



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata

**RUOLO DELL'IMMUNOFENOTIPO NELLA
DIAGNOSI DELLA LEUCEMIA
MIELOMONOCITICA CRONICA**

**FLOW CITOMETRY IN THE DIAGNOSIS OF
CHRONIC MYELOMONOCYtic LEUKEMIA**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Marianeve Caprino

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Antonella Poloni

Sessione Autunnale 2022
Anno accademico 2021-2022

INDICE

INTRODUZIONE

1. LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA	1
1. <i>Epidemiologia</i>	2
2. <i>Eziologia e patogenesi</i>	2
3. <i>Classificazione e Sistemi prognostici</i>	3
4. <i>Diagnosi e quadro clinico</i>	11
4.1 <i>Citogenetica e alterazioni molecolari</i>	15
4.2 <i>Sottopopolazioni Monocitarie</i>	17
2. MONOCITOSI REATTIVA	24
3. MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE - MIELOFIBROSI DIOPATICA	25
SCOPO DELLA TESI	28
MATERIALI E METODI	30
1. <i>Popolazione dello studio</i>	30
2. <i>Separazione cellule mononucleate, congelamento e scongelamento</i>	33
3. <i>Caratterizzazione immunofenotipica</i>	35
4. <i>Analisi statistica dei dati</i>	42
RISULTATI	43
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	51
BIBLIOGRAFIA	

INTRODUZIONE

1. LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA

La leucemia mielomonocitica cronica (LMMC) è una neoplasia mieloide rara caratterizzata da displasia e produzione anomala della linea monocitica. La diagnosi di LMMC richiede sia la presenza di persistente monocitosi ($>1 \times 10^9$ /L monociti) nel sangue periferico (SP) che di monociti superiori al 10% dei globuli bianchi (GB). La monocitosi deve persistere per almeno tre mesi e ne devono essere escluse cause secondarie. I pazienti inoltre presentano un rischio intrinseco elevato in evoluzione leucemica entro circa 3-5 anni. La LMMC è attualmente classificata come sindrome da sovrapposizione tra le sindromi mielodisplastiche (MDS) e mieloproliferative (MPN), in quanto contrassegnata da caratteristiche intermedie tra le due, con prevalenza delle une o delle altre a seconda dei casi; è stata considerata una MDS fino al 2001 quando, per la prima volta, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha proposto una nuova categoria di disordini mieloidi con caratteristiche cliniche, di laboratorio e morfologiche/citogenetiche intermedie tra le MDS e le MPN, conosciuta come "*sindromi overlap o da sovrapposizione*" o "*sindromi MDS/MPN*".¹ Fanno parte di quest'ultima categoria la leucemia mielomonocitica giovanile (JMML), la leucemia mieloide cronica atipica

BCR-ABL-negativa (aCML), la neoplasia mielodisplastica/mieloproliferativa con sideroblasti ad anello e trombocitosi (MDS/MPN-RS-T), MDS/MPN non classificabili e la LMMC che risulta essere la più frequente tra queste.² Le MDS/MPN sono caratterizzate dalla presenza simultanea di alterazioni della maturazione cellulare, tipiche nelle MDS, con un aumento della proliferazione cellulare nel midollo osseo (MO) e nel sangue periferico, tipicamente osservate nelle neoplasie mieloproliferative croniche; di conseguenza, i pazienti con MDS/MPN presentano anemia e piastrinopenia, in associazione ad un incremento di granulociti neutrofili e/o monociti.

1. Epidemiologia

La LMMC interessa generalmente pazienti anziani in prevalenza maschi (3:1), con età media alla diagnosi, compresa tra i 70-75 anni. L'incidenza è stimata intorno a 4 casi per 100.000 abitanti all'anno.³

2. Eziologia e patogenesi

Le cause responsabili che inducono lo sviluppo della LMMC non sono tutt'ora note; si tratta comunque di una patologia clonale, originata da alterazioni citogenetiche e molecolari acquisite che coinvolgono le cellule staminali ematopoietiche. Lo sviluppo della malattia è ritenuto un processo a più stadi, in cui ad alterazioni genetiche primitive, se ne sovrappongono di secondarie, che danno origine a cloni cellulari caratterizzati da un'umentata

proliferazione. Sebbene l'eziologia specifica non sia nota, in alcuni casi è stata associata all'esposizione ad agenti cancerogeni professionali e ambientali, radiazioni ionizzanti e agenti citotossici.⁴

3. Classificazione e sistemi prognostici

Inizialmente la LMMC è stata inclusa nella classificazione FAB (French-American-British) del 1976 come una categoria di MDS (tabella 1).⁵ La suddetta classificazione presentava dei limiti: non comprendeva infatti, il numero delle citopenie, le alterazioni citogenetiche e non inquadrava correttamente le displasie o le sindromi da sovrapposizione. La FAB è stata utilizzata come modello per la classificazione delle MDS per molti anni, tuttavia, la presenza di caratteristiche mieloproliferative in un sottogruppo di LMMC erano diverse dalla tradizionale presentazione clinica delle MDS, per cui non risultava ottimale per prevedere con precisione la sopravvivenza o la trasformazione in leucemia mieloide acuta (AML) nei singoli pazienti.

Classificazione FAB

Malattia	Descrizione
Anemia Refrattaria (RA)	Caratterizzata da <5% di mieloblasti nel midollo osseo e anomalie patologiche osservate nei precursori dei globuli rossi.
Anemia Refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS)	Caratterizzata da <5% di mieloblasti nel midollo osseo, ma distinta dalla presenza del 15% o più di precursori di globuli rossi nel midollo osseo (sideroblasti ad anello)
Anemia refrattaria con eccesso di blasti (RAEB)	Caratterizzata dal 5%-19% di mieloblasti nel midollo osseo (>20% di blasti è definita come Leucemia Mieloide Acuta)
Anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione (RAEB-T)	Caratterizzata dal 5%-19% di mieloblasti nel midollo osseo (>20% di blasti è definita come Leucemia Mieloide Acuta)
Leucemia mielomonocitica cronica (LMMC)	Caratterizzata da <29% di mieloblasti nel midollo osseo e monocitosi (WBC>1x10/L nel sangue periferico)

Tabella 1. *Classificazione French-American-British (FAB). Sottogruppi di MDS con caratteristiche individuali. Si basa su criteri morfologici riscontrabili all'aspirato midollare ed allo striscio periferico.*

Successivamente, nel 2001 l'OMS, ha pubblicato la classificazione delle malattie ematopoietiche e linfoidi, catalogando la LMMC come una sottocategoria delle MDS/MPN (tabella2).⁶ Tale classificazione comprende molti dei criteri delle classificazioni del gruppo cooperativo franco-americano-britannico, ma con alcune differenze significative.

La categoria MDS/MPN comprende un gruppo eterogeneo di disturbi mieloidi che presentano caratteristiche sia displastiche che proliferative al momento della presentazione della malattia.

Classificazione OMS delle MDS/MPN	
Leucemia Mielomonocitica cronica	LMMC
Leucemia Mieloide Cronica atipica, BCR-ABL-negativa	aCML
Leucemia Mielomonocitica Giovanile	JMML
Malattie mielodisplastiche/mieloproliferative non classificabili	MDS/MPN-U

Tabella 2. *Classificazione OMS delle sindromi da sovrapposizione MDS/MPN*

La revisione dell'OMS, che ha ampiamente rimpiazzato la classificazione FAB nella pratica clinica, consente l'identificazione di tre gruppi in base alla percentuale dei blasti midollari e periferici: LMMC-0 con <2% blasti nel sangue periferico e <5% di blasti nel sangue midollare, LMMC-1 con <5% blasti nel sangue periferico e <10% di blasti nel sangue midollare, LMMC-2

con 5-19% di blasti nel sangue periferico e 10-19% di blasti nel sangue midollare; un'altra caratteristica è la presenza di corpi di Auer.⁷ (Tabella 3)

Gruppo	Blasti Sangue Periferico	Blasti Midollo osseo
LMMC-0	<2%	<5%
LMMC-1	<5%	<10%
LMMC-2	5%-19%	10%-19% e/o presenza corpi di Auer

Tabella 3. *Classificazione dei sottotipi di LMMC dell'OMS (2016) basata sulla percentuale di blasti nel sangue periferico e midollare.*

La gravità della LMMC è correlata al rischio di trasformazione leucemica: al fine di valutare i rischi al momento della diagnosi, sono stati proposti dei sistemi prognostici basati su uno *score* internazionale, che includono differenti fattori di rischio.⁸ A tal fine, i sistemi prognostici risultano uno strumento fondamentale per predire il decorso della malattia e negli anni se ne sono succeduti diversi, nel tentativo di produrre strumenti sempre più accurati per la valutazione del rischio nei pazienti e a cui proporre approcci terapeutici differenti. Le linee guida dell'*European Leukemia Net (ELN)* e dell'*Hematology Association (EHA)*, hanno pubblicato nel 2018 i cinque sistemi prognostici di valutazione del rischio più utilizzati: MD Anderson Prognostic Score (MDAPS), CMML Prognostic Scoring System (CPSS),

Groupe Français Des Myélodysplasies (GFM), Mayo Molecular Model (MMM), CPSS-MOL. La tabella 4 evidenzia i vari modelli prognostici con i rispettivi fattori e categorie di rischio, evidenziando anche la sopravvivenza complessiva mediana.^{9,10}

Modelli di Valutazione del Rischio						
Modello	Fattori di rischio	Rischio in base allo score	OS mediana (mesi)			
			Basso	Int-1	Int-2	Alto
MDAPS	HB < 12 g/dL	Basso (0-1)	24	15	8	5
	Conta assoluta linfociti > 2.5x10 ⁹ /L	Intermedio-1 (2)				
	Cellule periferiche mieloidi immature	Intermedio-2 (3)				
	Blasti nel midollo osseo >10%	Alto (4)				
CPSS	Trasfusione dipendente	Basso (0)	72	31	13	5
	LMMC FAB	Intermedio-1 (1)				
	MD-LMMC = 0 punti	Intermedio-2 (2-3)				
	MP-LMMC = 1 punto	alto (4-5)				
	LMMC OMS					
	LMMC-1 = 0 punti					
	LMMC-2 = 1 punto					
	LMMC-specifica citogenetica					
	basso = 0 punti					
	intermedio = 1 punto					
	alto = 2 punti					
GFM	Anemia	Basso (0-4)	-	38.5	-	14.4
	HB < 10 g/dL nelle femmine	Intermedio (5-7)				
	HB < 11 g/dL nei maschi	Alto (≥ 8)				
	WBC > 15x10 ⁹ /L					
	Piastrine ≤ 11x10 ⁹ /L					
	Età > 65 anni					
	Mutazione ASXL1					
MMM	HB < 10 g/dL	basso (0)				
	Conta assoluta monociti > 10x10 ⁹ /L	intermedio-1 (≤2)				
	Cellule periferiche mieloidi immature	intermedio-2				
	Piastrine ≤ 100x10 ⁹ /L	(2.5-4.5)				
	Mutazione frameshift e nonsense ASXL1	Alto (≥ 5)				
CPSS-MOL	Trasfusione dipendente	basso (0)				
	WBC ≥ 13 x 10 ⁹ /L	intermedio-1 (1)				
	Blasti nel midollo osseo ≥ 5%	intermedio-2 (2-3)				
	Gruppi di rischio genetico come definiti da valutazione del rischio CPSS e ASXL1, NRAS, SETBP1 e RUNX1	alto (≥ 4)				

Tabella 4. Modelli prognostici di valutazione del rischio per la LMMC.

Il sistema prognostico MD Anderson ha come fattori di rischio: un livello di HB <12 g/dL, la presenza di cellule mieloidi immature nel sangue periferico, conta assoluta dei linfociti >2,5x10⁹/L e presenza di blasti nel midollo osseo ≥10%. In questo caso, la sopravvivenza complessiva (Overall Survival – OS) indicata come periodo di tempo che intercorre tra data della diagnosi o inizio della cura ed il tempo del decesso del paziente, varia da 5 a 26 mesi. Sono identificati 4 gruppi prognostici con sopravvivenza mediana rispettivamente di 54 (bassa), 25 (intermedio-1), 14 (intermedio-2) e 6 mesi (alta). Il sistema prognostico CPSS ha identificato quattro variabili per l'OS, sono inoltre considerati i sottotipi della classificazione sia FAB che OMS della LMMC, e comprende come fattori di rischio: trasfusione dipendenza per i globuli rossi, ed il sistema spagnolo di valutazione del rischio citogenetico. È stato assegnato un punto per ciascuna variabile, ad eccezione della citogenetica ad alto rischio, a cui sono stati assegnati due punti, e sono state definite quattro categorie di rischio: basso (0), intermedio-1 (1), intermedio-2 (2, 3) e ad alto rischio (4, 5). La scoperta di mutazioni genetiche presenti e frequenti nella LMMC ha portato inevitabilmente all'implementazione dei sistemi prognostici esistenti, per sviluppare dei modelli prognostici molecolari. Tre di questi sono il Mayo Molecular Model, il GFM ed il CPSS-Mol. Il primo, include come fattori di rischio HB <10 g/dL, conta piastrinica <100 x 10⁹/L, AMC >10x10⁹/L e

presenza di mutazioni frameshift e non-senso di ASXL1. Le categorie di rischio in questo caso sono 3: basso (0), intermedio (1) e alto (≥ 2), con sopravvivenza mediana rispettivamente di 32, 18,5 e 10 mesi. Il GFM, comprende come fattori di rischio: età >65 anni, conta leucocitaria (WBC) $> 15 \times 10^9/L$, conta piastrinica $< 100 \times 10^9/L$ e HB < 10 g/dL nelle femmine e < 11 g/dL nei maschi. Le categorie di rischio sono: bassa (0-4), intermedia (5-7) e alta (8-12), con sopravvivenza mediana rispettive di 56, 27.4 e 9.2 mesi. Il modello CPSS è stato recentemente aggiornato per includere le anomalie molecolari, comprese le mutazioni ASXL1, RUNX1, NRAS e SETBP1, ed è stato definito come CPSS-Mol. I fattori di rischio comprendono: WBC $\geq 13 \times 10^9/L$, presenza di blasti nel midollo osseo $\geq 5\%$ e trasfusione dipendenza. Le categorie di rischio sono: bassa (0). Intermedia-1 (1), intermedia-2 (2-3), alta (≥ 4). La sopravvivenza mediana complessiva corrisponde rispettivamente dal rischio intermedio-1 a 64, 37 e 18 mesi. ¹¹

4. Diagnosi e quadro clinico

La diagnosi della LMMC si basa sull'esame emocromocitometrico e sull'aspirato midollare, secondo i criteri diagnostici dell'OMS, deve essere presente una persistente (>3 mesi) monocitosi nel sangue periferico ($\geq 1 \cdot 10^9/L$) con monociti che rappresentano più del 10% dei GB. La monocitosi però può essere presente anche in situazioni non maligne, come malattie infiammatorie, malattie infettive, disturbi gastrointestinali ed endocarditi batteriche. Una volta esclusa la possibile eziologia infiammatoria della monocitosi, gli altri criteri diagnostici mirano all'esclusione della leucemia mieloide cronica (LMC) che prevede la presenza del cromosoma Philadelphia ed il gene di fusione BCR-ABL. Poi devono essere valutati i riarrangiamenti genetici dei recettori A e B del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFRA e PDGFRB) (cromosoma 5q31-q32), coinvolti in neoplasie mieloidi con eosinofilia e reattività ad Imatinib.¹² Vanno poi esaminati ulteriori marcatori molecolari, come i riarrangiamenti di FGFR1 e la fusione genica PCM1-JAK2.¹³

La monocitosi può anche essere associata a neoplasie mieloproliferative (MPN) come la mielofibrosi (MFI) e la policitemia vera (PV). Infine, un ulteriore criterio diagnostico preso in considerazione dell'OMS è la valutazione della presenza di displasia in una o più linee mieloidi; se la mielodisplasia è assente o minima, è possibile la diagnosi di LMMC se sono presenti anche anomalie

citogenetiche o molecolari (Tabella 4). Il quadro clinico varia a seconda del paziente, in base alla conta dei GB, si può distinguere un tipo displastico (MD-LMMC) con $WBC < 13 \times 10^9/L$ e uno proliferativo (MP-LMMC) con $WBC \geq 13 \times 10^9/L$. Nei pazienti con caratteristiche displastiche predominanti, sono maggiormente osservabili sintomi correlati alle citopenie, emorragie e infezioni ricorrenti, mentre i pazienti con caratteristiche proliferative predominanti presentano più frequentemente leucocitosi, sudorazioni notturne, splenomegalia, dolore osseo, prurito acquagenico e perdita di peso.¹⁴

Inoltre, circa il 20% dei casi, può presentare una malattia infiammatoria e/o autoimmune sistemica, ad interessamento multiorgano (piastrinopenia immune, artrite reumatoide, vasculite).⁹ I criteri diagnostici raccomandati dall'OMS (2016) sono riportati nella tabella 5.

Criteri diagnostici LMMC – OMS (2016)

Monocitosi persistente (>3 mesi) nel sangue periferico WBC > 1X10⁹/L, con monociti ≥ 10% della conta differenziale dei globuli bianchi

Assenza del cromosoma Philadelphia

Assenza del gene di fusione BCR/ABL

Assenza di mutazioni PDGFRA e PDGFRB

Assenza di mutazioni FGFR1 O PCM1-JAK2 con concomitante eosinofilia

Blasti <20% nel sangue periferico e midollare

Displasia in 1 o più linee cellulari mieloidi

Presenza nelle cellule ematopoietiche di almeno un'anomalia citogenetica acquisita: TET2, ASXL1, SRSF2, SETBP1.

Tabella 5. *Criteri diagnostici raccomandati dall'OMS (2016) per la diagnosi della LMMC.*

Nell'ultima classificazione dell'OMS delle neoplasie mieloidi del 2022, nel gruppo delle MDS/MPN non è più presente la JMML che è stata raggruppata con i disturbi associati a mutazioni germinali e/o pediatriche.⁸

Nella tabella 6 sono riportati i principali cambiamenti dei criteri diagnostici della LMMC.

Criteri diagnostici LMMC (OMS - 2022)
Monocitosi definita da monociti $>0,5 \times 10^9/L$
Citopenia (thresholds come MDS)
Monociti $> 10\%$ WBC
Blasti $<20\%$ nel sangue periferico e midollo osseo
Presenza di clonalità: citogenetica anormale e/o presenza di almeno una mutazione associata a neoplasia mieloide
Nei casi senza evidenza di clonalità
Monocitosi definita da monociti $>1,0 \times 10^9/L$
Monociti $> 10\%$ WBC
Aumento di blasti $>5\%$ nel midollo e $>2\%$ nel sangue periferico, displasia morfologica o per la diagnosi sarebbe necessario immunofenotipo anormale coerente con LMMC
Esame del midollo osseo con segni morfologici coerenti con la LMMC (ipercellularità dovuta a proliferazione mieloide, spesso con aumento di monociti) e privo di caratteristiche diagnostiche di leucemia mieloide acuta, MPN o altre condizioni associate alla monocitosi.
Assenza del gene BCR-ABL1
Assenza anomalie genetiche di neoplasie mieloidi/linfoidi con eosinofilia
Assenza fusione del gene tirosina chinasi

Tabella 6. *Criteri diagnostici per la LMMC – OMS 2022.*

La revisione dell'OMS del 2022 ha previsto anche una modifica nella classificazione dei sottotipi della LMMC in base alla percentuale dei blasti midollari e periferici; è stato eliminato il gruppo LMMC-0.

Gruppo	Blasti Sangue Periferico	Blasti Midollo osseo
LMMC-1	<5%	<10%
LMMC-2	5%-19%	10%-19% e/o presenza corpi di Auer

Tabella 7. *Classificazione dei sottotipi di LMMC dell'OMS (2022) basata sulla percentuale di blasti nel sangue periferico e midollare.*

4.1 Citogenetica e alterazioni molecolari

Circa il 20-30% dei pazienti affetti da LMMC presenta anomalie citogenetiche alla diagnosi, di cui, le più frequenti sono la trisomia 8 e la delezione del cromosoma Y.¹⁵ Sulla base di queste, è possibile distinguere 3 categorie di rischio: basso, intermedio, alto. Il basso rischio comprende cariotipo normale o delezione del cromosoma Y, quello intermedio include tutte le anomalie cromosomiche, ad eccezione di quelli delle categorie ad alto e basso rischio, mentre il terzo comprende anomalie del cromosoma 7 o trisomia del cromosoma 8. La sopravvivenza complessiva (*overall survival*, OS) è di circa 5 anni, ma le percentuali delle varie categorie di rischio corrispondono rispettivamente al 35%, 26% e 4%. Nonostante la presenza di queste anomalie sia spesso riscontrata in pazienti affetti da LMMC, nessuna, da sola od in combinazione è esclusivamente specifica della MDS/MPN.^{16,17} Le mutazioni genetiche sono presenti in circa 40 geni, tra cui, quelli frequentemente mutati sono TET2, ASXL1 e SRSF2. Nel 90% dei casi, 2 mutazioni sono rilevate

sequenziando solamente 20 geni e le classi funzionali includono anche modificatori epigenetici come EZHZ e DNMT3A, il complesso spliceosoma con SF3B1, U2FA1, ZRSR2 e le molecole del *pathway* di segnalazione come CBL, NRAS, KRAS e JAK2. TET2 e SRSF2. La loro combinazione è fortemente associata alla LMMC ed alle neoplasie mieloidi con displasie e monocitosi.¹⁸ Le mutazioni geniche riscontrate nella LMMC e le rispettive percentuali della frequenza sono riportate nella tabella 8.

Gene	Frequenza della mutazione
TET2	60%
SRSF2	50%
ASXL	40%
RUNX1	15%
SETBP1	15%
CBL	15%
KRAS	10%
IDH2	5%-10%
JAK2	5%-10%
SF3B1	5%-10%
U2AF1	5%-10%
EZH2	5%
DNMT3A	5%
PTPN11	5%
ZRSR2	5%
PHF6	5%

Tabella 8. Mutazioni genetiche riscontrate nella LMMC e rispettive percentuali della loro frequenza

4.2 Sottopopolazioni Monocitarie

I monociti, anche definiti come leucociti agranulari, sono cellule con diametro compreso tra i 10 e 18 μm . Presentano un grande nucleo di forma varia, reniforme, sferico o talvolta lobato. La monocitopoiesi ha sede nel midollo osseo a partire dalle cellule progenitrici CFU-GM (*colony forming unit - granulocyte-macrophage progenitor*) e si compie attraverso diverse fasi di maturazione che prevedono la formazione di monoblasti, promonociti ed infine

monociti. Questi ultimi, una volta maturati, giungono nel torrente circolatorio, dove vi rimangono per circa un giorno, per poi migrare nei diversi tessuti. Oltre al loro ruolo nella fagocitosi, presentano una funzione di cooperazione con i linfociti T helper nel promuovere la risposta immunitaria. Nella Figura 1 sono riportati degli esempi di monocita maturo e immaturo, promonocita e monoblasto circolanti. Nella tabella 9 sono riportate le raccomandazioni per la valutazione dei monociti in strisci di sangue periferico e midollo osseo.³³

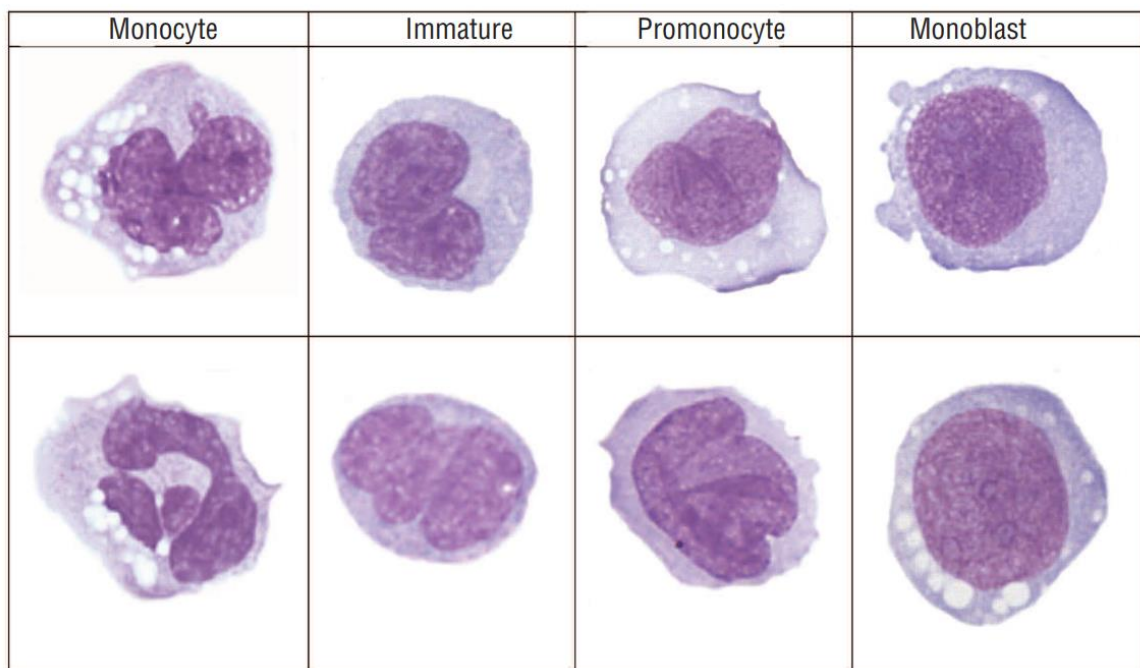


Figura 1. Esempi di monocita, monocita immaturo, promonocita e monoblasto.

	Nucleo	Cromatina	Citoplasma	Commento
Monoblasti	Rotondo/ovale	Non condensata e nucleolo prominente	Basofilo, rari granuli azzurrofilii	20 - 30 µm
Promonociti	Convoluto/rientrato	Non condensata e nucleolo prominente	Variabilmente basofilo, granuli variabilmente azzurrofilii	Ad eccezione della forma del nucleo, molto simile al monoblasto
Monociti immaturi	Convoluto/rientrato	Molto condensata e nucleolo raro	Meno basofilo del promonocita o dei blasti, ma più basofili e piccoli rispetto al monocita maturo	Assomigliano ai monociti maturi e più piccoli
Monociti	Lobato/rientrato	Condensata e nucleolo non visibile	Grigio, granuli azzurrofilii occasionali	20 - 25 µm

Tabella 9. *Caratteristiche per la valutazione dei monociti in strisci di sangue periferico o midollo osseo. Si possono identificare monoblasti, promonociti, monociti immaturi e monociti.*

I monociti rappresentano l'1% - 9% dei globuli bianchi totali e un valore al di sopra della soglia è definito monocitosi. I monociti umani nel 2010, attraverso una nomenclatura approvata a livello internazionale, sono stati suddivisi in tre sottopopolazioni sulla base dell'espressione sulla superficie di cluster di differenziazione (CD), ovvero di molecole di superficie cellulare che permettono l'immunofenotipizzazione delle cellule. In base all'espressione di CD14 e CD16, i monociti circolanti possono essere classificati in 3 sottopopolazioni: classici o MO1 (CD14⁺⁺ CD16⁻), intermedi o MO2 (CD14⁺⁺

CD16⁺), non classici o MO3 (CD14⁺ CD16⁺) (Tabella 10). Ai monociti classici appartengono diverse funzioni, come la risposta immunitaria e la riparazione di tessuti, sono responsabili della fagocitosi e coinvolti nella coagulazione ed hanno attività anti-apoptotiche. I monociti intermedi sono invece responsabili della proliferazione delle cellule T, mentre quelli non classici sono coinvolti nella stimolazione delle cellule T CD4⁺.¹⁹

Sottopopolazioni Monocitarie		
<i>Monociti Classici</i>	MO1	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻
<i>Monociti Intermedi</i>	MO2	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺
<i>Monociti Non classici</i>	MO3	CD14 ⁺ CD16 ⁺

Tabella 10. *Sottopopolazioni monocitarie basate sull'espressione sulla superficie di CD14 e CD16*

Il primo lavoro che ha stabilito un cutoff dei monociti per discriminare diverse patologie, è stato svolto da un gruppo francese nel 2015.³⁴ In questo studio, è stata esaminata la caratteristica ripartizione dei sottoinsiemi dei monociti per identificare la “firma” diagnostica della LMMC. Lo studio ha compreso 53 pazienti con LMMC, 39 donatori sani anziani, 26 donatori sani giovani, 33 pazienti con monocitosi reattiva e 24 pazienti con neoplasie ematologiche di cui 12 MPN, 7 MDS, 1 JMML e 4 pazienti con tumori linfoidei. La classificazione delle sottopopolazioni dei monociti è stata analizzata in

citofluorimetria tramite una strategia di gating di esclusione che ha permesso di identificare i monociti e successivamente le sottopopolazioni comprendenti monociti classici, intermedi e non classici. Tra i donatori sani giovani e quelli anziani i risultati degli MO1 erano sovrapponibili, non è stata quindi rilevata una differenza significativa, mentre i pazienti con LMMC hanno riportato un aumento percentuale della frazione di MO1 e ridotta di MO2 e MO3. La percentuale di MO1 raggiungeva il 96,6%. Per determinare se questo valore fosse caratteristico della LMMC, è stato confrontato con gli MO1 del sangue periferico di pazienti con monocitosi reattiva e con gli MO1 di pazienti con altre malattie ematologiche. Il risultato è stato che la frazione di monociti classici era significativamente più alta nei pazienti con LMMC rispetto agli altri gruppi presi in considerazione. Per validare ulteriormente i risultati, è stata effettuata un'analisi ROC, l'area sotto la curva osservata indicava che i monociti classici potrebbero essere utilizzati per distinguere la LMMC da altre situazioni maligne e non maligne in presenza di monocitosi. Attraverso lo studio, quindi, è stato possibile definire un cutoff del 94% per i MO1 con una specificità del 95,1% ed una sensibilità del 90,6%.³⁴

Successivamente, nel 2016 uno studio internazionale svolto da numerosi laboratori sull'analisi delle sottopopolazioni dei monociti attraverso la citofluorimetria, ha confermato i dati dello studio francese.²⁴ Il test è stato

approvato come test clinico e certificato dalla *Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)* negli Stati Uniti e dall' *European Leukemia Network*.^{20,21,22}

Nonostante ciò, la diagnosi della LMMC può essere difficile in presenza di una malattia infiammatoria; per questo è stato proposto l'utilizzo di un marker aggiuntivo per identificare i monociti non classici: lo SLAN, un residuo carboidratico inizialmente descritto per essere espresso sulla superficie delle cellule dendritiche nel sangue umano e solo successivamente riconosciuto, tramite lo studio del trascrittoma, come struttura carboidratica collegata alla proteina di superficie PSGL-1 (ligando della glicoproteina P-selectina). Il *cutoff* delle cellule SLAN+ è stato stabilito a 1,7%: un valore <1,7%, che definisce quindi una diminuzione dei monociti non classici SLAN+, supporta la diagnosi della LMMC.²³

L'analisi della distribuzione dei monociti attraverso la citofluorimetria è diventato criterio molto utile per la diagnosi della LMMC, in quanto permette di distinguere la LMMC, da altre neoplasie ematologiche come MPN, AML, e dalle monocitosi reattive. Diversi studi hanno dimostrato con elevata specificità e sensibilità che la sottopopolazione monocitaria MO1 (MO1/monociti totali) aumenta notevolmente nel sangue periferico e midollare in pazienti affetti da LMMC, rispetto a pazienti con altre neoplasie ematologiche e con monocitosi

reattive.²⁶ L'OMS ed il gruppo di lavoro europeo *LeukemiaNet* suggeriscono che la standardizzazione dell'immunofenotipizzazione con citofluorimetria possa essere inserita come parte integrante nel protocollo della diagnosi della LMMC, in quanto può facilitare la distinzione, attraverso l'utilizzo di un pannello citofluorimetrico per l'individuazione delle sottopopolazioni monocitarie, tra monocitosi reattiva, LMMC e mielofibrosi.^{24,27}

A causa della sua rarità e della sovrapposizione con altri disturbi mieloproliferativi/mielodisplastici con monocitosi reattiva, la CMML rimane una malattia difficile da diagnosticare. L'evidenza citogenetica della clonalità si trova solo nel 20-40% dei casi di LMMC. La differenziazione morfologica tra monocitosi reattiva e LMMC può essere impegnativa, specialmente nei casi con displasia assente o minima e un cariotipo normale.

2. MONOCITOSI REATTIVA

La monocitosi consiste in un'elevata concentrazione di monociti circolanti nel sangue e può essere causata da un'ampia varietà di condizioni neoplastiche e non neoplastiche: tra cui infezioni virali, fungine e batteriche, stress o traumi, disturbi infiammatori sistemici, malattie autoimmuni e reazioni ai farmaci. I disturbi neoplastici, comprese le neoplasie ematologiche e non ematologiche, possono anch'esse provocare una monocitosi periferica. Pertanto, quando le cause della monocitosi non sono note, è generalmente necessario un attento e approfondito studio clinico.²⁸

3. MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE - MFI

Le malattie mieloproliferative croniche sono un gruppo di malattie clonali caratterizzate da proliferazione anomala della cellula staminale mieloide. Il midollo osseo è caratterizzato da iperplasia di tutte le serie mieloidi e il sangue periferico da leucocitosi, piastrinosi e poliglobulia. Le principali categorie di MPN incluse nella classificazione dell’OMS del 2022, sono riportate nella tabella 11.⁸

Malattie Mieloproliferative croniche
Leucemia mieloide cronica
Policitemia Vera
Trombocitemia essenziale
Mielofibrosi Primaria
Mielofibrosi primaria prefibrotica
Mielofibrosi primaria conclamata
Leucemia neutrofila cronica
Leucemia eosinofila cronica non altrimenti specificata
MPN non classificabile

Tabella 11. *Classificazione MPN – OMS 2022.*

La mielofibrosi primaria o idiopatica (MFI) è una neoplasia mieloproliferativa cronica BCR-ABL1 negativa, caratterizzata da proliferazione clonale di cellule staminali, spesso accompagnata da mutazioni somatiche quali JAK2, MPL,

CALR e fibrosi midollare. Oltre a presentare dal punto di vista clinico splenomegalia, anemia, trombocitosi o trombocitopenia,²⁹ talvolta è presente anche leucocitosi ed eventuale monocitosi. I criteri diagnostici della MFI sono descritti nella tabella 12. La diagnosi di MFI o MFI conclamata, richiede tutti e tre i criteri principali ed almeno un criterio minore confermato per due volte consecutive.

MFI Stadio prefibrotico (pre-MFI)	MFI Stadio fibrotico conclamato
1. Biopsia del midollo osseo mostra proliferazione megacariocitica e atipia, fibrosi del midollo osseo di grado <2, aumento della cellularità nel midollo osseo, proliferazione granulocitica e spesso diminuzione dell'eritropoiesi	1. Biopsia del midollo osseo mostra proliferazione megacariocitica e atipia accompagnata da fibrosi reticolinica e/o fibrosi del collagene di tipo 2 o 3
2. Mutazione JAK2, CALR o MPL o presenza di altri marker clonali o assenza di fibrosi reticolinica reattiva del midollo osseo	2. Mutazione JAK2, CALR o MPL o presenza di altri marker clonali o assenza di mielofibrosi reattiva.
3. Non sono soddisfatti i criteri diagnostici per BCR-ABL LMC, PV, ET, MDS o altre neoplasie mieloidi positive per ABL	3. Non sono soddisfatti i criteri diagnostici per ET, PV, BCR-ABL LMC ABL1 positiva o altre neoplasie
Criteri minori	Criteri minori
Anemia non attribuita a comorbidità	Anemia non attribuita a comorbidità
Leucocitosi $\geq 11 \times 10^9/L$	Leucocitosi $\geq 11 \times 10^9/L$
Splenomegalia	Splenomegalia
Livello di lattato deidrogenasi al di sopra dell'intervallo di riferimento	Livello di lattato deidrogenasi al di sopra dell'intervallo di riferimento
	Leucoeritroblastosi

Tabella 12. *Criteri diagnostici MFI – OMS 2022*

SCOPO DELLA TESI

In Italia, le linee guida dell'OMS per la diagnosi della LMMC prevedono che venga eseguito lo striscio periferico e la valutazione midollare con l'aspirato per lo studio morfologico al fine di valutare anomalie delle cellule del sangue e dei suoi precursori, la cellularità e la fibrosi sono esaminate attraverso la biopsia osteomidollare, lo studio molecolare tramite *Next Generation Sequencing (NGS)* che permette l'identificazione di mutazioni caratteristiche, e l'analisi del cariotipo per evidenziare le anomalie citogenetiche.

Lo studio citofluorimetrico, in Italia, non è tra gli esami obbligatori per la LMMC, ma è solo suggerito dalle linee guida dell'OMS per definire la presenza o meno di displasia nelle linee mieloidi (mancanza o espressione anormale di CD14, CD16, CD13, CD33, anormale espressione CD11b e HLA-DR, over espressione di CD56 oppure anormale presenza di granuli o aumento di cellule immature) e la percentuale di blasti presenti.

Lo scopo della tesi, quindi, è stato quello di studiare dal punto di vista immunofenotipico, attraverso la citofluorimetria, le caratteristiche delle tre sottopopolazioni monocitarie, nel sangue periferico e nelle cellule midollari, nei pazienti affetti da LMMC, valutando sia campioni appena prelevati alla diagnosi che campioni congelati in dimetilsolfossido, afferenti alla Clinica di

Ematologia presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona negli ultimi 6 anni.

MATERIALI E METODI

1. Popolazione dello studio

In questo studio sono stati analizzati campioni di sangue periferico e midollare di 25 pazienti con diagnosi confermata di LMMC, 16 maschi e 9 femmine, con età mediana di 75,5 anni (range 49-86). Come osserviamo nella tabella 13 la casistica comprendeva 13 pazienti con LMMC-0, 5 pazienti con LMMC-1 e 7 pazienti con LMMC-2. Secondo la classificazione FAB, 19 presentano forma mielodisplastica e 6 forma mieloproliferativa. Secondo i criteri prognostici CPSS, 15 presentavano un rischio più basso (basso e int-1), e 10 un rischio più alto (int-2 e alto). Stando invece al sistema prognostico CPSS-mol 10 pazienti presentavano rischio più basso (basso e int-1), 6 un rischio più alto (int-2 e alto). I campioni sono stati ottenuti alla diagnosi, prima di qualsiasi trattamento. Il primo gruppo di confronto era rappresentato da 7 pazienti con MFI e monocitosi 1 maschio e 6 femmine con età mediana di 76 anni (range 39-89). Di questi pazienti abbiamo analizzato solo il sangue periferico. Il secondo gruppo di controllo era rappresentato da 28 pazienti con diagnosi accertata di monocitosi reattiva, 17 maschi e 11 femmine, con età mediana di 68 anni (range 16-102), anche in questo gruppo abbiamo analizzato solo il sangue periferico.

Le caratteristiche cliniche e biologiche dei gruppi in esame, sono riportate nella tabella 14.

	CMML
Classificazione WHO	
CMML-0	13
CMML-1	5
CMML-2	7
Classificazione FAB	
mielodisplastico	19
mieloproliferativo	6
Blasti midollari (mediana %, range)	5
CPSS (rischio)	
basso	8
Intermedio-1	7
Intermedio-2	8
alto	2
CPSS-mol (rischio)	
basso	5 (5/16)
intermedio-1	5 (5/16)
intermedio-2	4 (4/16)
alto	2 (2/16)

Tabella 13: Caratteristiche cliniche e biologiche valutate nei pazienti oggetto di studio.

	CMML	MFI	Monocitosi reattive
	(25)	(7)	(28)
Età (anni)	75,5 (49-86)	76 (39-89)	68 (16-102)
Sesso			
M	16	1	17
F	9	6	11
Leucociti	7.688	17.190	11.820
(nr/mmc)	(74-47.130)	(12.730-95.360)	(3.210-28.390)
Hb (g/dl)	10,65	10,4	10,25
	(7.9-14.6)	(9-13,3)	(7.6-16.7)
Piastrine	142.500	157.000	254.000
(nr/mmc)	(128-639.000)	(19.000-186.1000)	(28.400-486.000)
Monociti	1.625	1.970	1.195
(nr/mmc)	(400-14.000)	(1.290-14.800)	(1.010-2.010)

Tabella 14: *Caratteristiche cliniche e biologiche valutate nei pazienti oggetto di studio.*

I campioni di sangue periferico e di midollo osseo sono stati trattati allo stesso modo per isolare le cellule leucocitarie mononucleate ed una parte di queste è stata congelata in dimetilsolfossido (DMSO).

2. Separazione cellule mononucleate, congelamento e scongelamento

Le cellule mononucleate (*PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells*) sono state ottenute da sangue periferico e aspirato midollare, tramite la tecnica di separazione cellulare su gradiente di densità, il separatore utilizzato è il Ficoll Lymphosep®-Lymphocyte Separation Medium (MP), un co-polimero sintetico ad alto peso molecolare di saccarosio ed epicloridina, selettivo per il loro isolamento. Il sangue periferico ed il sangue midollare sono raccolti in provette contenente l'anticoagulante EDTA: sono stati prelevati 20 mL di sangue periferico e 5 mL di sangue midollare. Entrambi i campioni vengono diluiti 1:3 con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e stratificati sopra il Ficoll Lymphosep – Lymphocyte Separation Medium (15 ml per la stratificazione del sangue periferico e 4 mL per la stratificazione dell'aspirato midollare). Per creare il gradiente di densità, i campioni vengono sottoposti a centrifugazione a 1520 rpm per 30 minuti. In questo modo, dal basso verso l'altro si potranno osservare gli eritrociti sedimentati, i granulociti, il Ficoll, un anello bianco lattiginoso di leucociti ed infine il plasma e le piastrine (Figura 2).

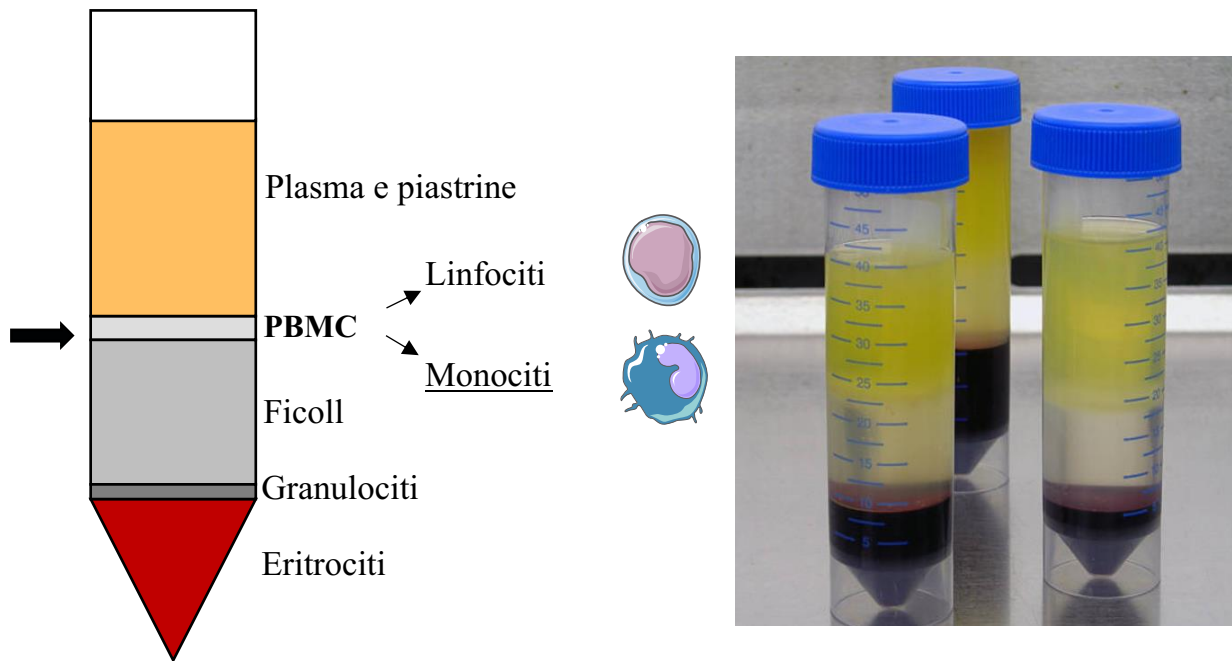


Figura 2. Risultato del principio della separazione su gradiente. La componente leucocitaria mononucleata di interesse, forma lo strato intermedio.
 PBMC: peripheral blood mononuclear.

Viene poi recuperato l'anello intermedio di cellule mononucleate, e lavato 2 volte con 30 ml di PBS attraverso centrifugazione 2000 rpm per 10 minuti. Al termine della centrifuga, le cellule formano un pellet sul fondo della provetta, il surnatante viene eliminato per inversione ed il pellet viene risospeso in 2 ml di PBS.

Si effettua la conta dei GB attraverso un contaglobuli (Beckman-Coulter) e si dispensa una quantità di 10×10^6 cellule in ogni *criovial*. Attraverso un ulteriore lavaggio in centrifuga a 2000 rpm per 10 minuti, una volta eliminato il surnatante, il pellet contenente le cellule viene criopreservato aggiungendo il

terreno di congelamento, *FBS (fetal bovine serum)* + 10% di *DMSO*. Il campione viene congelato in criovials e poi in specifici *crio-box* posti in congelatore a -80°C.

Per essere utilizzate, le PBMC vengono scongelate in bagno termostatico a 37°C, lavate in PBS + 2% FBS, e risospese con FBS.

3. Caratterizzazione immunofenotipica

Le PBMC vengono poi trasferite in tubi da citofluorimetria ad una concentrazione di 1×10^6 in 100 uL e marcate utilizzando il kit DuraClone Phenotyping BASIC Tube by Beckman-Coulter LifeSciences. Il kit è composto da anticorpi monoclonali liofilizzati rivolti contro antigeni di superficie che per la loro specificità, caratterizzano fenotipicamente le popolazioni cellulari oggetto di studio. Ogni anticorpo monoclonale è diretto verso uno specifico antigene presente sulla membrana cellulare, ed è coniugato con un fluorocromo che gli permette di essere rilevato dal citofluorimetro. In particolare, il pannello utilizzato per l'analisi ha compreso i seguenti anticorpi monoclonali:

- CD16: recettore a bassa affinità per l'immunoglobulina G, esiste in due diverse forme, codificate da due diversi geni *FcγRIIIA* (o III-2) e *FcγRIIIB* (o III-1). Il primo è una forma transmembrana espressa dalle cellule NK, monociti e macrofagi, l'altro è una forma ancorata al *GPI* (glucosilfosfatidilinositolo)

- espresso solo sui neutrofili. Utilizzato in confronto con CD14, permette di suddividere i monociti nelle sottopopolazioni dei classici, intermedi e non classici
- CD56: identifica un'isoforma della molecola delle cellule neuronali d'adesione espressa sulle cellule natural killer (NK) e può essere espresso in modo abnorme nei linfociti displastici
 - CD19: proteina transmembrana che nell'uomo è espressa in tutti i linfociti B
 - CD14: recettore del lipopolisaccaride della parete batterica dei Gram- e Gram+. antigene fortemente espresso sui monociti, sui macrofagi e debolmente sui neutrofili. E anche debolmente espresso sui linfociti B, ma è assente sui linfociti T e sulle cellule NK, sui globuli rossi e sulle piastrine. Utilizzato con il CD16, permette di suddividere i monociti nelle 3 sottopopolazioni, quali classici, intermedi e non classici.
 - CD4: co-recettore per il TCR (recettore delle cellule T). È utile per discriminare le cellule T-helper e le cellule T-citotossiche perché entrambe esprimono il TCR, poiché CD4 è specifico delle cellule T-helper mentre CD8 è espresso sulle cellule T-citotossiche.
 - CD8: l'espressione di CD8 è specifica per i linfociti T citotossici.
 - CD3: complesso proteico composto da distinte catene polipeptidiche epsilon, gamma, delta e zeta; gli anticorpi anti-CD3 possono essere utilizzati efficacemente come marcatori dei linfociti T.

- CD45: recettore della proteina tirosina fosfatasi di tipo C, può essere presente in varie isoforme su tutte le cellule ematopoietiche differenziate (tranne eritrociti e plasmacellule). È utile riconoscere preliminarmente i linfociti T.

Sono inoltre stati aggiunti al pannello:

- SLAN (6-SulfoLacNAc), residuo carboidratico legato alla proteina di superficie PSGL-1, marker per i monociti non classici (MO3) utilizzato per migliorare la distinzione tra gli MO2 e gli MO3.
- 7AAD (7-Amino-Actinomicina D), colorante fluorescente, utilizzato per discriminare le cellule non vitali. Le cellule vive, impermeabili, saranno debolmente colorate, mentre le cellule le cui membrane hanno perso l'integrità strutturale, saranno fortemente colorate. Fondamentale l'utilizzo di un colorante vitale per escludere le cellule morte, che forniscono ugualmente siti di ancoraggio non specifico per gli anticorpi durante l'analisi del campione.

Specificità	Clone	Fluorocromo	Marker	Laser
CD16	3G8	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Cellule NK, Monociti, Macrofagi	488 nm
CD56	N901	R Phycoerythrin (PE)	Cellule NK	488 nm
CD19	J3_119	R Phycoerythrin-Texas Red-X (ECD)	Linfociti B	488 nm
CD14	RMO52	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)	Monociti	488 nm
CD4	13B8.2	Allophycocyanin(APC)	Linfociti T Helper	638 nm
CD8	B9.11	Alexa Fluor 700 (A700)	Linfociti T citotossici	638 nm
CD3	UCHT-1	Allophycocyanin Alexa Fluor 750 (APC-A750)	Linfociti T	638 nm
CD45	J33	Krome Orange	Leucociti	405 nm
SLAN	DD-1	R Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7)	Monociti, Macrofagi, Neutrofili, cellule dendritiche	450 nm
7AAD	-	Peridinin chlorophyll protein (PerCP)	Positivo nelle cellule morte	650 nm

Tabella 15. Pannello degli anticorpi monoclonali utilizzati per l'identificazione delle sottopopolazioni monocitarie.

In seguito ad incubazione al buio di 15 minuti, durante la quale le cellule vengono legate dagli anticorpi liofilizzati, si procede con centrifugazione e risospensione del pellet con PBS. I tubi vengono analizzati con il citofluorimetro *DxFlex Beckman-Coulter (LifeSciences)* (Figura 3) in grado di analizzare diversi parametri fisici e 13 segnali di fluorescenza. I tre diodi laser allo stato solido sono in grado di emettere luce laser ai livelli: 405 nm (viola),

488 nm (blu), 638 nm (rosso). Oltre alla componente ottica, lo strumento è costituito dalla componente elettronica, che trasforma il segnale elettrico analogico del laser in segnale digitale, dalla componente fluidica che permette alle cellule in sospensione di passare in fila singola nella camera di conta dove vengono colpite dal laser, e dal sistema software per l'analisi dei dati. Le modalità con cui la luce attraversando le cellule viene distribuita sulla stessa linea del fascio laser (FSC, *forward scatter*), sia lateralmente (SSC, *side scatter*), fornisce informazioni sulle dimensioni, sulla granularità relativa e complessità interna, ma anche della sua intensità relativa di fluorescenza. L'espressione di antigeni di superficie o intracellulari, vengono definiti parametri estrinseci e si identificano nei CD. L'immunofenotipo deriva dalla valutazione simultanea di parametri sia estrinseci che intrinseci, cioè dallo studio delle caratteristiche sia fisiche che immunologiche.

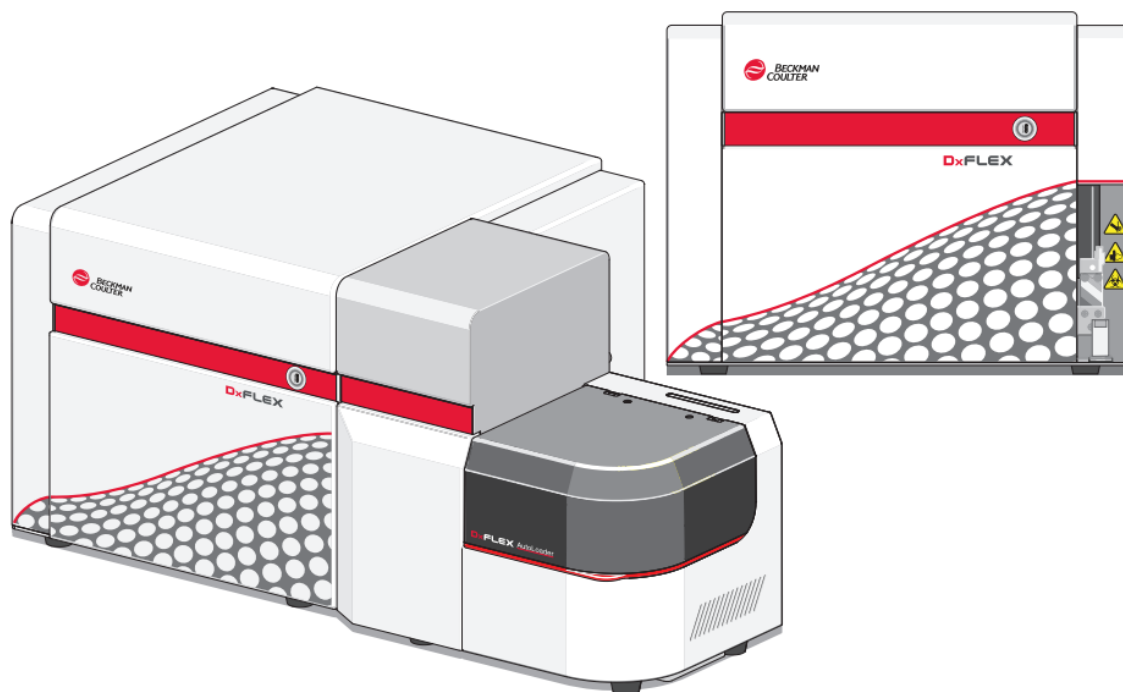


Figura 3: Citofluorimetro DxFlex Beckman Coulter

Di ogni campione fresco sono acquisiti circa 100.000 eventi, mentre di ogni campione congelato sono stati acquisiti circa 200.000 eventi, ed almeno 20.000 nel gate dei monociti (CD14+).

I citogrammi sono stati analizzati con i *software CytExpert (Beckman-Coulter; LifeSciences) e KALUZA (Beckman-Coulter; LifeSciences)*.

La strategia di *gating* prevede l'esclusione dei doppietti (aggregati cellulari), la selezione delle cellule vive attraverso il marcatore di vitalità 7-AAD, e successivamente lo studio dell'espressione degli antigeni di superficie CD14 e CD16 per distinguere le tre sottopopolazioni monocitarie. Infine, viene studiata l'espressione del *marker* SLAN sui monociti non classici.

La strategia di *gating* seguita per garantire l'identificazione delle sottopopolazioni monocitarie e dei monociti non classici SLAN⁺, ha quindi previsto:

1. Gating dei singoletti
2. Gating per discriminare le cellule vitali, attraverso il marcatore di vitalità *7AAD*
3. Gating su monociti CD14⁺
4. Suddivisione delle tre sottopopolazioni monocitarie:
 - classici o MO1 (CD14⁺⁺ CD16⁻),
 - intermedi o MO2 (CD14⁺⁺CD16⁺),
 - non classici o MO3 (CD14⁺CD16⁺)
5. Gating dei monociti non classici SLAN⁺

4. Analisi statistica dei dati

I risultati ottenuti sono stati elaborati attraverso Microsoft Excel: i dati sono stati presentati con mediana \pm deviazioni standards (SD) ed analizzati con Student's t-test. Le differenze tra i campioni sono state considerate statisticamente significative per $P < 0.05$.

Nei diversi gruppi di pazienti abbiamo effettuato un'analisi ROC.

RISULTATI

L'analisi citofluorimetrica delle tre diverse popolazioni di monociti, ha mostrato percentuali statisticamente differenti di monociti MO1, MO2, MO3 nei tre gruppi di pazienti. Come riportato nella tabella 16, la frazione dei monociti classici è risultata essere più alta nei pazienti con diagnosi di LMMC, infatti, la percentuale mediana degli MO1 riscontrata è pari a 95,8, mentre è risultata più bassa nelle MFI e nelle monocitosi reattive, riportando rispettivamente un valore di 79,7 e 93,34 di mediana.

È stata poi valutata la frazione dei monociti intermedi che è risultata essere invece più alta nelle MFI con una percentuale mediana di 12, più bassa nelle LMMC e nelle monocitosi reattive, rispettivamente con un valore di mediana 2,6 e 3,92.

La frazione dei monociti non classici è risultata essere più bassa nelle LMMC con una percentuale mediana di 0,8, e più alta nelle MFI e nelle monocitosi reattive, con un valore di mediana di 3,9 e 1,4 rispettivamente.

Inoltre, nelle LMMC la frazione dei monociti classici è risultata $\geq 94\%$ in 21 di 25 pazienti totali valutati (84%), mentre nelle monocitosi reattive in 11 dei 28 pazienti totali (39%), e solo in 1 dei 7 pazienti nelle MFI (18%).

Dalla curva ROC (figura 10) che abbiamo eseguito paragonando il valore degli MO1 nelle LMMC e nelle monocitosi reattive, l'area sotto la curva (AUC) è risultata essere di 0,7.

La frazione dei monociti non classici MO3 è risultata <1,13% (cutoff di riferimento dello studio francese) in 18 dei 25 pazienti totali (72%) e solo 1 paziente con LMMC presentava sia la frazione di MO1 <94% e MO3 >1,13%. Questo paziente aveva una diagnosi di carcinoma ureterale attivo, oltre alla LMMC che era stata confermata anche alla valutazione NGS, infatti, risultavano presenti le mutazioni di TET2, JAK2 e ZRSR2.

Nel gruppo dei pazienti con MFI il paziente che aveva un valore di MO1 >94% aveva anche una frazione MO3 <1,13% e la diagnosi era stata fatta con la biopsia osteomidollare (BOM).

Negli 11 pazienti con monocitosi reattiva che avevano una percentuale di MO1 > 94%, 8 avevano anche gli MO3 < 1,13 (cutoff dello studio francese), quindi abbiamo valutato la positività o meno dello SLAN nella frazione dei monociti non classici, per definire se questo marker poteva efficacemente differenziare i diversi gruppi di pazienti. Questa valutazione è stata effettuata su campioni di cellule mononucleate da sangue periferico stoccate e congelate. Purtroppo, i 2 campioni di LMMC e MFI che avremmo voluto valutare non erano disponibili. Mentre nelle monocitosi reattive, gli 8 campioni analizzati che presentavano le

caratteristiche descritte in precedenza, hanno mostrato sempre una positività allo SLAN maggiore del cutoff considerato (1,7%).

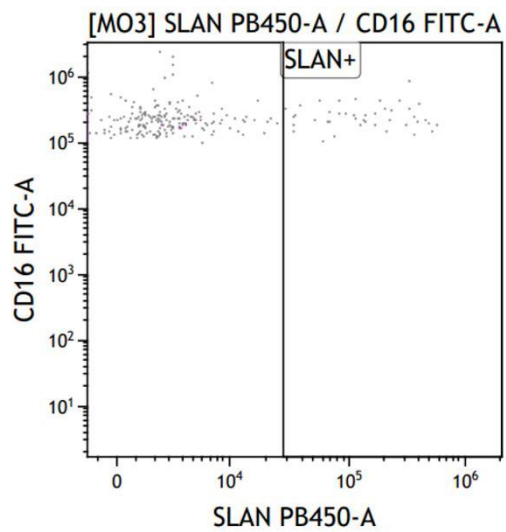
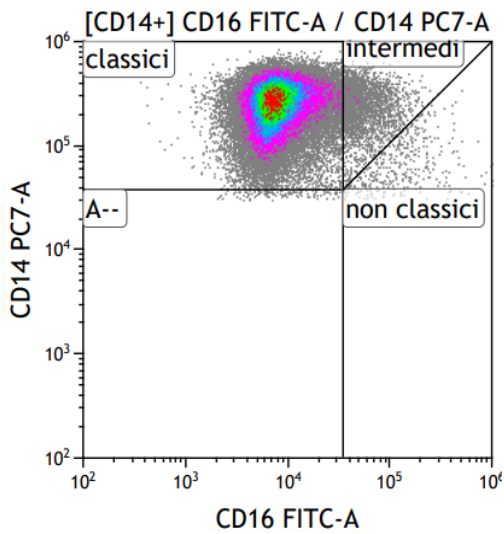
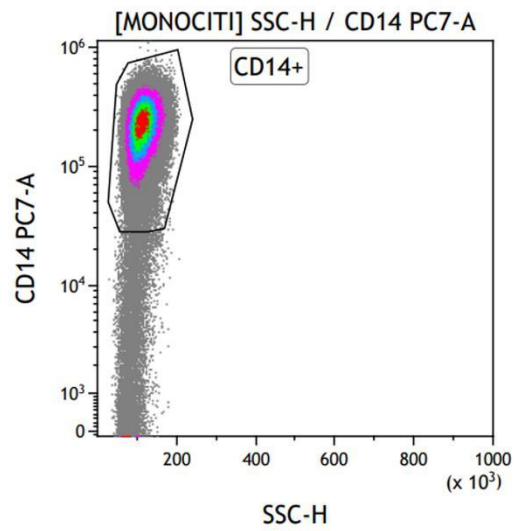
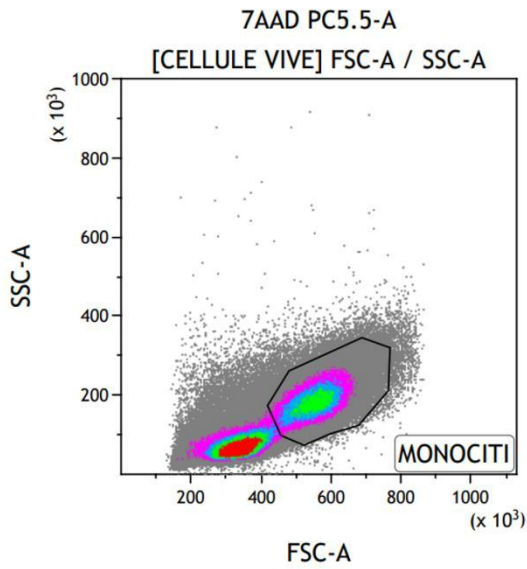
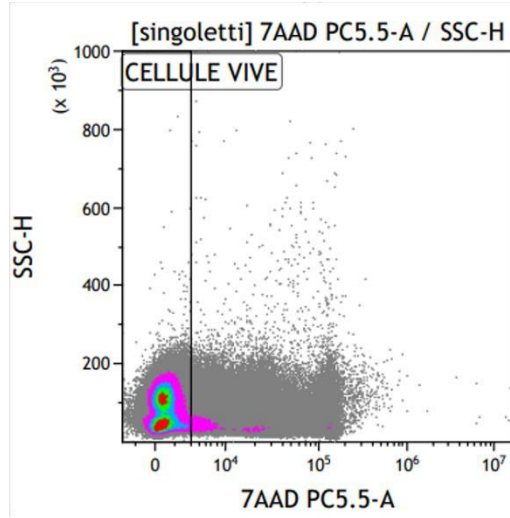
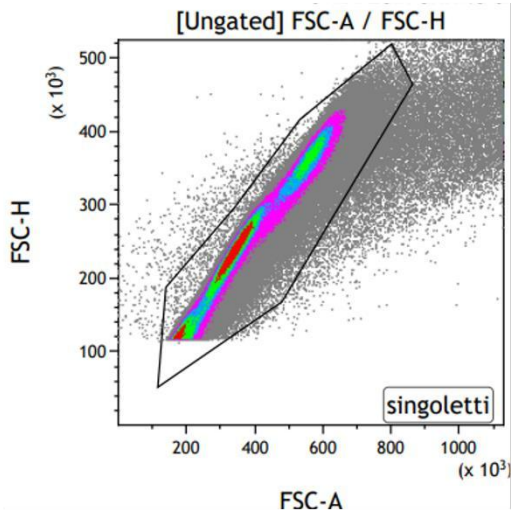
L'immunofenotipo midollare è stato effettuato in 17 campioni di pazienti con LMMC ed è stato sempre possibile valutare le tre frazioni di MO1, MO2, MO3. Solo in cinque pazienti abbiamo potuto valutare sia il sangue periferico che il midollo osseo contemporaneamente, i risultati sono stati sovrapponibili.

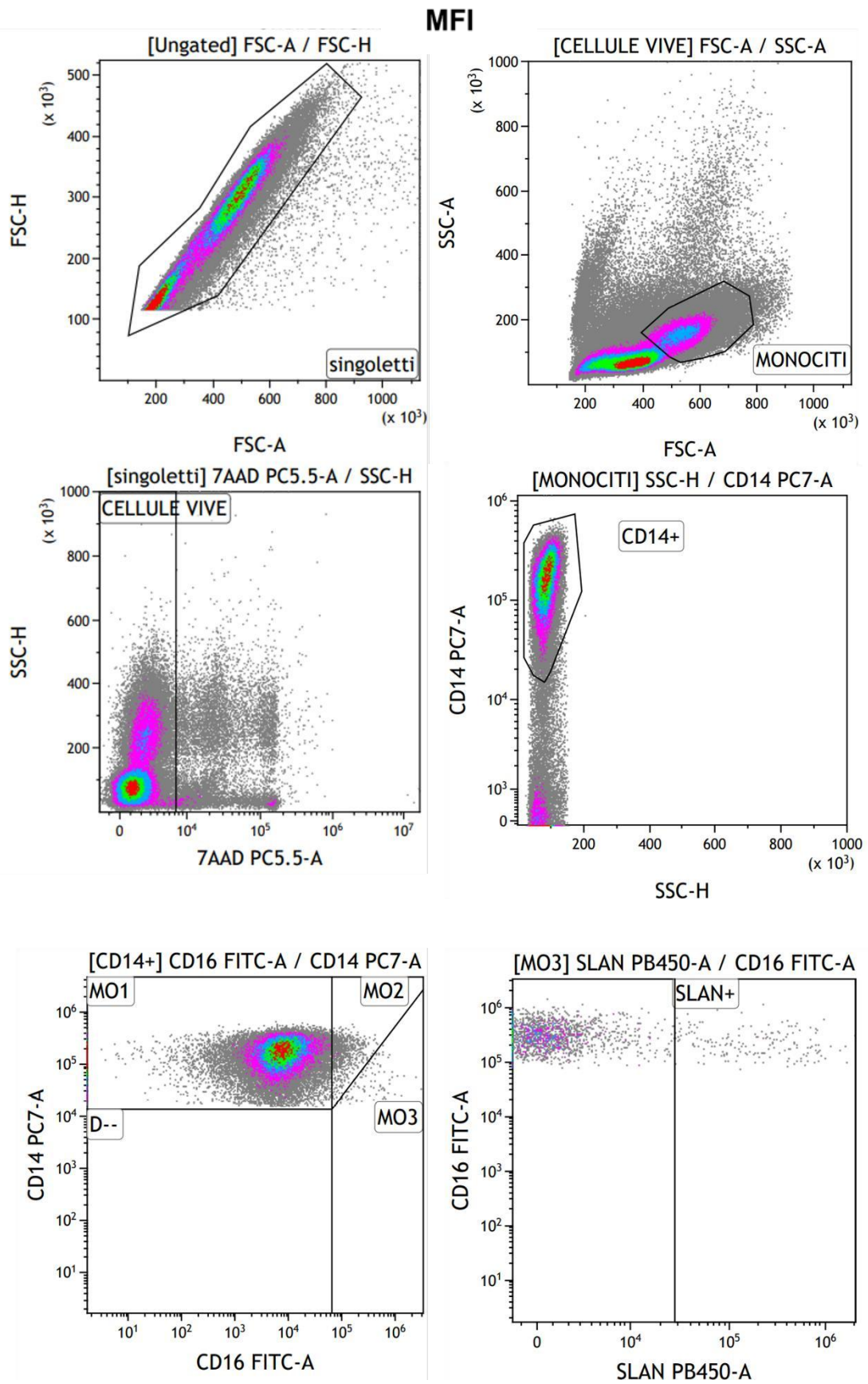
Abbiamo quindi valutato in citofluorimetria i MO1, MO2, MO3 in campioni di sangue periferico e midollo osseo congelati, confrontando i risultati con i campioni degli stessi pazienti analizzati a fresco. Abbiamo valutato in totale 18 campioni ed in 15/18 (83%) abbiamo potuto effettuare l'analisi, risultando sufficiente la cellularità e la vitalità. I risultati rispecchiavano quelli delle sottopopolazioni dei monociti valutati a fresco.

	CMML	Monocitosi MPN	Monocitosi reattive
	(25 pz)	(7 pz)	(28 pz)
Monociti (nr/mmc)	1.625	1.970	1.195
MO1 (%)	95,8 (57-99)	79,7 (70-96)	93,34 (78,2-98,5)
MO2 (%)	2,6 (0,17-43)	12 (2,3-24)	3,92 (0,8-18)
MO3 (%)	0,8 (0-5)	3,9 (0,4-6)	1,4 (0,08-6)

Tabella 16. Percentuali delle frazioni di monociti classici, intermedi, non classici e non classici SLAN+

LMMC





Monocitosi reattive

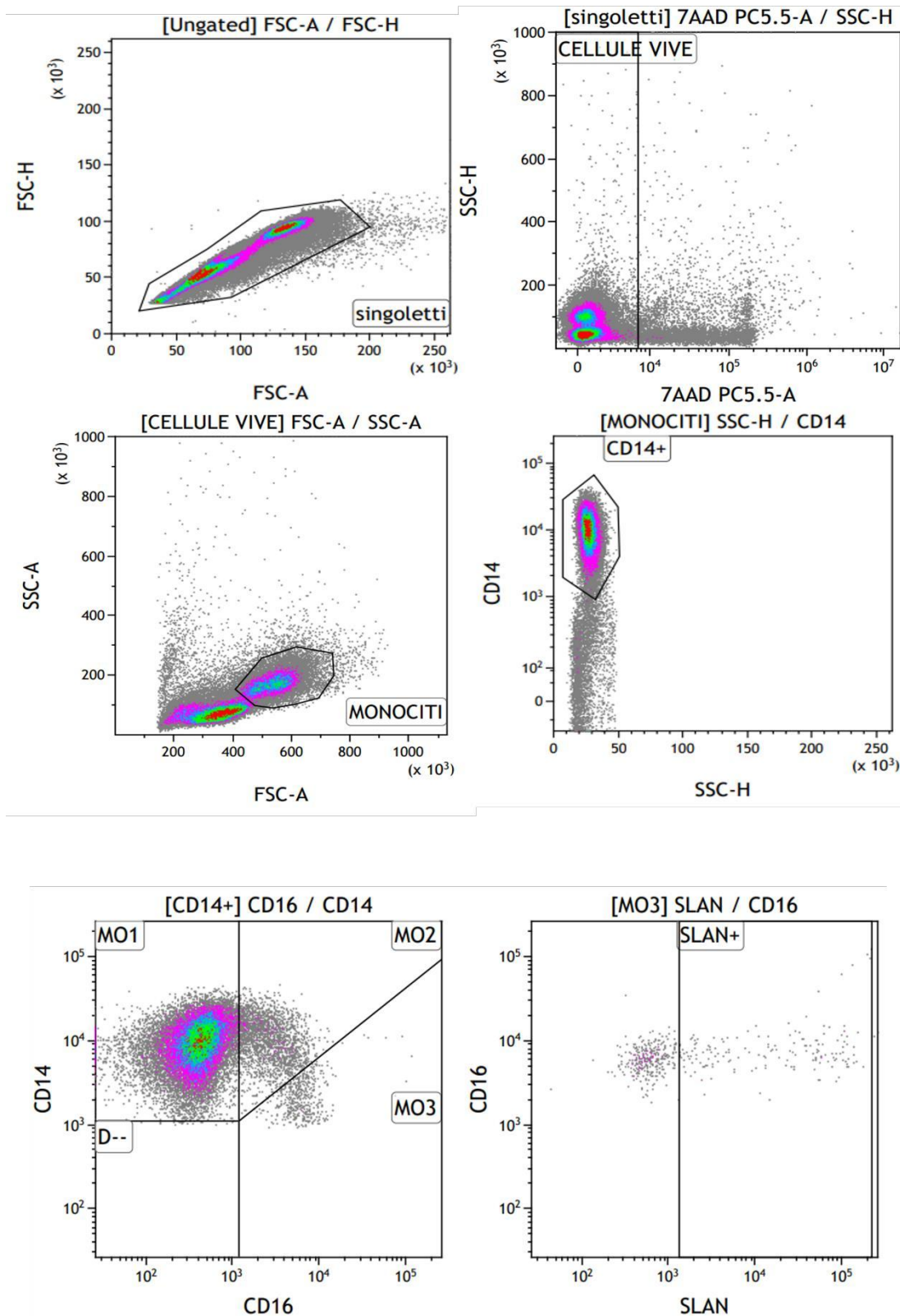


Figura 4,5,6: Strategia di gating utilizzata per l'analisi delle pop. monocitarie

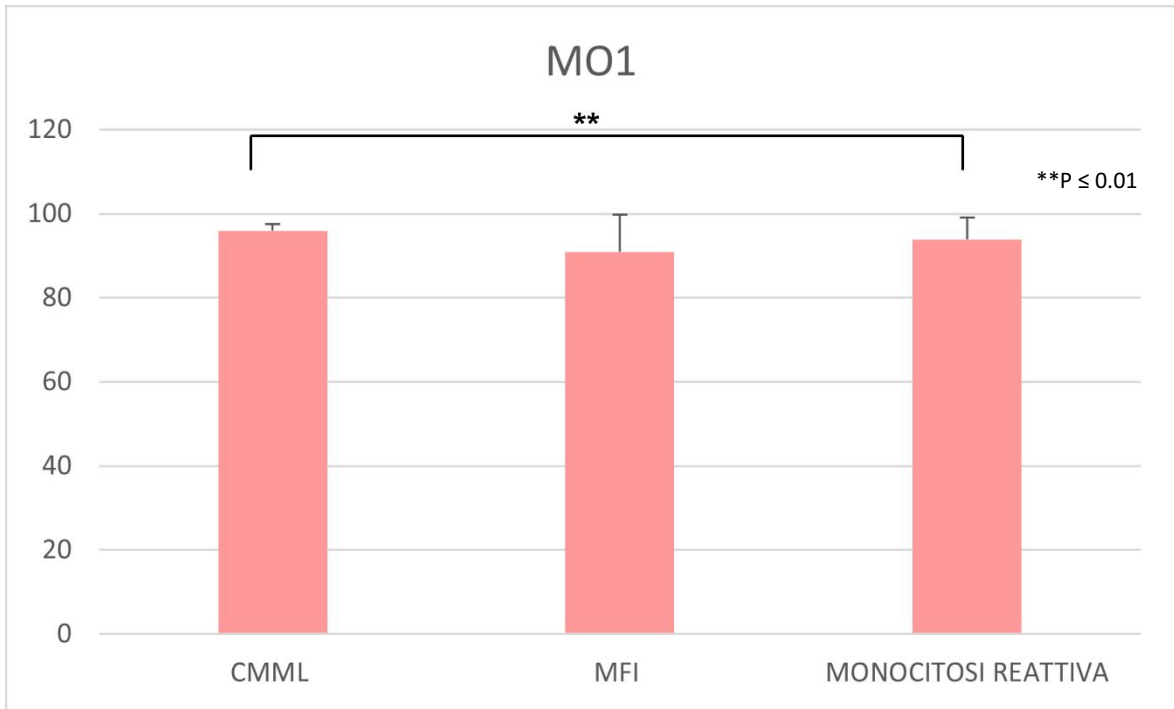


Figura 7. Istogramma della sottopopolazione monocitaria MO1 nella LMMC, MFI e monocitosi reattiva.

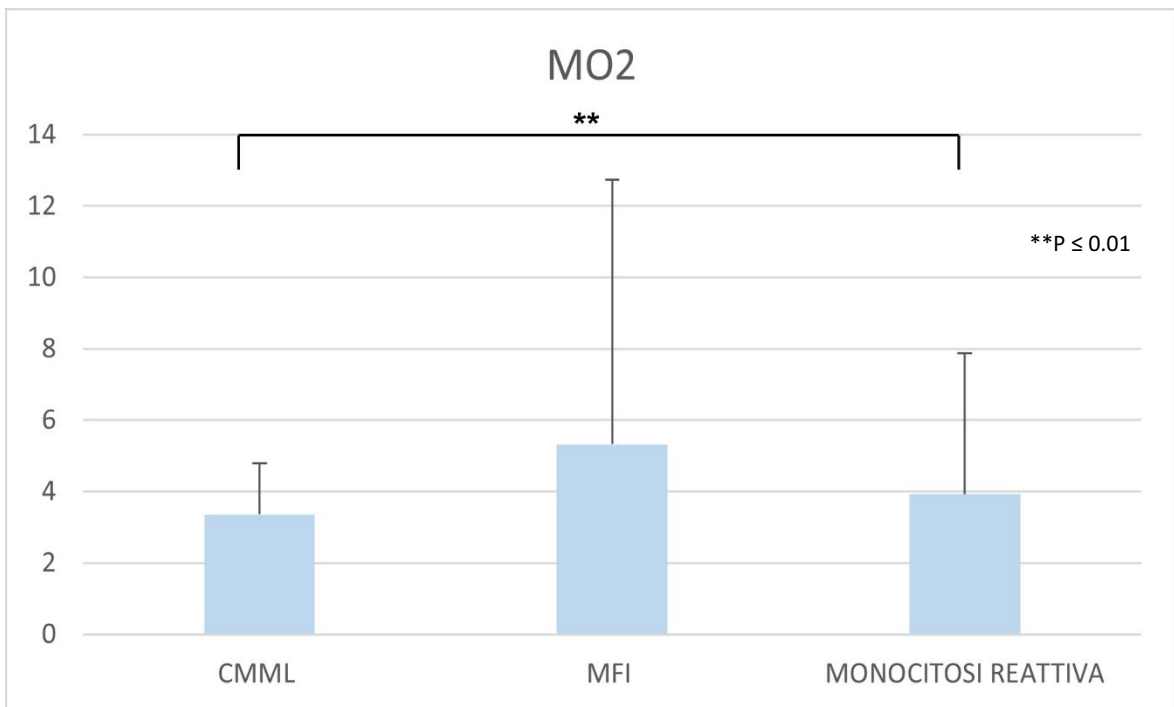


Figura 8. Istogramma della sottopopolazione monocitaria MO2 nella LMMC, MFI e monocitosi reattiva.

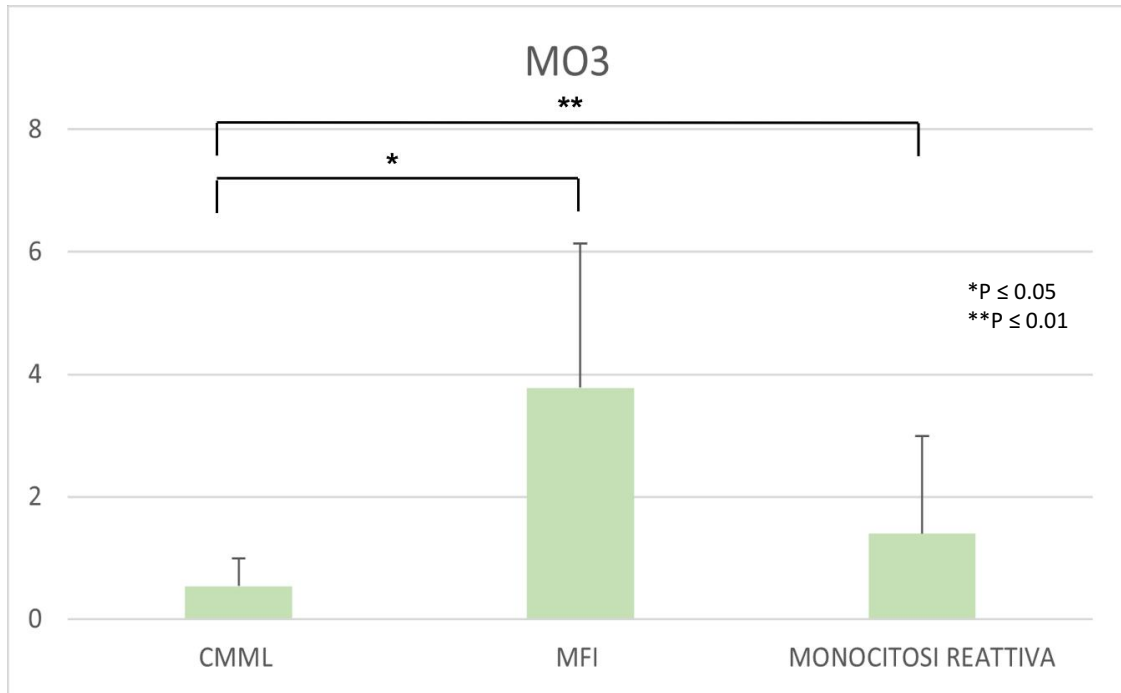


Figura 9. Istogramma della sottopopolazione monocitaria MO3 nella LMMC, MFI e monocitosi reattiva.

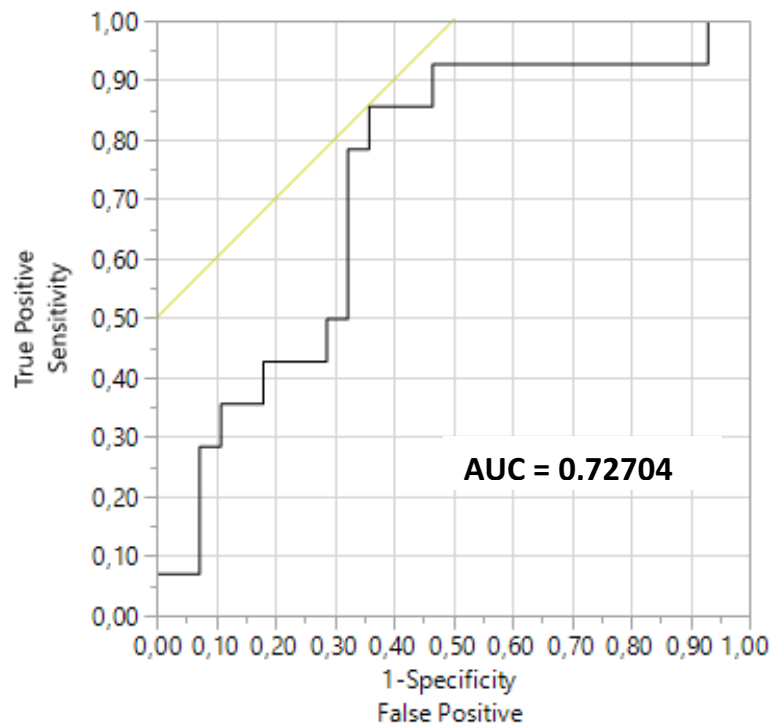


Figura 10. Analisi della curva ROC della sensibilità e specificità diagnostica della percentuale di MO1 nel sangue periferico in pazienti con LMMC e monocitosi reattiva.

DISCUSSIONE

La leucemia mielomonocitica cronica (LMMC) è una neoplasia mieloide classificata dall'OMS come sindrome da sovrapposizione mielodisplastica/mieloproliferativa. I criteri diagnostici si basano sulla presenza di monocitosi periferica $>1000/\text{mmc}$ persistente per più di 3 mesi, con monociti che in percentuale rappresentino più del 10% dei GB, assenza di altre neoplasie mieloidi (assenza del gene di fusione BCR-ABL, mutazioni CALR ed ML, riarrangiamenti di PDGFRA e PDGFRB ed FGFR1), e sull'esclusione di altre cause (infiammatorie, etc.) che possono dare monocitosi.

La diagnosi è basata sullo studio morfologico del sangue periferico e midollare e mira a valutare anomalie delle cellule del sangue e dei suoi precursori.

La biopsia osteomidollare è importante per valutare la cellularità, la fibrosi e la topografia delle cellule emopoietiche nel midollo. L'analisi del cariotipo è utile per evidenziare eventuali anomalie citogenetiche e infine, l'analisi molecolare tramite sequenziamento di geni attraverso tecniche NGS permette l'identificazione di specifiche mutazioni coinvolte nella neoplasia.

L'analisi citofluorimetrica non è un esame obbligatorio per la diagnosi della LMMC. In letteratura è stata dimostrata l'utilità della

citofluorimetria come supporto alla diagnosi della LMMC ^{24, 25, 31}, e viene utilizzata solo in Centri, altamente specializzati o a scopi di ricerca. In più, molto spesso l'indagine è effettuata per valutare nel midollo osseo la displasia delle cellule leucocitarie e l'eventuale presenza dei blasti.

Alcuni gruppi di ricerca hanno studiato specificatamente i monociti nel sangue periferico di questi pazienti ed hanno identificato e delineato con accuratezza le tre sottopopolazioni dei monociti: classici, intermedi e non classici anche in questa patologia. Queste tre popolazioni nello studio francese sono risultate significativamente differenti, in particolare gli MO1 e MO3 nei pazienti con LMMC rispetto ai controlli normali sia giovani che anziani, a pazienti con monocitosi reattiva e a pazienti monocitosi in altre malattie ematologiche.³⁴ Questi dati sono stati validati sempre dallo stesso gruppo con un'altra coorte di pazienti e gli autori hanno anche stabilito un cutoff che è risultato essere $\geq 94\%$ per gli MO1 che era altamente indicativo per una monocitosi in pazienti con LMMC ed un cutoff per gli MO3 $< 1,13\%$ predittivo per la LMMC. Questi dati sono poi stati successivamente validati dallo studio del gruppo europeo. Sempre il gruppo francese ha poi identificato nello studio dello SLAN un ottimo marker per differenziare in modo più preciso i monociti non classici.²⁴

Nel lavoro di tesi, abbiamo voluto verificare se nella nostra casistica di pazienti affetti da LMMC, erano riprodotte le stesse caratteristiche delle popolazioni monocitarie pubblicate dagli studi descritti.

I nostri dati, hanno confermato i risultati di questi Centri, mostrando un'ottima correlazione della percentuale dei monociti classici nel sangue periferico di pazienti con diagnosi di LMMC, con valori superiori al cutoff 94%, significativamente differenti rispetto ai risultati nei gruppi di controllo rappresentati dalle monocitosi in MFI e dalle monocitosi reattive.

Abbiamo poi valutato se i risultati provenienti dallo studio delle cellule midollari erano paragonabili a quelli del sangue periferico. Lo studio sul midollo osseo delle popolazioni monocitarie è stato sempre possibile, ed i dati riproducevano quelli ottenuti dal sangue periferico.

In ultimo, abbiamo voluto valutare la possibilità di studiare campioni di sangue periferico e midollo osseo congelati ed anche se abbiamo avuto una mortalità cellulare del 30-50% in questi campioni, comunque attesa, in più dell'80% dei casi l'analisi è stata possibile ed i risultati comparabili a quelli dei campioni a fresco.

Nei campioni midollari sia freschi che congelati, è stata effettuata un'analisi immunofenotipica non solo sui monociti maturi, ma di tutti i leucociti, come suggerito dall'OMS, per valutare la displasia cellulare e l'eventuale presenza di blasti e i risultati anche qui sono stati comparabili nei due gruppi.

Chiaramente, un'analisi su sangue periferico semplice e poco cruenta per il paziente, può rappresentare un esame fondamentale come screening di primo livello delle monocitosi di varia origine.

L'analisi su midollo è stata effettuata per valutare la possibilità di analizzare le 3 sottopopolazioni monocitarie, in quanto la monocitosi nel midollo risulta meno spiccata rispetto alla monocitosi periferica, e soprattutto per verificare se i monociti midollari maturi presentassero le stesse caratteristiche dei monociti del sangue periferico.

Anche se abbiamo studiato un numero limitato di campioni, l'analisi fatta su campioni congelati, confrontando poi i risultati con quelli dei campioni a fresco, è di particolare rilevanza perché mostra la possibilità di valutare i pazienti in modo più semplice, ottimizzando l'organizzazione generale del laboratorio di ricerca.

In conclusione, questo lavoro ha confermato l'utilità dello screening dei monociti maturi per discriminare le monocitosi periferiche di varia origine, suggerito dallo studio francese del 2015, ma effettuato in pochissimi Centri, soprattutto in Italia, e a scopo di ricerca.

Lo studio è stato possibile sia su sangue periferico che su midollo osseo, e soprattutto riproducibile su campioni congelati.

Chiaramente i dati devono essere confermati in una casistica più ampia e soprattutto riproducibili nella real-life.

BIBLIOGRAFIA

¹ Vardiman JW et al. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292–302.

² Arber DA et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391-2405.

³ M.M.Patnaik et al. Chronic Myelomonocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2020 Jan;95(1):97-115.

⁴ A.A.N. Giagounidis et al. Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q3.

⁵ Bennett J.M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976;33:451–8.

⁶ Ardiman J.W. et al. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292–302.

- ⁷ Schuler E. et al. Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Res* 2014; 38 :1413-1419.
- ⁸ D.A.Arber et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data – *Blood* (2022) 140 (11): 1200–1228.
- ⁸ M.M.Patnaik et al. Chronic Myelomonocytic Leukemia: Insights into Biology, Prognostic Factors, and Treatment. *Current Oncology Reports* (2019).
- ⁹ O. Chan et al. Chronic myelomonocytic leukemia diagnosis and management - *Leukemia* 2021 Jun;35(6):1552-1562.
- ¹⁰ Itzykson R, et al. Diagnosis and treatment of chronic myelomonocytic leukemias in adults: recommendations from the European Hematology Association and the European LeukemiaNet. *Hemasphere*. 2018;2:e150
- ¹¹ Patnaik MM et al. Chronic myelomonocytic leukemia: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management - *Am J Hematol*. 2020 Jan;95(1):97-115.
- ¹² Patnaik MM et al. Targeted next generation sequencing of PDGFRB rearranged myeloid neoplasms with monocytosis. *Am J Hematol*. 2016;91(3):E12-E14.

- ¹³ Patnaik MM, et al. FGFR1 rearranged hematological neoplasms - molecularly defined and clinically heterogeneous. *Leuk Lymphoma*. 2018;1-3:1520-1522
- ¹⁴ Solary E et al. How I treat chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2017;130:126–36.
- ¹⁵ Onida F et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* 2002;99:840–9.
- ¹⁶ Tang G, et al. Cytogenetic risk stratification of 417 patients with chronic myelomonocytic leukemia from a single institution. *Am J Hematol*. 2014;89: 813–8.
- ¹⁷ Wassie EA et al. Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study. *Am J Hematol*. 2014;89:1111–5.
- ¹⁸ Ball M et al. When clinical heterogeneity exceeds genetic heterogeneity: thinking outside the genomic box in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2016;128:2381–7.
- ¹⁹ Ozanska A et al. Pattern of human monocyte subpopulation in health and disease. *Immunology* (2020).

- ²⁰ Tarfi S et al. Multicenter validation of the flow measurement of classical monocyte fraction for chronic myelomonocytic leukemia diagnosis. *Blood Canc J* 2018;8:114.
- ²¹ Talati C et al. Monocyte subset analysis accurately distinguishes CMML from MDS and is associated with a favorable MDS prognosis. *Blood* 2017;129:1881–3.
- ²² Zhu J et al. A hierarchical approach in the diagnostic workflow of chronic myelomonocytic leukemia: pivotal role of the "Mono-dysplasia-score" combined with flow cytometric quantification of monocyte subsets. *Int J Lab Hematol* 2019;41:782–90.
- ²³ T.P.Hofer et al. 6-Sulfo LacNAc (Slan) as a Marker for Non-classical Monocytes. *Front Immunol.* 2019; 10: 2052.
- ²⁴ E.Solary et al. Incorporating flow cytometry and next generation sequencing in the diagnosis of CMML. Are we ready for prime? *Best Practice & Research Clinical Haematology* 33 (2020) 101134
- ²⁵ D.Selimoglu et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* (2015) 125 (23): 3618–3626.

²⁶ Chad A et al. Emerging utility of flow cytometry in the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Res* 2018 Oct;73:12-15.

²⁷ Porwit A et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia*. 2014; 28: 1793– 1798.

²⁸ Lynch DT et al. How i investigate monocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2018 Apr;40(2):107-114.

²⁹ A.Genthon et al. Myelofibrosis: A review. *Rev Med Interne* 2021 Feb;42(2):101-109.

³⁰ L.Boiocchi et al. Development of monocytosis in patients with primary myelofibrosis indicates an accelerated phase of the disease. *Mod Pathol* 2013 Feb;26(2):204-12.

³¹ Tarfi S et al. Disappearance of slan-positive non-classical monocytes for diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia with an associated inflammatory state - *Haematologica* 2020.

³² Ziegler-Heitbrock L et al. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol*. (2013) 4:23.

³³ Jean E. Goasguen et al. Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *haematologica* | 2009; 94(7).

³⁴ D.Selimoglu-Buet et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015;125(23):3618-3626).