clin Pathol.* 2019;48 (Supl. 1):45-58.
<https://doi.org/10.1111/vcp.12767>
33. **Suefuji N, Niino D, Arakawa F, Karube K, Kimura Y, Kiyasu J, et al.** Clinicopathological analysis of a composite lymphoma containing both T-

and B-cell lymphomas. *Pathol Int.* 2012;62:690-8.

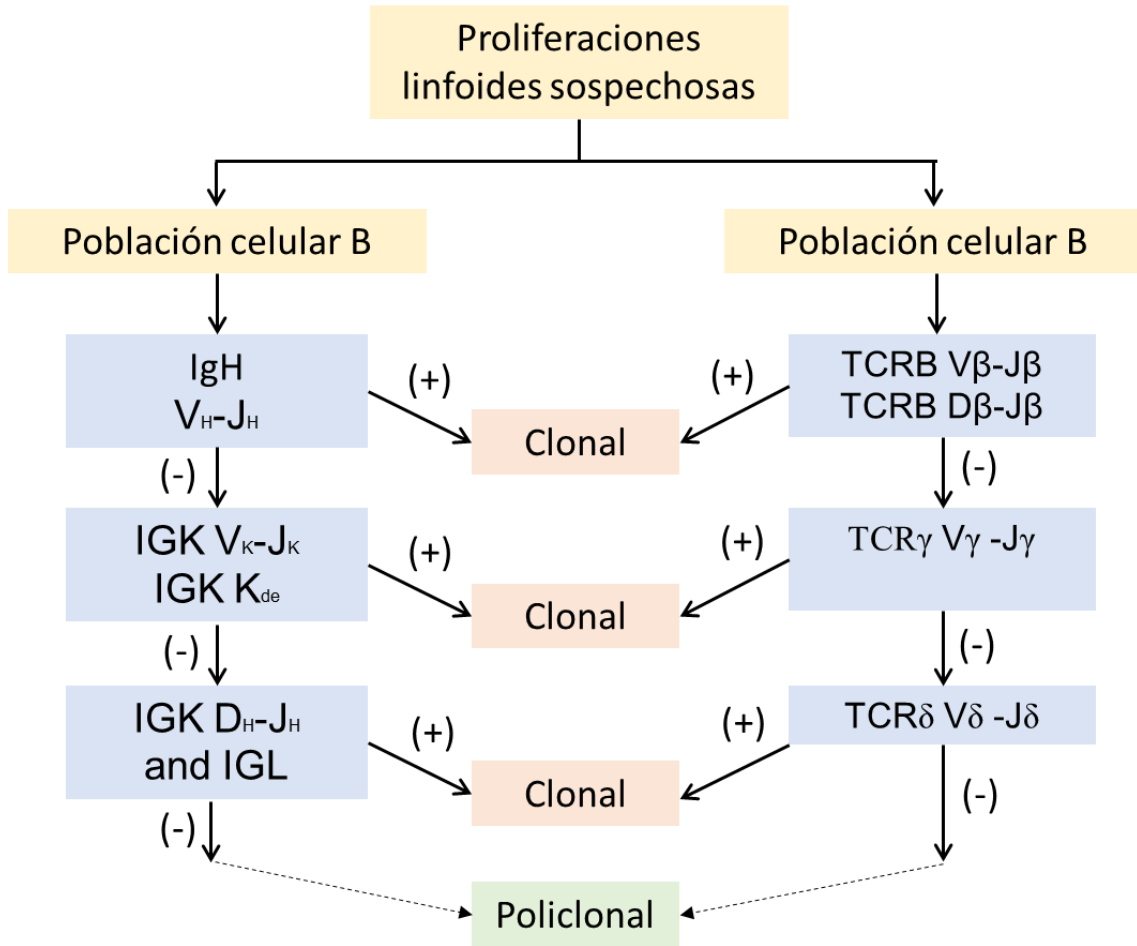
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2012.02858.x>

Figura 1. Proceso de reordenamiento del gen de receptor de antígeno



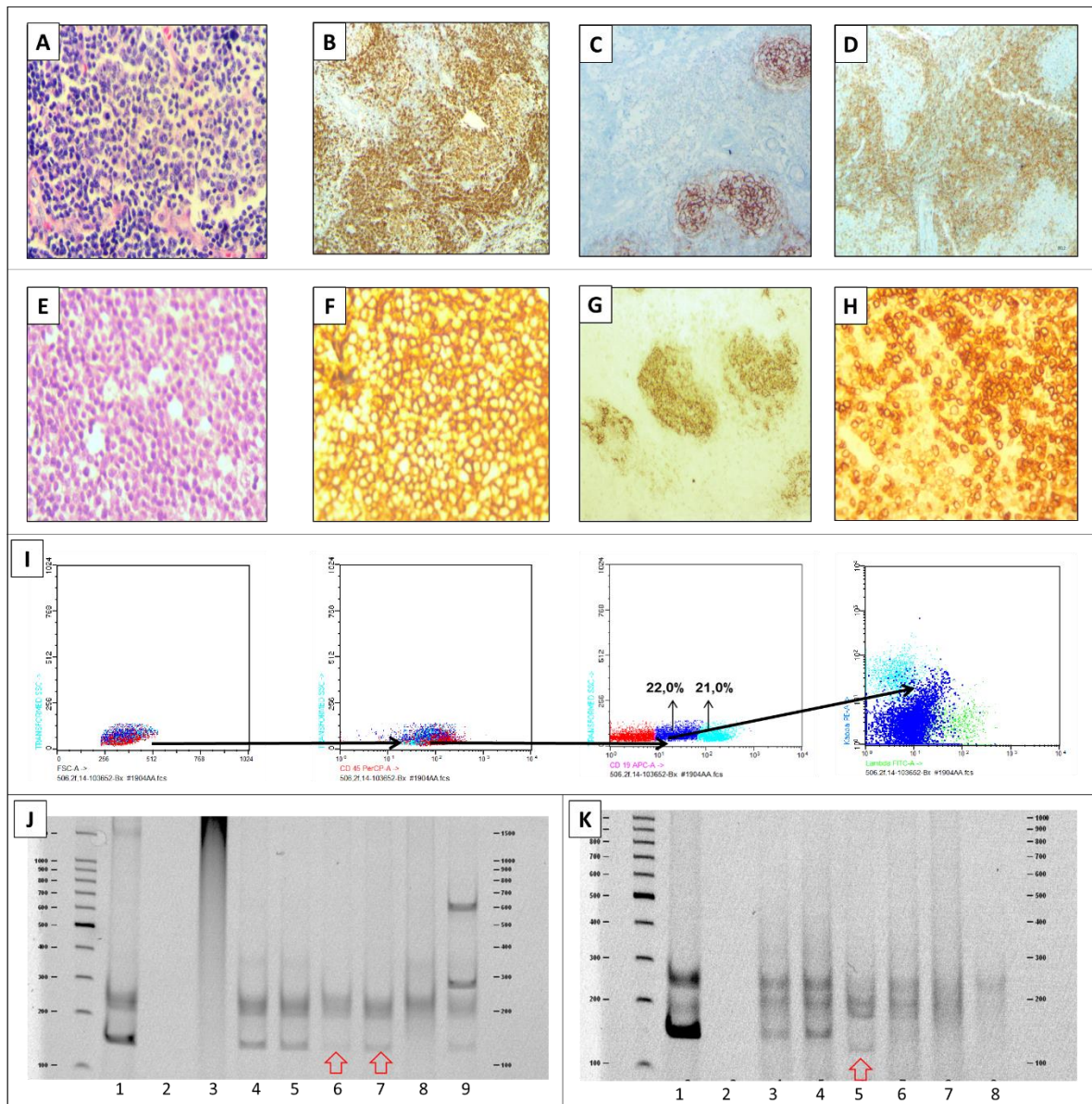
En la figura se muestra el reordenamiento de la cadena Beta del receptor de células T (TCR), sin embargo, este proceso es muy similar tanto para las demás cadenas del TCR como para las inmunoglobulinas. En este proceso se pueden llegar a tener hasta 10^{18} combinaciones.

Figura 2. Algoritmo propuesto y utilizado para el estudio de clonalidad en lesiones linfoides



Los reordenamientos se evalúan de acuerdo al origen celular de la lesión a evaluar. Si los resultados son positivos se determina como "Clonal" en caso contrario se utilizan los siguientes reordenamientos, Si en ningún resultado se obtienen reordenamientos, la muestra se considera "policlonal"

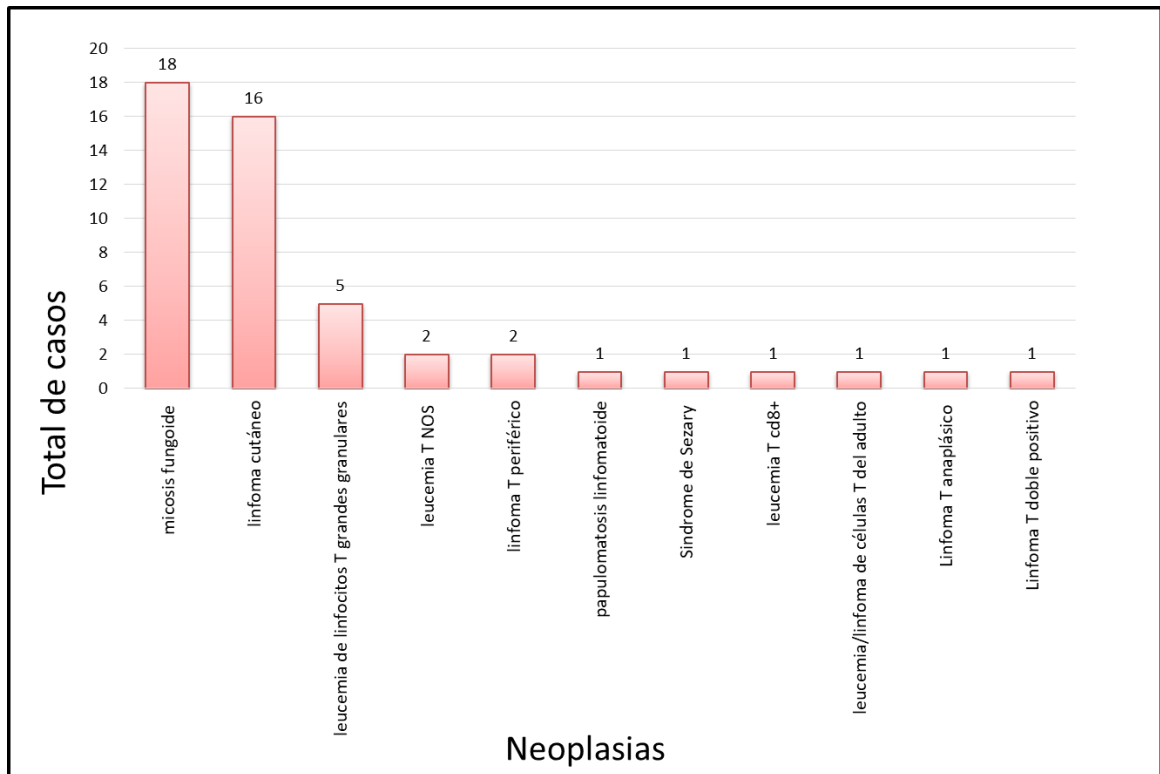
Figura 3. Caso representativo del diagnóstico multidisciplinario en casos de clonalidad.



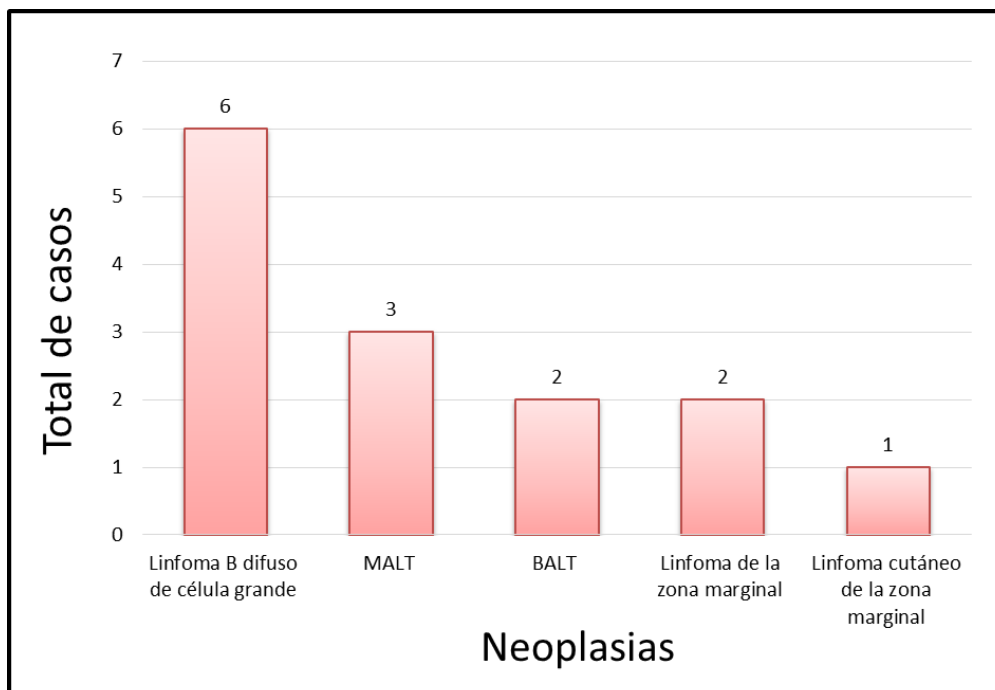
Paciente mujer de 69 años con lesiones en ganglio linfático e infiltrado en la piel, el equipo clínico quiere determinar si son lesiones diferentes. **A.** Lesión de piel H&E 400x **B.** CD79a 100x **C.** CD23 100x **D.** BCL2 100x **E.** Biopsia de ganglio linfático H&E 400x **F.** CD25 100x **G.** CD23 100x **H.** BCL2 100x **I.** Citometría de flujo evidenciando una población celular irregular. **J.** Electroforesis en gel de poliacrilamida para los reordenamientos de IgK Carril 1. Control Positivo. 2. Control Negativo 3. Control policlonal. Carril 6. Biopsia de Piel (clonal), Carril 7. Biopsia de Nódulo linfático (clonal). **K.** Reordenamientos de la región FR3 de IgH. Carril 1. Control Positivo. 2. Control Negativo 3. Control policlonal. Carril 5. Biopsia de Piel (clonal), Carril 6. Biopsia de Nódulo linfático (policlonal).

Figura 4. Número total de neoplasias diagnosticadas con la prueba de clonalidad 2015-2019.

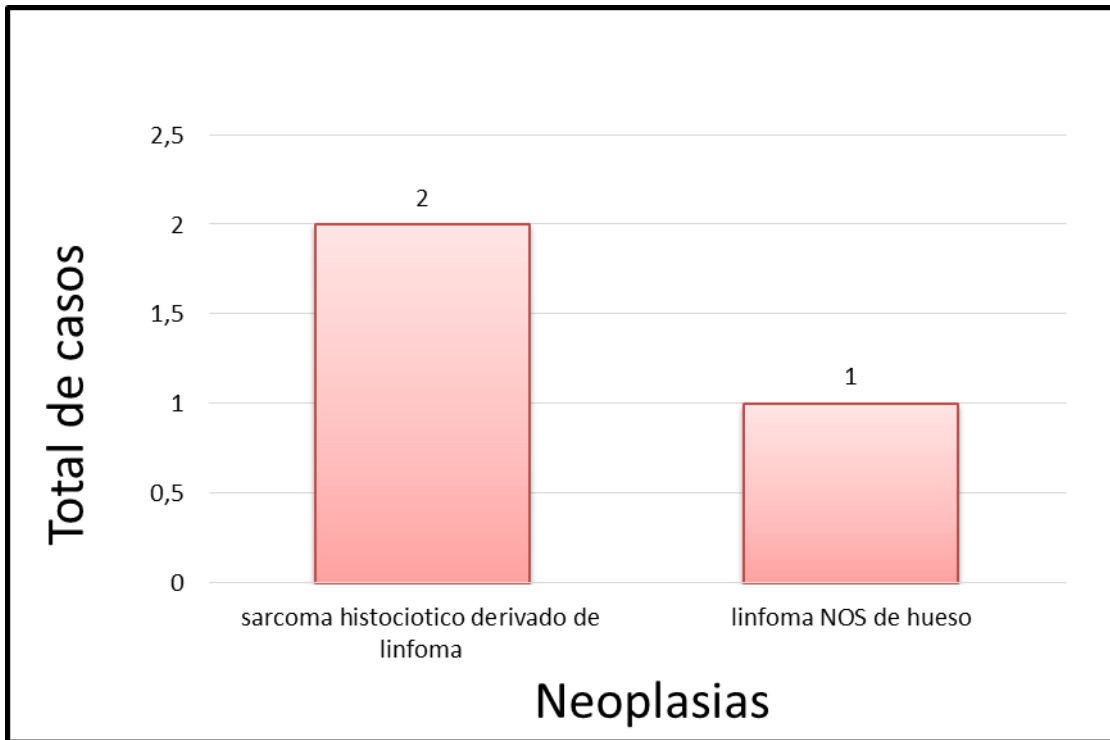
A.



B.



C.



Total de las proliferaciones analizadas entre 2015 y 2019. A. Proliferaciones de linfocitos B. B. Proliferaciones de linfocitos T. C. Proliferaciones de origen celular indeterminado. MALT: *Mucosa-associated lymphoid tissue*. BALT: *Bronchus associated lymphoid tissue*.

Figura 5. Distribución de los reordenamientos de receptor de antígeno en cada una de las proliferaciones analizadas.

A. Proliferaciones B

Dx Final	Sexo	Edad	Tejido	IgH V _H FR1 – J _H	IgH V _H FR2 – J _H	IgH V _H FR3 – J _H	Igk V _K – J _K	Igk V _K /intron – K _{de}	TCRβ V _β – J _β ½	TCRβ V _β – J _β 2	TCRβ D _β – J _β	TCRγ V _γ 1 – 8, V _γ 10 + J _γ	TCRγ V _γ 9, V _γ 11 + J _γ
Linfoma B difuso de célula grande	M	78	Tejido FFEP		■	■	■	■	■	■	■		
	F	51	Tejido FFEP			■	■			■	■	■	■
	F	35	Tejido FFEP	■	■	■	■						
	F	58	Tejido FFEP			■	■					■	■
	M	69	Tejido FFEP	■	■	■	■	■					
	M	86	Tejido FFEP	■	■	■	■	■				■	■
ALT	F	36	Tejido FFEP			■		■					
	M	59	Tejido FFEP	■	■	■	■	■					
	F	54	Tejido FFEP	■	■	■			■	■	■	■	■
	F	77	Tejido FFEP	■	■	■							
	M	72	Tejido FFEP	■	■	■	■	■					
	F	60	Tejido FFEP	■	■	■	■	■					
Linfoma primario cutáneo de la zona marginal	M	51	Tejido FFEP				■		■	■			
	F	79	Tejido FFEP				■	■				■	■
Linfoma de la zona marginal	F	68	Aspirado líquido de Médula Osea	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Leucemia NOS	F	81	Tejido FFEP			■	■					■	■
	M	79	Aspirado líquido de Médula Osea			■	■					■	■
Linfoma Asociado a IDP (1)	F	21	Tejido FFEP		■	■						■	■
Linfoma Asociado a IDP (2)	M	76	Tejido FFEP	■	■	■							

B.

Dx Final	Sexo	Edad	Tejido	IgH V α -FR1-JH	IgH V α -FR2-JH	IgH V α -FR3-JH	Igk V κ -Jk	Igk V κ intron-Kde	TCR β V β -J β ½	TCR β V β -J β 2	TCR β D β -J β	TCR γ V γ 1-8, V γ 10+J γ	TCR γ V γ 9, V γ 11+J γ
Micosis Fungoide	F	48	Tejido FFEP										
	F	55	Tejido FFEP										
	F	43	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	M	50	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	F	63	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	M	24	Tejido FFEP										
	M	9	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	F	12	Tejido FFEP										
	M	10	Tejido FFEP										
	M	62	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	F	37	Tejido FFEP										
	M	61	Tejido FFEP										
	M	29	Tejido FFEP										
	M	71	Tejido FFEP										
	M	15	Tejido FFEP										
	F	63	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	M	53	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	M	53	Sangre Periférica										
	F	45	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	M	63	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	F	35	Sangre Periférica										
	F	74	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	M	35	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
	F	40	Tejido FFEP										
	F	90	Tejido FFEP										
	Linfoma cutaneo de células T	M	59	Tejido FFEP									
M		86	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
F		36	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
F		74	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
F		57	Tejido FFEP										
F		38	Tejido FFEP										
F		66	Tejido FFEP										
F		54	Tejido FFEP										
F		67	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
F		28	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
M		7	Tejido FFEP										
F		12	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
F		27	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										
M		11	Tejido Fresco en NaCl (Piel)										

B. (continuación).

Dx Final	Sexo	Edad	Tejido	IgH V _H FR1 – J _H	IgH V _H FR2 – J _H	IgH V _H FR3 – J _H	Igk V _k – J _k	Igk V _k /intron – K _{de}	TCRβ Vβ – jβ ½	TCRβ Vβ – jβ 2	TCRβ Dβ – jβ	TCRγ Vγ 1 – 8, Vγ10 + Jγ	TCRγ Vγ 9, Vγ11 + Jγ
Linfoma Cutaneo NOS	M	19	Tejido Fresco en NaCl (Piel)						■	■		■	■
	M	56	Tejido Fresco en NaCl (Piel)						■	■		■	■
	M	94	Tejido FFEP						■	■	■	■	■
	F	45	Tejido Fresco en NaCl (Piel)						■	■		■	■
	F	45	Sangre Periférica						■	■	■	■	■
Leucemia de linfocitos T grandes granulares	M	58	Sangre Periférica						■	■		■	■
	M	56	Sangre Periférica						■	■	■	■	■
	F	65	Tejido FFEP			■			■	■	■	■	■
	M	53	Aspirado líquido de Médula Osea						■	■	■	■	■
	F	59	Sangre Periférica						■	■	■	■	■
Linfoma T periférico	F	51	Tejido FFEP			■	■		■	■	■	■	■
	M	74	Tejido FFEP			■	■	■	■	■	■	■	■
Síndrome de Sezary	M	88	Tejido Fresco en NaCl (Piel)						■	■		■	■
	M	88	Sangre Periférica						■	■		■	■
	M	72	Tejido FFEP						■	■	■	■	■
Linfoma T anaplásico	M	30	Tejido FFEP			■	■		■	■	■	■	
Linfoma T doble positivo	F	69	Tejido FFEP						■	■		■	■
papulomatosis linfomatoide	M	43	Tejido FFEP						■	■	■	■	■
Leucemia T NOS	M	75	Sangre Periférica						■	■	■	■	■
	F	82	Tejido Fresco en NaCl (Ganglio)						■	■	■	■	■
	M	27	Sangre Periférica						■	■		■	■
leucemia T CD8+	M	69	Aspirado líquido de Médula Osea						■	■	■	■	
Leucemia/Linfoma de células T del adulto	F	58	Aspirado líquido de Médula Osea						■	■		■	■

C. Neoplasias indeterminadas

Dx Final	Sexo	Edad	Tejido	IgH V _H FR1 – J _H	IgH V _H FR2 – J _H	IgH V _H FR3 – J _H	Igk V _k – J _k	Igk V _k intron – K _{de}	TCRβ Vβ – Jβ 1/2	TCRβ Vβ – Jβ 2	TCRβ Dβ – Jβ	TCRY Vγ 1 – 8, Vγ10 + Jγ	TCRY Vγ 9, Vγ11 + Jγ
Sarcoma histiocítico derivado de linfoma	M	43	Tejido Fresco en NaCl (Ganglio)	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Red				
	M	11	Tejido FFEP			Blue	Blue	Blue			Blue	Blue	Blue
Linfoma NOS en hueso	M	49	Tejido Fresco en NaCl (Hueso)				Red	Blue				Red	Blue

Reordenamientos de receptor de antígeno para cada una de las proliferaciones analizadas. En cada una de las columnas

Linfoma asociado a IDP (1): Desorden linfoproliferativo asociado a IDP de tipo polimorfo con rearrreglo clonal de IGH.

Linfoma asociado a IDP (2): Linfoma no Hodgkin primario del sistema nervioso central asociado con inmunodeficiencia