Anno 7 - Numero 2 - 2020

Ematologia Oncologica.it

Dalla morfologia alla classificazione molecolare

Organo Ufficiale
della **Fondazione Matarelli** - Milano

Con il supporto non condizionante di

Celgene | Bristol Myers Squibb™ Company

Ematologia Oncologica.it

www.ematologiaoncologica.it

Dalla morfologia alla classificazione molecolare

Sindromi mielodisplastiche
Matteo G Della Porta, Erica Travaglino 7

Neoplasie mieloproliferative
Barbara Mora, Umberto Gianelli, Francesco Passamonti 15

Leucemia acuta linfoblastica
Cristina Mecucci, Roberta La Starza 27

Leucemie acute mieloidi
Giorgina Specchia, Paola Carluccio, Francesco Albano 41

Linfomi maligni
Marco Paulli 55

Ematologia Oncologica.it
Vol 7 - n.2 - 2020

Direttore Responsabile
Giorgio Maggiani

Direttore Scientifico
Giorgio Lambertenghi Deliliers
Fondazione Matarelli, Milano

Comitato Editoriale
Sergio Amadori
Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccadoro
Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi
Università degli Studi, Firenze

Michele Cavo
Università degli Studi, Bologna

Paolo Corradini
Università degli Studi, Milano

Antonio Cuneo
Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi
Università degli Studi, Genova

Cristina Mecucci
Università degli Studi, Perugia

Fabrizio Pane
Università degli Studi, Napoli

Francesco Passamonti
Università degli Studi, Varese

Gianni Pizzolo
Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia
Università degli Studi, Bari

Ematologia Oncologica.it
è una rivista quadrimestrale monotematica, di aggiornamento in lingua italiana, che ha essenzialmente lo scopo educativo di rendere disponibili le informazioni più aggiornate su argomenti pertinenti le malattie del sangue, in particolare quelle neoplastiche. Per raggiungere questo obiettivo la rivista desidera coinvolgere gli specialisti italiani più qualificati e informare il lettore sui più recenti progressi nel campo della ricerca di base, della clinica e della terapia.

La rivista si attiene alle raccomandazioni indicate dal World Association of Medical Editors (WAME) riguardante l'etica delle pubblicazioni in ambito sanitario.

Registrazione Tribunale di Milano
n. 348 del 19/11/2013

Progetto grafico
Dynamicom srl

Sito Internet
www.ematologiaoncologica.it

Coordinamento editoriale
Dynamicom - Milano
Tél. (+39)0289693750 - Fax (+39)02201176

Editore
Fondazione Matarelli

Periodicità
Quadrimestrale

Avvertenze ai lettori
L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni eventualmente citati negli articoli, ed invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

Norme per gli Autori
- L'accettazione dei testi inviati è comunque subordinata al parere del Comitato Editoriale che deve verificare la loro compatibilità con le norme redazionali.
- Gli Autori dei testi sono gli unici responsabili del loro contenuto, e della riproduzione delle immagini allegate.
- Il primo Autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora utilizzi figure e/o tabelle già pubblicate altrove.
- La proprietà dell'articolo, una volta pubblicato, appartiene alla Fondazione Matarelli, (Largo Crocetta, 2 - 20122 MI) che ha depositato il nome della rivista presso il Tribunale di Milano in data 19/11/2013
- Il manoscritto deve essere inviato a Dynamicom Edizioni (segreteria@ematologiaoncologica.it) che, dopo averlo controllato ed impaginato, lo invierà al Direttore Scientifico (giorgio.lambertenghi@unimi.it) per la revisione e il controllo della stesura secondo le norme redazionali. Le bozze di stampa verranno quindi rinviate all'Autore per le opportune correzioni, che dovrà provvedere entro cinque giorni lavorativi a rinviarle a: segreteria@ematologiaoncologica.it

Norme redazionali
Il contenuto dell'articolo, redatto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh, non deve superare le 30-35 cartelle dattiloscritte (2000 battute cad.) compresa la bibliografia, e corredato delle illustrazioni (tabelle, grafici, figure) nel numero che l'Autore ritiene necessario, in file ad alta risoluzione (salvate in formato pdf, jpg o eps).

Lo stile del manoscritto, le citazioni bibliografiche e il loro riferimento nel testo del manoscritto devono seguire le raccomandazioni dell'International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Per le relative informazioni, gli Autori sono pregati di consultare il sito http://www.icmje.org.

L'articolo deve essere così strutturato:
- **Titolo conciso** e pertinente con il tema della rivista;
- **Prima pagina** con nome e cognome degli Autori, istituzione di appartenenza, foto tessera a colori del primo Autore;
- **Introduzione iniziale** che esponga in maniera chiara lo scopo dell'articolo;
- **Corpo del testo** suddiviso in sottocapitoli a contenuto omogeneo;

Pagina finale:
1) nome e cognome del primo autore, con telefono, fax, e-mail al quale andrà indirizzata la corrispondenza;
2) eventuali **ringraziamenti** a persone e/o associazioni;
3) 3-5 parole chiave.

Bibliografia
Per lo stile nella stesura seguire le seguenti indicazioni o consultare il sito "lnternational Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements far Manuscripts Submitted to Biomedical Journals Sample References".
Le **voci bibliografiche** non devono superare il numero massimo di 150, numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo, citate tra parentesi con il testo in apice e con i numeri arabi, tenendo presente gli esempi sottostanti.

Articoli con 1-3 autori
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Articoli con più di 3 autori
Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

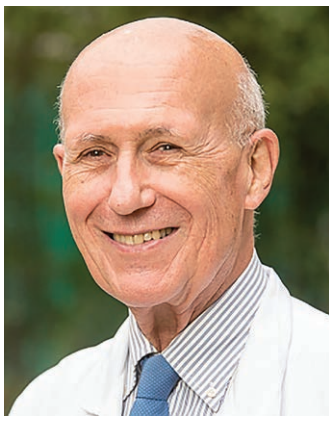
Abstract e Congressi
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts. 2000;100(10):1000.

Capitoli di libri
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. The Hemoglobin, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 1980:10-15.

Editoriale

Giorgio Lambertenghi Deliliers
Fondazione Matarelli - Milano



La notevole eterogeneità clinica delle neoplasie ematologiche ha reso necessario un inquadramento diagnostico basato ancora sulla morfologia, ma integrato dai più recenti avanzamenti sui versanti immunoistochimico e genetico-molecolare. Pertanto ***Ematologia Oncologica.it*** dedica questo numero all'evoluzione che negli anni più recenti hanno avuto i criteri classificativi, contribuendo alla identificazione di diverse entità cliniche con prognosi differenti e consentendo l'impiego di strategie terapeutiche personalizzate. Un esempio significativo sono le sindromi mielodisplastiche dove l'approccio diagnostico iniziale è sempre basato sull'esame microscopico di uno striscio di sangue periferico, sull'esame del mieloaspirato e della biopsia osteomidollare. Tuttavia l'incorporazione nei sistemi classificativi, variamente proposti in questi anni, delle alterazioni del cariotipo e di alcune mutazioni somatiche hanno migliorato notevolmente la stratificazione prognostica e quindi il processo clinico decisionale. Analogamente nelle sindromi mieloproliferative, dove la distinzione delle varie entità si basa sui rilievi dei valori anomali dell'emocromo e sugli aspetti istologici del midollo. Il contributo clinico può essere modesto all'esordio e il quadro istologico non ancora completamente diagnostico. In questi casi è importante analizzare alcuni parametri strettamente morfologici (come la cellularità emopoietica in termini quantitativi e qualitativi, la percentuale dei blasti CD34 positivi, le caratteristiche dei sinusoidi, il grado di fibrosi) e soprattutto integrarli con metodiche di sequenziamento genico per la ricerca di mutazioni correlabili al fenotipo clinico e al rischio di evoluzione. L'utilizzo di questi nuovi modelli classificativi per definire la strategia terapeutica, in particolare il trapianto, è ancora oggetto di ricerca.

Nelle leucemie acute la diagnosi morfologica presenta notevoli limiti classificativi, per cui l'impatto clinico e prognostico è garantito dalla integrazione con la caratterizzazione immuno-fenotipica e citogenetico-molecolare. Nelle leucemie linfoblastiche a cellule B la classificazione genetica si basa sulle tecnologie del genoma, a partire dalla citogenetica convenzionale, alla FISH, al sequenziamento genico e all'espressione genica. La maggioranza delle mutazioni è utile per il rilievo della malattia minima residua e quindi correlata ad una prognosi sfavorevole. Nella classificazione delle leucemie acute linfoblastiche T le alterazioni genetiche non sono state ancora introdotte tra i parametri biologici per l'identificazione di sottogruppi specifici. Anche se estremamente eterogenei sono i meccanismi di deregolazione genica, è stato possibile identificare sei sottogruppi biologici che riflettono diversi stadi di differenziazione del timocita. Studi recenti hanno concentrato l'attenzione sul processo di deregolazione delle principali vie di trasduzione del segnale, come indici prognostici e potenziali bersagli terapeutici. Nelle leucemie acute mieloidi l'approccio diagnostico è dinamico: parte dalla citomorfologia secondo i criteri FAB stabiliti ancora negli anni '80, integrata successivamente dalla immunoistochimica, dalla citogenetica convenzionale e quindi dalla diagnostica molecolare. Negli ultimi anni il sequenziamento genico di nuova generazione ha consentito di analizzare un pannello di geni che hanno un rilevante ruolo prognostico e terapeutico. La stratificazione genetico-molecolare è complessa ed in continua evoluzione, richiede tempo, competenze ed alti costi, ma non c'è dubbio che sta aprendo nuove prospettive di cura.

Significativi anche i mutamenti delle classificazioni dei linfomi maligni. Dalla classificazione di Kiel del 1974, alla R.E.A.L. del 1994, quindi alla WHO del 2001, revisionata nel 2017 con l'inserimento di dati soprattutto genetico-molecolari, molti dei quali hanno importanti ricadute prognostico-terapeutiche. L'impiego delle moderne indagini ha permesso di evidenziare nei linfomi non-Hodgkin B e T sottotipi che vanno da un basso potenziale di malignità a quelli ad alto grado di aggressività clinica, con variabili localizzazioni d'organo principalmente a livello del sistema linfo-emopoietico, cutaneo e intestinale. Immodificata la classificazione del linfoma di Hodgkin nelle sue varianti tradizionali. Utile sul piano terapeutico la ricerca di marcatori dell'infezione da EBV e di mutazioni PDL1 e PDL2.

Sindromi mielodisplastiche



Matteo G Della Porta, Erica Travaglino

Comprehensive Cancer Center, IRCCS Humanitas Research Hospital & Humanitas University, Milan Italy

Introduzione

Le sindromi mielodisplastiche (SMD) costituiscono, nel loro insieme, un gruppo di disordini del midollo osseo emopoietico clinicamente caratterizzati da anemia, solitamente refrattaria al trattamento, neutropenia e piastrinopenia, e da una progressiva tendenza a evolvere in leucemia acuta mieloide (LAM) [1].

Le SMD rappresentano una problematica ematologica particolarmente complessa, a causa dell'estrema eterogeneità clinica e del difficoltoso inquadramento diagnostico. Tale complessità emerge già considerando la terminologia utilizzata in passato per descrivere questi disordini, variamente indicati come anemie refrattarie, a sottolineare il sintomo clinico prevalente nelle forme indolenti, o come preleucemie o leucemie subacute, a rimarcare la propensione alla progressione leucemica delle forme più aggressive [1].

La classificazione morfologica

Nel tentativo di favorire una più omogenea classificazione di questi disordini, nel 1982 un Gruppo Cooperativo Franco-Americano-Britannico (FAB) ha individuato una serie di criteri diagnostici basati sulle anomalie morfologiche a carico delle diverse filiere emopoietiche e sulla percentuale di mieloblasti [2].

Sulla base di questi elementi, è stata formulata una classificazione che prevede cinque sottogruppi: anemia refrattaria, anemia sideroblastica idiopatica acquisita, anemia refrattaria con eccesso di blasti (AREB), AREB in trasformazione (AREB-t) e leucemia mielomonocitica cronica (LMMC). Questa proposta è rimasta valida fino al 2001, anno di formulazione dei nuovi criteri classificativi delle neoplasie mieloidi da parte della WHO, che da allora costituiscono il riferimento per il management clinico dei pazienti e per la conduzione di studi biologici e clinici [2].

L'attuale approccio diagnostico include l'esame microscopico di uno striscio di sangue periferico, che può rivelare la presenza di anomalie morfologiche come neutrofili ipogranulati con nuclei iposegmentati (anomalia pseudo-Pelger-Huët) e piastrine di dimensioni aumentate, il mieloaspirato, la biopsia osteomidollare e l'analisi citogenetica [3].

La documentazione della displasia midollare è il fondamento della diagnosi di SMD. La cellularità midollare è generalmente aumentata, con iperplasia della serie eritroide e inversione del normale rapporto leuco-eritroblastico; in circa il 10% dei casi, tuttavia, si può osservare un quadro ipoplastico. Generalmente si osserva un aumento di precursori eritroidi più immaturi con aspetti megaloblastoidi. Altri segni di diseritropoiesi comprendono anomalie nucleari quali multinuclearità, tendenza alla picnosi, corpi di Howell-Jolly, lobulazioni e ponti internucleari, nonché alterazioni citoplasmatiche come punteggiatura basofila, aree di incompleta emoglobinizzazione, vacuolizzazione degli elementi più immaturi. Di frequente riscontro è un asincronismo maturativo nucleocitoplasmatico con persistenza di intensa basofilia. La reazione di Perls consente di valutare l'entità dei depositi di ferro midollari e di individuare la presenza di eritroblasti con accumulo di ferro (sideroblasti). I sideroblasti ad anello (sideroblasti con >5 granuli che ricoprono almeno 1/3 della circonferenza nucleare) riflettono un accumulo di ferro a livello mitocondriale e sono un segno specifico di diseritropoiesi.

Per quanto riguarda la serie mieloide, la principale anomalia citoplasmatica è rappresentata dall'ipo-agranularità: i mielociti, metamielociti e granulociti neutrofili degranulati hanno citoplasma incolore e privo di granulazioni secondarie specifiche evidenti, e sono altamente indicativi di dismielopoiesi [3]. Nel citoplasma possono inoltre trovarsi coalescenze giganti delle granulazioni primarie (pseudo-Chédiak-Higashi) o affusolate (corpi di Auer). L'alterazione nucleare più frequente è l'anomalia pseudo-Pelger-Huët: il nucleo del granulocita neutrofilo, normalmente plurisegmentato, è rotondo o bilobato con cromatina addensata. Altre caratteristiche di dismielopoiesi sono la dissociazione tra maturazione nucleare e citoplasmatica e la prevalenza di forme immature.

Infine, nella serie granulocitaria le aberrazioni più frequenti sono la presenza di micromegacariociti (elementi di dimensioni inferiori a 20μm con singolo nucleo rotondo o bilobato centrale a cromatina densa e citoplasma a differenti stadi di maturazione, megacariociti con nuclei ipo- o monolobati e citoplasma abbondante e differenziato (caratteristici delle forme con delezione 5q-), e megacariociti atipici con molti nuclei rotondi separati ed abbondante citoplasma. Essenziale per una corretta classificazione delle SMD è la valutazione dei blasti, elementi mieloidi immaturi di aspetto indifferenziato, espressione della progressiva perdita della capacità di differenziazione

e maturazione del clone displastico. Le anomalie morfologiche della serie megacariocitaria sono caratteristiche e patognomoniche di SMD. Un elenco dettagliato delle principali anomalie morfologiche riscontrate nelle SMD è riportato in Tabella 1 ed alcuni esempi nella Figura 1. La biopsia osteomidollare, per quanto possa essere considerata eccessivamente invasiva nei pazienti di età avanzata, fornisce informazioni estremamente utili in caso di sospetta SMD. L'esame consente di valutare con accuratezza la cellularità midollare e, in particolare, il rapporto tra cellularità emopoietica e tessuto adiposo in relazione all'età del paziente e il rapporto leuco-eritroblastico. L'analisi permette inoltre di valutare alcuni aspetti citologici, soprattutto la displasia megacariocitaria, non sempre valutabile ac-

Serie eritroide	Nucleo: - Bi- o multinuclearità (immagine A, May-Grünwald Giemsa 1000X) - Lobulazioni nucleari (immagine B, May-Grünwald Giemsa 1000X) - Carioressi (frammentazione) - Carioschisi (fissurazione) - Gigantismo (immagine C, May-Grünwald Giemsa 630X) - Picnosi precoce
	Citoplasma - Colorazione citoplasmatica irregolare (immagine D, May-Grünwald Giemsa 1000X) - Vacuoli (immagine C, May-Grünwald Giemsa 630X) - Punteggiatura basofila (immagini C e D, May-Grünwald Giemsa 630X e 1000X)
	Maturazione nucleo-citoplasmatica asincrona con distaccamento di uno o più cromosomi dal fuso mitotico
	Mitosi: - Figure mitotiche anomale - Distaccamento di uno o più cromosomi dal fuso mitotico (corpi di Howell-jolly) (immagine E, May-Grünwald Giemsa 630X) - Ponti intercitoplasmatici (immagine F, May-Grünwald Giemsa 630X)
	Aspetti megaloblastoidi (maturazione asincrona nucleo-citoplasmatica) (immagine G, May-Grünwald Giemsa 630X)
	Isolotti eritroidi monomorfi
	Sideroblasti ad anello (colorazione di Perls) (immagine H, Perls 1000X)
Serie granulocitaria	Nucleo: - Iposegmentazione (pseudo-Pelger) (immagine I, May-Grünwald Giemsa 630X) - Ipersegmentazione (immagine L, May-Grünwald Giemsa 1000X) - Densità cromatinica aumentata quasi picnotica (immagine I, May-Grünwald Giemsa 630X) - Densità cromatinica ridotta (aspetto spugnoso) (immagine M, May-Grünwald Giemsa 630X) - Forme nucleari bizzarre (immagine L, May-Grünwald Giemsa 1000X) - Protrusioni nucleari (immagini N e O, May-Grünwald Giemsa 1000X e 630X)
	Citoplasma - Dimensioni ridotte o aumentate - Granulazioni secondarie ridotte o assenti (immagine O, May-Grünwald Giemsa 630X) - Granulazioni primarie ridotte o assenti - Distribuzione dei granuli anomala - Coalescenza granulazioni primarie (pseudo-Chédiak-Higashi, corpi di Auer) (immagini P e Q, May-Grünwald Giemsa 1000X e 630X) - Basofilia citoplasmatica persistente (cellule immature)
	Maturazione nucleo-citoplasmatica asincrona (immagine R, May-Grünwald Giemsa 1000X)
Serie megacariocitaria	Micromegacariociti (immagine S, May-Grünwald Giemsa 630X)
	Megacariociti con multipli nuclei rotondi separati (immagine T, May-Grünwald Giemsa 630X)
	Megacariociti ipo- o monolobati con abbondante citoplasma (immagine U, May-Grünwald Giemsa 200X)
	Megacariociti ipogranulati dal citoplasma basofilo (immagine V, May-Grünwald Giemsa 630X)
	Megacariociti con nuclei dalla forma bizzarra o iperlobulati

***Tabella 1** - Elenco delle principali anomalie morfologiche riscontrate nelle SMD*

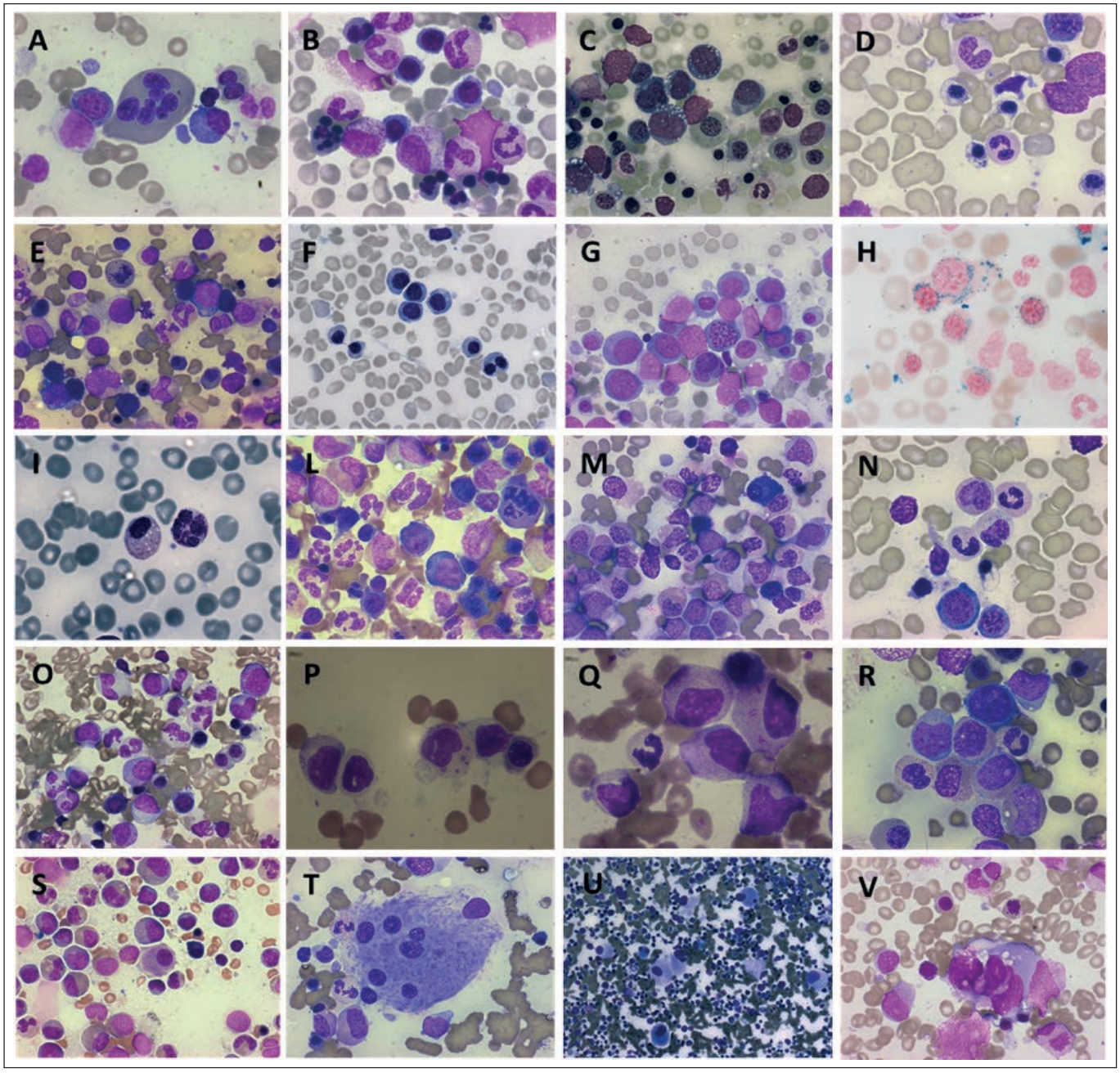


***Figura 1** - Principali anomalie morfologiche associate a displasia midollare*

curatamente con il mieloaspirato. L'analisi istopatologica consente infine di valutare il contenuto in fibre reticoliniche midollari, un aumento focale o diffuso delle quali (fibrosi midollare) può essere rilevato nel 10-20% dei pazienti con SMD, più frequentemente nelle forme secondarie a radio-chemioterapia e in quelle con displasia multilineare [3,4].

L'analisi citogenetica ha un ruolo essenziale nell'inquadramento delle SMD. Il 40-60% dei pazienti con SMD primitiva e l'80-90% di quelli con forme secondarie presentano alterazioni del cariotipo al momento della diagnosi. Il riscontro di una o più anomalie citogenetiche clonali aumenta sensibilmente l'accuratezza della diagnosi. Nei pazienti con cariotipo normale o in caso di fallimento dell'analisi citogenetica (inconveniente che si verifica nel 10-15% dei casi), la diagnosi può essere formulata soltanto sulla base della morfologia midollare, che tuttavia non sempre è dirimente, in particolare nei pazienti senza eccesso di blasti e con displasia eritroide isolata. In questi casi è raccomandabile un periodo di osservazione di circa 6 mesi prima di formulare una diagnosi definitiva. Alcune anomalie citogenetiche ricorrono con maggiore frequenza nelle SMD e possono essere correlate a quadri morfologici e clinici peculiari, come nel caso della SMD con delezione isolata delle braccia lunghe del cromosoma 5 (sindrome 5q-). Questa forma, riconosciuta dalla classificazione WHO come sottotipo distinto, è più frequente nel sesso femminile, si presenta generalmente con numero di piastrine

normale o aumentato e con anomalie morfologiche peculiari (megacariociti mono- ipolobati con abbondante citoplasma in genere differenziato), e ha una prognosi particolarmente favorevole. Oltre che dal punto di vista diagnostico, l'analisi citogenetica ha un significato prognostico molto rilevante ed è ormai parte integrante di tutti i sistemi di predizione della sopravvivenza [3].

Nel 2001 la WHO ha formulato una nuova classificazione delle neoplasie mieloidi, che fornisce al clinico uno strumento molto utile per definire i vari sottotipi di SMD. La nuova proposta incorpora molti dei principi del sistema FAB, ma definisce con maggiore precisione alcuni sottotipi. Essa distingue sei forme principali: anemia refrattaria, anemia refrattaria con sideroblasti ad anello, citopenia refrattaria con displasia multilineare senza o con sideroblasti ad anello, AREB di tipo 1 e 2, SMD con del(5q) isolata. Le principali differenze rispetto alla classificazione precedente riguardano l'esclusione del sottotipo AREB-t, assimilato alle leucemie acute, la collocazione della LMMC in un gruppo di disordini con caratteristiche mielodisplastiche/mieloproliferative (SMD/MPD), e il riconoscimento della sindrome 5q- come entità clinica distinta. Questa classificazione non è utile soltanto ai fini diagnostici, ma possiede anche un rilevante valore prognostico e può pertanto essere utilizzata per orientare la decisione terapeutica nei singoli pazienti [5].

Dal 2001 la classificazione WHO è stata sottoposta a 2 revisioni successive, nel 2008 e 2016. L'ultima revisione (Tabella 2) ha introdotto in modo uniforme il termine sindrome mielodisplastica (SMD) per definire tutti i fenotipi di malattia, e nei casi con sideroblasti ad anello <15% introduce per la prima volta come criterio diagnostico la presenza di una mutazione somatica (SF3B1). Questo rappresenta il primo passo verso l'integrazione di parametri molecolari nella classificazione di questi disordini [5].

Categoria	Dysplastic lineages	Cytopenias [1]	Ring sideroblasts as % of BM erythroid elements	BM blasts	PB blasts	Cytogenetics
MDS with single lineage dysplasia {MDS-SLD)	1	1 o 2	<15% / <5% [2]	<5%, no Auer rods	<1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated Del(5q)
MDS with multilineage dysplasia (MDS-MLD)	2 o 3	1-3	<15% / <5% [2]	<5%, no Auer rods	<1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated Del(5q)
MDS with ring sideroblasts						
and single lineage dysplasia {MD-RSSLD)	1	1 o 2	≥15% / ≥5% [2]	<5%, no Auer rods	<1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated Del(5q)
and multilineage dysplasia {MDS-RSMLD)	2 o 3	1-3	≥15% / ≥5% [2]	<5%, no Auer rods	<1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated Del(5q)
MDS with isolated del(5q)	1-3	1-2	None or Any	<5%, no Auer rods	<1 %, no Auer rods	Del(5q) alone or with 1 additional abnormality except -7 or Del(7q)
MDS with excess blasts-1 {MDS-EB1)	0-3	1-3	None or Any	5-9%, no Auer rods	2-4%, no Auer rods	Any
MDS with excess blasts-2 {MDS-EB2)	0-3	1-3	None or Any	10-19%, or Auer rods	5-19%, or Auer rods	Any
MDS, unclassifiable (MDS-U)						
with 1% blood blasts	0-3	1-3	None or Any	<5%, no Auer rods	=1% [3], no Auer rods	Any
with single lineage dysplasia and pancytopenia	1	3	None or Any	<5%, no Auer rods	<1%, no Auer rods	Any
based on defining cytogenetic abnormality	0	1-3	<15%	<5%, no Auer rods	<1%, no Auer rods	MDS-defining abnormality

[1] Cytopenias defined as Hb < 10 g/dl, PLT < 100.000 /mm^3, N < 1800/mm^3. Rarely, MDS may present with mild anemia or thrombocytopenia above these levels. PB monocytes must be < 1000/mm^3.

[2] If SF3B1 mutation is present

[3] 1% PB blasts must be recorded on at least 2 separate occasions

***Tabella 2** - Classificazione WHO 2016 delle SMD.*

Mutazioni somatiche di geni candidati

La nostra comprensione della base molecolare di SMD è migliorata drammaticamente negli ultimi 10 anni [6]. La prima grande scoperta è stata l'identificazione delle mutazioni del gene TET2 nei pazienti con riarrangiamenti del cromosoma 4q24, regione dove è mappato il gene [7]. Negli ultimi anni, studi di sequenziamento genomico hanno portato alla scoperta di mutazioni ricorrenti in geni implicati nello splicing dell'RNA e in altre vie metaboliche nei pazienti con SMD [8-10]. Utilizzando metodi di sequenziamento ad alta sensibilità sono state identificate mutazioni somatiche nella maggior parte dei pazienti SMD sequenziati, con frequenza variabile tra 78% e 90% in diversi studi. [8-10]. Un elenco dei più comuni geni ricorrentemente mutati nei pazienti con SMD è riportato nella Tabella 3.

Biological pathways and genes	Frequency %	Timing of mutation acquisition	Relationship between mutant gene and clinical phenotype	Prognostic or predictive relevance of mutant gene
RNA splicing				
SF3B1	15-30%	Founding mutation	Associated with ring sideroblasts phenotype	Good overall survival and low risk of leukemic evolution
SRSF2	10-20%	Founding mutation	Associated with RCMD or RAEB, co-mutated with TET2 in CMML	Poor overall survival and high risk of leukemic evolution
U2AF1	<10%	Founding mutation	Associated with RCMD or RAEB	High risk of leukemic evolution
ZRSR2	<10%	Founding mutation	Not defined	Not defined
DNA methylation				
TET2	20-30%	Founding mutation	All MDS subtypes, high mutation frequency (50-60%) in CMML	No impact on overall survival, may predict response to hypomethylating agents
DNMT3A	10%	Founding mutation	MDS subtypes, co-mutated with SF3B1 in RARS	Unfavorable clinical outcome
IDH1/IDH2	5%	Founding mutation	Associated with RCMD or RAEB	Unfavorable clinical outcome
Chromatin modification				
ASXL1	15-20%	Subclonal mutation	Associated with RCMD or RAEB, high mutation frequency (40%) in CMML	Unfavorable clinical outcome
EZH2	5%	Subclonal mutation	Associated with RCMD or RAEB	Unfavorable clinical outcome
Transcription				
RUNX1	10%	Subclonal mutation	Associated with RCMD or RAEB	Unfavorable clinical outcome
BCOR	5%	Subclonal mutation	Associated with RCMD or RAEB	Unfavorable clinical outcome
DNA repair control				
TP53	5-10%	Subclonal mutation	Associated with advanced disease and complex karyotype, mutated in 20% of MDS with del(5q)	Poor overall survival and high risk of leukemic evolution; Predicts poor response to lenalidomide and poor survival after transplant
Cohesin				
STAG2	5-10%	Subclonal mutation	Associated with RCMD or RAEB	Unfavorable clinical outcome
RAS pathway				
CBL	5%	Subclonal mutation	Found in different MDS subtypes, associated with JMML in children	Not defined MDS
NRAS/KRAS	5%	Subclonal mutation	Found in different MDS subtypes, associated with JMML in children	Not defined MDS
NF1	5%	Subclonal mutation	Found in different MDS subtypes, associated with JMML in children	Not defined MDS
DNA replication				
SETBP1	5%	Subclonal mutation	Found in 25% of patients with aCML and in advanced MDS	Poor overall survival and high risk of leukemic evolution

Tabella 3 - Mutazioni geniche ricorrenti nelle SMD

Mutazioni dei geni codificanti per componenti dei meccanismi di splicing dell'RNA

Mutazioni nei geni coinvolti nel processo di splicing dell'RNA si trovano in oltre il 50% dei pazienti con SMD [8-10]; si tratta in gran parte di mutazioni mutualmente esclusive e fondanti (il carico allelico è tipicamente compreso tra 40% e 50%, indicando un clone dominante eterozigote per la mutazione). Le mutazioni nei geni più frequentemente coinvolti (SF3B1, SRSF2 e U2AF1), sono quasi tutte missense (non vi sono mutazioni nonsense o frameshift [8-10]. Complessivamente, le evidenze disponibili suggeriscono che le mutazioni che interessano il processo di splicing dell'RNA possono creare nuove proteine isoforme che sono responsabili della induzione di dominanza clonale da parte delle cellule staminali mutate. Questa situazione biologica era difficilmente prevedibile poiché una mutazione dello spliceosoma era attesa indurre una pletora di anomalie cellulari non specifiche piuttosto che promuovere la proliferazione clonale. Le differenti mutazioni dello spliceosoma sono associate a differenti fenotipi e risultati clinici diversi. Le mutazioni somatiche del gene SF3B1 si trovano quasi esclusivamente nei pazienti con SMD con sideroblasti ad anello e questo chiaramente suggerisce a una relazione causale tra mutazione e formazione di sideroblasti [10]. Inoltre, la stragrande maggioranza dei pazienti con mutazione di SF3B1 hanno una buona prognosi e un basso rischio di evoluzione leucemica [8-10]. Le mutazioni del gene SRSF2 si trovano principalmente nei pazienti con displasia multilineare e/o eccesso di blasti e, a differenza delle mutazioni di SF3B1, associano ad un elevato rischio di evoluzione leucemica e ridotta sopravvivenza [10]. Mutazioni di SRSF2 sono state rilevate in circa un quinto dei casi di LMA secondaria ad altra neoplasia mieloide e nel 40-50% dei pazienti con LMMC, dove sono spesso associati a mutazioni TET2 [11]. Mutazioni di U2AF1 sono state riportate in vari sottotipi SMD, e sono ritenute predittive di un elevato rischio di evoluzione leucemica e breve sopravvivenza [10]. L'osservazione che le mutazioni dello spliceosoma sono principalmente mutazioni fondanti associate a diversi fenotipi clinici, ha portato a ipotizzare che essi possano dare luogo a cloni con predestinazione genetica diversa. Secondo questo modello, la mutazione fondante dovrebbe determinare la traiettoria di evoluzione del clone, eventualmente anche attraverso l'interazione con altre lesioni genetiche concomitanti [8,9].

Mutazioni somatiche nei geni implicati nei meccanismi di regolazione epigenetica

La differenziazione cellulare è un processo epigenetico che richiede regolazioni specifiche ed altamente complesse della metilazione del DNA e della struttura della cromatina. Una differenziazione cellulare disordinata è spesso associata alle SMD. Mutazioni somatiche nei geni che controllano la metilazione del DNA (TET2, DNMT3A e IDH1/IDH2) o che regolano le modificazioni della cromatina (ASXL1 e EZH2), sono presenti frequentemente nei pazienti con SMD [10,12]. Mutazioni somatiche del gene TET2 sono state descritte per la prima volta nei pazienti con neoplasie mieloidi nel 2009 [7]. TET2 è mutato nel 20 - 25% di pazienti con SMD e nel 50 - 60% dei pazienti con LMMC [11]. In uno studio molto elegante, Busque et al. hanno identificato mutazioni ricorrenti nel gene TET2 in donne anziane con emocromo normale in cui era stata dimostrata la presenza di ematopoiesi clonale [13]. Questa osservazione ci porta a considerare la mutazione di TET2 come un evento in grado di indurre un vantaggio proliferativo (emopoiesi clonale) da parte della cellula staminale mutata, ma non un fenotipo specifico di malattia ematologica. Le mutazioni TET2 sono spesso riscontrate in pazienti con cariotipo normale e quindi rappresentano un indicatore utile della clonalità dell'emopoiesi in questi soggetti [10]. Inoltre, la co-occorrenza della mutazione di TET2 e SRSF2 è tipicamente presente nei pazienti con LMMC [11]. Finora, non è stata dimostrata nessuna correlazione conclusiva tra presenza della mutazione di TET2 e una prognosi definita, e tuttavia studi suggeriscono che la mutazione di TET2 può essere associata ad elevata probabilità di risposta al trattamento con farmaci ipometilanti [14].

Mutazioni somatiche di DNMT3A sono state successivamente rilevate in circa il 10-15% dei pazienti con SMD [15]. Sono associate a ridotta sopravvivenza e rapida progressione in LMA nei pazienti con RCMD o RAEB ma non in quelli con RARS, probabilmente perché la co-occorrenza della mutazione di SF3B1 mitiga l'effetto negativo di DNMT3A [10]. Questa osservazione può indicare che l'effetto delle mutazioni di geni specifici può essere differente in contesti genomici diversi. Mutazioni ricorrenti nei geni IDH1 e IDH2 (che codificano per le isocitrato deidrogenasi 1 e 2, rispettivamente) si trovano nei pazienti con LMA e SMD [10]. Nelle LMA, la co-occorrenza delle mutazioni dei geni NPM1 e IDH1/IDH2 è associata a buona prognosi; al contrario, la mutazione IDH1 è stata trovata associata a una ridotta sopravvivenza libera dalla leucemia nelle SMD [10].

Due geni coinvolti nelle modificazioni e regolazione della cromatina sono ricorrentemente mutati nelle SMD: ASXL1 (Additional Sex Combs Like 1) e EZH2 [10]. Le mutazioni di ASXL1 sono comuni non solo nelle SMD, ma anche nei pazienti con LMA, LMMC e mielofibrosi primaria e sono generalmente associate a ridotta sopravvivenza in tutti questi contesti clinici [10]. Analogamente, le mutazioni di EZH2 sono risultate associate a prognosi sfavorevole nei pazienti con SMD a basso rischio [10,15].

Mutazioni somatiche in altre vie cellulari

Sono state descritte mutazioni acquisite in fattori di trascrizione nelle SMD [10,15]. Ad esempio, mutazioni somatiche del gene RUNX1 si trovano in circa il 7-10% di tutti i pazienti con SMD e sono generalmente associate a malattie avanzate, trombocitopenia severa, e ridotta sopravvivenza [10,12,15]. Il gene TP53, situato sul cromosoma 17p13.1, codifica per la proteina p53 che regola il ciclo cellulare e il processo di trascrizione di geni coinvolti nei meccanismi di tumor suppression [10]. Mutazioni di TP53 si trovano in circa il 5-10% dei pazienti con SMD, principalmente nei soggetti con malattia avanzata, cariotipo complesso, e anomalie del cromosoma 17, o delezioni del cromosoma 5 e 7 [10,12,15]. I pazienti con mutazione del gene TP53 hanno una prognosi sfavorevole, una scarsa proba-

bilità di risposta a trattamenti convenzionali e un elevato rischio di evoluzione leucemica. Nei pazienti con SMD del(5q), sublconi con mutazione di TP53 possono essere presenti sin dalle prime fasi di malattia, e la loro presenza è associata ad una ridotta probabilità di risposta al trattamento con lenalidomide e ad un aumento del rischio di progressione leucemica [16]. Inoltre, in pazienti con SMD sottoposti a trapianto, le mutazioni di TP53 sono risultate associate ad elevato rischio di recidiva dopo la procedura [17,18].

Rilevanza clinica delle mutazioni nelle SMD

Il panorama delle mutazioni nelle SMD è molto eterogeneo, con grande variabilità da paziente a paziente [10]. Solo un numero limitato di geni (SF3B1, TET2, SRSF2, ASXL1, DNMT3A e RUNX1) è mutato in >10% dei pazienti con SMD, mentre un numero ulteriore di circa 40-50 geni è mutato in <5% dei pazienti [10,12,15]. Alla diagnosi, la maggior parte dei pazienti con SMD ha 2 o 3 mutazioni oncogeniche. Considerando le frequenze alleliche, le mutazioni di geni implicati nello splicing dell'RNA e nella metilazione del DNA sembrano essere principalmente associati alla proliferazione clonale iniziale [8-10]. L'attuale approccio diagnostico in un paziente con sospetta SMD comprende l'osservazione morfologica del sangue periferico e del midollo osseo per valutare la presenza di anomalie morfologiche suggestive, la biopsia ossea per valutare la cellularità emopoietica e l'eventuale presenza di fibrosi e la citogenetica per identificare anomalie cromosomiche clonali nelle cellule emopoietiche [3]. Le tecniche di sequenziamento NGS sono destinate a migliorare drammaticamente il nostro approccio alla diagnosi di SMD. Anche se il sequenziamento del genoma è chiaramente più informativo, il sequenziamento di un pannello di geni mieloidi selezionati è sicuramente più fattibile in un laboratorio clinico e consentirà verosimilmente di individuare una mutazione oncogenica in circa l'80-90% dei pazienti, migliorando sensibilmente la sensibilità del processo diagnostico in questo contesto clinico [10,12,15].

L'implementazione clinica della ricerca di mutazioni genetiche ricorrenti è attesa in aggiunta e può avere un impatto positivo nella stratificazione prognostica dei pazienti con SMD. L'attuale classificazione WHO delle SMD ha una importante rilevanza prognostica, ed in particolare la presenza di displasia multilineare e una elevata percentuale di blasti midollari sono associati ad un elevato rischio di evoluzione leucemica [5]. Tuttavia, la riproducibilità della valutazione morfologica della displasia midollare e del conteggio di blasti è tutt'altro che ottimale, e vi è quindi necessità di sviluppare sistemi prognostici più robusti. La definizione di mutazioni oncogeniche potrebbe migliorare notevolmente il processo di stratificazione prognostica dei pazienti con SMD, e più in generale il processo clinico-decisionale in questo campo [10,12,15,19].

In primo luogo, l'identificazione del gene mutante responsabile del clone iniziale è rilevante ai fini clinici. Per esempio, i sideroblasti ad anello possono essere trovati non solo in pazienti con una mutazione di SF3B1, ma anche in quelli con una lesione oncogenica di SRSF2: infatti, la sopravvivenza libera da leucemia è di 10 anni nel primo caso e di 2 anni nel secondo caso [10]. In secondo luogo, l'individuazione di mutazioni associate a piccoli cloni può consentire una diagnosi precoce della progressione di malattia e dell'evoluzione in LMA. Alcuni studi hanno già suggerito che l'incorporazione di mutazioni somatiche nei sistemi prognostici attualmente in uso può migliorare la stratificazione prognostica delle SMD [12,15].

Infine, la caratterizzazione del genoma del paziente può essere rilevante per la scelta del trattamento. Le mutazioni TET2 potrebbero essere associate a una maggiore probabilità di risposta ad agenti ipometilanti [14], mentre le mutazioni di TP53 sono associate a ridotta probabilità di risposta a lenalidomide nei pazienti con del(5q) [16] e ridotta sopravvivenza dopo trapianto allogenico [17,18]. Dati recenti mostrano che la presenza di mutazioni di SF3B1 conferisce elevata probabilità di risposta a farmaci inibitori di TGFβ per il trattamento dell'anemia [19,20]. In ultima analisi, l'identificazione delle mutazioni oncogeniche nel singolo paziente con SMD costituirà la base nei prossimi anni per lo sviluppo e l'implementazione clinica di programmi di medicina personalizzata, che sono attesi avere un impatto rilevante nel miglioramento della qualità e dell'aspettativa di vita dei pazienti.

Bibliografia

1. Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic Syndromes. Lancet. 2014; 383(9936):2239-52.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol. 1982;51(2):189-99.
3. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. Blood. 2013;122(17):2943-64.
4. Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol. 2009;27(5):754-62
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-40
6. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. Blood. 2013;122(25):4021-34.
7. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med. 2009;360(22):2289-2301.
8. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. N Engl J Med. 2011;365(15):1384-95.
9. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature. 2011;478(7367):64-9.
10. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. Blood 2013;122(22):3616-27.

11. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, C et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. Blood. 2013;121(12):2186-98.

12. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. N Engl J Med. 2011;364(26):2496-2506.

13. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. Nat Genet. 2012;44(11):1179-81.

14. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. Leukemia. 2011;25(7):1147-52.

15. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol. 2012;30(27):3376-82.

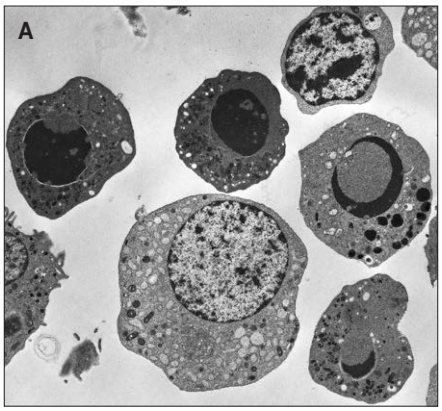
16. Jadersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. J Clin Oncol. 2011;29(15):1971-79.

17. Della Porta MG, Galli A, Bacigalupo A, et al. Clinical effects of driver somatic mutations on the outcomes of patients with myelodysplastic syndromes treated with allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. J Clin Oncol 2016;34(30):3627-37

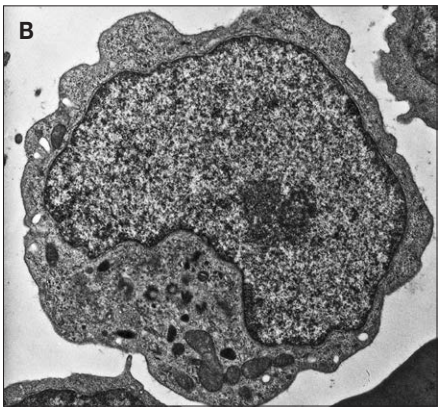
18. Lindsley RC, Saber W, Mar BG, et al. Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation. N Engl J Med 2017;376(6):536-47.

19. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for myelodysplastic syndromes. Blood. 2012;120(12):2454-65.

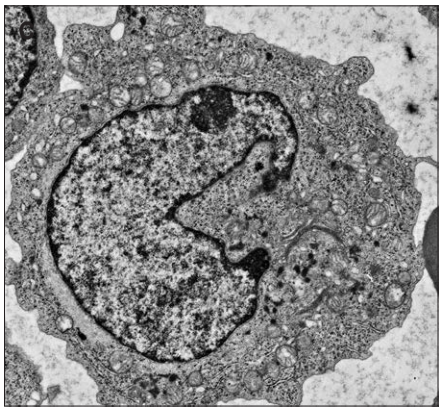
20. Fenaux P, Platzbecker U, Mufti GJ, et al. Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. N Engl J Med. 2020;382(2):140-51.



SMD: cellule mieloidi in apoptosi al microscopio elettronico a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



LMA M1: blasto mieloide al microscopio elettronico a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



LMA M4: blasto monocitario al microscopio elettronico a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Sindromi mielodisplastiche, mutazioni geniche, diagnosi, prognosi.

Indirizzi per la corrispondenza

Matteo G. Della Porta
Comprehensive Cancer Center - IRCCS Humanitas Research Hospital
Via Manzoni, 56 - 20089 Rozzano Milano
E-mail: matteo.della_porta@hunimed.eu

Neoplasie mieloproliferative



Barbara Mora,[1] Umberto Gianelli,[2] Francesco Passamonti[1,3]

[1] Ematologia, ASST Sette Laghi, Varese; [2] Anatomia Patologica, Università Statale di Milano, Milano;
[3] Ematologia, Università degli Studi dell'Insubria, Varese

In questa revisione affronteremo il ruolo della morfologia midollare nel sistema classificativo delle neoplasie mieloproliferative (NMP), indicando quali siano i criteri utili che aiutano a riconoscere le diverse entità. Nella seconda parte affronteremo le mutazioni driver e le mutazioni addizionali e quanto queste stiano cambiando le modalità con cui affrontiamo la cura dei malati.

Diagnosi morfologica delle neoplasie mieloproliferative Philadelphia-negative

In accordo con le indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della sanità (OMS) [(1)], la diagnosi delle neoplasie mieloproliferative croniche Philadelphia-negative (Ph-NMP) si basa sulla integrazione di dati clinici, morfologici e genetici (mutazioni *driver* ed addizionali), non essendo presente un marcatore molecolare specifico [(1)]. In questo modo si riesce a formulare una diagnosi precisa in circa il 90% dei casi [(2,3)]. Una delle principali novità nei criteri diagnostici aggiornati dell'OMS [(1)] è quella di considerare il dato morfologico istologico come criterio diagnostico maggiore [(1)].
Tuttavia, il quadro istologico può essere di difficile interpretazione, soprattutto negli stadi iniziali, a causa di minime differenze tra le diverse entità. Per tale ragione, la morfologia deve sempre essere messa in relazione alla storia clinica, in particolare modo nei casi in cui non sia possibile identificare una mutazione *driver*.
In questa sezione saranno presi in considerazione: 1) i criteri morfologici diagnostici delle Ph-NMP; 2) un approccio morfologico alla diagnosi differenziale delle NMP in caso di fibrosi midollare assente o lieve e nella fase di fibrosi avanzata; 3) le informazioni morfologiche predittive di una possibile progressione di malattia.

Criteri diagnostici

La trombocitemia essenziale (TE) si caratterizza per un coinvolgimento principale della serie piastrinopoietica, con conseguente piastrinosi persistente nel sangue periferico ed aumentato rischio di complicanze trombotico-emorragiche. L'incidenza della malattia si attesta intorno a 0,2 - 2,3 casi x 100.000 abitanti in Europa e negli Stati Uniti, con una età media di insorgenza intorno ai 50-60 anni ed una lieve prevalenza per il sesso femminile [(2)].
In circa la metà dei casi la malattia è asintomatica e viene diagnosticata per il riscontro occasionale di piastrinosi (> 450.000/mmc), rilevata nel corso di esami di routine. Negli altri casi, il quadro clinico si caratterizza per la comparsa di fenomeni trombotico-emorragici.
In accordo ai criteri diagnostici OMS (Tabella 1) la piastrinosi persistente rappresenta un criterio diagnostico maggiore [(1)]. L'analisi istologica del midollo osseo rappresenta il secondo criterio maggiore [(1)]. Nella TE, la cellularità midollare tende ad essere nei limiti di norma in relazione all'età del paziente [(4)] e, solo raramente, può risultare modicamente incrementata [(1)]. Le serie eritropoietica e granulopoietica non mostrano alterazioni di rilievo [(1)]. I megacariociti sono aumentati di numero, presentano dimensioni grandi o giganti, citoplasma maturo e nuclei plurilobati [(1)]. Essi tendono a formare degli aggregati lassi, con interposti elementi emopoietici [(1)]. Solo in una minima percentuale di casi, inferiore al 5%, si può osservare un modesto incremento della fibrosi reticolinica (MF), seppure di grado lieve (MF-1) [(4,5)]. La diagnosi di TE è ulteriormente supportata dalla identificazione di una mutazione driver o di altro marcatore di clonalità e, in ogni caso, dalla esclusione di tutte le cause di piastrinosi reattiva (quali infezioni, stati infiammatori cronici e tumori) [(1)].

Criteri maggiori	
1	*Piastrinosi persistente > 450 x 10^9/L*
2	*BOM: proliferazione principalmente a carico della serie piastrinopoietica, con incremento dei megacariociti di grandi dimensioni, con citoplasma maturo e nuclei iperlobati. Non significativo incremento o "left-shifting" delle serie eritropoietica o granulopoietica. Molto raro e lieve incremento della fibrosi reticolinica (grado 1)*
3	*Assenza di criteri OMS per la diagnosi di PV, MFP, LMC BCR/ABL1-positiva, sindrome mielodisplastica o altre neoplasie mieloidi*
4	*Presenza della mutazione JAK2, CALR o MPL.*
Criterio minore	
1	*Presenza di altro marcatore di clonalità o non evidenza di trombocitosi reattiva*

***Tabella 1** - Criteri diagnostici di TE (*)*
(*) la diagnosi richiede la presenza di 4 criteri maggiori oppure dei primi 3 criteri maggiori e del criterio minore

In una limitata percentuale dei casi (<5%) la TE può progredire in mielofibrosi post-trombocitemica (MF post-TE), anche nota come mielofibrosi secondaria (MFS) [6]. La diagnosi di MF post-TE può essere formulata esclusivamente in presenza dei criteri diagnostici definiti dall'IWG-MRT (*International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment*) [6]. In particolare, sono richiesti i due criteri maggiori: una precedente diagnosi di TE (formulata in accordo con i criteri OMS) ed una fibrosi di grado avanzato (MF-2 o -3) [6]. Devono essere inoltre presenti almeno due criteri minori tra i seguenti: anemia, leuco-eritroblastosi, splenomegalia, aumento delle LDH, sintomi costituzionali [6].

La mielofibrosi primaria (MFP) si caratterizza per una proliferazione delle serie granulopoietica e piastrinopoietica che, nella forma conclamata, si associa a fibrosi midollare severa e ad emopoiesi extramidollare [1]. Come è noto, nella MFP si possono identificare due entità della malattia, diverse dal punto di vista clinico, morfologico e prognostico: la fase iniziale definita come *prefibrotica* (preMFP) e la fase avanzata, *fase fibrotica* (overt-MFP) [1].

L'incidenza della malattia si attesta intorno ai 0.5 - 1.5 casi per 100.000 abitanti / anno, di cui circa il 30-50% vengono diagnosticati in fase prefibrotica [3]. L'età media di insorgenza coincide con la sesta e settima decade di vita. Circa un terzo dei pazienti con MFP è asintomatico al momento della diagnosi: il sospetto sorge dal riscontro occasionale di leucocitosi e/o piastrinosi su sangue periferico, talora associati a splenomegalia. Più raramente, la diagnosi si effettua per l'evidenza di leuco-eritroblastosi o di elevati livelli di LDH. Circa la metà dei pazienti con MFP, soprattutto nelle fasi più avanzate, manifesta sintomi sistemici quali astenia, dispnea, perdita di peso, sudorazioni notturne, febbricola e cachessia. Una splenomegalia di grado variabile è presente nel 90% dei casi; l'epatomegalia può essere riscontrata in circa il 50% dei pazienti [3].

La diagnosi di preMFP si basa principalmente sulle caratteristiche istologiche del midollo osseo, che risulta ipercellulare per età [1,4]. La serie eritropoietica non presenta inizialmente particolari alterazioni, ma -con il progredire della malattia- tende a ridursi [1]. La serie granulopoietica è iperplastica e talora presenta un certo grado di incremento delle forme immature (*left-shifting*) [1]. Il rapporto mielo-eritroide è aumentato [1]. I megacariociti sono di numero incrementato, tendono a formare aggregati densi (ovvero gli elementi sono in diretto contatto, senza interposizione di cellule emopoietiche), mostrano dimensioni variabili ed appaiono caratteristicamente atipici [1]. Tali alterazioni sono rappresentate da: nuclei vescicolosi, anomalie nel rapporto nucleo/citoplasmatico, ipercromasia nucleare, eosinofilia citoplasmatica, presenza di nuclei nudi [1]. Nella preMFP, mediante colorazione immunoistochimica anti-CD34, può essere documentato un incremento della densità microvascolare.

Per definizione, la preMFP si caratterizza per l'assenza di fibrosi (reticolinica e collagene) o per la presenza di una fibrosi reticolinica di grado lieve (MF-1) [1].

La diagnosi di preMFP è inoltre definita dalla presenza degli altri due criteri maggiori e di un criterio minore, tra quelli riportati in Tabella 2. A questo proposito, è importante sottolineare che il criterio minore deve essere documentato in due determinazioni successive.

Criteri maggiori	
1	*BOM: proliferazione di megacariociti con atipie, in assenza di fibrosi o in presenza di fibrosi di grado lieve (grado 1); le alterazioni dei megacariociti devono essere accompagnate da un incremento della cellularità complessiva, per proliferazione della serie granulopoietica e possibile riduzione della serie eritropoietica.*
2	*Assenza di criteri WHO per la diagnosi di PV, LMC BCR/ABL1-positiva, sindrome mielodisplastica o altre neoplasie mieloidi*
3	*Presenza della mutazione JAK2, CALR o MPL o di altro marcatore clonale o in assenza di marcatore clonale esclusione di tutte le cause di fibrosi secondaria*
Criteri minori(**)	
1	*Anemia non attribuibile ad altre comorbidità*
2	*Leucocitosi > 11 x 10^9/L*
3	*Splenomegalia palpabile*
4	*Incremento LDH*

***Tabella 2** - Criteri diagnostici della fase prefibrotica di MFP (*)*
(*) La diagnosi richiede la presenza di tutti e 3 i criteri maggiori e di almeno un criterio minore.
(**) La presenza del criterio minore deve essere confermata in due determinazioni consecutive

Nel corso della storia naturale della malattia, la preMFP tende, in un tempo variabile, a progredire verso la fase fibrotica (overt-MFP), a causa della deposizione di fibre collagene e della comparsa di metaplasia mieloide. In questa fase della malattia la cellularità midollare tende a ridursi, spesso in maniera disomogenea, fino a condurre ad una significativa ipocellularità. In primo luogo, viene progressivamente compromessa la serie eritropoietica, mentre la serie granulopoietica può mostrare un incremento della quota di forme immature. I megacariociti tendono a diventare più piccoli e formano aggregati densi, costituiti da elementi con nuclei ipercromici o dismorfici e citoplasma ipereosinofilo.

Nella overt-MFP, lo stroma midollare è caratterizzato da un marcato incremento della densità microvascolare, con ectasia dei sinusoidi e possibile emopoiesi intrasinusoidale. Per definizione, il grado di fibrosi è moderato (MF-2) o marcato (MF-3) [4]; può associarsi osteosclerosi di grado variabile [1]. Dal punto di vista pratico, la documentazione di una fibrosi di grado avanzato rappresenta l'unico criterio diagnostico che differenzia la prePMF dall'overt-PMF (Tabella 3).

La policitemia vera (PV) si caratterizza per una proliferazione di tutte le serie ematopoietiche (panmielosi), in particolare di quella eritropoietica, a cui consegue l'aumentata produzione di eritrociti (poliglobulia). La PV si caratterizza per la panmielosi midollare e la

Criteri maggiori	
1	*BOM: proliferazione di megacariociti con atipie, associata alla presenza di fibrosi collagene (grado 2 o 3)*
2	*Assenza di criteri WHO per la diagnosi di PV, LMC BCR/ABL1-positiva, sindrome mielodisplastica o altre neoplasie mieloidi*
3	*Presenza della mutazione JAK2, CALR o MPL o di altro marcatore clonale o in assenza di marcatore clonale esclusione di tutte le cause di fibrosi secondaria*
Criteri minori(**)	
1	*Anemia non attribuibile ad altre comorbidità*
2	*Leucocitosi > 11 x 10^9/L*
3	*Splenomegalia palpabile*
4	*Incremento LDH*
5	*Leucoeritroblastosi*

***Tabella 3** - Criteri diagnostici della fase fibrotica di MFP (*)*
(*) la diagnosi richiede la presenza di tutti e 3 i criteri maggiori e di almeno un criterio minore.
(**) presenza di almeno un criterio minore confermato in due determinazioni consecutive

Criteri maggiori	
1	*Emoglobina > 16.5 g/dL (maschio) e > 16.0 g/dL (femmina) o ematocrito > 49% (maschio) e del 48% (femmina) o aumento della massa eritrocitaria*
2	*BOM: Midollo emopoietico ipercellulare per età, per proliferazione trilineare (panmielosi), con iperplasia delle serie eritroide e granulopoietica ed incremento dei megacariociti che mostrano aspetti pleomorfi (variabilità dimensionale)*
3	*Presenza della mutazione JAK2V617F o di altre mutazioni a carico dell'esone 12*
Criteri minori	
1	*Livelli sierici di EPO inferiori al valore di riferimento*

***Tabella 4** - Criteri diagnostici di PV (*)*
(*) La diagnosi richiede la presenza dei 3 criteri maggiori o dei primi 2 criteri maggiori e del criterio minore.

poliglobulia periferica, oltre che dall'incremento della massa eritrocitaria e può evolvere verso la mielofibrosi post-policitemica (MF post-PV) caratterizzata a sua volta da progressiva citopenia, fibrosi midollare, ematopoiesi extramidollare e ipersplenismo.
La PV ha un'incidenza di 0.01 - 2.8 casi per 100.000 abitanti / anno [7] con lieve prevalenza per il sesso maschile ed una età media di insorgenza intorno ai 60 anni [8].
I principali sintomi della PV sono correlati all'aumento della massa eritrocitaria: rubeosi, cefalea, vertigini, disturbi visivi, prurito, eritromelalgia ed iperuricemia sintomatica (quest'ultima secondaria ad aumentato *turnover* cellulare) sono inoltre molto comuni. Nel 30% dei pazienti si riscontra inoltre splenomegalia [9]. Talora, soprattutto nelle fasi avanzate, può aggiungersi anche epatomegalia. In quasi il 20% dei casi, l'esordio è legato a un evento trombotico venoso (anche in sede atipica, come a livello splancnico) o arterioso (ad esempio ischemia miocardica o cerebrale). Mutazioni a carico dell'esone 14 o -più raramente- dell'esone 12 del gene *JAK2* sono virtualmente presenti in tutti i casi di PV [10,11].
La diagnosi di PV è principalmente basata sul rilievo dei valori anomali di emoglobina ed ematocrito e sugli aspetti istologici del midollo osseo (Tabella 4) [1]. Quest'ultimo si presenta marcatamente ipercellulare per età [4], a causa della proliferazione trilineare [1]. Caratteristico è l'incremento della cellularità nelle lacune ossee sottocorticali, che fisiologicamente invece tendono ad essere ipoplasiche. La serie eritropoietica presenta iperplasia ed un incremento delle forme immature (*left-shifting*) [1]; la serie granulopoietica è variabilmente aumentata, talora si nota anche in questo caso un incremento delle forme immature [1]. Il rapporto mielo/eritroide è variabile, anche se spesso risulta ridotto per la particolare prominenza dello stipite eritroide. I megacariociti sono aumentati di numero, tendono a formare aggregati lassi e densi [1]. L'aspetto caratteristico è il loro polimorfismo: ci sono forme mature, elementi giganti a nucleo iperlobato, forme di piccola taglia, a nucleo ipolobato talora aggregate (aggregati polimorfi). Le atipie nucleari che caratterizzano la MFP sono di solito assenti o poco rappresentate [1]. La densità microvascolare, identificabile mediante colorazione immunoistochimica anti-CD34, risulta di solito incrementata, con presenza di sinusoidi ectasici. In circa l'80% dei casi non è documentabile un incremento della fibrosi reticolinica o collagene (MF-0); nei rimanenti, si può osservare un incremento della fibrosi reticolinica di grado lieve (MF-1) [1]. Quest'ultima evenienza si associa a maggior rischio di evoluzione in MF post-PV [12].
Il 5-15% dei casi di PV, in un tempo variabile tra 10 e 15 anni dalla diagnosi, tende a progredire in MF post-PV [13]. I criteri diagnostici della MF post-PV sono simili a quelli della MF post-TE e prevedono la presenza dei due criteri maggiori secondo l'IWG-MRT [6]: precedente diagnosi di PV (formulata in accordo con i criteri OMS) [1] e presenza di fibrosi di grado avanzato (MF-2 o -3) [4]. Analogamente, sono richiesti almeno due criteri minori tra i seguenti: anemia, leuco-eritroblastosi, splenomegalia, aumento delle LDH, sintomi costituzionali.

Diagnosi differenziale delle NMP

Di fronte ad un nuovo caso sospetto per Ph-NMP, l'iter prevede ormai molto precocemente la ricerca delle mutazioni *driver (JAK2, CALR e MPL)* [14].
Dal punto di vista morfologico, questo approccio può comportare che il quadro istologico non sia ancora completamente sviluppato, con ovvi problemi diagnostico-differenziali. Inoltre, nelle fasi molto precoci, le Ph-NMP tendono ad essere asintomatiche o paucisintomatiche (la trombocitosi è il segno più comune). Pertanto, il contributo diagnostico dovuto alla clinica può essere modesto all'esordio. Occorre allora approcciarsi morfologicamente alla diagnosi differenziale delle Ph-NMP avendo ben chiaro che non esiste un cri-

terio morfologico patognomonico di una specifica entità. Per tale ragione, si deve individuare un insieme di caratteristiche (profilo o pattern morfologico) che, se riscontrate, consentono di formulare una diagnosi specifica. Può essere utile valutare il grado di fibrosi, distinguendo i casi in cui essa è assente o lieve (MF-0 e -1) da quelli in cui il grado è moderato o avanzato (MF-2,-3) [4].

Nel primo caso, che potremo per estensione definire *stadio prefibrotico*, ci troviamo di fronte a tre possibili diagnosi differenziali: TE, preMFP e PV in fase iniziale. In alternativa, una fibrosi di grado almeno pari a due potrebbe sottendere una diagnosi di overt-MFP o di MFS. In Tabella 5 sono riassunti i profili morfologici che possono essere utili nella diagnosi differenziale delle Ph-NMP in *stadio prefibrotico*.

Diverso è il discorso per la diagnosi delle Ph-NMP in fase fibrotica avanzata. La distinzione morfologica tra overt-MFP e MFS, che riveste peraltro una notevole importanza prognostica, risulta estremamente difficile, se non impossibile.

Uno studio retrospettivo ha postulato come, rispetto all'overt-MFP, nella MF post-PV la cellularità risulti maggiore e i megacariociti, se pure distrofici, mantengano più frequentemente aspetti di polimorfismo e maturità, in assenza delle atipie caratteristiche della MFP [15]. Tuttavia, i criteri morfologici identificati in questa analisi [15], pur interessanti dal punto di vista biologico, non possono essere utilizzati per una diagnosi differenziale con implicazioni cliniche. Pertanto, il dato anamnestico di pregressa TE o PV continua a rivestire un ruolo fondamentale nella diagnosi differenziale.

In tutti i casi di MF avanzata, siano essi primitivi o secondari, l'analisi morfologica del midollo osseo deve comunque essere eseguita in maniera dettagliata. In questo modo si può fornire al clinico una fotografia più precisa possibile della malattia. Diventa dunque importante descrivere la cellularità emopoietica in termini quantitativi e qualitativi (distribuzione omogenea o disomogenea, tipologie cellulari riconoscibili, rapporto mielo-eritroide), valutare blasti CD34-positivi (in termini di percentuale, eventuale disposizione ed aggregazione) descrivere le caratteristiche dei sinusoidi (ectasie, presenza di emopoiesi intrasinusoidale), definire il grado di fibrosi (MF-2 o -3) e la eventuale presenza di osteosclerosi.

Una descrizione accurata è ancora più rilevante in caso di terapie che possano modificare l'aspetto istologico del midollo osseo, con ovvie implicazioni prognostiche [16-19].

Caratteristiche morfologiche predittive di progressione

Nel corso del *follow-up*, può essere utile eseguire una biopsia osteomidollare nei casi in cui il quadro clinico si modifichi in maniera significativa. Ciò è importante per rilevare quelle modificazioni istologiche che, interpretate alla luce del quadro clinico, sono suggestive per progressione di malattia.

Nella classificazione OMS più recente vengono per la prima volta definiti i criteri di fase accelerata e fase blastica della MFP [1]. Tali criteri, in senso lato, possono essere applicati anche alla TE e alla PV. In particolare, si definisce *fase accelerata* la presenza nel sangue periferico e/o nel midollo osseo di una percentuale di blasti variabile tra 10-19% e la identificazione, mediante la colorazione immunoistochimica, di blasti CD34-positivi disposti in aggregati e/o localizzati in sede paratrabecolare [1]. Analogamente a quanto avviene nella Leucemia Mieloide Cronica, si definisce *fase blastica* l'identificazione di una percentuale blastica > 20% nel sangue periferico o nel midollo osseo [1].

Tuttavia, altri possibili quadri di progressione sono stati riportati in letteratura negli anni passati, associati a peculiari quadri morfologici.

In uno studio retrospettivo sono stati descritti 10 casi di MFP che, nel corso del *follow-up* (intervallo medio dalla diagnosi di circa 42 mesi), avevano sviluppato una monocitosi assoluta, con conseguente decorso clinico più aggressivo [20]. In questi pazienti l'analisi morfologica del midollo osseo evidenziava un'iperplasia mieloide ed alterazioni dei megacariociti diverse da quelle tipiche della MFP [20].

Più recentemente, sono stati descritti 10 casi di MF post-PV che avevano sviluppato una leucocitosi neutrofila al momento della progressione in MFS e il cui decorso clinico è risultato significativamente peggiore rispetto ai controlli [21]. Il reperto morfologico più caratteristico era l'iperplasia granulopoietica con significativo incremento della componente matura [21]. Pur trattandosi di segnalazioni quasi aneddotiche, questi studi suggeriscono la possibilità di altre

	TE	preMFP	PV
Cellularità	normale	aumentata	aumentata
Serie eritropoietica	normale	normale o ridotta	aumentata
Serie granulopoietica	normale	aumentata	aumentata
Rapporto mieloide / eritroide	3 / 1	>3 / 1	variabile
Megacariociti	aumentati, in aggregati lassi, di taglia grande-gigante con nuclei iperlobati e citoplasmi maturi	aumentati, in cluster densi, con atipie citologiche	aumentati, in cluster lassi e densi, di aspetto polimorfo
Reticolo	MF-0 (<5% MF-1)	MF-0 o MF-1	MF-0 (MF-1 nel 20%)

***Tabella 5** - Profili morfologici utili alla diagnosi differenziale delle Ph-NMP in fase prefibrotica*

forme di progressione nell'ambito delle Ph-NMP [20,21].
Recentemente, in un lavoro multicentrico che ha raccolto 114 casi, è stato analizzato il decorso clinico di pazienti affetti da Ph-NMP in relazione alla quota blastica o alla presenza di altri possibili caratteri evolutivi (monocitosi o neutrofilia) [22]. I risultati di questo studio hanno evidenziato come, nei pazienti con una quota blastica tra 5 e 9% o con altro tipo di pattern di progressione, la sopravvivenza sia inferiore rispetto ai controlli, più simile a quella dei pazienti in fase accelerata [22]. Questa osservazione suggerisce la necessità di ripensare, sulla base di osservazioni più ampie, ai criteri diagnostici clinici e morfologici di progressione delle Ph-NMP, al fine di poter diagnosticare e trattare precocemente questa fase [22,23].

Basi molecolari delle Ph-NMP

La scoperta di anomalie molecolari ricorrenti nelle Ph-NMP ha rafforzato l'originaria visione di Dameshek secondo la quale queste patologie hanno un comune meccanismo patogenetico e presumibilmente rappresentano un unico disordine [24].
La clonalità delle Ph-NMP venne dapprima dimostrata mediante studi di inattivazione del cromosoma X in soggetti femminili [25]; successivamente, nel 2005, vennero identificate mutazioni somatiche acquisite del gene *JAK2*, una tirosin-chinasi essenziale per la regolazione dell'emopoiesi [26-29]. Tale anomalia è presente in oltre il 95% di pazienti con PV e nel 50-60% dei pazienti con TE e MFP [26-29]. Nel 2006, mutazioni a carico del gene *MPL*, codificante il recettore della trombopoietina (TPO), sono state documentate in circa il 3-5% delle TE e nell'8-11% delle MFP *JAK2*-negative [30,31]. Più recentemente (2013), grazie all'utilizzo di tecniche di sequenziamento genico, sono state identificate le mutazioni del gene *CALR*, responsabile della produzione di una proteina multifunzionale [32,33]. Tale alterazione è presente nel 20-25% di pazienti affetti da TE e MFP [32,33]. Pertanto, circa il 10-15% dei casi di MFP o TE risultano "tripli negativi" (TN), cioè non esprimono alcuna delle suddette mutazioni. Lo studio retrospettivo internazionale MYSEC (*Myelofibrosis Secondary to Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia*) ha evidenziato una simile distribuzione di *JAK2, CALR e MPL* nelle MFS. Tutti i casi secondari a PV erano *JAK2* positivi, mentre nei soggetti con pregressa diagnosi di TE *JAK2* era mutato nel 54%, *CALR* nel 31%, *MPL* nel 9%; il 6% risultava TN [34].
Complessivamente, le tre mutazioni citate sono definite *driver*: esse sono infatti responsabili dell'eccessiva proliferazione delle cellule staminali emopoietiche e, di conseguenza, del fenotipo clinico delle Ph-NMP. Hanno inoltre un ruolo primario in termini diagnostici (come recentemente evidenziato nella classificazione OMS [1] e in termini prognostici (si veda oltre) [35]. Inizialmente considerate mutualmente esclusive, studi recenti condotti da gruppi indipendenti hanno invece evidenziato come non sia trascurabile la frequenza di TE e MFP in cui l'anomalia di *JAK2* (soprattutto in caso di clone < 5%) si accompagni ad un'altra mutazione *driver*. Le caratteristiche cliniche dei casi "doppi mutati" sono in corso di definizione (*Mora et al., submitted*).
Studi riguardanti il ruolo delle alterazioni di *JAK2* e *MPL* nelle Ph-NMP hanno consentito di identificare il coinvolgimento della via di trasduzione del segnale JAK-STAT [36]. Il meccanismo patogenetico derivato dalle mutazioni di *CALR* risulta ancora poco chiaro, sebbene diversi studi suggeriscano una stretta correlazione con l'attività di *MPL* [37-40].
In aggiunta alle tre mutazioni *driver*, nelle Ph-NMP si riscontrano anche alterazioni geniche in comune con altre neoplasie mieloidi [41-44]. Grazie a metodiche di sequenziamento genico (NGS), si è scoperto come la loro frequenza sia più elevata nei pazienti affetti da MFP rispetto a PV e TE. Tali mutazioni vengono definite "addizionali", in quanto non hanno né ruolo patogenetico né fenotipico, bensì contribuiscono a determinare l'aggressività biologica della patologia e di conseguenza la prognosi [45]. Differenti sono le funzioni dei geni coinvolti: regolazione dell'epigenetica (*ASXL1, EZH2, TET2, DNMT3A, IDH1, IDH2*), dello *splicing* (*SRSF2, SF3B1, U2AF1*) o della trascrizione (*TP53, IKZF1, CBL*). La Tabella 6 riporta la frequenza di distribuzione e la rilevanza prognostica delle mutazioni addizionali nella TE, PV e MFP. Meno numerose sono le informazioni relative alla distribuzione delle mutazioni addizio-

Gene Mutazione	Cromosoma	Frequenza % TE/PV/MFP
Regolatori epigenetici		
ASXL1 Esone 12	20q11.1	3/rara/13-20 FB: 18
EZH2 Diversi esoni	7q36.1	rara/3/13
TET2 Diversi esoni	4q24	5/16/17 FB: 17
IDH1/2 Esone 4	2q33.3/15q26.1	1/2/4 FB: 22
Regolatori dello splicing		
SF3B1 Esoni 14 e 15	2q33.1	rara/rara/7
SRSF2 Esone 2	17q25.1	rara/rara/17
U2AF1	21q22	rara/rara/16
Regolatori della trascrizione		
TP53 Esoni 4-9	17p13.1	rara/rara/4 FB: 20
IKZF1	7p12	rara/rara/rara FB: 20
CBL Esoni 8/9	11q23.3	rara/rara/6

FB = fase blastica.

***Tabella 6** - Distribuzione e correlati clinico-biologici delle mutazioni mieloidi addizionali nelle Ph-NMP*

nali nella MFS. In una piccola coorte di 59 casi sottoposta a sequenziamento genico, i pazienti presentavano meno frequentemente mutazioni di *ASXL1* (27.1%) e di *SRSF2* (3.4%) rispetto a soggetti affetti da MFP (47.7% e 14%, rispettivamente) [46]. È attualmente in corso analoga analisi nell'ambito del progetto MYSEC.

Il gene *JAK2* (*Janus Kinasis 2*), localizzato sul cromosoma 9p24, codifica per una tirosin-chinasi citoplasmatica coinvolta nella trasduzione del segnale generato dal legame tra molecole della famiglia delle citochine di tipo I, quali eritropoietina (EPO), TPO e il fattore stimolante le colonie granulocitarie (G-CSF) e il loro recettore di membrana. La mutazione acquisita puntiforme V617F a livello dell'esone 14 è quella più frequentemente riscontrata nelle Ph-NMP [29]. Tale mutazione rende la proteina JAK2 costitutivamente attiva [47], pertanto la sua attività di segnale, originata dai recettori dei fattori di crescita delle cellule mieloidi, subisce un netto incremento con conseguente mieloproliferazione.

In una piccola percentuale di PV *JAK2V617F* negative sono state identificate mutazioni (per lo più inserzioni e delezioni) dell'esone 12 del gene *JAK2* [48,49]. Le mutazioni dell'esone 12 di *JAK2* sono esclusive per la PV [48,49].

Le mutazioni di *JAK2* inducono un fenotipo policitemico. Infatti, nella maggior parte dei casi di PV sono presenti due copie di *JAK2V617F* (stato di omozigosi), mentre nella TE la mutazione è spesso presente in eterozigosi [50,51].

In generale, i pazienti con Ph-NMP *JAK2* mutati presentano età più avanzata e leucocitosi più spiccata [52]. Ad eccezione delle MFS, questi soggetti presentano inoltre livelli più alti di emoglobina, conta piastrinica più bassa ed un aumentato rischio trombotico rispetto ai casi *JAK2* negativi [34,52].

CALR (Calreticulin) è un gene localizzato sul cromosoma 19p32.2, che codifica per la calreticulina, una proteina multifunzionale [53,54]. Mutazioni a carico di tale gene sono inserzioni o delezioni della parte terminale dell'esone 9. Le più frequenti (85%) sono la delezione di 52 paia di basi (tipo 1, 44-53% dei casi) oppure l'inserzione di 5 paia di basi (tipo 2, 32-42% dei casi) [55]. Le varianti di tali alterazioni sono denominate tipo 1-like e tipo 2-like, sulla base delle loro analogie strutturali con le mutazioni di tipo 1 e tipo 2, rispettivamente [55,56]. Pleiotropici sembrano gli effetti delle anomalie di *CALR*. Ad esempio, differenze nella mobilizzazione del calcio citosolico sono state riportate nel tipo 1 [56]. Più recentemente, è stato ipotizzato che le mutazioni di *CALR* attivino un segnale intracellulare indipendente da TPO, mimando l'effetto delle anomalie di *MPL* [37,40]. In occasione del Congresso dell'*American Society of Hematology* (ASH) del 2018 è stato inoltre suggerito il ruolo autocrino e paracrino della calreticulina, che agirebbe come citochina attivante il recettore MPL.

Rispetto ai pazienti con TE *JAK2* mutata, i casi *CALR* positivi sono più frequentemente di sesso maschile, hanno un'età inferiore, trombocitosi più spiccata, livelli di emoglobina e leucociti più contenuti e ridotta incidenza di eventi trombotici [57].

Nella TE non sembrano esserci differenze in termini di decorso clinico tra le due mutazioni più comuni di *CALR*, tuttavia il tipo 2 parrebbe associarsi ad una più alta conta piastrinica alla diagnosi [56,57].

Nelle MFP, i pazienti *CALR* positivi hanno caratteristiche fenotipiche analoghe a quelle sopra descritte nella TE, presentano più frequentemente mutazioni dello spliceosoma ed hanno una sopravvivenza migliore rispetto ai soggetti *JAK2* e *MPL* positivi [35,55,58]. Tale vantaggio è indipendente dall'età e dalla categoria di rischio secondo i convenzionali scores prognostici [58]. In questa patologia la più frequente tra le mutazioni di *CALR* è il tipo 1, mentre il tipo 2 è associato ad una ridotta sopravvivenza [58]. Anche nella MFS le mutazioni tipo 1 di *CALR* sono le più frequenti, ma non si notano differenze in termini prognostici rispetto al tipo 2 [34]. Nello studio MYSEC, i pazienti *CALR* mutati presentano miglior sopravvivenza rispetto ai casi *JAK2* positivi [34].

Il gene MPL (Myeloproliferative Leukemia virus oncogene) è localizzato sul cromosoma 1p34 e codifica per il recettore della TPO. Le alterazioni acquisite sono prevalentemente *missense* a carico dell'esone 10, con conseguente sostituzione di un triptofano in posizione 515 (W515) con una leucina, lisina o arginina [30,31]. Ne deriva una proliferazione cellulare citochino-indipendente [30,31]. Le mutazioni a carico di *MPL* si associano a marcata trombocitosi, con caratteristiche che ricordano una TE o MFP [59].

Ruolo delle mutazioni geniche nell'evoluzione clonale delle Ph-NMP

La storia naturale della TE e della PV è caratterizzata dalla potenzialità di progredire in MFS [13]. Inoltre, in tutte le Ph-NMP è possibile l'evoluzione in una leucemia acuta mieloide secondaria, anche detta fase blastica (FB) [13]. Pertanto, è plausibile considerare di fondamentale importanza il contributo di mutazioni somatiche tanto all'iniziazione dell'ematopoiesi clonale e alla mieloproliferazione, quanto all'evoluzione della malattia.

Studi su modelli animali hanno dimostrato come la presenza della mutazione *JAK2V617F* a livello della cellula staminale emopoietica sia capace di dare origine al clone patologico, ma conferisca solo un debole vantaggio in termini di auto-rinnovamento e crescita cellulare [60,61]. È emersa quindi l'ipotesi di una cooperazione genica sinergizzante, sia nell'induzione che nella progressione della patologia. L'esistenza (o coesistenza) di cloni *JAK2*-indipendenti spiega, ad esempio, le FB *JAK2* negative, secondarie a Ph-NMP *JAK2* positive [62]. Le metodiche di sequenziamento genico hanno permesso di identificare non solo la presenza ma anche l'ordine temporale di acquisizione delle mutazioni geniche. Le informazioni derivate da tali analisi sono quindi essenziali nell'ottica di una medicina sempre più personalizzata.

Ad esempio, mutazioni di *TET2* sono considerate eventi precedenti a *JAK2V617F*, mentre alterazioni di *ASXL1, EZH2 e IDH1* sono spesso successive. Il pattern di evoluzione clonale è simile per i casi *CALR* mutati [63]. Inoltre, il numero di mutazioni è proporzionalmente correlato al rischio di progressione di malattia e, di conseguenza, alla possibilità di sopravvivenza e di trasformazione in FB [45]. Tuttavia, rispetto ad altre neoplasie mieloidi, le Ph-NMP

non sono associate ad uno stato ipermutabile, poiché limitate sono le mutazioni somatiche addizionali identificabili durante il decorso. Nell'ambito delle TE *CALR* mutate, una recente analisi ha evidenziato come il rischio di trasformazione in MFS sia maggiore nel caso di alterazione tipo 1-like rispetto al tipo 2-like [56]. Tuttavia, in coorti di pazienti affetti da TE con simile distribuzione delle mutazioni di *CALR*, non è stata confermata tale associazione [64]. Haider et al. hanno dimostrato un alto rischio di evoluzione fibrotica nei casi di TE *MPL* positiva [65]. In particolare, la probabilità sembra maggiore in caso di elevata carica allelica, associata ad un *"acquired copy-neutral loss of heterozygosity"* del cromosoma 1. A ciò corrisponde, infatti, una transizione della mutazione di *MPL* dallo stato di eterozigosi a quello di omozigosi [66]. Al contrario, la presenza e la carica allelica di *JAK2V617F* non hanno alcun impatto in termini di evoluzione clonale nella TE [67,68].

Una recente analisi con tecniche di *deep sequencing* ha mostrato che nella TE la mutazione di almeno uno tra *SH2B3, SF3B1, TP53, IDH2, EZH2* e soprattutto *U2AF1* si associa a maggior velocità di trasformazione in MFS [69]. Uno studio collaborativo tra la Mayo Clinic e l'Università di Firenze ha confermato il ruolo delle alterazioni di *U2AF1 e SF3B1* nel condizionare il rischio di MFS [70]. Inoltre, le mutazioni di *TP53* si dimostrano predittive del rischio di FB [70].

Nella PV, un'elevata carica allelica (> 50%) e lo stato di omozigote per *JAK2V617F* sono stati associati ad aumentato rischio di evoluzione fibrotica [71]. Analoga probabilità a lungo termine sembra avere la mutazione a carico dell'esone 12 [49]. Al contrario, il numero di copie di *JAK2V617F* non influisce sulla progressione in FB [72].

Utilizzando metodiche di *deep sequencing* in due differenti coorti di pazienti affetti da PV, si è evidenziato come mutazioni di *ASXL1*, *IDH2* ed in particolare di *SRSF2* siano associate a maggior possibilità di evoluzione in MFS [69]. *SRSF2* e *IDH2* sembrano anche rilevanti in termini di predizione del rischio di FB [73].

Le mutazioni *driver* influenzano anche il tempo alla progressione (TP) da PV e TE in MFS [34,74]. In uno studio recente, considerando l'età, le dimensioni spleniche e il livello di emoglobina al momento dell'evoluzione in MFS, è stato evidenziato come i casi di TE *CALR* mutata abbiano un TP significativamente più lungo rispetto ai casi di TE/PV *JAK2* mutati e, soprattutto, alle TE TN [34,74].

Nei pazienti affetti da MFP, è stata recentemente proposta una stratificazione prognostica molecolare, basata sulla presenza di almeno una tra le seguenti mutazioni ad alto rischio: *ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 e SRSF2* [45]. In particolare, la presenza di due o più tra queste alterazioni è correlata ad un aumentato rischio di FB [75]. Analogo significato sembrano avere le mutazioni a carico di *CBL, KIT, RUNX1, SH2B3 e CEBPA* [76].

Nelle MFS, la probabilità di evolvere in FB è risultata significativamente maggiore nei casi con *JAK2V617F* o TN rispetto a quelli *CALR* mutati [34]. Dati preliminari del progetto MYSEC suggeriscono che, nella MFS, la presenza di blasti circolanti ≥ 3%, una durata della fase di PV/TE superiore a 14 anni e l'assenza di CALR siano associati ad aumentato rischio di FB (*Mora et al., comunicazione personale*).

Courtier et al. hanno recentemente analizzato il ruolo prognostico delle mutazioni addizionali nella MFS, sebbene su una coorte di soli 59 casi [46]. L'evoluzione in FB avveniva più frequentemente se *SRSF2* risultava mutato, in minor misura in caso di alterazioni di *CALR* [46]. Analoga indagine di sequenziamento genico è in corso nell'ambito del progetto MYSEC. Tuttavia, questi dati preliminari sottolineano l'importanza di uno studio molecolare esteso anche nella MFS, al fine di personalizzarne il trattamento e il monitoraggio.

Integrazione dei dati molecolari nei modelli prognostici delle Ph-NMP

Nell'ambito della ricerca, è evidente l'approccio alla predizione personalizzata della sopravvivenza nelle Ph-NMP. Grinfeld et al. [77] hanno analizzato, tramite un esteso pannello di geni mieloidi, 2035 pazienti affetti da Ph-NMP. La caratterizzazione integrata clinico-molecolare ha permesso di distinguere otto sottogruppi genomici, caratterizzati da differente fenotipo, rischio di evoluzione in FB e probabilità di eventi durante il *follow-up* [77].

Nella pratica clinica, le ultime linee guida europee sulle Ph-NMP suggeriscono il ricorso a metodiche di sequenziamento genico per integrare gli altri parametri prognostici solo nei casi di MFP, non nei soggetti affetti da TE e PV [14]. Il rapido evolvere delle conoscenze potrebbe però far mutare a breve anche l'approccio a queste patologie.

Trombocitemia essenziale e policitemia vera

I convenzionali modelli predittivi di sopravvivenza per la TE e la PV considerano come variabili solo dati clinico-laboratoristici [78,79]. Recentemente, è stata però studiata la possibilità di integrare anche il dato genetico [70]. A partire da un'analisi in NGS condotta su 502 pazienti affetti da TE e 404 con PV, è stato realizzato per ciascuna delle due patologie il *Mutation-enhanced International Prognostic Scoring System* (MIPSS-ET/PV) [70].

In tale studio, mutazioni sfavorevoli sono state identificate nel 10% delle TE e nel 2% delle PV [70]. In particolare, le alterazioni dei geni coinvolti nello *splicing* hanno impatto negativo sulla sopravvivenza: *SF3B1 e SRSF2* nella TE e *SRSF2* nella PV [70].

Il MIPSS-ET prende pertanto in considerazione: mutazioni avverse (*SRSF2, SF3B1, U2AF1 e TP53*; due punti), l'età superiore a 60 anni (quattro punti), il sesso maschile e la leucocitosi ≥11 × 10^9/l (un punto) [70]. Nelle tre categorie di rischio in cui vengono stratificati i pazienti, la sopravvivenza globale mediana va da 34,4 a 7,9 anni [70].

Il MIPSS-PV utilizza come variabili: la mutazione di SRSF2 (tre punti), l'età superiore a 67 anni (due punti), la leucocitosi ≥15 × 10^9/l e la storia di trombosi (un punto) [70]. La sopravvivenza globale mediana nei tre gruppi così ottenuti è compresa tra 24 e 3,2 anni [70]. La capacità predittiva dei modelli MIPSS-ET/PV sembra superiore agli *scores* convenzionali ma il loro uso, basato su metodiche di sequenziamento, attualmente è limitato al *setting* di ricerca [70].

Mielofibrosi primaria

Le più recenti linee guida europee sulla gestione della MFP fanno riferimento ai modelli prognostici convenzionali, calcolati alla diagnosi (*International Prognostic Scoring System*, IPSS) o durante il decorso (*Dynamic-IPSS*, DIPSS; DIPSS-plus) [14,80-82].

L'utilizzo di metodiche di NGS ha tuttavia influenzato in modo significativo la predizione di mortalità nella MFP [83]. Essenziale in tal senso è stata la scoperta delle mutazioni addizionali ad alto rischio [45]: la presenza di almeno un gene alterato tra *ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 e SRSF2* si correla infatti ad una ridotta sopravvivenza [45]. Particolarmente sfavorevole è lo stato mutazionale *ASXL1-positivo/CALR-negativo* [84]. Queste informazioni hanno portato all'elaborazione di tre modelli prognostici comprensivi del dato molecolare: MIPSS70 (*Mutation-enhanced IPSS for transplant-age patients*), MIPSS70 plus versione 2.0 e GIPSS (*Genetically Inspired Prognostic Scoring System*) [85-87]. Le caratteristiche di tali modelli sono riassunte nella Tabella 7.

Lo *score* MIPSS70 va applicato a pazienti di età inferiore a 70 anni, ovvero la popolazione che potrebbe essere trattata con un trapianto allogenico [85]. Tra le nove variabili considerate, sei sono a carattere clinico e tre di tipo molecolare: assenza della mutazione *CALR* tipo-1/like, presenza di una mutazione ad alto rischio e riscontro di almeno due tra quest'ultime [85]. Nelle tre categorie di rischio così ottenute, la sopravvivenza globale mediana è stimata essere tra 27,7 a 2,3 anni [85].

Il modello MIPSS70 plus versione 2.0 integra parametri clinici con mutazioni geniche ed anomalie cromosomiche [86]. I pazienti vengono stratificati in cinque gruppi, con sopravvivenza mediana estremamente diversa [86]: da quella non raggiunta della categoria a rischio molto basso a 1,8 anni per i casi a rischio molto elevato [86].

La particolarità dello score GIPSS è l'utilizzo unicamente di variabili molecolari e cariotipiche nel predire la sopravvivenza dei pazienti affetti da MFP [87]. Nelle quattro categorie così ottenute, la sopravvivenza globale mediana varia da 26,4 a 2 anni [87]. L'utilizzo dei modelli sopracitati per definire la strategia terapeutica nei pazienti con MFP è tuttora oggetto di studio.

Mielofibrosi secondaria

I convenzionali modelli prognostici usati per la MFP si sono rivelati subottimali nel predire la sopravvivenza nella MFS [88,89]. Pertanto, utilizzando la coorte MYSEC di 685 MFS con noto stato mutazionale *driver*, è stato possibile definire uno score basato sull'integrazione di dati clinici e molecolari, denominato *MYSEC-Prognostic Model* (MYSEC-PM) [90]. In dettaglio, alla diagnosi di MFS vengono assegnati due punti in caso di emoglobina < 11 g/dl, blasti circolanti ≥ 3% ed assenza della mutazione *CALR* [90]; un punto se la conta piastrinica è inferiore a 150 x10^9/l e se sono presenti sintomi costituzionali [90]. Il rischio correlato all'età è valutato considerando 0,15 punti per anno [90]. Le risultanti categorie MYSEC-PM sono quattro: basso (punteggio < 11), intermedio-1 (11 ≤ punteggio < 14), intermedio-2 (14 ≤ punteggio < 16) e alto rischio (punteggio ≥ 16) [90]. La sopravvivenza globale mediana non è stata raggiunta nel primo gruppo, mentre è risultata pari a 9,3 nell'intermedio-1, 4,4 nell'intermedio-2 e 2 anni nell'alto rischio [90]. Passamonti et al. hanno inoltre messo in evidenza che i casi CALR mutati non erano presenti all'interno del gruppo ad alto rischio [90]. Al fine di aiutare i clinici a calcolare lo score MYSEC-PM, sono state realizzate anche un nomogramma (Figura 1) ed un'applicazione web (disponibile online: http://www.mysec-pm.eu)

Il MYSEC-PM è stato poi validato esternamente in altre coorti di MFS [91], in pazienti trattati con il JAK 1/2 inibitore Ruxolitinib [92], e nel *setting* del trapianto allogenico [93,94].

L'impatto delle mutazioni addizionali sulla sopravvivenza nella MFS è ancora da definire. Tra le mutazioni ad alto rischio, l'unica che sembra avere un ruolo sfavorevole è SRSF2, nei casi secondari a TE [95]. Nello studio di Coutrier et al. [46], *ASXL1* e *TP53* sono state associate a ridotta sopravvivenza. Queste ultime mutazioni clusterizzano anche con le categorie più sfavorevoli del MYSEC-PM e permettono una miglior stratificazione del rischio nel gruppo a prognosi peggiore [46].

	MIPSS-70	MIPSS 70+ versione 2.0	GIPSS
Variabili genetiche (punti)	1 mutazione AR (1) >1 mutazione AR (2) No CALR tipo 1-like (1)	1 mutazione AR (2) >1 mutazione AR (3) No CALR tipo 1-like (2) Cariotipo molto AR (4) Cariotipo AR (3)	ASXL1 mutato (1) SRSF1 mutato (1) No CALR tipo 1-like (1) *U2AF1*Q157 (1) Cariotipo molto AR (2) Cariotipo AR (1)
Variabili cliniche (punti)	Hb < 10 g/dl (1) GB > 25*10^9/l (2) PLT < 100*10^9/l (2) Blasti periferici ≥ 2% (1) Sintomi sistemici (1) Fibrosi midollare ≥ 2 (1)	Anemia severa (2) Anemia moderata (1) Blasti periferici ≥ 2% (1) Sintomi sistemici (2)	

AR = Alto rischio; **Hb** = emoglobina; **GB** = globuli bianchi; **PLT** = piastrine.

***Tabella** 7 - Modelli prognostici ad impronta molecolare per la mielofibrosi primaria*

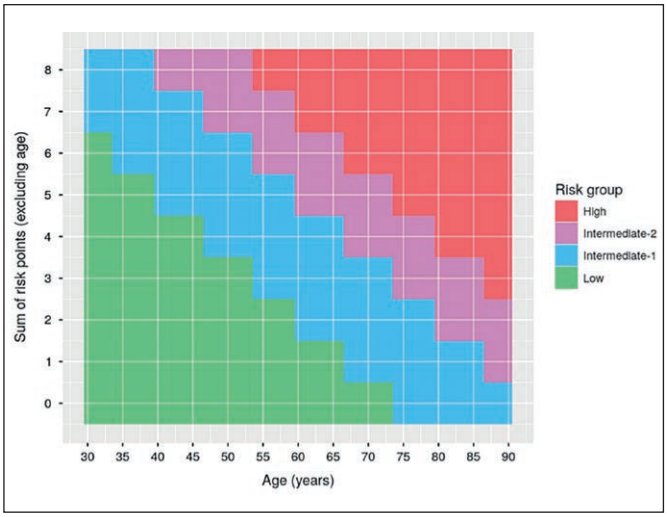


***Figura 1** - Il nomogramma di calcolo del MYSEC PM.[90]*
Legenda: Il nomogramma assegna visivamente la categoria di rischio MYSEC-PM partendo dalle variabili non anagrafiche (asse verticale) e dall'età del paziente (asse orizzontale).

La complessità della scelta trapiantologica nella mielofibrosi: un caso clinico

Nei pazienti affetti da MF la sopravvivenza può essere drasticamente compromessa. Le più recenti linee guida europee raccomandano di sottoporre a procedura di trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche pazienti giovani ed appartenenti alle categorie di rischio più sfavorevoli, ovvero in cui la sopravvivenza stimata sia inferiore a cinque anni [14]. Tale valutazione avviene prendendo in considerazione gli *scores* prognostici convenzionali in vigore per la MFP (IPSS, DIPSS, DIPSS-plus) e la presenza di mutazioni ad alto rischio [45,80-82].

In realtà, studi recenti hanno evidenziato come l'indicazione a trapianto non possa basarsi solo sull'età del paziente o sull'utilizzo di un singolo *score* prognostico, bensì sull'integrazione del *performance status* con l'andamento dinamico della patologia [94]. Considerando i significativi tassi di mortalità e morbilità, la selezione del paziente da avviare a trapianto è quindi critica [94].

Gagelmann et al. [96] hanno recentemente descritto uno score prognostico clinico-molecolare (MTSS, *Myelofibrosis Transplant Scoring System*) in grado di predire, al momento dell'invio alla procedura trapiantologica, la successiva sopravvivenza. Tale modello è applicabile sia ai casi di MFP che MFS e considera come parametri molecolari la presenza della mutazione di *ASXL1* e l'assenza di *CALR/MPL* [96]. Nelle quattro categorie in cui vengono distinti i pazienti, la sopravvivenza globale mediana a 5 anni è stimata tra 90% e 34% [96]. La mortalità da complicanze procedurali varia, in modo inverso, dal 10% al 57% [96].

Pertanto, è stato successivamente proposto di selezionare i pazienti entro i 70 anni e la cui sopravvivenza risulti inferiore a cinque anni, tramite gli *scores* prognostici più recenti e specifici per patologia: MIPSS70 per la MFP e MYSEC-PM per la MFS [94]. In alternativa, si possono anche considerare candidabili pazienti giovani affetti da MFP con score DIPSS intermedio-1 e ASXL1 mutati [94].

Applicando successivamente il MTSS [96], si identificano i soggetti con miglior probabilità di sopravvivenza post-trapiantologica e ridotto rischio di complicanze (Figura 2) [96].

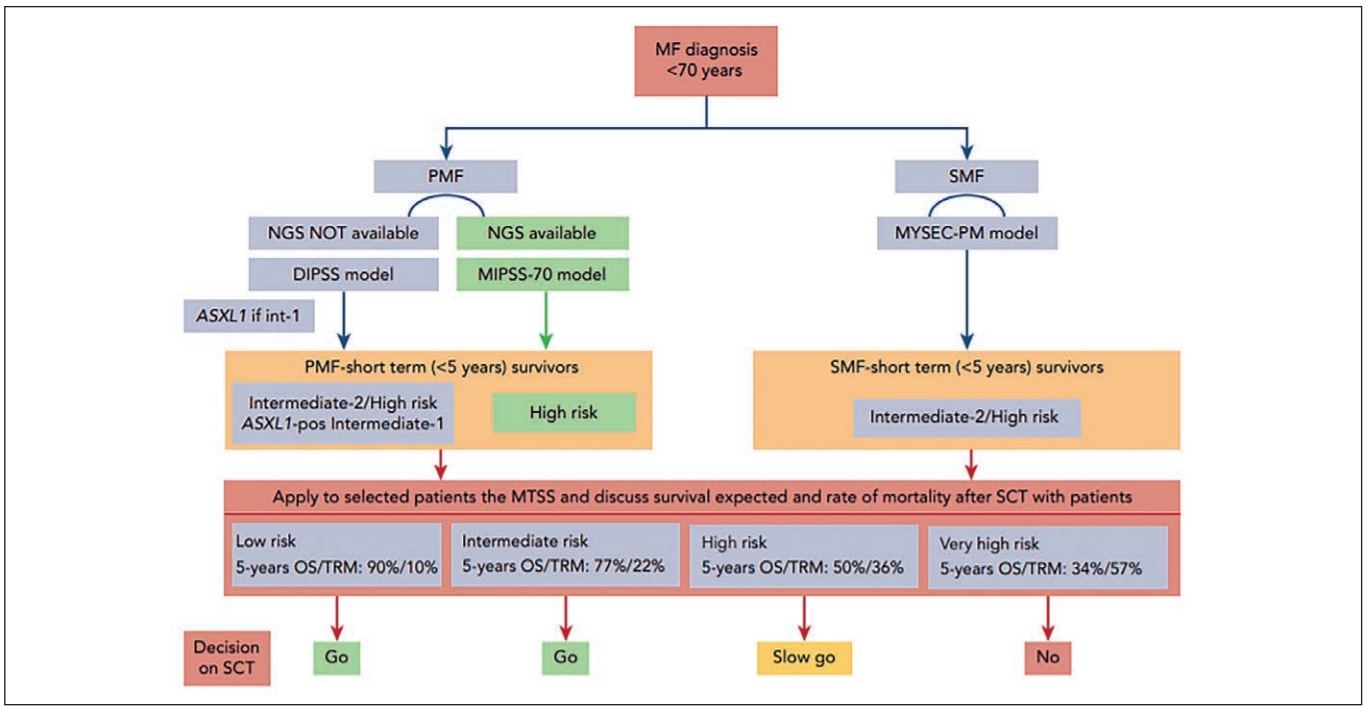


***Figura 2** - Algoritmo decisionale per pazienti con mielofibrosi primaria e secondaria potenzialmente candidabili ad allotrapianto*

L'applicazione di modelli prognostici che integrano dati molecolari può anche ridefinire il rischio di mortalità del paziente rispetto a quello calcolato con i modelli convenzionali, come evidente nel seguente caso clinico.
Nel gennaio 2019, ad un uomo di 63 anni viene posta diagnosi di MFP *JAK2* mutata, rischio IPSS intermedio-1. Nel dettaglio, il paziente non presentava sintomi costituzionali né leucocitosi significativa, i blasti circolanti erano il 3% e l'emoglobina pari a 11.5 g/dl. Alla visita, la milza era palpabile a 10 cm dall'arcata costale sinistra. L'analisi citogenetica su sangue midollare aveva evidenziato una delezione del cromosoma 9 su tutte le 32 metafasi analizzate. Non significative comorbidità in anamnesi.
Data la giovane età, il paziente è stato sottoposto a sequenziamento genico: tale analisi evidenziava, oltre alla presenza di *JAK2V617F*, anche le mutazioni di *ASXL1* e *EZH2*.
Con i dati molecolari e citogenetici a disposizione, lo *score* MIPSS70 e il MIPSS70 plus versione 2.0 identificavano un quadro ad alto rischio, diversamente da quanto previsto mediante IPSS. Come da algoritmo in Figura 2, si applicava quindi il modello MTSS. Il punteggio ottenuto configurava un rischio intermedio, ovvero la sopravvivenza post-trapianto a 5 anni risultava del 77% e la mortalità secondaria alla procedura stessa del 22%.
L'indicazione a procedere lungo il percorso trapiantologico, non evidente ricorrendo al modello convenzionale IPSS, è diventata quindi chiara ricorrendo a modelli integrati clinico-molecolari.
L'approccio al trapianto nella mielofibrosi diventa quindi personalizzato.

Bibliografia

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-2405.
2. Madelung AB, Bondo H, Stamp I et al. World Health Organization-defined classification of myeloproliferative neoplasms: morphological reproducibility and clinical correlations - the Danish experience. Am J Hematol. 2013;88(12):1012-16.
3. Gianelli U, Bossi A, Cortinovis I et al. Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. Mod Pathol. 2014;27(6):814-22.
4. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. Haematologica 2005;90(8):1128-32.
5. Gianelli U, Vener C, Bossi A et al. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. Mod Pathol. 2012;25(9):1193-1202.
6. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Leukemia. 2008;22(2):437-8.
7. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. Eur J Haematol. 2014;92(4):289-297.
8. Landolfi R, Di Gennaro L, Nicolazzi MA, et al. Polycythemia vera: gender-related phenotypic differences. Intern Emerg Med. 2012;7(6):509-15.
9. Passamonti F. How to manage polycythemia vera. Leukemia. 2012;26(5):870-4.
10. McMullin MF, Harrison CN, Ali S, et al. A guideline for the diagnosis and management of polycythaemia vera. A British Society for Haematology Guideline. Br J Haematol. 2019;184(2):176-91.
11. Marneth AE, Mullally A. The Molecular Genetics of Myeloproliferative Neoplasms. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020;10(2).
12. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Initial bone marrow reticulin fibrosis in polycythemia vera exerts an impact on clinical outcome. Blood 2012;119(10):2239-41.
13. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. Am J Med. 2004;117(10):755-61.
14. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. Leukemia. 2018;32(5):1057-69.
15. Boiocchi L, Mathew S, Gianelli U, et al. Morphologic and cytogenetic differences between post-polycythemic myelofibrosis and primary myelofibrosis in fibrotic stage. Mod Pathol. 2013;26(12):1577-85.
16. Kvasnicka HM, Thiele J, Bueso-Ramos CE, et al. Effects of five years of ruxolitinib therapy on bone marrow morphology in patients with myelofibrosis and comparison with best available therapy. ASH Annual Meeting Abstracts. 2013;122:4055.
17. Kvasnicka HM, Beham-Schmid C, Bob R, et al. Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis - a consensus-based study. Histopathology. 2016;68(6):905-15.
18. Gianelli U, Fiori S, Cattaneo D, et al. Prognostic significance of a comprehensive histological evaluation of reticulin fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis in primary myelofibrosis patients. Histopathology. 2017;71(6):897-908.
19. Kvasnicka HM, Thiele J, Bueso-Ramos CE, et al. Long-term effects of ruxolitinib versus best available therapy on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. J Hematol Oncol. 2018;11(1):42.
20. Boiocchi L, Espinal-Witter R, Geyer JT, et al. Development of monocytosis in patients with primary myelofibrosis indicates an accelerated phase of the disease. Mod Pathol. 2013;26(2):204-12.
21. Boiocchi L, Gianelli U, Iurlo A, et al. Neutrophilic leukocytosis in advanced stage polycythemia vera: hematopathologic features and prognostic implications. Mod Pathol. 2015;28(11):1448-57.
22. Geyer JT, Margolskee E, Krichevsky SA, et al. Disease progression in myeloproliferative neoplasms: comparing patients in accelerated phase with those in chronic phase with Increased blasts (<10%) or with other types of disease progression. Haematologica. 2020;105(5):e221-e224.
23. Iurlo A, Cattaneo D, Gianelli U. Blast Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: Risk Factors, Biological Findings, and Targeted Therapeutic Options. Int J Mol Sci. 2019;20(8).
24. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood. 1951;6(4):372-5.
25. Tsukamoto N, Morita K, Maehara T, et al. Clonality in chronic myeloproliferative disorders defined by X-chromosome linked probes: demonstration of heterogeneity in lineage involvement. Br J Haematol. 1994;86(2):253-8.

26. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature. 2005;434(7037):1144-8.

27. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell. 2005;7(4):387-97.

28. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet. 2005;365(9464):1054-61.

29. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med. 2005;352(17):1779-90.

30. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med. 2006;3(7):e270.

31. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood. 2006;108(10):3472-6.

32. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N Engl J Med. 2013;369(25):2391-405.

33. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med. 2013;369(25):2379-90.

34. Passamonti F, Mora B, Giorgino T, et al. Driver mutations' effect in secondary myelofibrosis: an international multicenter study based on 781 patients. Leukemia. 2017;31(4):970-3.

35. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. Blood. 2014;124(16):2507-13.

36. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. Blood. 2014;123(22):e123-33.

37. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Blood. 2016;127(10):1307-16.

38. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. Blood. 2016;127(10):1325-35.

39. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. Blood. 2016;127(10):1317-24.

40. Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, et al. Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. Cancer Discov. 2016;6(4):368-81.

41. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. Blood. 2013;122(22):3616-27.

42. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J. Med 2009;360(22):2289-301.

43. Boultwood J, Perry J, Pellagatti A, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2010;24(5):1062-5.

44. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. Nat Genet. 2010;42(8):722-6.

45. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. Leukemia 2013;27(9):1861-9.

46. Courtier F, Garnier S, Carbuccia N, et al. Targeted molecular characterization shows differences between primary and secondary myelofibrosis. Genes Chromosomes Cancer. 2019. doi:10.1002/gcc.22789 [Epub ahead of print]

47. Dusa A, Mouton C, Pecquet C, et al. JAK2 V617F constitutive activation requires JH2 residue F595: a pseudokinase domain target for specific inhibitors. PLoS One. 2010;5(6):e11157.

48. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med. 2007;356(5):459-68.

49. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. Blood. 2011;117(10):2813-6.

50. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, et al. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. Blood. 2006;108(7):2435-7.

51. Dupont S, Masse A, James C, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. Blood. 2007;110(3):1013-21.

52. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. Leukemia. 2008;22(7):1299-307.

53. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. FASEB J. 2010;24(3):665-83.

54. Guglielmelli P, Bartalucci N, Rotunno G, et al. Calreticulin: a new horizon for the testing and treatment of myeloproliferative neoplasms. Expert Rev Hematol. 2014;7(4):423-5.

55. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. Leukemia. 2014;28(7):1568-70.

56. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2016;30(2):431-8.

57. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. Blood. 2014;123(10):1544-51.

58. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia. 2014;28(7):1472-7.

59. Pecquet C, Staerk J, Chaligné R, et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. Blood. 2010;115(5):1037-1048.

60. James C, Mazurier F, Dupont S, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. Blood. 2008;112(6):2429-2438.

61. Kent DG, Li J, Tanna H, et al. Self-renewal of single mouse hematopoietic stem cells is reduced by JAK2V617F without compromising progenitor cell expansion. PLoS Biol. 2013;11(6):e1001576.

62. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. Blood. 2006;108(10):3548-55.

63. Martin S, Wright CM, Scott LM. Progenitor genotyping reveals a complex clonal architecture in a subset of CALR-mutated myeloproliferative neoplasms. Br J Haematol. 2017;177(1):55-66.

64. Elala YC, Lasho T, Gangat N, et al. Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia. Am J Hematol. 2016;91(5):503-6.

65. Haider M, Elala YC, Gangat N, et al. MPL mutations and palpable splenomegaly are independent risk factors for fibrotic progression in essential thrombocythemia. Blood Cancer J. 2016;6(10):e487.

66. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis

in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. Blood. 2013;121(21):4388-95.
67. Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, et al. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. Blood. 2010;115(14):2882-90.
68. Guglielmelli P, Barosi G, Pieri L, et al. JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. Haematologica. 2009;94(1):144-6.
69. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. Blood Adv. 2016;1(1):21-30.
70. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. Br J Haematol. 2020;189(2):291-302.
71. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. Leukemia. 2010;24(9):1574-9.
72. Malak S, Labopin M, Saint-Martin C, et al. Long term follow up of 93 families with myeloproliferative neoplasms: life expectancy and implications of JAK2V617F in the occurrence of complications. Blood Cells Mol Dis. 2012;49(3-4):170-6.
73. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol. 2017;92(1):94-108.
74. Mora B, Giorgino T, Guglielmelli P, et al. Phenotype variability of patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis is associated with the time to progression from polycythemia vera and essential thrombocythemia. Leukemia Res. 2018;69:100-2.
75. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. Leukemia. 2014;28(9):1804-10.
76. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol. 2016;91(12):1262-71.
77. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. N Engl J Med. 2018;379(15):1416-30.
78. Passamonti F, Thiele J, Girodon F, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. Blood. 2012;120(6):1197-1201.
79. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. Leukemia. 2013;27(9):1874-81.
80. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Blood. 2009;113(13):2895-2901.
81. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). Blood. 2010;115(9):1703-8.
82. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. J Clin Oncol. 2011;29(4):392-7.
83. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. Blood Adv. 2016;1(2):105-11.
84. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. Leukemia. 2014;28(7):1494-1500.
85. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. J Clin Oncol. 2018;36(4):310-8.
86. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. MIPSS70+ version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. J Clin Oncol. 2018;36(17):1769-70.
87. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. Leukemia. 2018;32(7):1631-42.
88. Hernandez-Boluda JC, Pereira A, Gomez M, et al. The International Prognostic Scoring System does not accurately discriminate different risk categories in patients with post-essential thrombocythemia and post-polycythemia vera myelofibrosis. Haematologica. 2014;99(4):e55-e57.
89. Gowin K, Coakley M, Kosiorek H, et al. Discrepancies of applying primary myelofibrosis prognostic scores for patients with post polycythemia vera/ essential thrombocytosis myelofibrosis. Haematologica 2016;101(10):e405-e406.
90. Passamonti F, Giorgino T, Mora B, et al. A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. Leukemia. 2017;31(12):2726-31.
91. Hernández-Boluda JC, Pereira A, Correa JG, et al. Performance of the myelofibrosis secondary to PV and ET-prognostic model (MYSEC-PM) in a series of 262 patients from the Spanish registry of myelofibrosis. Leukemia. 2018;32(2):553-5.
92. Palandri F, Palumbo GA, Iurlo A, et al. Differences in presenting features, outcome and prognostic models in patients with primary myelofibrosis and post-polycythemia vera and/or post-essential thrombocythemia myelofibrosis treated with ruxolitinib. New perspective of the MYSEC-PM in a large multicenter study. Semin Hematol. 2018;55(4):248-55.
93. Gagelmann N, Eikema DJ, de Wreede LC, et al. Comparison of Dynamic International Prognostic Scoring System and MYelofibrosis SECondary to PV and ET Prognostic Model for Prediction of Outcome in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia Myelofibrosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2019;25(6):e204-e208.
94. Passamonti F. Stem cell transplant in MF: it's time to personalize. Blood 2019;133(20):2118-20.
95. Rotunno G, Pacilli A, Artusi V, et al. Epidemiology and clinical relevance of mutations in postpolycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. A study on 359 patients of the AGIMM group. Am J Hematol. 2016;91(7):681-6.
96. Gagelmann N, Ditschkowski M, Bogdanov R, et al. Comprehensive clinical-molecular transplant scoring system for myelofibrosis undergoing stem cell transplantation. Blood. 2019;133(20):2233-42.

Parole Chiave

Mielofibrosi, policitemia, trombocitemia, jak2.

Indirizzi per la corrispondenza

Francesco Passamonti
Dipartimento di Ematologia
Ospedale di Circolo - ASST Sette Laghi
Viale Borri 57 - 21100 Varese - Italia

Leucemia acuta linfoblastica



Cristina Mecucci, Roberta La Starza

Ematologia - Università di Perugia

Introduzione

La leucemia acuta linfoblastica (LAL) è una neoplasia che colpisce sia bambini che adulti, con un picco di massima incidenza nell'età compresa tra 2 e 5 anni [1]. La diagnosi morfologica, che si avvale del riconoscimento di un infiltrato di blasti leucemici pari ad almeno il 20% delle cellule nucleate nel midollo ematopoietico, ha notevoli limiti classificativi. I blasti delle LAL infatti hanno caratteristiche fenotipiche abbastanza monotone: dimensioni piccole e/o medie, cromatina moderatamente condensata o dispersa, alto rapporto nucleo/citoplasma e assenza di granulazioni citoplasmatiche. In alcuni casi, si osservano blasti leucemici con aspetto cosiddetto *hand mirror*. In realtà la forma di gran lunga più caratteristicamente individuabile sul piano morfologico è il sottogruppo tipo Burkitt con i caratteristici vacuoli citoplasmatici (WHO 2017).

Le classificazioni ad alto impatto clinico e prognostico si basano sull'integrazione della caratterizzazione immunofenotipica e citogenetico-molecolare.

Sulla base dell'espressione di antigeni citoplasmatici e di superficie, le LAL vengono classificate in due gruppi principali, a cellule B (LAL-B) e a cellule T (LAL-T) (Figura 1) (WHO 2017) [2,3]. Gli antigeni espressi, l'intensità di espressione e la percentuale di cellule positive sono parametri necessari per la classificazione di linea ma anche per la definizione dello stadio maturativo dei blasti leucemici. La precisa definizione diagnostica immunofenotipica si avvale di un ampio pannello di anticorpi monoclonali che riconoscono antigeni specificatamente espressi nel citoplasma e/o sulla superficie dei linfociti B e T, nei vari passaggi differenziativi della linfocitopoiesi normale [2]. Inoltre, sia nelle LAL-B che -T immature (20-25%), si osserva la co-espressione di antigeni mieloidi o di antigeni di staminalità [2-4]. La Figura 1 riporta le caratteristiche immunofenotipiche che riflettono il grado di differenziamento delle filiere B e T e che consentono l'individuazione di sottotipi di LAL-B e -T, rispettivamente. Questo approccio diagnostico è anche molto utile nella comprensione delle caratteristiche clinico-biologiche delle lesioni genetiche, come di seguito discusso.

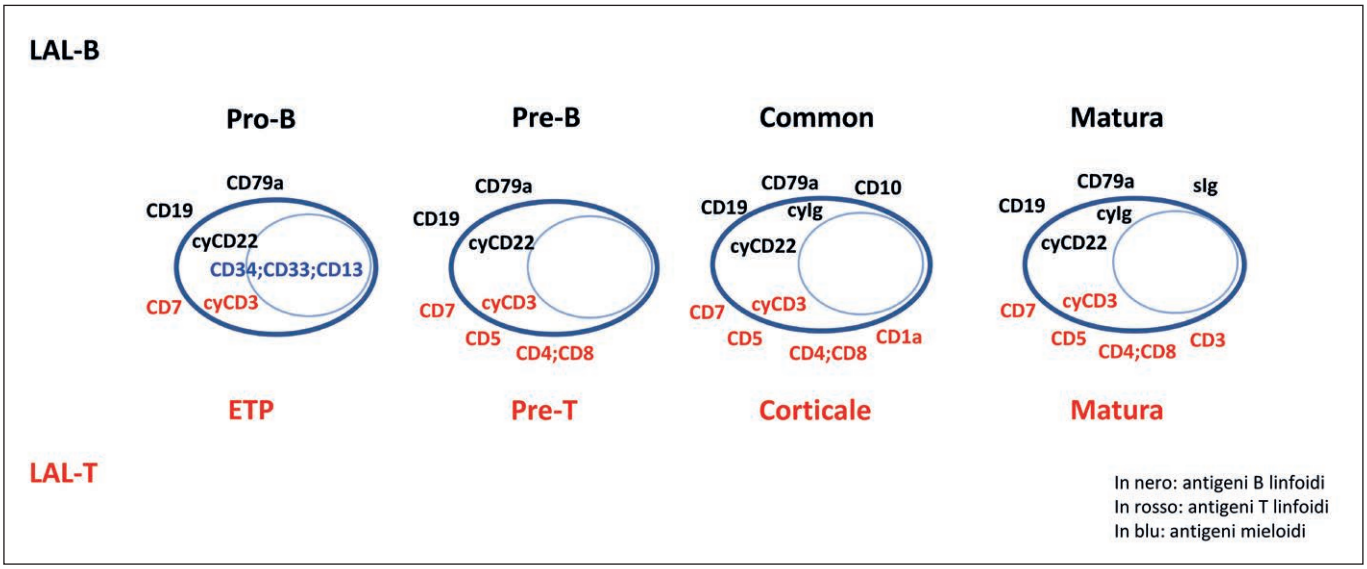


***Figura 1** - La figura mostra i quattro stadi differenziativi delle LAL-B (pro-B, pre-B, common, e matura) (in alto in nero) e delle LAL-T (ETP/immatura, pre-T, cortical, e matura) (in basso in rosso), che si possono definire sulla base dell'espressione di antigeni citoplasmatici e di superficie*

Classificazione genetica delle LAL a cellule B

Come mostrato dalla Figura 2, la classificazione genetica delle LAL-B è il risultato dell'integrazione delle tecnologie del genoma, a partire dalla citogenetica convenzionale, alla FISH, al sequenziamento genico, all'espressione genica.

ETV6-RUNX1

La fusione *ETV6-RUNX1* sottende alla traslocazione bilanciata t(12;21)(p13;q22), che essendo criptica alla citogenetica convenzionale, può essere diagnosticata con la FISH e/o la RT-PCR [5,6]. Il riarrangiamento, identifica un sottogruppo biologico e clinico di LAL-B pediatriche (circa 25% dei casi), con una mediana di età di 4 anni e a prognosi particolarmente favorevole (WHO 2017). La delezione dell'allele di *ETV6* non coinvolto nella traslocazione è l'anomalia addizionale più frequente; altamente ricorrente è anche la delezione di *PAX5* [7]. Il riarrangiamento *ETV6-RUNX1* è un evento molto precoce nel processo di leucemogenesi B, che però è insufficiente a determinare il fenotipo leucemico. Studi in gemelli identici hanno dimostrato che la traslocazione può anche avvenire *in utero*, e che solo dopo la successiva acquisizione di eventi addizionali, che può avvenire dopo un periodo variabile di latenza durante la vita post-natale, si verifica l'insorgenza della leucemia [8]. La frequenza del riarrangiamento *ETV6-RUNX1*, in neonati sani, è stata attestata entro un range molto ampio, dallo 0.01% all'8%, in funzione della sensibilità dell'approccio metodologico utilizzato nello studio [9].
È stato recentemente identificato un sottogruppo di LAL-B definito *ETV6-RUNX1* like, sulla base di studi di profilo di espressione genica [10]. Tali LAL-B hanno la stessa *signature* dei casi *ETV6-RUNX1* positivi, pur in assenza del riarrangiamento. Piú dell'80% di questi casi sono caratterizzati dalla concomitante presenza di alterazioni (delezioni totali o intrageniche, fusioni in-frame o out-of-frame) di *ETV6* e/o *IKZF1*. Lo studio in SNPa ha identificato un altro riarrangiamento genomico ricorrente, una delezione di 78Kb, intragenica a *ARPP21*/3p22.3, che provoca la perdita del sito di inizio della traduzione di tutte le isoforme del gene [11]. Altre caratteristiche che assimilano le LAL-B *ETV6-RUNX1* positive alle forme "*ETV6-RUNX1*-like", sono l'immunofenotipo, caratterizzato dall'espressione dell'antigene CD27 e negatività/bassa espressione del CD44, e la prognosi che sembrerebbe favorevole anche in queste ultime [11].

KMT2A(MLL)/11q23

Le traslocazioni del gene *KMT2A*, con un elevato numero di possibili partners (almeno 135) a volte descritti in casi singoli, identificano uno specifico sottogruppo di LAL-B che presenta due picchi di incidenza, uno nell'età adulta (15% dei casi) e l'altro in età infantile (<1 anno) (70%) (WHO 2017). In questi ultimi casi, le traslocazioni di *KMT2A* possono anche avvenire in utero, come dimostrato dal riscontro del riarrangiamento nella Guthrie card di pazienti leucemici. La traslocazione più frequente è la t(4;11)(q21;q23)/*KMT2A-AFF1*; altri riarrangiamenti di *KMT2A* con partners ricorrenti, come *MLLT3*/9p21, *MLLT1*/19p13, *MLLT10*/10p12, *ELL*/19p13, *MLLT4*/6q27, *MLLT5*/1p32, e *MLLT11*/1q21 [12]. La t(4;11)(q21;q23) è un marcatore prognostico sfavorevole che caratterizza un sottogruppo di LAL-B che mostrano resistenza agli steroidi e alta incidenza di recidive precoci. Comunque anche tutti gli altri riarrangiamenti di *KMT2A* nelle LAL-B sono associati ad alto rischio [13,14]. Tipicamente, queste LAL-B presentano iperleucocitosi e coinvolgimento del sistema nervoso centrale e altre sedi extra-midollari. L'immunofenotipo dei blasti leucemici è spesso immaturo e caratterizzato da espressione di antigeni mieloidi (pro-B) (Figura 1).

Traslocazioni *IGH*/14q32

Le traslocazioni del gene *IGH*, con molteplici partner genici, sono considerate, insieme alla fusione *KMT2A-AFF1*, nell'ambito delle

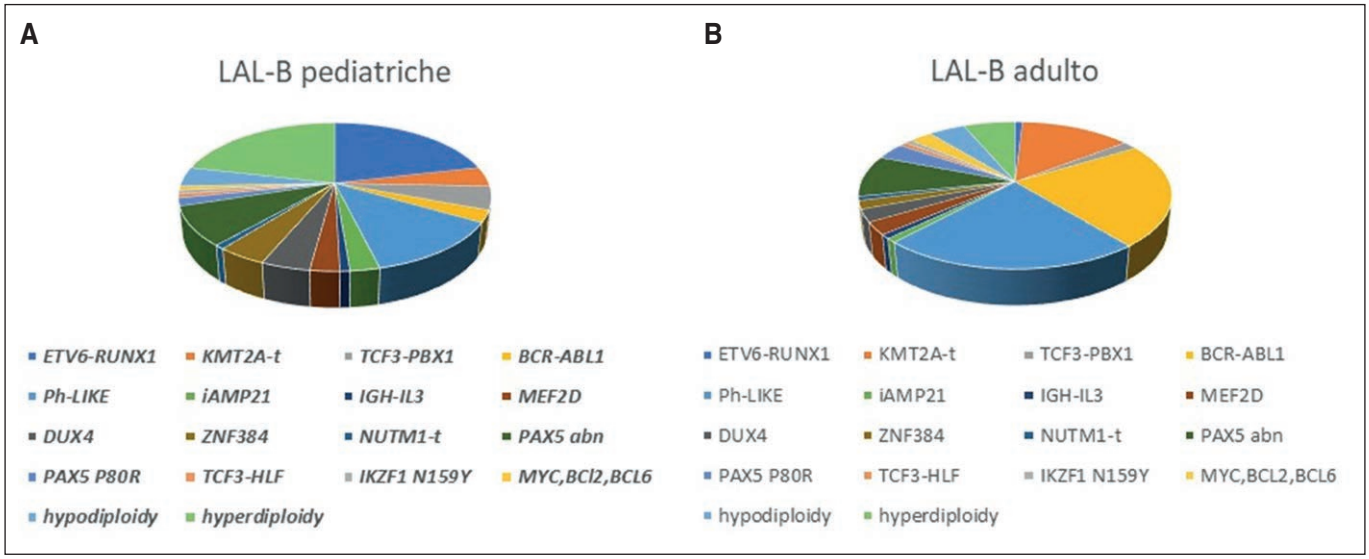


***Figura 2** - Distribuzione dei principali sottotipi citogenetico-molecolari nelle LAL-B pediatriche (pannello A) e dell'adulto (pannello B)*

LAL-B Filadelfia-negative (~5% dei casi), un sottogruppo a prognosi sfavorevole [15]. Dal punto di vista genetico, queste LAL-B sono eterogenee, in quanto dalla giustapposizione alle sequenze regolatorie delle IGH provocata da ogni specifica traslocazione si verifica la de-regolazione funzionale di oncogeni diversi. Inoltre, queste traslocazioni possono rappresentare anche eventi secondari e sub-clonali, associati a diverse alterazioni citogenetico-molecolari, come *ETV6-RUNX1, BCR-ABL1, iAMP21*, traslocazioni di *KMT2A*, e iperdiploidia [16].

IGH-IL3. Questo riarrangiamento, causato dalla traslocazione t(5;14)(q31.1;q34), definisce una entità nosologica unica (Figura 2) (WHO 2017). Si tratta di una alterazione moto rara (<1% dei casi) che si riscontra sia nei bambini che negli adulti. L'attivazione costitutiva dell'IL3, conseguenza molecolare del riarrangiamento, può provocare una iper-eosinofilia reattiva.

IGH-ID4. Tale riarrangiamento, che si origina dalla traslocazione t(6;14)(p22;q32), provoca la iperespressione di *ID4*, ed è tipicamente associato a delezione di *CDKN2AB* e *PAX5*, spesso come risultato di un isocromosoma i(9)(q10) che provoca la completa perdita del braccio corto del cromosoma 9 [17]. Alcuni dati preliminari non mostrerebbero per questo riarrangiamento un significato prognostico sfavorevole, come generalmente riportato per le altre traslocazioni *IGH* [15].

IGH- fattori di trascrizione CEBP. I fattori di trascrizione *CEBP* sono fra i geni più frequentemente coinvolti nelle traslocazioni con il gene *IGH*. Queste traslocazioni interessano tutti i cinque membri della famiglia, *CEBPA*/19q13, *CEBPB*/20q13, *CEBPD*/8q11, *CEBPE*/14q11, e *CEBPG*/19q13, anche se la traslocazione t(8;14)(q11;q34)/*IGH-CEBPD* è la più frequente [18,19]. Quest'ultima si riscontra frequentemente nelle LAL-B che insorgono in pazienti affetti da Sindrome di Down [19].

IGH-CRLF2. Questo riarrangiamento appartiene alle alterazioni tipicamente associate al sottogruppo delle LAL-B Ph-like (vedi paragrafo LAL Ph-like).

IGH-MYC, BCL2, e/o BCL6. Studi di profilo di espressione genica hanno identificato un sottogruppo di LAL-B a fenotipo pre-B, caratterizzati da riarrangiamenti delle *IGH* con gli oncogeni *MYC* e *BCL2*, e/o *BCL6* [20]. Questo sottogruppo è molto raro (0.2% nei bambini, 2% negli adulti), tipico dell'età avanzata (mediana: 48,5 anni), e è associato a una prognosi estremamente sfavorevole [15,20].

Cromosoma Filadelfia

La traslocazione t(9;22)(q34;q11), è l'anomalia citogenetica piú frequente nelle LAL-B dell'adulto (~25% dei casi) (Figura 2B) ed è un marcatore citogenetico predittivo di prognosi sfavorevole, malgrado l'utilizzo di schemi di terapia intensificata e il trapianto di cellule staminali ematopoietiche [14]. L'associazione della t(9;22)(q34;q11) alla delezione completa o intragenica di *IKZF1* (>60% dei casi) e/o di *CDKN2A*/B (25-30% dei casi), rende la prognosi ancora più sfavorevole [21,22].

L'avvento degli inibitori tirosin-chinasici (iTC) ha cambiato radicalmente il trattamento e la possibilità di indurre remissione di malattia, sia quando queste molecole vengono somministrate in combinazione con chemioterapici, sia nei casi in cui vengono usate in monoterapia [23]. Numerosi studi clinici hanno dimostrato l'efficacia di iTC sia di prima (imatinib) [24,25] che di seconda (dasatinib) [26] o terza generazione (ponatinib) [27], nell'indurre remissione ematologica completa in una larga maggioranza dei pazienti (90-100%), anche in età avanzata. È però da sottolineare che, pur essendo efficaci nell'indurre una remissione ematologica completa, gli iTC determinano la comparsa di resistenza, che spesso è dovuta all'insorgenza di una mutazione puntiforme, la T315I, nel dominio tirosin-chinasico della proteina. Tale mutazione è significativamente meno frequente nei pazienti trattati con il ponatinib [28]. Pertanto, nei soggetti che raggiungono la remissione ematologica completa, si pone il problema di scegliere la terapia di consolidamento [23].

LAL Ph-like

L'identificazione delle LAL-B Ph-like deriva da studi di espressione genica che hanno evidenziato un distinto sottogruppo di leucemie con profilo di espressione simile a quello delle LAL-B Filadelfia-positive, in assenza del trascritto *BCR-ABL1*, e frequente presenza di mutazioni/delezioni del gene *IKZF1* [29]. Tale sottogruppo di LAL-B rappresenta il 10-15% delle forme pediatriche e il 25% di quelle dell'adolescente [16-20] e del giovane adulto [21-39], per poi decrescere in età più avanzata [30,31]. Si tratta di un sottogruppo ad alto rischio, persistenza di malattia minima e prognosi sfavorevole [32,33].

Le LAL-B Ph-like sono caratterizzate da un ampio spettro di alterazioni genomiche, come mutazioni, traslocazioni, e variazioni del numero di copie, che coinvolgono almeno 28 proteine chinasi (Figura 3). Malgrado questa estrema eterogeneità genetica, circa il 50% dei casi è caratterizzato dalla presenza di un riarrangiamento, per lo più criptico alla citogenetica convenzionale, di *CRLF2* (*IGH-CRLF2 o P2RY8-CRLF2*), spesso concomitante alla mutazione di una proteina JAK, più frequentemente JAK2, o un regolatore della via *JAK/STAT* [33]. Tutti i riarrangiamenti/mutazioni delle LAL Ph-like convergono nell'attivazione costitutiva di alcune vie di trasduzione del segnale, come la via di *JAK/STAT*, la via di *RAS* e delle *MAPK*, e la via *PI3K/AKT*. Queste, a loro volta, rappresentano potenziali bersagli molecolari per il disegno e l'utilizzo di specifici farmaci inibitori [34].

iAMP21

È una anomalia citogenetica cosiddetta primaria per il ruolo patogenetico e diagnostico di uno specifico sottogruppo di LAL B (B-cell precursor). Interessa circa il 2% delle LAL B, prevalentemente in una fascia di età pediatrica più avanzata (età mediana 9 anni) rispetto alle altre LAL dei bambini (2-5 anni), ma anche adolescenti e giovani adulti. La diagnosi è di notevole rilievo clinico dal momento che la leucemia risulta a rischio molto elevato e non risponde alla chemioterapia standard, mentre si ottiene la remissione completa, diminuzione di ricadute e miglioramento della sopravvivenza intensificando i trattamenti [35].

Si tratta di un'anomalia citogenetica complessa con amplificazione di materiale a livello del braccio lungo del cromosoma 21 coin-

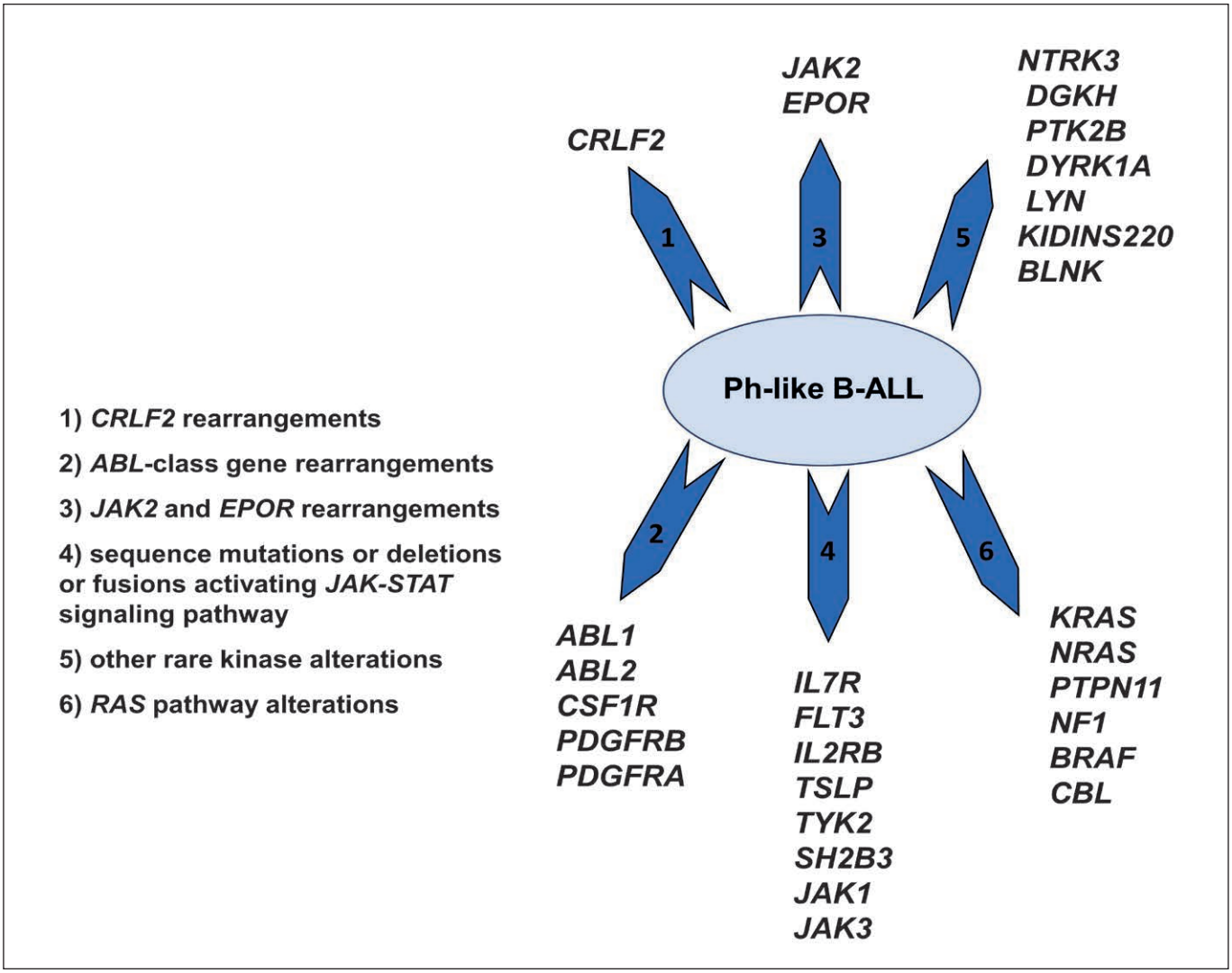


Figura 3 *- Geni tipicamente riarrangiati e/o mutati nelle LAL-B Ph-like*

volgente il gene *RUNX1* comunemente utilizzato per la diagnosi in FISH, che rileva le copie multiple di questo gene (da 3-4 a n volte). Nel caso di un basso numero di copie (3-4), tuttavia, va considerata la diagnosi differenziale con il sottogruppo iperdiploide. Da questo punto di vista lo SNP array è un ulteriore utile approccio diagnostico. Le cellule leucemiche possono presentare delezioni accompagnanti di *ETV6* (12p13), *RB1* (13q14) e *BTLA* (3q13). Molecolarmente è rilevante la frequente associazione con le mutazioni coinvolgenti la via di *RAS/MEK/ERK*, potenziali targets di terapie mirate [36]. L'aspetto genetico di gran lunga più interessante in questo tipo di leucemia è la predisposizione ad altissimo rischio nei soggetti portatori di anomalie costituzionali quali la traslocazione robertsoniana 15;21 o un cromosoma ring21 [37].

TCF3/19p13

Il gene *TCF3* si comporta come gene promiscuo in quanto può essere coinvolto in almeno 6 traslocazioni con diversi partner genici/cromosomici. La traslocazione t(1;19)(q23;p13)/*TCF3-PBX1* e la t(17;19)(q22;p13)/*TCF3-HLF*, si riscontrano rispettivamente nel 3-6% e <1% dei casi (Figura 2). La fusione *TCF3-PBX1* può originare sia da traslocazioni bilanciate che sbilanciate; identifica uno specifico sottogruppo di LAL-B considerato a prognosi intermedia in età pediatrica, ma con significato prognostico meno definito (intermedio/alto) in età adulta. La traslocazione t(17;19)(q22;p13) determina la fusione *TCF3-HLF*, che seppur molto rara, è clinicamente importante perché marcatore prognostico sfavorevole, predittivo di recidiva precoce, e di una sopravvivenza mediana inferiore a due anni. Le LAL-B *TCF3-HLF* positive presentano uno specifico profilo di espressione genica e sono associate a eventi ricorrenti, quali l'aplo-insufficienza di *PAX5*, le mutazioni dell'allele di *TCF3* non coinvolto nella traslocazione, e mutazioni dei membri della via di *RAS* [20,38]. Oltre alle suddette traslocazioni, *TCF3* può essere coinvolto in altri riarrangiamenti rari ma ricorrenti: la traslocazione t(12;19)(p13;p13) che coinvolge il gene *ZNF384* (vedi paragrafo dedicato ai riarrangiamenti rari) e l'inv(19)(p13q13) che coinvolge *TFPT* in LAL-B pediatriche [39].

IKZF1/7p12

Il fattore di trascrizione *IKZF1* è coinvolto sia in delezioni che in mutazioni. Le delezioni di *IKZF1* e le mutazioni dominanti negative (delezioni esoni 4-7 con produzione dell'isoforma IK6) sono state riportate, per la prima volta, in circa il 30% delle LAL-B pediatriche, e identificano un sottogruppo con profilo di espressione genica sovrapponibile a quello delle LAL-B Ph-positive [40,41]. Tali delezioni sono frequentemente associate al cromosoma Filadelfia (>60% dei casi) o alla presenza di riarrangiamenti e/o mutazioni tipici delle LAL-B Filadelfia-like. Le delezioni di *IKZF1* sono un marcatore prognostico altamente sfavorevole, predittivo di scarsa risposta alla chemioterapia, e persistenza di malattia minima residua; tale impatto prognostico è conservato nelle LAL-B Filadelfia positive e Filadelfia-like, anche se trattate con inibitori tirosin-chinasici [31,40,42,43].

Il gene *IKZF1* è anche interessato da una mutazione puntiforme, la N159Y, localizzata al sito di legame per il DNA, nella regione zinc finger dell'estremità n-terminale, che provoca una deregolazione del gene e una delocalizzazione della proteina subcellulare [43]. La mutazione puntiforme N159Y, in eterozigosi, definisce uno specifico sottogruppo di LAL-B (0.2-0.5% dei casi sia nei bambini che negli adulti), rispetto agli altri tipi di mutazione di *IKZF1*. Mutazioni di IKZF1 possono essere presenti come unica anomalia genetica o essere associate a trisomia del cromosoma 21 [20,44].

Mutazioni di *IKZF1* germinali danno ragione di leucemie linfoblastiche familiari e dello 0,9% di presunte LAL sporadiche [45].

PAX5/9p13

Il gene PAX5, un fattore di trascrizione cruciale nel processo di differenziazione dei linfociti B, va incontro a un'ampia gamma di anomalie genetiche, che definiscono due distinti sottogruppi, come mostrato da studi di RNAseq in una casistica di pazienti pediatrici [20]. Il primo sottogruppo è caratterizzato dalla mutazione puntiforme *PAX5*P80R, il secondo dalle "alterazioni di *PAX5*" che includono delezioni/amplificazioni e i geni di fusione [20,46]. Le fusioni di *PAX5* sono rare (~2% nelle forme pediatriche), coinvolgono almeno 24 partner differenti (Figura 4A), e in genere producono una proteina tronca. La fusione più comune è quella con il fattore di trascrizione *ETV6*, che si origina dal dic(9;12)(p13;p13) [47]. Mentre le traslocazioni d *PAX5* sono generalmente isolate, a suggerire che si tratterebbe di un evento leucemico precoce, altre alterazioni di gene *PAX5* sono più frequenti in cariotipi complessi e/o in associazione a traslocazioni ricorrenti. *PAX5* risulta deleto in circa il 60% dei casi con del(9p) [46]. Le delezioni di *PAX5*, insieme alle delezioni di *CDKN2A*, e di *IKZF1*, concorrono a definire il sottogruppo a prognosi estremamente sfavorevole "*IKZF1*-plus", descritto nel 2018 dal gruppo AIEOP-BFM [42]. Nel sottogruppo delle "alterazioni di *PAX5*" sono comprese anche le amplificazioni intrageniche (<1% nelle forme pediatriche) che sembrerebbero associate ad un'alta incidenza di recidive [48].

La mutazione PAX5P80R è spesso associata a inattivazione dell'allele wild type (delezione o mutazione frame-shift), con conseguente completa inattivazione del gene, e alterazioni di vie di trasduzione del segnale, in particolare a carico di membri della via di *RAS e JAK/STAT, FLT3, e PIK3CA*. È stata proposta la definizione di gruppo "*PAX5*-plus" per questo sottogruppo di LAL-B, che corrisponde a uno specifico profilo di espressione genica [44]. La sua incidenza aumenta con l'età (0.4% nei bambini e circa il 4% negli adulti) e sembra caratterizzato da prognosi intermedia/favorevole [7,49].

Una mutazione germinale (p.G183S) è stata identificata in LAL familiari con pattern ereditario autosomico dominante [50].

Aneuploidie

Aneuploide è un numero di cromosomi che si discosta dalla diploidia [46] per la perdita (ipodiploidie) o l'acquisto (iperdiploidie) di interi cromosomi.

Nelle LAL queste anomalie numeriche hanno assunto un rilievo tassonomico, costituendo circa il 25% dei casi nei bambini, più rare negli adulti, con implicazioni sia clinico-prognostiche che patogenetiche (Figura 2).

Ipodiploidie. Sulla base del numero dei cromosomi si distinguono tre sottogruppi:

- quasi aploide *(near haploid)* 24-31 cromosomi
- ipodiploide a numero basso *(low hypodiploid)* 32-39
- ipodiploide a numero alto *(high hypodiploid)* 40-44

Mentre la terza categoria contiene un gruppo di leucemie clinicamente e biologicamente eterogeneo, i primi due identificano sottogruppi specifici caratterizzati da un profilo genomico tipico e un preciso impatto clinico [51,52].

La leucemia *near-haploid* è praticamente osservata solo nei bambini e conferisce una prognosi particolarmente sfavorevole. Solo i cromosomi X,Y,8,10,14,18 e 21 restano diploidi in uno scenario di monosomie a carico di tutti gli altri componenti del cariotipo. Il profilo trascrizionale vede tipicamente alterati il sistema del segnale di RAS, recettori tirosinchinasici e IKZF3 (Aiolos). Anomalie genetiche criptiche coinvolgono *NF1, CREBBP*, il cluster istonico sul 6p22, *PAG1 e CDKN2A/2B*.

L'incidenza del sottotipo *low-hypodiploid* aumenta con l'età ed è presente in circa il 3-4% delle LAL dell'adulto. I cromosomi disomici nel cariotipo *low-hypodiploid* sono: X, Y, 1, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 18, 19, 21, e 22. La prognosi è sfavorevole, con una sopravvivenza riportata a 5 anni inferiore al 30% sia negli adulti che nei bambini. Il profilo mutazionale in oltre il 90% dei casi vede il coinvolgimento di *TP53* per lo più di natura ereditaria, sì da identificare la leucemia come una delle manifestazioni della sindrome di Li-Fraumeni. In quanto membri di famiglie Li-Fraumeni, inoltre, questi bambini hanno un maggiore rischio di sviluppare un secondo tumore rispetto alle altre LAL ipodiploidi [53]. Alla *TP53* si associa il coinvolgimento di *RB1*. Inoltre *IKZF2* (Helios) è mutato in circa il 50% dei casi.

Un fenomeno biologico da non sottovalutare nella diagnosi di precisione è la tendenza delle leucemie ipodiploidi alla formazione di subcloni iperdiploidi per un fenomeno di duplicazione cromosomica. In questi casi si osserva un cariotipo vicino alla triploidia

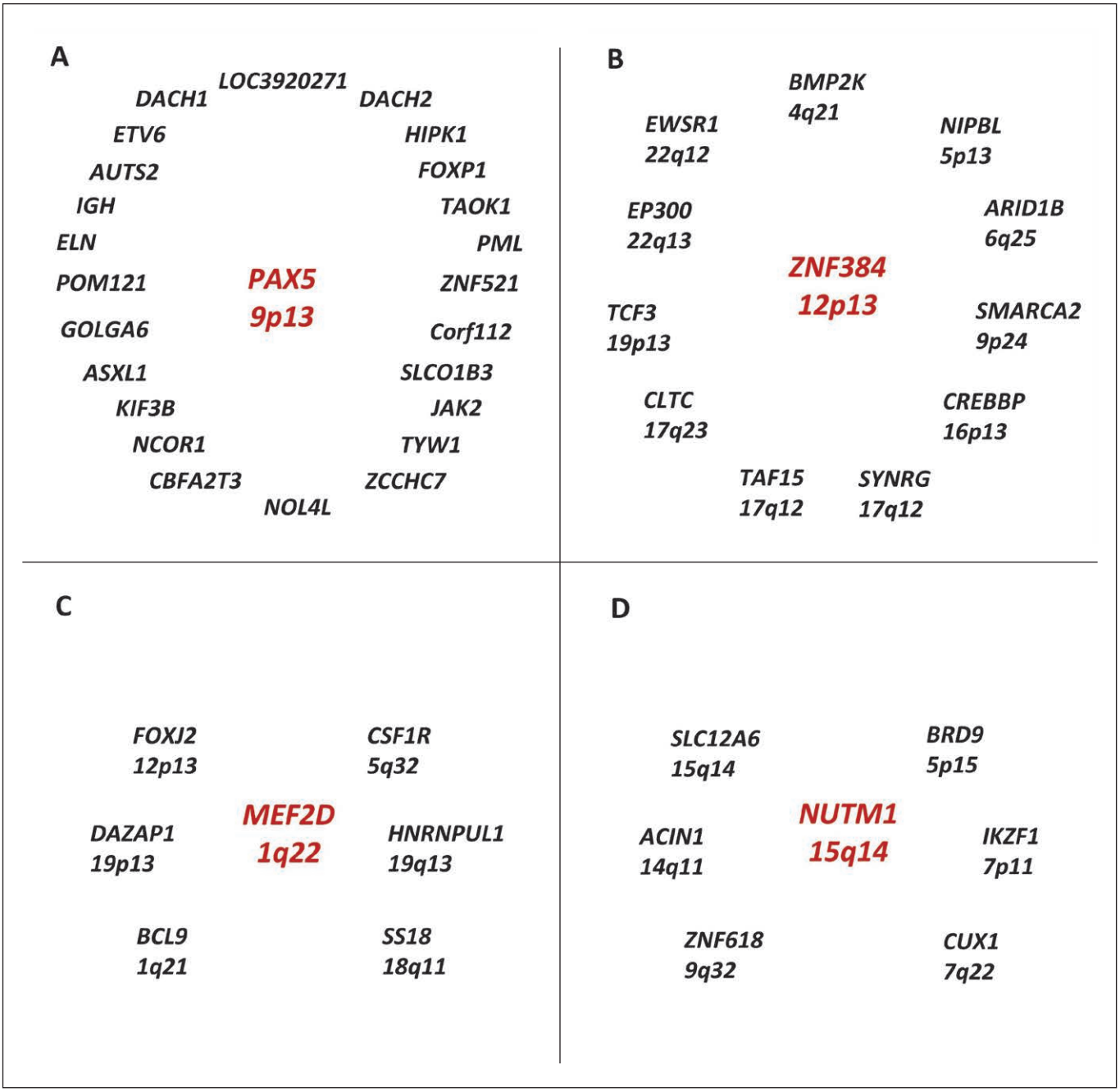


Figura 4 *- I geni promiscui PAX5 (A), ZNF384 (B), MEF2D (C), e NUTM1 (D) e i rispettivi partners di riarrangiamento*

(pseudo-iperdiploidia). La ricerca dell'originario clone ipodiploide è quindi molto importante per la stratificazione prognostica [54-56].
Le iperdiploidie sono di gran lunga più frequenti nelle LAL del bambino, in particolare il cariotipo con 50-59 cromosomi è praticamente esclusivo dell'età pediatrica. I casi iperdiploidi con >50 cromosomi a confronto di quelli con 47-50 cromosomi hanno mostrato una migliore sopravvivenza fin dai primi studi di citogenetica [57], in particolare il sottogruppo a iperdiploidia elevata (HeH, *High Hyperdiploid*) che è definito da un numero di cromosomi compreso tra 51 e 65- 67 [58,59]. Nei bambini dà ragione del 25-35% delle LAL con prognosi favorevole, mentre nell'adulto è molto meno comune e interessa circa il 13% dei casi, sostenendo una migliore prognosi nell'ambito dei casi Ph-negativi [58,60]. La prognosi favorevole si correla con la presenza in sovrannumero dei cromosomi X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, e 21; in particolare la presenza simultanea di trisomie 4, 10 e 17 sarebbe di particolare significato nel bambino, mentre nell'adulto sembra significativa solo la trisomia 4 [61]. Nell'adulto peraltro una trisomia 20 modificherebbe la prognosi in senso avverso. Non viene compreso in questo sottogruppo un numero modale vicino alla tetraploidia che è geneticamente distinto per la presenza, nella maggior parte dei casi, della t(12,21)/*ETV6-RUNX1*. Raramente si associano le traslocazioni tipiche delle LAL

(*BCR-ABL1; TCF3-PBX1; ETV6-RUNX1*) che, quando presenti, sono determinanti per la prognosi. Il cariotipo può altresì mostrare riarrangiamenti strutturali sbilanciati, il più frequente è un braccio lungo del cromosoma 1 (1q) addizionale nel 10-15% dei casi. Lo scenario mutazionale vede il coinvolgimento di quattro geni mutualmente esclusivi: *FLT3, K- e N-RAS e PTPN11*, che convergono nella via del segnale RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*)-RAS. La trisomia 21 costituzionale aumenta il rischio di questa LAL che tuttavia presenta caratteristiche identiche nei bambini Down e non-Down. Predisposizione genetica a questo sottotipo di LAL è riportata anche in casi con sindrome di Noonan, una RASopathy dovuta a mutazioni di *PTPN11* [62] e rare mutazioni di *ETV6* [63]. L'applicazione sistematica di NGS sta rivelando numerose varianti germinali nei bambini con iperdiploidia, fino al 15% dei casi [64].

Alterazioni ricorrenti rare

In questo paragrafo illustreremo alcune anomalie rare, ma ricorrenti, che si riscontrano in circa la metà dei casi di LAL-B pediatriche in cui non siano presenti le traslocazioni ricorrenti maggiori, e che identificano specifici sottogruppi genetici [65].

ZNF384/12p13

Nel 2002, per la prima volta il nostro gruppo ha descritto traslocazioni cromosomiche ricorrenti a carico del gene *ZNF384* in un sottogruppo di LAL-B caratterizzate da co-espressione degli antigeni mieloidi CD13/CD33 e assenza o debole espressione di CD10 [66,67]. Dopo le prime segnalazioni è stato definitivamente dimostrato che le fusioni di *ZNF384*, con almeno 11 diversi partners (Figura 4B), identificano uno specifico sottogruppo di LAL-B, sono mutualmente esclusive con le maggiori traslocazioni ricorrenti, e si riscontrano nel 4-5% dei pazienti pediatrici e 5-10% degli adulti [7,68]. Da sottolineare che i riarrangiamenti di *ZNF384* caratterizzano anche un sottogruppo di leucemie a fenotipo misto mieloide/B [69].
Profili di espressione genica hanno identificato due rare fusioni del fattore di trascrizione *ZNF362*, in particolare *SMARCA2-ZNF362 e TAF15-ZNF362*, in casi che appartenevano al sottogruppo e *ZNF384* positivi [44]. Tra le fusioni di *ZNF384* e di *ZNF362* ci sono molte omologie che spiegano la sovrapposizione dei casi in termini di profilo di espressione genica: i due fattori di trascrizione appartengono alla stessa famiglia zinc finger C2-H2, i punti di rottura sono simili e il dominio zinc finger è ritenuto in tutte le fusioni, infine condividono anche i partners delle traslocazioni.

MEF2D/1q22

La prima descrizione di una traslocazione, la t(1;9)(q22;p13), con riarrangiamento di *MEF2D* e *DAZAP1* è stata fatta in una linea cellulare stabilizzata da una LAL-B pediatrica [70]. Ad oggi sono state descritte 6 diverse fusioni in-frame di *MEF2D*, di cui la più frequente è la *MEF2D-BCL9* che deriva da un riarrangiamento intra-cromosomico, in quanto entrambi i geni mappano alla banda 1q21.2-22 [71,72]. Gli altri partners sono: *CSF1R, DAZAP1, FOXJ2, HNRNPUL1, e SS18* (Figura 4C). Le fusioni di *MEF2D* sono spesso caratterizzate da sbilanciamenti genomici in corrispondenza dei punti di rottura, causano un incremento dell'attività trascrizionale del gene, e definiscono uno specifico profilo di espressione genica [71]. Dal punto di vista clinico-ematologico si associano a un distinto immuno-fenotipo dei blasti leucemici (espressione di CD38 e bassa o assente espressione di CD10) e a una prognosi severa; l'incidenza è di circa il 6% negli adulti e il 3% dei bambini (età mediana di insorgenza: 14 anni; range: 4-48) (Figura 2) [71].

Riarrangiamenti di *DUX4*/4q35 e la delezione di *ERG*/21q22

I riarrangiamenti di *DUX4* identificano un sottogruppo di LAL-B, sia pediatriche (4%) che adulte, contraddistinto da uno specifico profilo di espressione genica, immuno-fenotipo (espressione degli antigeni CD2 e CD371), e prognosi particolarmente favorevole [7,65]. Studi di genomica hanno mostrato che il 50-70% di queste LAL-B presenta una concomitante delezione intragenica di *ERG*, anomalia che non si ritrova associata con altre traslocazioni ricorrenti nelle LAL-B. *ERG*, inoltre, è uno dei fattori trascrizionali direttamente controllati da *DUX4* che, quando riarrangiato, determina l'espressione di una nuova isoforma di *ERG*, con capacità dominante negativa nei confronti dell'allele wild-type [73]. Pertanto, la iper-espressione di *DUX4* accompagnata all'inattivazione di *ERG*, sono le caratteristiche genetiche peculiari di questo sottogruppo di LAL-B.
Un'altra delezione frequente nelle LAL-B con riarrangiamento di *DUX4*, è quella di *IKZF1*, che in questo contesto, non ha un significato prognostico sfavorevole. I riarrangiamenti di *DUX4* sono criptici alla citogenetica convenzionale, sia perché il gene mappa all'interno di sequenze ripetute *D4Z4* nelle regioni subtelomeriche del braccio lungo del cromosoma 4 e 10, sia perché si tratta di piccole inserzioni geniche, che nella maggior parte dei casi si verificano a livello del locus delle *IGH*, mentre più raramente possono coinvolgere una regione intronica di *ERG* [65,72,73].

NUTM1/15q14

Il gene *NUTM1* codifica per un regolatore della cromatina che recluta *EP300* determinando l'acetilazione istonica. Le fusioni del gene *NUTM1*, con 6 partner genici (*ACIN1, BRD9, CUX1, IKZF1, SLC12A6, ZNF618*) (Figura 4D), sono state recentemente identificate in LAL-B pediatriche (1-2%) e infantili (2/7 studiati) che non presentavano le alterazioni citogenetico-molecolari ricorrenti principali [20,74]. Tutte queste fusioni contengono il dominio *NUT* e sottendono alta espressione di *NUTM1*, che può essere anche rilevata a livello proteico con l'utilizzo di anticorpi specifici. Uno studio di trascrittomica condotto su 1223 casi di LAL-B, ha consentito di classificare le LAL-B in 14 distinti sottogruppi, e ha mostrato un raggruppamento dei casi con fusioni di *NUTM1* (6 dei 9 casi) nel sottogruppo G14, caratterizzato da alta espressione dei geni *HOXA*, del regolatore del ciclo cellulare ZYG11A, attivazione della via di *NOTCH1*, e ipo-espressione dei geni che codificano per le proteine Hedgehog [44]. Malgrado il significato prognostico rimanga da definire, va segnalato che tutti i pazienti studiati erano in remissione e vivi a un follow-up mediano di 8.3 anni (intervallo: 4.8-13.8).

Classificazione genetica delle LAL a cellule T

Per quanto riguarda le LAL-T, la classificazione WHO non ha ancora introdotto le alterazioni genetiche tra i parametri biologici per l'identificazione di sottogruppi specifici.

Le LAL-T originano da un processo di trasformazione neoplastica multi-step e in cui il fenotipo è determinato dalle molteplici e concomitanti alterazioni che hanno luogo nella cellula neoplastica [75]. Numerosi oncogeni e oncosoppressori sono ricorrentemente coinvolti nelle LAL-T, ed estremamente eterogenei sono i meccanismi di de-regolazione genica che hanno luogo in queste leucemie. Tra i geni e i processi cellulari tipicamente si annoverano alterazioni genomiche e di espressione di (onco)geni che svolgono azione di fattori di trascrizione con un ruolo cruciale nel processo di linfopoiesi T e la cui deregolazione consente di identificare 6 sottogruppi biologici di LAL-T (*TAL/LMO, TLX1, TLX3, HOXA, NKX2-1/2-2, MEF2C*), che riflettono diversi stadi di differenziazione del timocita e che sono caratterizzati da uno specifico profilo di espressione genica (Figura 5) [75-77]. A tali anomalie citogenetico-molecolari si associano alterazioni a carico di geni che codificano per membri/modulatori di vie di trasduzione del segnale (*NOTCH1, PI3K/AKT, RAS/MEK/ERK, IL7R/JAK/STAT, Beta-catenina*), proteine ribosomiali (*RPL5, RPL10, RPL22*), fattori epigenetici (*PRC2* e proteine coinvolte nella metilazione del DNA).

LAL-T immature: i sottogruppi *HOXA e MEF2C*

Le LAL-T immature sono un distinto sottotipo che deriva dalle cellule timiche corticali più precoci. Rappresentano il 15-25% dei casi e si riscontrano sia in età pediatrica che adulta [4]. La diagnosi di LAL-T immatura si basa su criteri immunofenotipici. Oltre a soddisfare i criteri diagnostici (MPO <5%, positività dell'antigene CD7, e positività di cyCD3, e/o CD3), l'immuno-fenotipo deve mostrare espressione di almeno un marcatore mieloide o di staminalità (CD34, CD117, CD13, CD33, HLA-DR, CD11b, e/o CD65), assenza o parziale (<75%) espressione del CD5, e negatività di antigeni T-linfoidi delle fasi più avanzate di differenziazione (CD1a, CD4, CD8) (Figura 1) [4]. Il sottogruppo delle LAL-T immature è estremamente eterogeneo sul piano bio-molecolare. Sono stati identificati riarrangiamenti e mutazioni a carico di geni tipicamente coinvolti nelle leucemie acute mieloidi, insieme a geni che sono più specifici della leucemogenesi T [78].

Le LAL-T immature vengono considerate un sottogruppo a prognosi particolarmente sfavorevole anche se, nei bambini, i protocolli di trattamento adattati al rischio hanno determinato un notevole miglioramento della prognosi e della sopravvivenza che risulta, in alcuni studi clinici, sovrapponibile a quella degli altri sottotipi di LAL-T [79,80]. Tali risultati, ottenuti da alcuni gruppi nel trattamento delle forme pediatriche, non sono stati però validati da tutti gli studi nei pazienti adulti [80,81].

In circa la metà dei casi di LAL-T immature, è presente un riarrangiamento genomico che provoca la diretta o indiretta deregolazione genica del cluster dei geni *HOXA*/7p15. In primo luogo i geni *HOXA* possono essere deregolati a seguito di una inversione pericentrica del cromosoma 7, che ne provoca la giustapposizione alle sequenze regolatorie enhancer del *TRB@*. Altri riarrangiamenti citogenetici rari, che possono provocare la deregolazione trascrizionale dei geni *HOXA*, sono la t(1;7)(p15;q31)/*mir181-HOXA*, l'inv(7)(p15q21)/*CDK6-HOXA*, e la t(7;14)(p15;q32)/*IGH-HOXA* [77].

Nel sottogruppo di LAL-T con deregolazione di HOXA troviamo anche trascritti di fusione ricorrenti che coinvolgono i geni *MLLT10, KMT2A, NUP98, e NUP214*, che causano una iperespressione dei geni *HOXA* (Tabella 1). Questi quattro geni possono essere definiti promiscui, in quanto ricombinano con diversi partners cromosomici e genici. In tutti i trascritti di fusione, comunque, i geni partecipano sempre con gli stessi domini funzionali e quindi conferiscono alle diverse proteine di fusione caratteristiche comuni, sia per la presenza degli stessi domini del gene "critico" nella fusione, e sia per gli effetti di deregolazione trascrizionale dei geni bersaglio.

Una piccola percentuale di LAL-T immature, è invece caratterizzata dalla elevata espressione del fattore di trascrizione *MEF2C*/5q14,

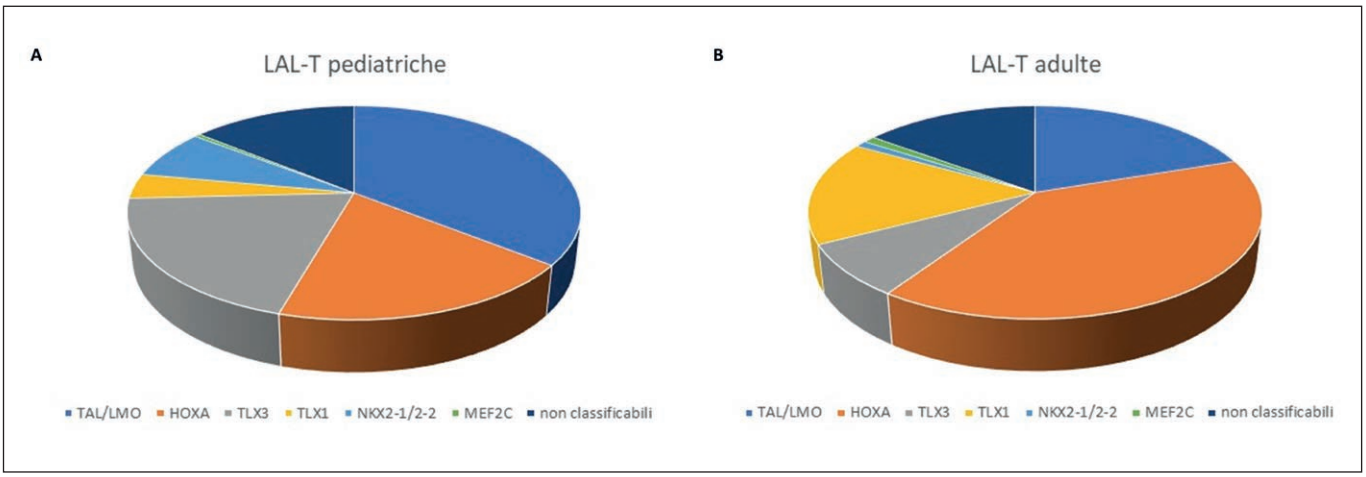


***Figura 5** - Distribuzione dei principali sottogruppi genetici nelle LAL-T pediatriche (pannello A) e dell'adulto (pannello B)*

HOXA subgroup	
MLLT10	33%
HOXA	29%
KMT2A	13%
NUP98	12%
NUP214	13%

***Tabella 1** - Geni i cui riarrangiamenti cromosomici provocano l'iper-espressione del cluster degli HOXA e relativa frequenza*

che può essere determinata da riarrangiamenti genomici che coinvolgono e attivano *MEF2C* o cofattori di *MEF2C* [82,83]. Infatti, le alterazioni associate alla iper-espressione di *MEF2C* sono piuttosto eterogenee, con delezioni del braccio lungo del cromosoma 5, fino alla banda q14, con punto di rottura immediatamente telomerico a *MEF2C*, o, in alternativa, riarrangiamenti genici come *BCL11B-NKX2-5, ETV6-NCOA2*, o riarrangiamenti di *SPI.1* [77,82].

LAL-T corticali: i sottogruppi *TLX1, NKX2-1/2-2, e TLX3*

Il gene *TLX1*/10q24 è tipicamente coinvolto in due traslocazioni cromosomiche, t(7;10)(q34;q24)e t(10;14)(q24;q11), che rispettivamente lo giustappongono al *TRB@*/7q34 e *TRAD@*/14q11, provocandone l'iper-espressione.

L'iper-espressione dei fattori di trascrizione *NKX2-1*/14q13 o *NKX2-2*/20p11, riscontrabile in circa il 10% delle T-ALL, può essere determinata sia dai riarrangiamenti genomici dei due geni, che dalla traslocazione t(6;7)(q23;q34)/*TRB@-MYB*.

È interessante sottolineare una distribuzione per età dei due sottogruppi genetici *TLX1 e NKX2-1/2-2*: il primo è significativamente associato all'età adulta mentre il secondo si riscontra quasi esclusivamente in soggetti pediatrici [76,77].

Mentre le traslocazioni di *TLX1* sono sempre associate a LAL-T CD1a positive (sottotipo corticale), e analogamente i riarrangiamenti di *NKX2-1/2-2*, sono largamente prevalenti nelle LAL-T corticali, questa correlazione non è esclusiva per quanto riguarda *TLX3*/5q35 che va incontro a varie traslocazioni cromosomiche di cui la più frequente, la t(5;14)(q35;q32), provoca la giustapposizione di *TLX3* alle sequenze regolatorie di *BCL11B*. Alternativamente, *TLX3* può essere coinvolto in una traslocazione t(5;7)(q35;q21), in cui riarrangia con *CDK6*. Le traslocazioni di *TLX3* sono più frequenti nelle forme pediatriche, in cui rappresentano circa il 15% dei casi [77].

LAL-T mature: il sottogruppo *TAL/LMO*

Le anomalie genomiche che determinano l'iper-espressione dei geni *TAL* e *LMO* sono quelle più frequentemente riscontrabili nei sottogruppi di LAL-T a fenotipo differenziato, sottotipi maturo (CD3 positive) e corticale (CD1a positivo).

I geni delle famiglie *TAL* e *LMO* codificano per fattori di trascrizione, che sono membri dello stesso complesso trascrizionale. Nelle LAL-T, i geni ricorrentemente coinvolti sono *TAL1*/1p33, *TAL2*/9q31, *LMO1*/11p15, *LMO2*/11p13, e seppur raramente anche *LMO3*/12p12 (Tabella 2) [77]. Le alterazioni più frequenti coinvolgono *TAL1*, che può partecipare a una fusione con il gene *SIL, SIL-TAL1*, che origina da una delezione criptica di circa 60Kb che avviene a livello della banda 1p33, e che si riscontra in approssimativamente il 25% dei casi [75]. Alternativamente, *TAL1* viene attivato da mutazioni geniche in sequenze non-codificanti, a circa 8Kb a monte del promotore di *TAL1*, e che trasformano la regione in un super-enhancer (~5% dei casi) [84]. Molto rare sono le traslocazioni cromosomiche che giustappongono *TAL1* al *TRB@* o al *TRAD@* [75]

I geni *LMO1* e *LMO2* sono coinvolti in traslocazioni cromosomiche con i loci dei *TCR*, rispettivamente nell'1% e 5-7% dei casi [75]. *LMO2*, però, può anche andare incontro a riarrangiamenti che non coinvolgono i *TCR* in circa il 3% delle LAL-T. Analogamente a quanto osservato per *TAL1*, mutazioni in sequenze non-codificanti, che creerebbero super-enhancers a monte dei promotori dei geni [85,86]. La traslocazione t(7;12)(q34;p13), che pone il *TRB@* in prossimità di *LMO3* è stata, ad oggi, descritta in 3 casi di LAL-T [77,87].

Deregolazione delle principali vie di trasduzione del segnale

La via *JAK/STAT* e la resistenza gli steroidi e alla chemioterapia

La via *JAK/STAT* è costitutivamente attiva nel 20-30% delle LAL-T [76], come conseguenza di diverse alterazioni citogenetiche e/o molecolari sia a carico di membri della via (*JAK3, JAK1, IL7R, STAT5B, SH2B3, FLT3, IL2RB*), che di fattori che ne modulano l'attività (*PTPN2, DNM2, PTPRD, PTPRC*). Le alterazioni a carico della via *JAK/STAT* hanno effetti anti-apoptotici e aumentano la proliferazione cellulare. Il coinvolgimento di questa via di trasduzione del segnale correla con la presenza di anomalie a carico di geni che codificano per modulatori epigenetici come

TAL/LMO subgroup	
TAL1	55%
TAL2	8%
LMO1	6%
LMO2	22%
LMO3	2%
TAL1+LMO2	6%
TAL1+LMO1	1%

***Tabella 2** - Membri del complesso trascrizionale TAL/LMO tipicamente riarrangiati nelle LAL-T e relativa frequenza*

PHF6, WT1 e/o i membri del complesso *PRC2* [88] e con i sottogruppi genetici *TLX3*, e *HOXA* [76,77] e significativamente associate con le forme immature [75,78]. Studi pre-clinici e studi condotti su pazienti hanno documentato una correlazione tra alterazioni della via *JAK/STAT* e la resistenza agli steroidi e alla chemioterapia convenzionale, e ne hanno suggerito un significato prognostico sfavorevole [89-92]. Tali LAL-T non sembrano beneficiare nemmeno di procedure trapiantologiche [93].
Studi pre-clinici hanno concentrato l'attenzione su *JAK/STAT* come potenziale bersaglio terapeutico nelle LAL-T e hanno dimostrato come un inibitore dei geni JAK, il ruxolitinib, eserciti un effetto anti-leucemico in modelli di xenotrapianto [94]. Inoltre, poichè l'oncogene *PIM1* è uno dei principali bersagli di *JAK/STAT* [95,96], è stata indagata la possibilità di utilizzare inibitori di *PIM1* nelle LAL-T con attivazione della via *JAK/STAT* [95,97,98].

La via PI3K/AKT/mTOR è predittiva di prognosi severa

L'attivazione della via *PI3K/AKT* si riscontra in circa il 15-20% delle LAL-T del bambino e dell'adulto e può essere causata da varie anomalie citogenetiche e/o molecolari sia a carico di proteine del pathway (mutazioni di *PIK3R1, PIK3C, PIK3D, AKT* nel 2-5% dei casi) che di modulatori negativi della medesima (mutazioni e/o delezioni di *PTEN* nel 14-18% dei casi) [99]. Queste alterazioni sono più frequenti nelle LAL-T che appartengono al sottogruppo *TAL/LMO* e sembrano correlate a prognosi severa. In particolare, mentre la delezione del gene *PTEN* determina una riduzione significativa della sopravvivenza globale e libera da malattia, le mutazioni non sembrerebbero avere lo stesso impatto prognostico [100-102].

La via di RAS e delle MAPK nelle LAL-T immature

Mutazioni a carico dei geni *HRAS* e *KRAS*, nelle regioni hot-spot codificate dagli esoni 2 e 3, si riscontrano nel 10-15% delle LAL-T, con particolare prevalenza nelle forme immature [76,78,103,104]. Uno studio retrospettivo condotto su una coorte di pazienti pediatrici ha dimostrato che le mutazioni di *H-* e *K-RAS* sono marcatori prognostici negativi che, in combinazione con la determinazione della Malattia Minima Residua (MMR), possono migliorare l'assegnazione del gruppo di rischio dei pazienti [105]. L'attivazione della via di RAS sottende anche alla perdita di *NF1*, il principale modulatore negativo. Delezioni criptiche, e in minor misura mutazioni inattivanti, di *NF1* sono riscontrabili in circa il 3% delle LAL-T [106].

Delezione di *CDKN2AB*/9p21 nelle LAL-B e -T

Le delezioni, mono- e/o bi-alleliche dell'oncosoppressore *CDKN2A* e/o *CDKN2B*, per la prima volta descritte come anomalia ricorrente nelle LAL nel 1994 [107], si riscontrano in circa il 20-30% delle forme B e 50-60% delle forme T [77,108]. Le delezioni di *CDKN2AB* sono considerate eventi secondari nel processo di leucemogenesi [14], tipicamente associate ad anomalie genetiche definite primarie o precoci perché determinanti per la trasformazione e il mantenimento della leucemia, in quanto provocano la deregolazione di oncogeni/fattori di trascrizione coinvolti nel processo di differenziamento linfoide B o T [75,108]. Infatti, l'inattivazione/aploinsufficienza di *CDKN2AB*, provocando la perdita di controllo del ciclo cellulare, gioca un ruolo fondamentale nel promuovere la progressione della leucemia.
La distribuzione delle delezioni di *CDKN2AB* correla con caratteristiche cliniche, ematologiche, immunofenotipiche e citogenetico-molecolari della LAL. Nelle LAL-B, le delezioni di *CDKN2AB* sono particolarmente frequenti nei bambini di età superiore a 10 anni, nei casi con una conta dei globuli bianchi >50x10^9/l, e in presenza di traslocazione t(9;22)(q34;q11) o t(1;19)(q23;p13). Nell'ambito delle LAL-T, si ha una distribuzione legata al fenotipo leucemico, con un'incidenza del 30% nelle forme immature (Early T-cell Precursor ALL) e del 60-70% nelle forme pre-T, corticali e mature [76,77]. In accordo con i sottogruppi genetici principali, nelle LAL-T si osserva una incidenza progressivamente crescente dal sottogruppo HOXA (~40%), al *TAL/LMO* e *NKX2-1/2-2* (~75%), e *TLX1* e *TLX3* (>80%) [77,108].
Non sono ad oggi disponibili studi in cui sia stato definitivamente stabilito il ruolo prognostico delle delezioni di *CDKN2AB* in quanto la loro associazione con diverse alterazioni citogenetico-molecolari, alcune delle quali con ben definito significato prognostico, renderebbe necessari studi su ampie casistiche e analisi multivariate [108]. È comunque da sottolineare che nelle LAL-B, quando la delezione di *CDKN2AB* è presente contestualmente con la delezione di *IKZF1* e *PAX5*, identifica un sottogruppo di LAL-B ad alto rischio, le cosiddette "*IKZF1^{plus}*" [42]. Nelle LAL-T, invece, le delezioni di *CDKN2AB* sembrano predire una prognosi relativamente buona nelle forme corticali e mature [77,104] Inoltre, la combinazione dello studio della delezione di *CDKN2AB* con la determinazione della MMR consentirebbe di identificare un sottogruppo di pazienti a prognosi particolarmente favorevole [109].
Il gene *CDKN2A* è anche stato correlato alla predisposizione germinale di sviluppare LAL a cellule B nei bambini. Numerosi studi hanno dimostrato che alcuni polimorfismi di *CDKN2A* (rs3731217 e rs77728904) sono associati ad un rischio significativamente elevato di sviluppo di LAL-B sia in soggetti affetti da Sindrome di Down (rs3731249) [110] che in soggetti non-Down [111,112].

Conclusioni e Prospettive

Nonostante l'impiego clinico delle informazioni citogenetico-molecolari abbia permesso di sviluppare e arricchire in maniera significativa la classificazione diagnostica attuale, nonché la stratificazione prognostica delle LAL-B, ci si attende che numerosi perfezionamenti clinico-biologici, nonché terapeutici, soprattutto per ciò che attiene le lesioni rare, anche in relazione alla malattia residua minima e alle nuove molecole bersaglio, contribuiranno alla migliore gestione clinica di queste leucemie.
Nel versante delle LAL-T, per le quali non esiste ancora una classificazione diagnostica su base citogenetico-molecolare validata dalla WHO, sembrano delinearsi criteri precisi per l'identificazione di entità clinico-biologiche con impatto prognostico e verosimilmente terapeutico.

Bibliografia

1. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2013;381(9881):1943-55.
2. Vitale A, Guarini A, Chiaretti S, et al. The changing scene of adult acute lymphoblastic leukemia. Curr Opin Oncol 2006;18(6):652-9.
3. Bene MC, Castoldi G, Knapp E, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 1995;9(10):1783-6.
4. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. Lancet Oncol 2009;10(2):147-56.
5. Romana SP, Coniat M Le, Berger R. t(12;21): A new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. Genes, Chromosom Cancer 1994;9(3):186-91.
6. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(11):4917-21.
7. Mullighan CG. How advanced are we in targeting novel subtypes of ALL? Best Pract Res Clin Haematol 2019;32(4):101095.
8. Wiemels J, Cazzaniga G, Daniotti M, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. Lancet 1999;354(9189):1499-1503.
9. Schäfer D, Olsen M, Lähnemann D, et al. Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. Blood 2018;131(7):821-6.
10. Lilljebjörn H, Henningsson R, Hyrenius-Wittsten A, et al. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. Nat Commun 2016;7(1):11790.
11. Zaliova M, Kotrova M, Bresolin S, et al. ETV6/RUNX1 -like acute lymphoblastic leukemia: A novel B-cell precursor leukemia subtype associated with the CD27/CD44 immunophenotype. Genes, Chromosom Cancer 2017;56(8):608-16.
12. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. Leukemia 2018;32(2):273-84.
13. Winters AC, Bernt KM. MLL-Rearranged Leukemias—An Update on Science and Clinical Approaches. Front Pediatr 2017;5:4.
14. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2016;101(4):407-16.
15. Lafage-Pochitaloff M, Baranger L, Hunault M, et al. Impact of cytogenetic abnormalities in adults with Ph-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 2017;130(16):1832-44.
16. Jeffries SJ, Jones L, Harrison CJ, et al. IGH@ translocations co-exist with other primary rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2014;99(8):1334-42.
17. Russell LJ, Akasaka T, Majid A, et al. t(6;14)(p22;q32): a new recurrent IGH@ translocation involving ID4 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Blood 2008;111(1):387-91.
18. Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, et al. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Blood 2007;109(8):3451-61.
19. Chapiro E, Radford-Weiss I, Cung H-A, et al. Chromosomal translocations involving the IGH@ locus in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: 29 new cases and a review of the literature. Cancer Genet 2013;206(5):162-73.
20. Gu Z, Churchman ML, Roberts KG, et al. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 2019;51(2):296-307.
21. Iacobucci I, Ferrari A, Lonetti A, et al. CDKN2A/B Alterations Impair Prognosis in Adult BCR-ABL1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. Clin Cancer Res 2011;17(23):7413-23.
22. Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, et al. IKZF1 (Ikaros) Deletions in BCR-ABL1 -Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Are Associated With Short Disease-Free Survival and High Rate of Cumulative Incidence of Relapse: A GIMEMA AL WP Report. J Clin Oncol 2009;27(31):5202-7.
23. Soverini S, Bassan R, Lion T. Treatment and monitoring of Philadelphia chromosome-positive leukemia patients: recent advances and remaining challenges. J Hematol Oncol 2019;12(1):39.
24. Ottmann OG, Wassmann B, Pfeifer H, et al. Imatinib compared with chemotherapy as front-line treatment of elderly patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL). Cancer 2007;109(10):2068-76.
25. Vignetti M, Fazi P, Cimino G, et al. Imatinib plus steroids induces complete remissions and prolonged survival in elderly Philadelphia chromosome-positive patients with acute lymphoblastic leukemia without additional chemotherapy: results of the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) LAL0201-B protocol. Blood 2007;109(9):3676-8.
26. Foà R, Vitale A, Vignetti M, et al. Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Blood 2011;118(25):6521-8.
27. Nicolini FE, Basak GW, Kim D-W, et al. Overall survival with ponatinib versus allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive leukemias with the T315I mutation. Cancer 2017;123(15):2875-80.
28. Soverini S, De Benedittis C, Papayannidis C, et al. Drug resistance and BCR-ABL kinase domain mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia from the imatinib to the second-generation tyrosine kinase inhibitor era: The main changes are in the type of mutations, but not in the frequency of mutation involvement. Cancer 2014;120(7):1002-9.
29. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, et al. Genetic Alterations Activating Kinase and Cytokine Receptor Signaling in High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Cell 2012;22(2):153-66.
30. Herold T, Baldus CD, Gökbuget N. Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia in Older Adults. N Engl J Med 2014;371(23):2235.
31. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, et al. Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med 2014;371(11):1005-15.
32. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, et al. High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. J Clin Oncol 2017;35(4):394-401.
33. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. Blood 2017;130(19):2064-72.
34. Roberts KG, Yang YL, Payne-Turner D, et al. Oncogenic role and therapeutic targeting of ABL-class and JAK-STAT activating kinase alterations in Ph-like ALL. Blood Adv 2017;1(20):1657-71.
35. Moorman A V., Robinson H, Schwab C, et al. Risk-Directed Treatment Intensification Significantly Reduces the Risk of Relapse Among Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia and Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21: A Comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 Trials. J Clin Oncol 2013;31(27):3389-96.
36. Ryan SL, Matheson E, Grossmann V, et al. The role of the RAS pathway in iAMP21-ALL. Leukemia 2016;30(9):1824-31.
37. Harrison CJ, Schwab C. Constitutional abnormalities of chromosome 21 predispose to iAMP21-acute lymphoblastic leukaemia. Eur J Med Genet 2016;59(3):162-5.
38. Fischer U, Forster M, Rinaldi A, et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF–positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. Nat Genet 2015;47(9):1020-9.
39. Brambillasca F, Mosna G, Colombo M, et al. Identification of a novel molecular partner of the E2A gene in childhood leukemia. Leukemia 1999;13(3):369-75.
40. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. Nature 2008;453(7191):110-4.

41. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med 2009;360(5):470-80.
42. Stanulla M, Dagdan E, Zaliova M, et al. IKZF1 plus Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol 2018;36(12):1240-9.
43. Churchman ML, Low J, Qu C, et al. Efficacy of Retinoids in IKZF1-Mutated BCR-ABL1 Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Cell 2015;28(3):343-56.
44. Li J-F, Dai Y-T, Lilljebjörn H, et al. Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. Proc Natl Acad Sci U S A 2018;115(50):E11711-E11720.
45. Churchman ML, Qian M, te Kronnie G, et al. Germline Genetic IKZF1 Variation and Predisposition to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Cell 2018;33(5):937-948.e8.
46. Coyaud E, Struski S, Prade N, et al. Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: a Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique study. Blood 2010;115(15):3089-97.
47. Cazzaniga G, Daniotti M, Tosi S, et al. The paired box domain gene PAX5 is fused to ETV6/TEL in an acute lymphoblastic leukemia case. Cancer Res 200115;61(12):4666-70.
48. Schwab C, Nebral K, Chilton L, et al. Intragenic amplification of PAX5: a novel subgroup in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? Blood Adv 2017;1(19):1473-7.
49. Bastian L, Schroeder MP, Eckert C, et al. PAX5 biallelic genomic alterations define a novel subgroup of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2019;33(8):1895-1909.
50. Shah S, Schrader KA, Waanders E, et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 2013;45(10):1226-31.
51. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 2013;45(3):242-52.
52. Safavi S, Paulsson K. Near-haploid and low-hypodiploid acute lymphoblastic leukemia: two distinct subtypes with consistently poor prognosis. Blood 2017;129(4):420-3.
53. Qian M, Cao X, Devidas M, et al. TP53 Germline Variations Influence the Predisposition and Prognosis of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. J Clin Oncol 2018;36(6):591-9.
54. Mühlbacher V, Zenger M, Schnittger S, et al. Acute lymphoblastic leukemia with low hypodiploid/near triploid karyotype is a specific clinical entity and exhibits a very high TP53 mutation frequency of 93%. Genes, Chromosom Cancer 2014;53(6):524-36.
55. Charrin C. A report from the LALA-94 and LALA-SA groups on hypodiploidy with 30 to 39 chromosomes and near-triploidy: 2 possible expressions of a sole entity conferring poor prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Blood 2004;104(8):2444-51.
56. Carroll AJ, Shago M, Mikhail FM, et al. Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. Cancer Genet 2019;23862-8.
57. Williams D, Tsiatis A, Brodeur G, et al. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. Blood 1982;60(4):864-71.
58. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Genes, Chromosom Cancer 2009;48(8):637-60.
59. Moorman A V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. Blood Rev 2012;26(3):123-35.
60. Chilton L, Buck G, Harrison CJ, et al. High hyperdiploidy among adolescents and adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): cytogenetic features, clinical characteristics and outcome. Leukemia 2014;28(7):1511-8.
61. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. Leukemia 2005;19(5):734-40.
62. Cavé H, Caye A, Strullu M, et al. Acute lymphoblastic leukemia in the context of RASopathies. Eur J Med Genet 2016;59(3):173-8.
63. Moriyama T, Metzger ML, Wu G, et al. Germline genetic variation in ETV6 and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study. Lancet Oncol 2015;16(16):1659-66.
64. de Smith AJ, Lavoie G, Walsh KM, et al. Predisposing germline mutations in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in children. Genes, Chromosom Cancer 2019;58(10):723-30.
65. Lilljebjörn H, Fioretos T. New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 2017;130(12):1395-1401.
66. Martini A, La Starza R, Janssen H, et al. Recurrent rearrangement of the Ewing's sarcoma gene, EWSR1, or its homologue, TAF15, with the transcription factor CIZ/NMP4 in acute leukemia. Cancer Res 2002;62(19):5408-12.
67. La Starza R, Aventin A, Crescenzi B, et al. CIZ gene rearrangements in acute leukemia: report of a diagnostic FISH assay and clinical features of nine patients. Leukemia 2005;19(9):1696-9.
68. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, et al. ZNF384 -related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. Haematologica 2017;102(1):118-29.
69. Alexander TB, Gu Z, Iacobucci I, et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. Nature 2018;562(7727):373-9.
70. Yuki Y, Imoto I, Imaizumi M, et al. Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). Cancer Sci 2004;95(6):503-7.
71. Gu Z, Churchman M, Roberts K, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. Nat Commun 2016;7(1):13331.
72. Liu Y-F, Wang B-Y, Zhang W-N, et al. Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. EBioMedicine 2016;8:173-83.
73. Zhang J, McCastlain K, Yoshihara H, et al. Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 2016;48(12):1481-9.
74. Hormann FM, Hoogkamer AQ, Beverloo HB, et al. NUTM1 is a recurrent fusion gene partner in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia associated with increased expression of genes on chromosome band 10p12.31-12.2. Haematologica 2019;104(10):e455-e459.
75. Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. Nat Rev Cancer 2016;16(8):494-507.
76. Liu Y, Easton J, Shao Y, et al. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 2017;49(8):1211-8.
77. La Starza R, Pierini V, Pierini T, et al. Design of a Comprehensive Fluorescence in Situ Hybridization Assay for Genetic Classification of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. J Mol Diagnostics 2020;22(5):629-39.
78. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. Nature 2012;481(7380):157-63.
79. Patrick K, Wade R, Goulden N, et al. Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. Br J Haematol 2014;166(3):421-4.
80. Bond J, Graux C, Lhermitte L, et al. Early Response-Based Therapy Stratification Improves Survival in Adult Early Thymic Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: A Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Study. J Clin Oncol 2017;35(23):2683-91.
81. Jain N, Lamb A V., O'Brien S, et al. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (ETP-ALL/LBL) in adolescents and adults: a high-risk subtype. Blood 2016;127(15):1863-9.
82. Homminga I, Pieters R, Langerak AW, et al. Integrated Transcript and Genome Analyses Reveal NKX2-1 and MEF2C as Potential Oncogenes in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Cell 2011;19(4):484-97.

83. Zuurbier L, Gutierrez A, Mullighan CG, et al. Immature MEF2C-dysregulated T-cell leukemia patients have an early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia gene signature and typically have non-rearranged T-cell receptors. Haematologica 2014;99(1):94-102.

84. Mansour MR, Abraham BJ, Anders L, et al. Oncogene regulation. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. Science 2014;346(6215):1373-7.

85. Rahman S, Magnussen M, León TE, et al. Activation of the LMO2 oncogene through a somatically acquired neomorphic promoter in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 2017;129(24):3221-6.

86. Li Z, Abraham BJ, Berezovskaya A, et al. APOBEC signature mutation generates an oncogenic enhancer that drives LMO1 expression in T-ALL. Leukemia 2017;31(10):2057-64.

87. Simonis M, Klous P, Homminga I, et al. High-resolution identification of balanced and complex chromosomal rearrangements by 4C technology. Nat Methods 2009;6(11):837-42.

88. Vicente C, Schwab C, Broux M, et al. Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2015;100(10):1301-10.

89. Li Y, Buijs-Gladdines JGCAM, Canté-Barrett K, et al. IL-7 Receptor Mutations and Steroid Resistance in Pediatric T cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Genome Sequencing Study. PLOS Med 2016;13(12):e1002200.

90. Gianfelici V, Chiaretti S, Demeyer S, et al. RNA sequencing unravels the genetics of refractory/relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. Prognostic and therapeutic implications. Haematologica 2016;101(8):941-50.

91. Delgado-Martin C, Meyer LK, Huang BJ, et al. JAK/STAT pathway inhibition overcomes IL7-induced glucocorticoid resistance in a subset of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. Leukemia 2017;31(12):2568-76.

92. Meyer LK, Huang BJ, Delgado-Martin C, et al. Glucocorticoids paradoxically facilitate steroid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemias and thymocytes. J Clin Invest 2020;130(2):863-76.

93. Kim R, Boissel N, Touzart A, et al. Adult T-cell acute lymphoblastic leukemias with IL7R pathway mutations are slow-responders who do not benefit from allogeneic stem-cell transplantation. Leukemia 2020;34(7):1730-40.

94. Maude SL, Dolai S, Delgado-Martin C, et al. Efficacy of JAK/STAT pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. Blood 2015;125(11):1759-67.

95. Padi SKR, Luevano LA, An N, et al. Targeting the PIM protein kinases for the treatment of a T-cell acute lymphoblastic leukemia subset. Oncotarget 2017;8(18):30199-216.

96. La Starza R, Messina M, Gianfelici V, et al. High PIM1 expression is a biomarker of T-cell acute lymphoblastic leukemia with JAK/STAT activation or t(6;7)(p21;q34)/TRB@-PIM1 rearrangement. Leukemia;32(8):1807-10.

97. De Smedt R, Peirs S, Morscio J, et al. Pre-clinical evaluation of second generation PIM inhibitors for the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. Haematologica 2019;104(1):e17-e20.

98. De Smedt R, Morscio J, Reunes L, et al. Targeting cytokine- and therapy-induced PIM1 activation in preclinical models of T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood 2020;135(19):1685-95.

99. Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, et al. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 2009;114(3):647-50.

100. Tesio M, Trinquand A, Ballerini P, et al. Age-related clinical and biological features of PTEN abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Leukemia 2017;31(12):2594-600.

101. Larson Gedman A, Chen Q, Kugel Desmoulin S, et al. The impact of NOTCH1, FBW7 and PTEN mutations on prognosis and downstream signaling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. Leukemia 2009;23(8):1417-25.

102. Zuurbier L, Petricoin EF, Vuerhard MJ, et al. The significance of PTEN and AKT aberrations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2012;97(9):1405-13.

103. Bar-eli M, Ahuja H, Foti A, et al. N-RAS mutations in T-cell acute lymphocytic leukaemia: analysis by direct sequencing detects a novel mutation. Br J Haematol 1989;72(1):36-9.

104. Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, De Keersmaecker K, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 2013;122(1):74-82.

105. Petit A, Trinquand A, Chevret S, et al. Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 2018;131(3):289-300.

106. Balgobind BV, Van Vlierberghe P, van den Ouweland AMW, et al. Leukemia-associated NF1 inactivation in patients with pediatric T-ALL and AML lacking evidence for neurofibromatosis. Blood 2008;111(8):4322-8.

107. Hebert J, Cayuela J, Berkeley J, et al. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias [see comments]. Blood 1994;84(12):4038-44.

108. Sulong S, Moorman A V., Irving JAE, et al. A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups. Blood 2009;113(1):100-7.

109. Genescà E, Lazarenkov A, Morgades M, et al. Frequency and clinical impact of CDKN2A/ARF/CDKN2B gene deletions as assessed by in-depth genetic analyses in adult T cell acute lymphoblastic leukemia. J Hematol Oncol 2018;11(1):96.

110. Brown AL, de Smith AJ, Gant VU, et al. Inherited genetic susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. Blood 2019;134(15):1227-37.

111. Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, et al. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. Nat Genet 2010;42(6):492-4.

112. Hungate EA, Vora SR, Gamazon ER, et al. A variant at 9p21.3 functionally implicates CDKN2B in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia aetiology. Nat Commun 2016;7(1):10635.

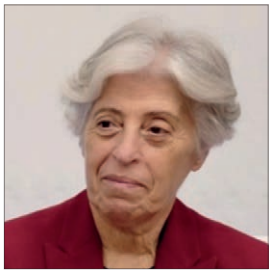
Parole Chiave

LAL-B, LAL-T, classificazione genetica.

Indirizzi per la corrispondenza

Cristina Mecucci
Laboratorio di Citogenetica e Medicina Molecolare
Sezione di Ematologia ed Immunologia Clinica
Centro Ricerche Emato-Oncologiche - Piano 1
Piazzale G. Menghini 9, 06132 Perugia
Tel. 075 5783808/3289 - Fax. 075 5783691
E-mail: cristina.mecucci@unipg.it

Leucemie acute mieloidi



Giorgina Specchia, Paola Carluccio, Francesco Albano

Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi - Sezione di Ematologia con Trapianto, Università degli studi di Bari, Bari

Introduzione

Le leucemie acute mieloidi (LAM) derivano dalla espansione clonale di progenitori mieloidi indifferenziati e sono caratterizzate da una elevata eterogeneità morfologica, citogenetico-molecolare e clinica. Le LAM rappresentano il 32% delle leucemie acute dell'adulto; la loro incidenza è di circa 2.5-3 casi per 100.000 abitanti per anno, l'età mediana alla diagnosi è di circa 65 anni, con un picco intorno a 80aa. La sopravvivenza a 5 anni nei soggetti di età inferiore a 65 anni, trattati con chemioterapia seguita dal trapianto allogenico, è circa il 50-70% mentre tale percentuale si riduce al 10% nei pazienti anziani non candidati a chemioterapie intensive [1-3].

Negli ultimi anni, grazie alle tecnologie innovative è stato rilevato che anomalie citogenetico-molecolari sono presenti in circa il 90% dei casi di LAM e questo spiegherebbe in parte l'eterogeneità della risposta terapeutica e dell'outcome clinico. L'analisi del pattern molecolare delle LAM ha inoltre contribuito a comprendere anche alcuni dei complessi meccanismi patogenetici della leucemogenesi; infatti numerosi pathway molecolari che controllano la proliferazione risultano deregolati insieme alla differenziazione, al self-renewal, al DNA-repair, alla stabilità della cromatina e al controllo del ciclo cellulare [4-7].

Le diverse classificazioni delle LAM a partire da quelle proposte dal gruppo Franco-Americano-Britannico (FAB) [8,9] fino alle Classificazioni della World Health Organization (WHO) [10-13] e le raccomandazioni dell'European LeukemiaNet (ELN) del 2017 [14] hanno in modo dinamico fornito importanti indicazioni sulla utilizzazione dei moderni criteri diagnostici in questo gruppo molto eterogeneo di patologie, contribuendo alla identificazione di diverse entità clinico biologiche con prognosi e outcome differenti e soprattutto consentendo l'impiego di strategie terapeutiche diversificate che includono i nuovi farmaci.

Obiettivo di questo manoscritto è quello di rivedere, alla luce anche della identificazione di nuovi markers molecolari, gli steps di una diagnostica integrata e aggiornata alle moderne tecnologie utilizzabili nella pratica clinica. Vengono illustrate infatti le valutazioni indispensabili, che includono quelle standard citomorfologiche, immunofenotipiche e citogenetiche, insieme alle indagini molecolari che negli ultimi anni hanno dato un contributo rilevante non solo alla classificazione WHO 2016 [12,13] e alla stratificazione prognostica, ma anche alla classificazione molecolare [6,15-17], alla ottimizzazione delle strategie terapeutiche e soprattutto all'impiego di terapie personalizzate con nuove molecole attive verso specifici targets molecolari. La mole di informazioni ottenute dalla integrazione delle moderne tecnologie diagnostiche rappresenta una grande sfida, ma anche l'unica strategia per utilizzare una terapia moderna personalizzata in ogni paziente con LAM.

Work-up diagnostico dinamico

Il work-up si basa su un approccio integrato dinamico che parte dall'analisi morfologica e che innesca i successivi step spesso paralleli e comunicanti, quali la caratterizzazione immunofenotipica e le analisi del cariotipo e molecolari (Figura 1 e Tabella 1).

La citomorfologia è il primo step indispensabile per la diagnostica delle patologie ematologiche; le prime classificazioni FAB [8,9] delle LAM hanno definito i criteri diagnostici morfologici e citochimici. Le anomalie morfologiche nucleari e citoplasmatiche consentono agli ematologi esperti di distinguere al microscopio ottico rapidamente le cellule normali e quindi di identificare le cellule anomale definite blasti, cellule di grandezza variabile con elevato rapporto

Indagini per definire la diagnosi
Conta differenziale sangue periferico
Agoaspirato midollare
Biopsia osteomidollare
Immunofenotipo
Citogenetica
Analisi molecolare: • screening per mutazioni NPM1, FLT3, CEBPA, RUNX1, TP53, ASXL1 • screening per riarrangiamenti genici PML-RARA, CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1

***Tabella 1** - Indagini diagnostiche nelle LAM*

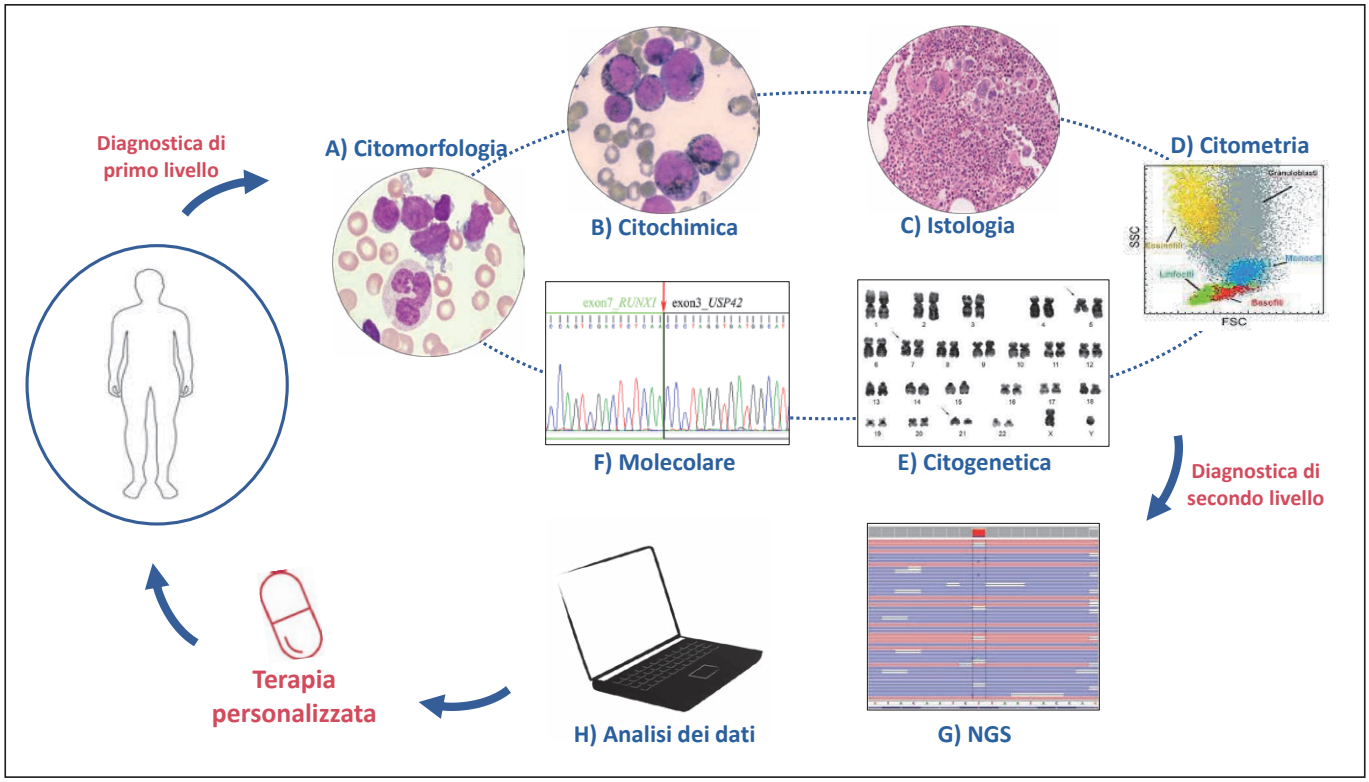


Figura 1 - Workup diagnostico dinamico

nucleo citoplasma, quest'ultimo più o meno basofilo e spesso ricco di granuli azzurrofili, a volte con blebs citoplasmatici; in alcuni casi i blasti possono presentare corpi di Auer e/o grossi granuli. I mieloblasti, i monoblasti, i promonociti e i megacarioblasti sono inclusi nella conta dei blasti per la diagnosi di LAM; in particolare la WHO 2016 [12,13] richiede una percentuale > 20% ad eccezione delle LAM con t(15;17), t(8;21), inv(16) oppure t(16;16).

La valutazione della percentuale relativa della eritropoiesi, della granulocitopoiesi, della monocitopoiesi e della presenza di displasia unilineare e/o multilineare sono molto variabili nei diversi sottogruppi e sono parte integrante della diagnostica delle LAM.

Le indagini citochimiche quali le esterasi non specifiche, la mieloperossidasi e il PAS possono contribuire a definire la linea di appartenenza della popolazione blastica e soprattutto gli aspetti displastici uni-bi-trilineari.

La biopsia osteomidollare (BOM) fornisce informazioni importanti, soprattutto nei casi con midollo ipocellulare e nella fibrosi, sulla topografia delle diverse linee cellulari e nella diagnosi differenziale con alcune sindromi mielodisplastiche e/o mieloproliferative. Inoltre, la valutazione istopatologica integrata con quella immunoistochimica può essere di ausilio in alcune forme di LAM del sottogruppo WHO denominato non altrimenti specificato (NOS).

L'analisi immunofenotipica effettuata in citofluorimetria consente di analizzare in tempi brevi il pattern antigenico di un elevato numero di cellule e quindi di definire l'identità di linea e il grado di maturazione [18-22]. Inoltre, utilizzando i moderni citofluorimetri a 8-10 colori è possibile identificare i fenotipi aberranti [13] quali:

a) espressione atipica di antigeni linfoidi da parte dei blasti mieloidi;
b) espressione asincrona di markers di maturazione;
c) overespressione di antigeni dei blasti ad es. CD34++, CD33++.

In particolare, il monitoraggio di blasti con fenotipo aberrante è di grande ausilio per valutare la qualità della risposta, la cinetica della risposta alla terapia e soprattutto la malattia minima residua (MMR) [23].

La citogenetica convenzionale (CC) è mandatoria nella valutazione diagnostica, consente infatti di dimostrare le anomalie cromosomiche numeriche e/o strutturali, definite in accordo con criteri dell'*International System for Human Cytogenetic Nomenclature* [24].

In casi selezionati, ad esempio la circostanza di assenza di un numero adeguato di metafasi, viene effettuata la ibridazione in situ fluorescente (FISH) che impiega specifiche probes fluorescenti per identificare nei nuclei in interfase anomalie cromosomiche, quali delezioni (5q;17p) o altri specifici riarrangiamenti quali RUNX1-RUNXT1, CBFB-MYH11.

Queste indagini sono indispensabili per un corretto inquadramento classificativo in accordo con i criteri della classificazione WHO 2016; infatti le traslocazioni t(8;21), t(9;11), t(6;9), t(1;22), t(16;16), t(15;17), t(3;3) e le inversioni inv(16), inv(3) identificano entità citogenetiche del sottogruppo LAM con anomalie genetiche ricorrenti (Tabella 2). La CC risulta quindi essere cruciale per la diagnosi, la stratificazione prognostica, il monitoraggio della risposta e la potenziale evoluzione clonale in recidiva.

La diagnostica molecolare ha contribuito significativamente negli ultimi anni a definire il complesso pattern molecolare delle LAM e quindi a ottimizzare non solo la classificazione WHO ma anche

LAM con anomalie genetiche ricorrenti	*LAM con t(8;21) (q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1*
	LAP con t(15;17)(q24.1;q21.2); PML-RARA
	LAM con inv(16)(pl 3.1q22) o t(16;16)(pl3.1;q22); CBFB-MYH11
	LAM con t(9;11)(p21.3;q23.3); KMT2A-MLLT3
	LAM con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
	LAM con inv(3)(q21.3q26.2) oppure t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM
	Leucemia acuta megacarioblastica con t(1;22)(pl3.3;ql3.1); RBM15-MKL1
	LAM con t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
	LAM con mutazione NPM1
	LAM con mutazione biallelica CEBPA
	LAM con mutazione RUNX1
LAM con alterazioni mielodisplastiche	
Neoplasie mieloidi secondarie a terapia	
LAM non altrimenti specificate (NOS)	*LAM con differenziazione minima*
	LAM senza maturazione
	LAM con maturazione
	Leucemia Acuta Mielomonocitica
	Leucemia Acuta Monoblastica/Monocitica
	Leucemia Acuta Eritroide
	Leucemia Acuta Megacarioblastica
	Leucemia Acuta Basofilica
	Panmielosi Acuta con mielofibrosi
Sarcoma mieloide	
Proliferazioni mieloidi associate alla Sindrome di Down	*Mielopoiesi transitoria anormale*
	Leucemia mieloide associata alla sindrome di Down

Tabella 2 *- Classificazione LAM WHO 2016*

la stratificazione prognostica (Figura 2) e il monitoraggio della MMR [25-27]. Le tecnologie comunemente più utilizzate e standardizzate sono quelle basate sulla *Polymerase Chain Reaction* (PCR), che consente in tempi rapidi l'amplificazione di sequenze dei geni target, mentre la PCR quantitatitiva (RT-qPCR) viene utilizzata per il monitoraggio della MMR.

Negli ultimi anni ha fatto il suo ingresso nella diagnostica ematologica il sequenziamento genico di nuova generazione (NGS) che consente di realizzare l'analisi di un pannello di geni le cui alterazioni sono associate alle LAM e che rivestono un rilevante ruolo prognostico, in alcuni casi anche per l'impiego di nuovi farmaci attivi verso specifici targets molecolari.

Alla diagnosi è necessario che gli step diagnostici molecolari vengano effettuati sulla base di indicazioni condivise tra il clinico ematologo e il biologo molecolare a partire dalla valutazione morfologica. Ad esempio, il sospetto morfologico di una Leucemia Acuta Promielocitica (LAP) impone l'analisi rapida in PCR di PML-RARA, come pure l'analisi mutazionale per FLT3-ITD per l'inserimento dell'inibitore specifico FLT3 nella chemioterapia di induzione delle LAM, mentre l'analisi delle altre mutazioni NPM1, DNMT3A, RUNX1, CEBPA, KIT, TP53, necessarie per la stratificazione di rischio, può essere pianificata in tempi successivi (10-15 giorni) anche in rapporto al risultato dell'analisi citogenetica. La ricerca di altre mutazioni geniche come quelle di IDH1/IDH2 può essere presa in considerazione vista la disponibilità oggi di un farmaco specifico. La presenza di un riarrangiamento genico rappresenta un'opportunità per monitorare la malattia dopo la terapia; in questo contesto il monitoraggio quantitativo del trascritto di fusione PML-RARA viene raccomandato da ELN per definire il management terapeutico del paziente [28,29]. La tecnologia NGS [30,31] consente oggi di analizzare esoni (cioè tutte le parti codificanti del DNA) e l'intera sequenza che compone la struttura di un gene, nonché le isoforme del suo

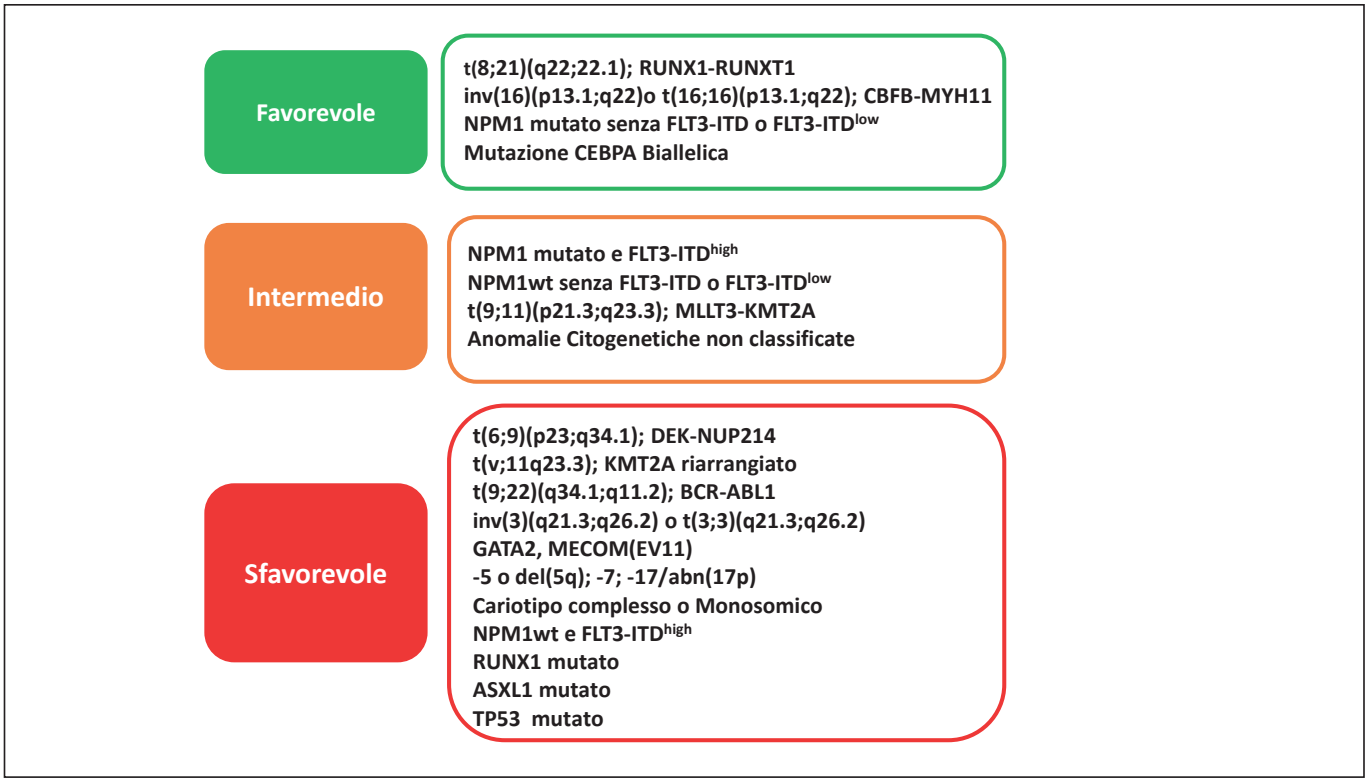


***Figura 2** - Stratificazione citogenetico-molecolare di rischio (ELN 2017).*

trascritto (NGS di terza generazione). Da questi approcci di studio derivano informazioni molto preziose per la definizione dei meccanismi patogenetici delle LAM.

In conclusione, l'approccio integrato morfologico e immunofenotipico rappresenta il primo step per consentire la diagnosi di LAM in massimo 2-3 ore e definire un iniziale inquadramento che deve essere seguito poi dall'analisi citogenetico-molecolare, avente come scopo la definizione dell'entità biologica in accordo con la classificazione WHO 2016. Questo step fornisce informazioni fondamentali per la stratificazione prognostica in accordo con le raccomandazioni dell'ELN [14] (Figura 2), per la pianificazione delle strategie terapeutiche, incluse le procedure trapiantologiche post terapia di induzione - consolidamento, per l'eventuale monitoraggio della MMR, e per la potenziale utilizzazione di farmaci attivi verso targets molecolari associati o meno alla chemioterapia.

L'approccio multidisciplinare è fondamentale per armonizzare i contributi delle singole tecnologie diagnostiche, incrementare la qualità delle stesse e comprendere meglio il profilo biologico del clone leucemico nei singoli pazienti con LAM [32-35].

Dalle classificazioni WHO alla classificazione molecolare

Le prime classificazioni delle LAM, proposte dal gruppo FAB nel 1976 e aggiornate nel 1985, basate solo su criteri morfologici e citochimici, identificavano 8 sottogruppi in ognuno dei quali si riscontrava una notevole eterogeneità clinica in termini sia di risposta alla terapia che di durata della stessa. Successivamente l'introduzione dei criteri immunofenotipici e il riscontro di specifiche anomalie citogenetiche portarono ad una classificazione integrata morfologica-immunofenotipica-citogenetica proposta dal gruppo cooperatore MIC [36]. L'avvento poi delle tecnologie genetico-molecolari produssero la elaborazione delle classificazioni WHO 2001 [10], 2008 [11] 2016 [12,13] basate sul cambio del paradigma diagnostico dal fenotipo al genotipo.

Sebbene la valutazione citogenetica rivesta un ruolo cruciale nella classificazione WHO 2016 delle LAM, la conta morfologica di > 20% di blasti nel sangue periferico e/o nel midollo è il prerequisito indispensabile per la diagnosi di LAM ad eccezione di 3 entità: LAM con t(8;21) e RUNX1-RUNX1T1; LAM con inv(16) o t(16;16) e CBFB-MYH11; LAP con t(15;17) e PML-RARA; in questi casi è la presenza del riarrangiamento genico che di per se definisce la diagnosi.

La WHO 2016 definisce sulla base dell'approccio diagnostico integrato morfologico-immunofenotipico-citogenetico-molecolare, 11 diverse entità clinico-biologiche (Tabella 2). Poiché le indagini citogenetico-molecolari possono richiedere un arco di tempo variabile da 2 a 7 giorni, l'accurata valutazione morfologica integrata da una rigorosa analisi immunofenotipica consente di effettuare, nella maggiore parte dei casi, rapidamente (1-2 ore) la diagnosi di LAM.

L'esperienza accumulata nel tempo di un rigoroso approccio diagnostico multidisciplinare ha contribuito a definire che alcuni sottogruppi di LAM presentano caratteristiche morfologiche/fenotipiche associate a specifiche alterazioni citogenetico-molecolari [18,37].

LAM con t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1

Questa entità citogenetico-molecolare presenta peculiari caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche che possono predire la presenza di una alterazione citogenetica. Si riscontrano infatti tipiche caratteristiche morfologiche quali a) differenziazione neutrofila spesso displastica, b) differenziazione eosinofila-basofila c) blasti con nucleo indentato, corpi di Auer, pronunciato alone perinucleare (Figura 3).

Il pattern immunofenotipico si caratterizza oltre che per la positività per CD34 e CD117, anche per altri markers specifici mieloidi, quali il CD13, CD33, CD15 e/o CD65; il CD11b è invece assente. Inoltre, i blasti possono presentare una espressione aberrante del CD19 [38], frequentemente sono positivi per il CD56, associato secondo alcuni ad una prognosi peggiore [39]. La concomitanza di queste caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche è fortemente suggestiva della LAM con t(8;21). In questa entità si possono riscontrare anche mutazioni a carico dei geni KIT, KRAS, NRAS, ASXL1/2, JAK2.

LAP con t(15;17)(q24.1;q21.2); PML-RARA

I promielociti della forma classica di LAP sono ipergranulari, nel citoplasma sono presenti spesso i tipici corpi di Auer e/o i granuli giganti; il nucleo spesso bilobato, poco visibile poiché coperto dai numerosi granuli, tali promielociti sono intensamente positivi alla mieloperossidasi (Figura 4). I promielociti possono essere rari e/o assenti nel sangue periferico e pertanto la valutazione del midollo osseo deve essere effettuata rapidamente per definire la diagnosi di LAP e iniziare il trattamento con ATRA in aggiunta poi alla chemioterapia con antraciclina e/o con triossido di arsenico. I promielociti della forma variante ipogranulare/microgranulare di LAP, che esordisce più frequentemente con iperleucocitosi, presentano un nucleo bilobato, assenza e/o rarissimi granuli (Figura 4); in alcuni casi possono coesistere alcuni rari promielociti con corpi di Auer e/o granuli insieme alle cellule prevalenti micro/ipogranulari. In questi casi, a volte non semplici da diagnosticare, può essere di ausilio l'analisi immunofenotipica; infatti il side scatter (SSD) CD45 è abbastanza tipico, i promielociti sono CD13+, CD33+, MPO+, ma CD34- CD15- CD16-, CD11b- [40]. È stato inoltre riportato che l'espressione di CD56 correla con un outcome peggiore [41]. In una piccola percentuale di casi i promielociti leucemici possono essere CD34+ e CD2+ (Figura 4) [42].

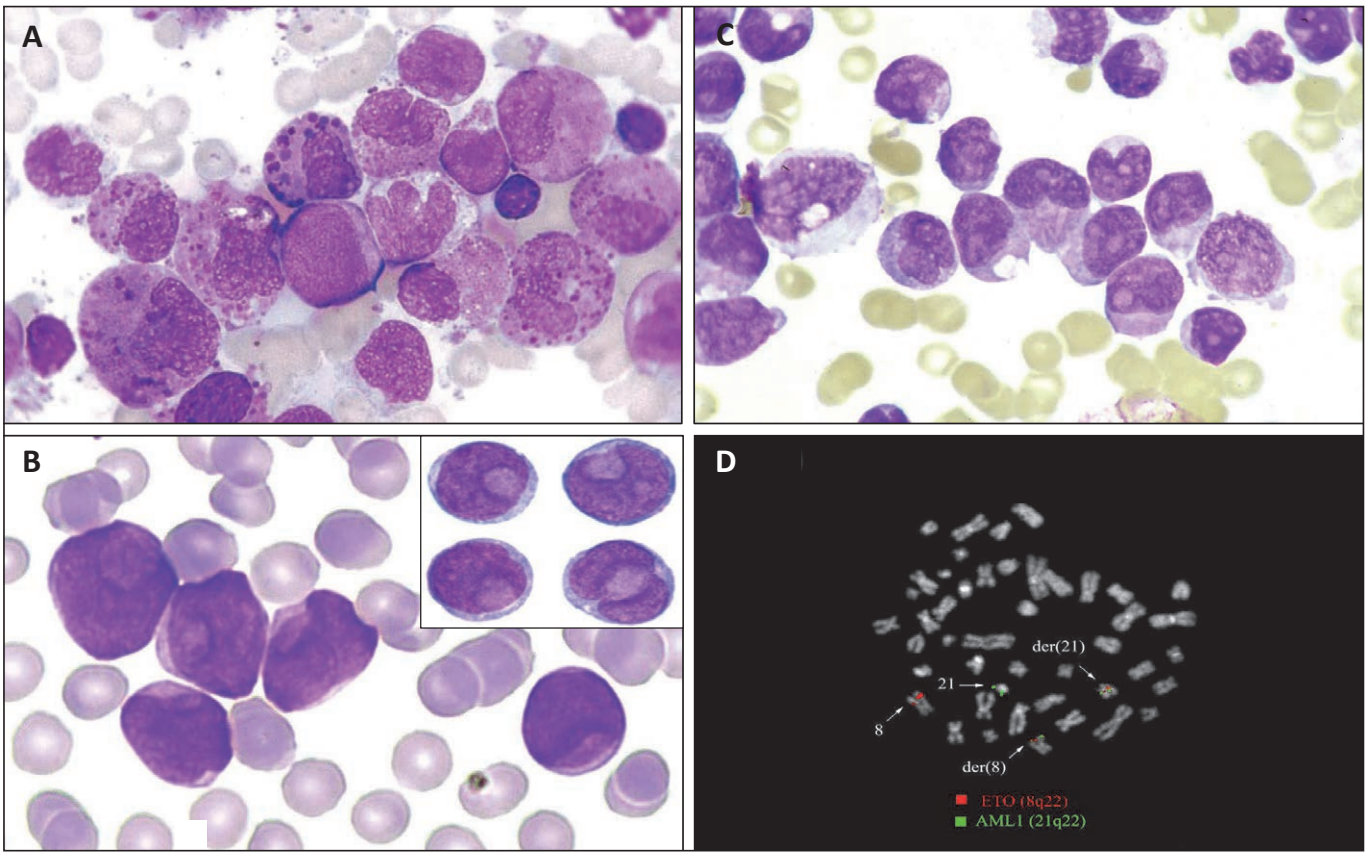


*Figura 3 - **A)** LAM con inv(16). Midollo osseo: visibili numerosi elementi eosinofili con molti granuli, in vari stadi di maturazione e con aspetti displastici. In particolare, i precursori più immaturi (promielociti e i mielociti) presentano granuli (preeosinofili) di colore tra il rosso porpora e il violetto intenso frammisti ai granuli di colore arancio. (MayGrünwald-Giemsa 100 x). **B)** LAM con mutazione NPM1. Midollo osseo: visibili blasti tipo M1 con nucleo voluminoso e con prominenti invaginazioni nucleari (cup-like) di colore più brillante rispetto al resto della cromatina, citoplasma basofilo privo di granuli. (MayGrünwald-Giemsa 100 x). **C)** LAM con t(8;21). Midollo osseo: blasti con nucleo indentato, con citoplasma lievemente granulato, alcuni con uno o più vacuoli, rari blasti con corpi di Auer (MayGrünwald-Giemsa 100 x). **D)** FISH che con sonde specifiche per il gene ETO (rosso) e per AML1(verde) identifica la t(8;21) con la formazione dei rispettivi geni di fusione sui cromosomi der(8) e der(21).*

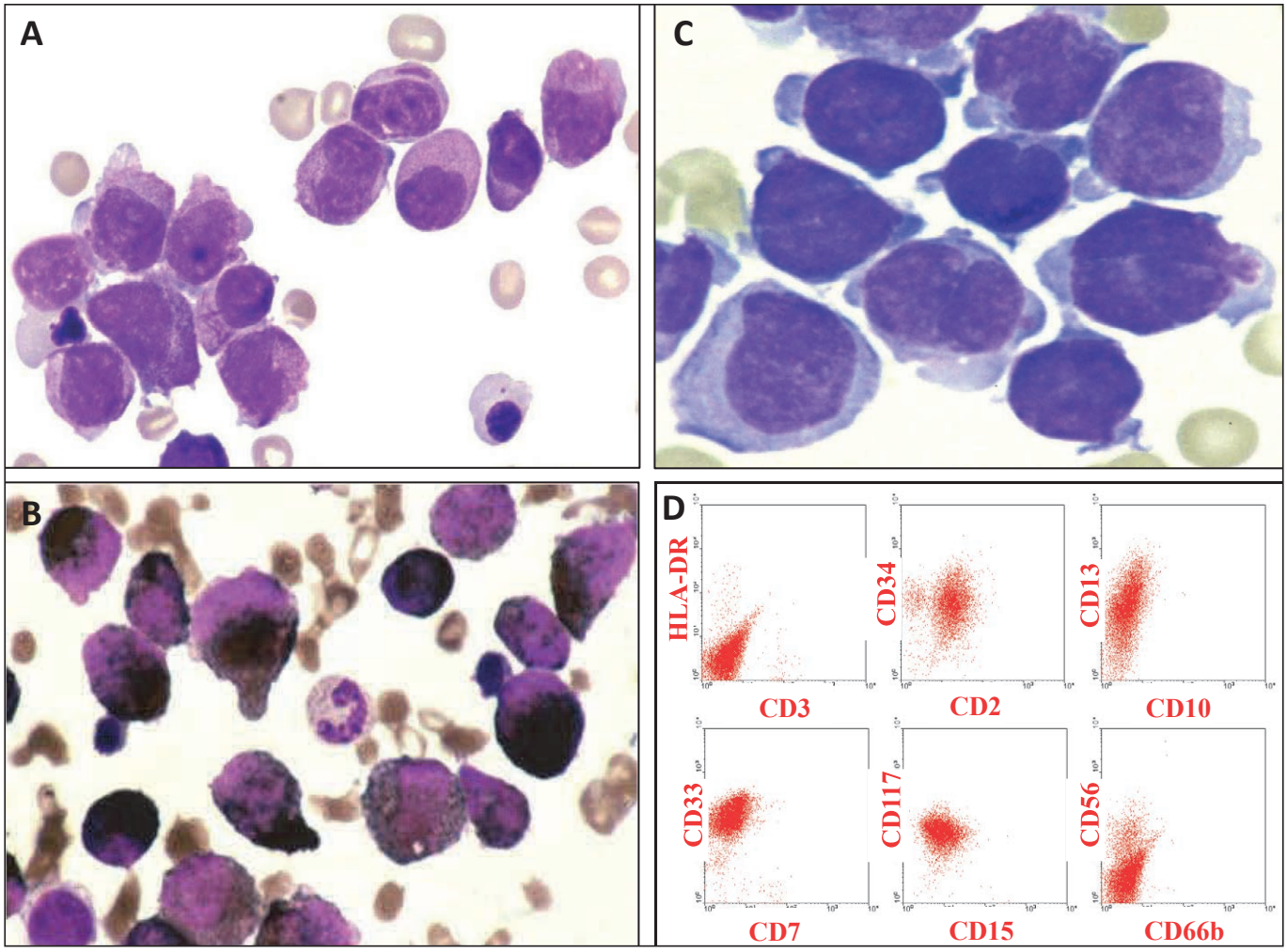


***Figura 4** - A) LAP classica con t(15;17). Midollo osseo: visibili promielociti ipergranulari e alcuni con numerosi corpi di Auer. (MayGrünwald-Giemsa 100 x). **B)** LAP classica con t(15;17). Midollo osseo: visibili promielociti con intensa positività alla mieloperossidasi, nel granulocito neutrofilo si evidenziano rarissimi granuli debolmente positivi (Perox 100x). **C)** LAP variante ipogranulare con t(15;17). Midollo osseo: visibili promielociti privi di granuli e di Auer, alcuni con nucleo reniforme e/o bilobato. **D)** LAP variante/ipogranulare. Midollo osseo: profilo immunofenotipico. I promielociti esprimono CD34, CD33, CD13, CD56 e sono negativi per CD2 e CD15.*

La combinazione dell'analisi morfologica e immunofenotipica consente la diagnosi di LAP che deve comunque essere confermata dall'analisi molecolare e citogenetica. L'analisi molecolare rileva la presenza del gene di fusione PML-RARA, l'analisi citogenetica conferma la t(15;17) associata a volte alla +8. Le mutazioni geniche di più frequente riscontro sono quella di FLT3-ITD o FLT3-TKD [43].

Sono descritti rarissimi casi con traslocazioni varianti di RARA associati a t(11;17) (ZBTB16-RARA) con presenza di promielociti più maturi, spesso privi di corpi di Auer e neutrofili displastici [44].

LAM con inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11

Questa entità non presenta peculiari aspetti morfologici del sangue periferico, comunemente il quadro anche se eterogeneo è quello di una leucemia mielomonocitica spesso con eosinofilia displastica e con leucocitosi. Il quadro midollare è invece più tipico ed è caratterizzato da incremento di eosinofili e loro precursori con granuli eosino-basofili (Figura 3). I blasti mieloidi esprimono antigeni monocitari (CD4, CD36, CD38 e CD11b), spesso presentano anche markers neutrofili quali CD15 e CD65 [45]. Tali aspetti morfologici del midollo e il pattern fenotipico sono predittivi dei riarrangiamenti del cromosoma 16 quali inversione e/o traslocazione reciproca da confermare in FISH e/o citogenetica convenzionale [46]. Le mutazioni geniche possono coinvolgere in alcuni casi KIT, FLT3, JAK2.

LAM con t(9;11)(p21.3;q23.3); KMT2A-MLLT3

Questa entità citogenetica, frequente nei citotipi FAB M5a ed M4, non presenta peculiari aspetti morfologici e immunofenotipici; si può associare a +8. Non sono riportate mutazioni geniche ricorrenti, circostanza probabilmente da attribuire alla rarità di questo tipo di LAM.

LAM con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214

Questo gruppo può presentare caratteristiche morfologiche di una

LAM con maturazione tipo M2 oppure M4, alcuni casi con differenziazione basofila con incremento dei basofili nel midollo e nel sangue periferico ed una elevata conta dei blasti nel sangue periferico. Relativamente al fenotipo immunologico non c'è un pattern tipico, ad eccezione di quanto riportato da qualche autore [47], come la maggiore espressione del CD117, del CD34 e a volte la coespressione del CD9 e del CD38. In questo caso, le caratteristiche morfologiche ed il pattern immunofenotipico non sono predittive della alterazione citogenetica molecolare; sono stati riportati casi con mutazione FLT3-ITD.

LAM con inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3) (q21.3;q26.2); GATA2, MECOM

Questo sottogruppo citogenetico-molecolare si associa spesso ad un incremento della linea megacariocitaria caratterizzata da aspetti displastici e a volte da piastrinosi. La displasia può essere anche trilineare. Il pattern immunofenotipico è quello di cellule mieloidi immature (CD34+, CD117+, CD13+, MPO-) [48], i megacariociti/megacarioblasti sono CD41+, CD42+ e/o CD61+; pertanto solo la iperplasia megacariocitaria e la piastrinosi sono più strettamente predittive di tale alterazione citogenetico-molecolare. Oltre la inv(3), sono riportati casi con anomalie aggiuntive quali del(5q), -7 oppure casi con cariotipo complesso e/o monosomico. Relativamente al profilo mutazionale sono riportati casi con mutazioni dei geni FLT3, NRAS, KRAS, CBL, RUNX1, SF3B1.

Leucemia acuta megacarioblastica con t(1;22) (p13.3;q13.1); RBM15-MKL1

Questa entità è più frequente in età pediatrica ed è caratterizzata dalla presenza di blasti basofili con blebs citoplasmatici ed un tipico pattern fenotipico (CD41+, CD42+, CD61+) [49].

LAM con t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1

Questa entità "provisional" non presenta specifiche anomalie morfologiche, mentre il pattern immunofenotipico è caratterizzato oltre che dalla espressione dei classici antigeni mieloidi anche dall'aberrante coespressione del CD7 e del CD19. Alla t(9;22) classica, si possono associare -7, +8, cariotipo complesso e/o monosomico; le mutazioni geniche riscontrabili sono prevalentemente NPM1, FLT3-ITD, perdita di IKZF1 [50].

LAM con mutazione NPM1

Le caratteristiche morfologiche di questo sottogruppo possono essere riconducibili ai citotipi M0, M1, M2 Perox+ oppure M5, M4 [51-53]. Il pattern immunofenotipico è quello tipico degli specifici citotipi. Sono riportati casi con fenotipo APL-like, cioè CD13+, CD33+ e CD34-, oppure casi CD4+ o CD19+ NPM+ e cariotipo normale. Inoltre, soprattutto nei casi NPM1+ e FLT3 ITD+, i nuclei dei blasti leucemici possono avere morfologia cuplike (Figura 3) [54,55]. Il cariotipo è nella maggior parte dei casi normale, però si possono riscontrare casi con +8, casi con del(9q) [56]. In questo gruppo possono essere presenti mutazioni geniche concomitanti quali NPM1e FLT3-ITD, NPM1 e DNMT3A; meno frequente l'associazione della mutazione di NPM1 con quella di IDH1/2, KRAS/NRAS e TET2 [57].

LAM con mutazione biallelica di CEBPA

Per questa entità non sono state descritte tipiche anomalie morfologiche ad eccezione di una più frequente displasia eritroide, mentre il pattern immunofenotipico è caratterizzato da markers di immaturità (CD34+, CD117+, HLADR+), intensa espressione di MPO, asincrona positività per CD15 e CD65 e abnorme espressione del CD56 e del CD7. Inoltre, alcuni autori [58], utilizzando la combinazione dell'analisi SSC e quella della espressione di 6 antigeni, trovano una stretta correlazione con tale mutazione. Le anomalie citogenetiche possono essere rappresentate da del(9q) oppure del(11q); può essere coinvolta la disregolazione del gene GATA1.

LAM con mutazione di RUNX1

Questa entità a prognosi sfavorevole non presenta tipiche anomalie morfologiche; i blasti esprimono frequentemente antigeni di immaturità: CD34+, HLADR+, CD15+. Le anomalie citogenetiche possono essere -7, del(7q), +8, +13. Inoltre, possono essere presenti le mutazioni dei geni ASXL1, FLT3 e IDH1/IDH2 [59].

In assenza di specifiche anomalie citogenetico-molecolari la WHO inserisce:

- LAM con alterazioni associate mielodisplastiche;
- LAM therapy-related;
- LAM NOS.

LAM con alterazioni mielodisplastiche

La valutazione morfologica del midollo e del sangue periferico fornisce tutti gli elementi per definire tale entità che deve essere implementata dalla storia clinica del paziente (ad es. una eventuale sindrome mielodisplastica precedente) [60] e dalla presenza di specifiche anomalie citogenetiche quali del(5q), -7, del(7q), +8, del(9q), del(20q) [12] cariotipo complesso, mutazioni geniche di ASXL1,U2AF1,TP53.

I criteri WHO per definire tale entità sono: 1) >20% blasti; storia di MDS o MDS/NMP; 2) alterazioni citogenetiche correlate alle MDS; 3) displasia multilineare (>50 % cellule displastiche in 2-3 linee emopoietiche).

LAM therapy-related

Questo sottogruppo include le LAM secondarie a trattamenti chemio-radioterapici anche per neoplasie non ematologiche [61]. La diagnosi si basa prioritariamente sulla storia clinica ed è caratterizzata morfologicamente da una displasia multilineare [12]; le anomalie citogenetiche riscontrate possono essere -5, -7, cariotipo complesso o monosomico; le mutazioni geniche possono coinvolgere TP53, TET2, FLT3, IDH1/2, NRAS, RUNX1.

LAM non altrimenti specificate (NOS)

Tutti i casi che non presentano i criteri diagnostici specifici degli altri sottogruppi vengono definiti *not otherwise specified* (NOS) [62], categorizzati a loro volta in rapporto ai criteri morfologici e fenotipici definiti dalla FAB, ad eccezione della Pure Erythroid Leukemia [63].

In particolare, per alcuni citotipi tale integrazione è fondamentale:

- il gruppo M7 è caratterizzato da blasti basofili, agranulati e con tipici blebs citoplasmatici, positivi per CD41, CD42 e CD61 (Figura 5);
- la leucemia eritroide pura ha elementi immaturi eritroidi che devono essere superiori all'80% con più del 30% di proeritroblasti con citoplasma intensamente basofilo, spesso vacuolato, positivi al PAS (Figura 5) e CD71+, CD235a+ e CD36+; le alterazioni cromosomiche riscontrabili sono 5/del(5q), -7/del(7q), cariotipo complesso e/o monosomico.
- la leucemia acuta basofila, rara, a prognosi infausta e riscontrata in età infantile; può essere associata alla t(X;6), t(3;6);

Per la diagnosi di Panmielosi con mielofibrosi invece è rilevante la valutazione istologica integrata dalla immunoistochimica che evidenzia un coinvolgimento multilineare.

Sarcoma mieloide

Per questa entità è basilare la diagnosi morfologica che può rilevare una popolazione di mieloblasti oppure di monoblasti/monociti che deve poi essere confermata dalle indagini di immunoistochimica sul prelievo bioptico che documenteranno il profilo immunofenotipico dei blasti mieloidi. Si possono riscontrare anomalie citogenetiche quali +4, -7, +11, -16, inv(16), -5q, -20q; spesso è presente la mutazione del gene NPM1 [64,66].

Proliferazione mieloide associata a Sindrome di Down

Questa entità è più frequente nei primi 5 anni di vita, anche senza una diagnosi precedente di S. Down; il quadro morfologico è caratterizzato dalla prevalenza di megacariociti nelle differenti fasi di differenziazione, dalla presenza nel sangue periferico di piastrine giganti, di blasti mieloidi ed eritroblasti immaturi. L'alterazione cromosomica che può essere presente è, oltre la +21, la +8; le mutazioni geniche possono interessare GATA1 e/o JAK3 [67].

Neoplasie mieloidi con predisposizione genetica

È riportato in letteratura che alcune mutazioni geniche germline che riguardano CEBPA, DDX41, RUNX1, ANKRD26, ETV6, GATA2, alcune patologie dei telomeri e alcune Bone Marrow Failure possono precedere le neoplasie mieloidi. Ciò ha indotto gli autori della WHO 2017 a introdurre la categoria delle "neoplasie mieloidi con predisposizione genetica". Studi prospettici saranno necessari per valutare la fattibilità di uno screening e l'impatto clinico di tali anomalie [68].

Classificazione Molecolare

È indiscusso che la classificazione WHO 2016 [12,13] abbia rappresentato un importante sistema classificativo che ha cercato di

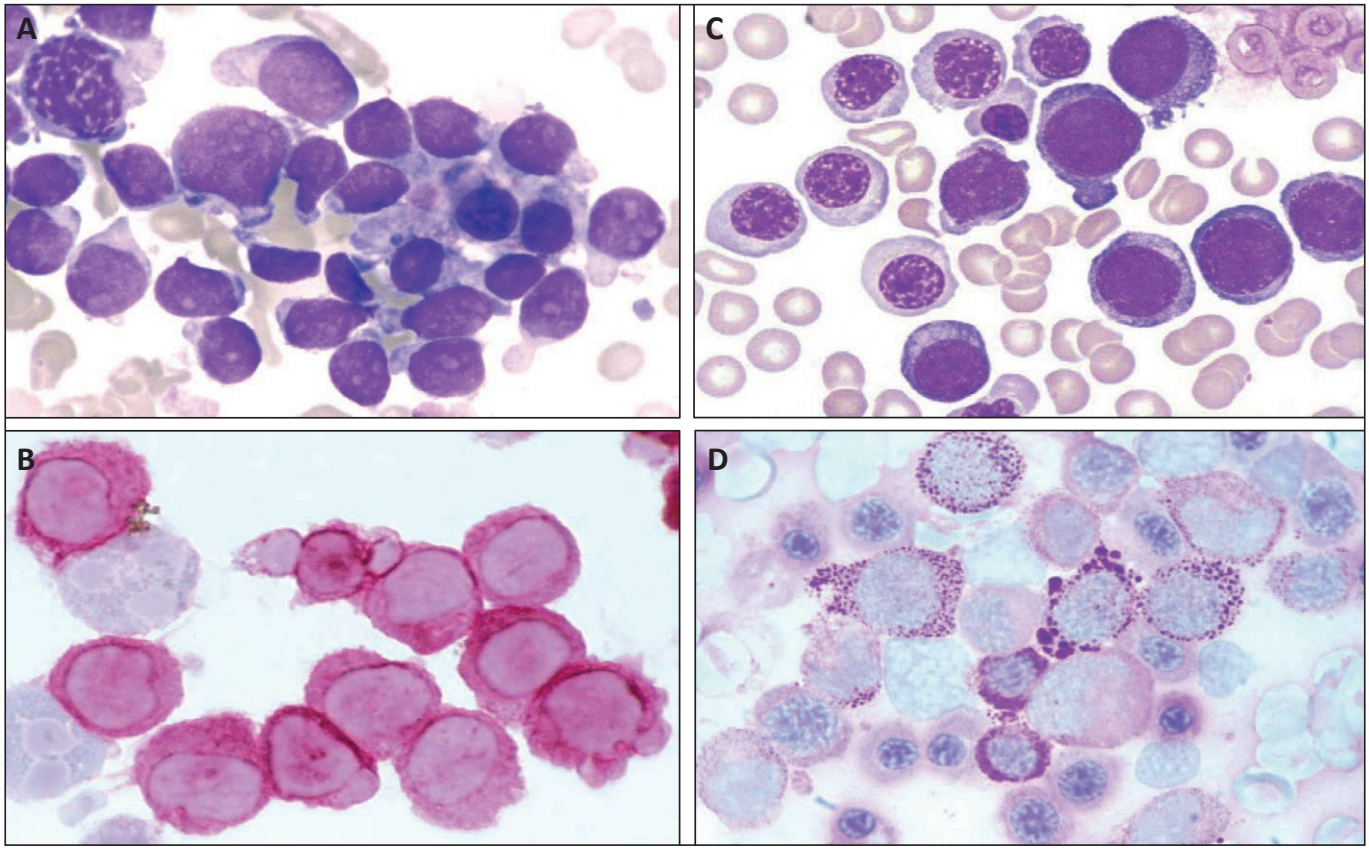


***Figura 5** - **A)** LAM M7 con t(1;22). Midollo osseo: visibili blasti con nucleo voluminoso, citoplasma basofilo senza granuli e alcuni con blebs citoplasmatici, visibili alcuni micromegacariociti (MayGrünwald-Giemsa 100 x). **B)** LAM M7 con t(1;22). Midollo osseo: visibili blasti intensamente positivi per CD61 (Immunocitochimica APAAP 100x). **C)** Leucemia Eritroide Pura. Midollo osseo: visibili solo elementi della linea eritroide: proeritroblasti, eritroblasti basofili e policromatofili. **D)** Leucemia Eritroide Pura. Midollo osseo: visibili proeritroblasti, eritroblasti più maturi intensamente PAS positivi (grossi granuli) e altri debolmente positivi e alcuni negativi (PAS 100x).*

armonizzare le informazioni della prima era diagnostica basata su tecnologie consolidate negli anni 2000 (morfologia, analisi immunofenotipica, citogenetica molecolare) con l'inizio di una nuova era tecnologica, cioè l'NGS, basata su tecnologie di sequenziamento genico di 2° generazione, che consente di analizzare esoni e l'intera sequenza che compone la struttura di un gene, incluse le isoforme del suo trascritto. Lo sviluppo di tali tecnologie innovative applicato su grandi casistiche [15] ha portato alla luce la complessità architetturale genetica delle LAM, identificando nuovi geni mutati e dimostrando alterazioni di specifiche classi funzionali di geni, evidenziando che nello stesso clone più geni possono concorrere a determinare pattern complessi con rilevanti ruoli sulla patogenesi e soprattutto sulla eterogeneità di risposta al trattamento.

L'analisi genomica su 1540 pazienti [15] ha consentito di rilevare non solo la eterogeneità genomica compresa in 8 gruppi/entità già definiti dalla WHO 2016 (Tabella 2), ma anche di identificare nuove classi genomiche rilevanti dal punto di vista biologico e clinico (Figura 6) [6].

1-6) LAM con riarrangiamenti genomici bilanciati e/o geni di fusione;
7) LAM con mutazione NPM1;
8) LAM con mutazione biallelica CEBPA;
9) LAM con mutazioni dello spliceosoma e/o della cromatina;
10) LAM con mutazioni TP53 e aneuploidie cromosomiche;
11) LAM con mutazioni IDH2R172.

Il gruppo WHO 2016 comprende tutti i casi con traslocazioni e/o inversioni, quelli con un riarrangiamento genomico e quelli con una eterogeneità genetica per il coinvolgimento di altri geni mutati quali NRAS, FLT3, KIT. Ogni sottogruppo è compreso in un range tra l'1% e il 10% e comprende: a) PML-RARA, con t(15;17)(q22;q21); b) RUNX1-RUNX1T1, con t(8;21)(q22;q22.1); c) CBFB-MYH11 con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); d) MLLT3-KMT2A, con t(9;11)(p21.3;q23.3); e) DEK-NUP214, con t(6;9)(p23;q34.1); f) GATA2 MECOM, con inv3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3; q26.2); g) RBM15-MKL1 con (t1;22)(p13.3;q13.3).

L'entità NPM1 presenta nel 75% dei casi mutazioni dei geni coinvolti nella metilazione o idrossimetilazione del DNA (DNMT3A, IDH1, IDH2r140, TET2), nel 40% dei casi si associa a mutazioni di FLT3-ITD, nel 20% mutazioni di NRAS ed il 20% coesprime mutazioni di geni del complesso della coesina (RAD21, SMC1A, SMC3). Il pattern delle co-mutazioni rende ragione anche dell'eterogeneo outcome clinico [51,56,69].

L'entità con mutazione biallelica CEBPA può associarsi a mutazioni quali GATA2, NRAS, WT1 e CSF3R e più raramente a FLT3-ITD [69].

La nuova classe genomica che include mutazioni di geni dello spliceosoma e/o della cromatina ha un pattern molecolare che comprende mutazioni di geni che regolano il rimodellamento della cromatina quali ASXL1, STAGE2, BCOR, KMT2APTD, EZH2 e PHF6 e/o quelli che sono coinvolti nello splicing quali SRSF2, SFRB1, U2AF1 e ZRSR2 o i fattori di trascrizione come RUNX1 che risulta mutato nell'8% dei casi. Le mutazioni di RUNX1 sono mutual-

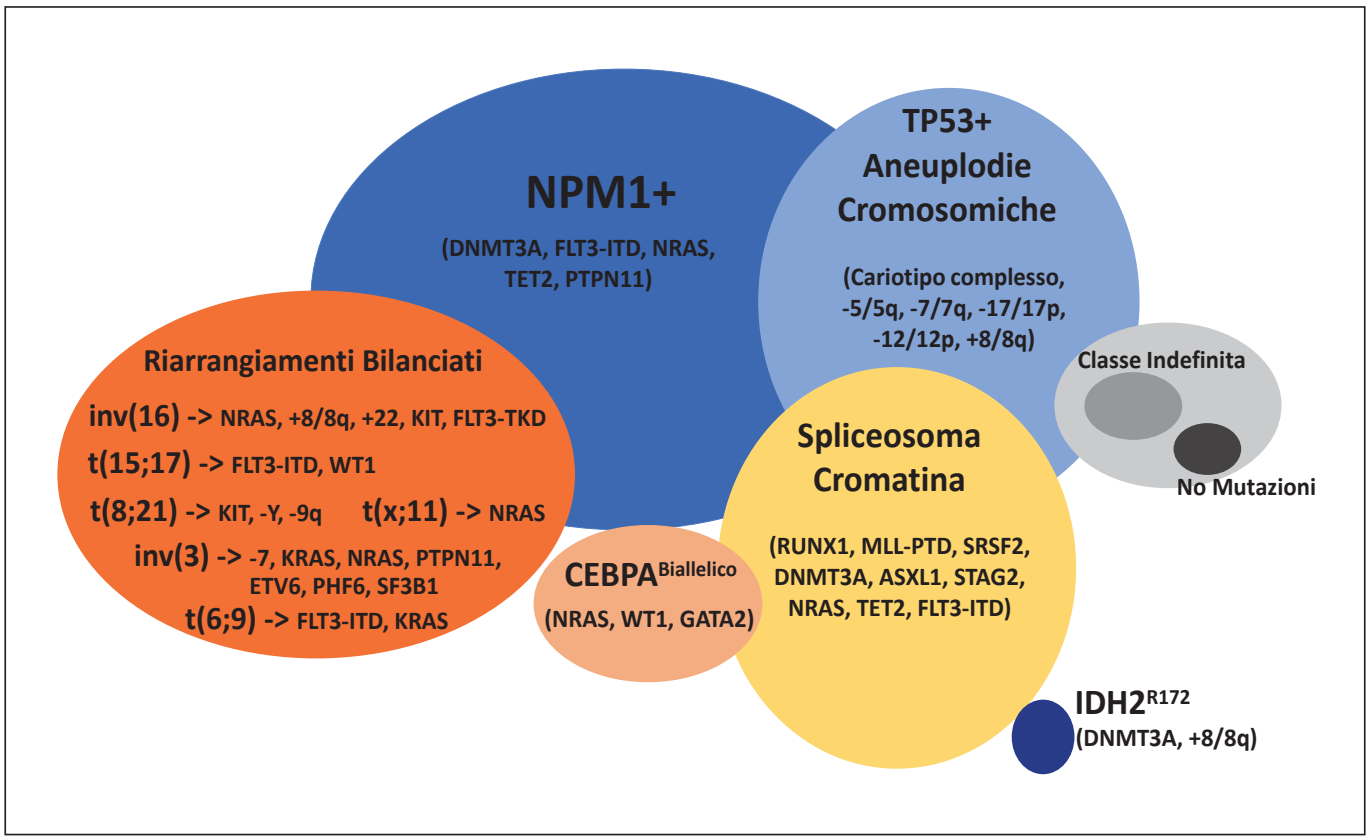


Figura 6 - Classificazione Genomica (da Bullinger et al [6], modificata).

mente esclusive con quelle di NPM1, con la mutazione biallelica CEBPA e con il gruppo delle LAM con anomalie citogenetiche ricorrenti. Tale entità più frequente nei soggetti anziani è associata ad una prognosi sfavorevole [70,71].

La seconda nuova classe genomica comprende un gruppo eterogeneo di LAM che presentano mutazioni di TP53 e/o aneuploidia, il 60% presenta un cariotipo complesso e/o monosomico. I pazienti sono anziani e più frequentemente hanno una LAM secondaria e a prognosi sfavorevole [72].

Una nuova entità genomica è quella che presenta la mutazione IDH2R172, rappresenta solo l'1% ed è associata ad una prognosi favorevole [73].

Ruolo della citogenetica molecolare nella stratificazione prognostica

Oltre ai noti fattori di rischio clinici quali l'età, le comorbidità e la fitness, alcuni markers citogenetico-molecolari rappresentano i punti chiave nelle LAM e rivestono un significato cruciale nella stratificazione prognostica dimostratasi oggi di grande utilità nella pianificazione delle strategie terapeutiche. L'ELN nel 2017 ha proposto un modello di rischio basato su specifiche alterazioni citogenetiche e molecolari che rappresentano il backbone degli algoritmi delle terapie, comprese le procedure trapiantologiche (Figura 2). Tale stratificazione presuppone la necessità di effettuare l'analisi citogenetica in tutti i pazienti con LAM, di ricercare il gene di fusione PML-RARA con urgenza nei casi di sospetta LAP e di pianificare gli step dell'analisi molecolare partendo dall'analisi mutazionale di NPM1 e FLT3-ITD che, come si evidenzia dalla stratificazione dell'ELN, rivestono, in rapporto allo stato mutazionale, un ruolo in tutti e tre i gruppi prognostici. In particolare, dopo i primi studi che hanno evidenziato il significato prognostico favorevole della mutazione NPM1 [51,52] e l'impatto sfavorevole di FLT3-ITD [74,75] è stato dimostrato, grazie alle tecnologie innovative quali NGS, che altri geni, come CEBPA, DNMT3A, RUNX1, ASXL1 e TP53, rivestono un ruolo prognostico. Poiché il clone leucemico può presentare una singola e/o doppia mutazione, trova indicazione la valutazione dello stato mutazionale dei geni DNMT3A, CEBPA, RUNX1, ASXL1 e TP53 oltre a quella del gene NPM1 e FLT3, al fine di valutare l'impatto prognostico; infatti è stato dimostrato che la prognosi favorevole di una mutazione come ad esempio quella di NPM1 cambia se associata con quella di FLT3 oppure con DNMT3A, come pure sembra avere un diverso significato prognostico il rapporto allelico FLT3-ITD basso o alto [76]. Nel gruppo delle LAM CBF i casi con t(8;21) che presentano mutazioni di KIT ad elevato burden hanno un outcome infausto. Un altro dato è che la mutazione di TP53 ha un elevato impatto sfavorevole se si considera che spesso si associa ad un cariotipo complesso e/o monosomico [77,78] o ad altre anomalie quali -5/5q-, -7/7q-. La stratificazione prognostica anche se è una semplificazione rispetto alla complessità genetica delle LAM, rimane ad oggi uno strumento utile nella programmazione delle strategie terapeutiche, sia nei pazienti giovani che in quelli anziani eleggibili ai trattamenti, inclusi quelli con gli agenti ipometilanti singoli o associati ad inibitori di BCL2.

Profilo genetico-molecolare e strategie terapeutiche

Nonostante i notevoli progressi raggiunti nella comprensione dei meccanismi patogenetici delle LAM, la chemioterapia standard seguita dal trapianto allogenico rappresenta oggi l'unico potenziale approccio terapeutico nella maggior parte dei pazienti, soprattutto giovani, con una sopravvivenza a 5 anni di circa il 50-70%. In ogni caso l'età avanzata e le relative comorbidità escludono molti pazienti da tali trattamenti standard e la percentuale di una sopravvivenza duratura non supera il 10%. In questo contesto la identificazione di nuovi markers molecolari potenziali target di terapie sta rivoluzionando non solo l'outcome dei pazienti giovani ma anche quello dei pazienti anziani non eleggibili a terapie intensive [79-81] (Tabella 3 e Figura 7).

In questa ottica si inserisce l'assoluta necessità dell'approccio diagnostico integrato nelle diverse fasi dell'algoritmo terapeutico delle LAM (induzione, post-remissione e recidiva) perché consente di ottimizzare le strategie terapeutiche:

- In rapporto al gruppo di rischio citogenetico-molecolare vengono pianificate le diverse strategie terapeutiche, incluse quelle trapiantologiche [82].
- Il profilo citogenetico molecolare risulta rilevante per la terapia di induzione, non solo per i pazienti positivi per PML-RARA che devono essere trattati subito con ATRA associato a triossido di arsenico o ad antraciclina [83], ma anche per quelli con LAM e mutazione per FLT3-ITD che devono essere trattati in 1 linea con midostaurina, inibitore di FLT3+, e chemioterapia [84].
- Alcuni markers molecolari, rilevabili con diverse tecnologie (RQ-PCR, digital PCR, NGS), e immunofenotipici (citofluorimetri a 8-10 colori) possono essere utilizzati nella valutazione della MMR, uno strumento guida per alcuni step decisionali terapeutici [25-27,85-87].

Gene	Frequenza (%)	Druggable	Prognosi	Farmaco
NPM1	30-45	No	Favorevole	/
DNMT3A	34	No	Incerta	/
FLT3-ITD	28-34	Si	Sfavorevole	Sorafenib Quizartinib Gilterinib Midostaurina
FLT3-TKD	11-14	Si	Non definita	Gilterinib Quizartinib
IDH1/2	15-30	Si	Favorevole	Ivosidenib Enasidenib
TET2	10	No	Non definita	/
ASXL1	5-16	No	Sfavorevole	/
CEBPA	10-18	No	Favorevole	/

Tabella 3 - Scenario mutazionale e nuovi farmaci nelle LAM

- L'analisi di mutazioni meno frequenti, quali IDH1/2, SF3B1, KIT, può rappresentare un punto chiave per la scelta di farmaci specifici/intelligenti. Infatti, sebbene tali markers genetici non rivestano un ruolo prognostico, devono oggi essere ricercati poiché il loro riscontro rappresenta una indicazione al trattamento con farmaci ad azione target specifica (ivosidenib, enasidenib) [88,89]. Un recente studio inoltre ha anche dimostrato che i pazienti con concomitante mutazione biallelica di CEBPA e mutazione di CSF3R rispondono alla terapia con inibitori di JAK2.
- Nelle LAM in recidiva e/o progressione la complessa architettura genetica può modificarsi con la comparsa di nuovi cloni; è quindi necessario ripetere il work up diagnostico. Tale rivalutazione è di grande ausilio anche per la possibilità di utilizzare farmaci quali venetoclax, in monoterapia o associato ad altri agenti inibitori di FLT3 di seconda e terza generazione, quali quizartinib, gilteritinib, crenolanib, [90-93] oppure anticorpi monoclonali come anti CD33 (gemtuzumab), anti CD123, CLEC12A [94-96].
- Il pattern citogenetico-molecolare può essere di grande ausilio, [97] sia alla diagnosi che in recidiva, nei pazienti anziani non eleggibili a chemioterapie intensive per la scelta di strategie terapeutiche efficaci e con profilo di buona tollerabilità, come venetoclax associato ad agenti ipometilanti o ad altre molecole [98-101] inibitori FLT3 di seconda e terza generazione quali quizartinib, gilteritinib, crenolanib.

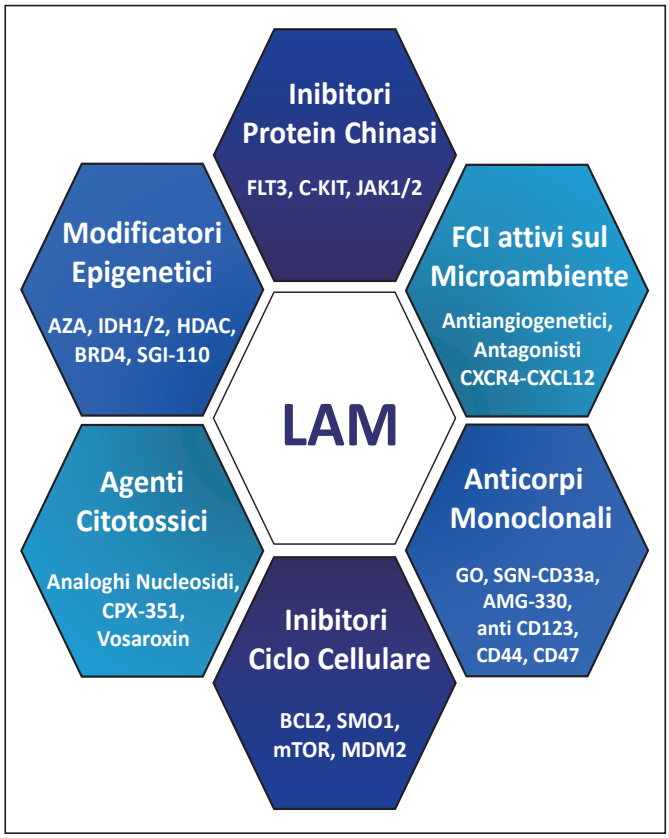


Figura 7 - Classi di farmaci utilizzabili nelle LAM.

Conclusioni

Le conoscenze sulla complessità genomica della LAM, grazie alle tecnologie molecolari innovative, sono in continua evoluzione e possono contribuire a caratterizzare il profilo molecolare della LAM in ogni singolo paziente. Le diverse alterazioni geniche rivestono un ruolo chiave non solo per la comprensione dei meccanismi patogenetici ma anche per l'approccio pratico alla cura dei pazienti. Nei prossimi cinque anni il management del paziente con LAM si baserà sempre più su un work up diagnostico integrato che include l'analisi morfologica, immunofenotipica e genetica ed uno stretto monitoraggio biologico e clinico inclusa la MMR. Gli obiettivi terapeutici saranno sempre quelli di utilizzare il migliore trattamento per ogni paziente, potenzialmente efficace e con il minor rischio di tossicità a breve e a lungo termine (come già dimostrato dall'uso degli ipometilanti associati all'inibitore di BCL2, oppure agli Inibitori di IDH1/IDH2).

Naturalmente dovranno modificarsi tempi e costi di NGS per poter rendere disponibile nel work-up diagnostico un pannello di geni che fotografi il clone leucemico alla diagnosi e alla recidiva, allo scopo di utilizzare una terapia sempre più personalizzata.

Nel futuro è ipotizzabile che nel processo diagnostico siano inseriti dati dell'intero genoma e del trascrittoma al posto delle singole anomalie geniche. Sarà una opportunità importante che consentirà di traslare tutte le conoscenze acquisite sulla biologia della LAM in una più completa classificazione e stratificazione prognostica personalizzata che avrà il compito di avviare una medicina di precisione nel vero senso del termine.

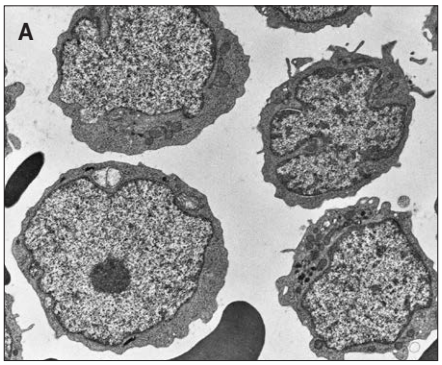
Bibliografia

1. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. Cancer. 2006;107(9):2099-2107.
2. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. Blood Cancer J. 2016;6(7):e441.
3. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. NEJM. 2015;373(12):1136-52.
4. Bullinger L, Döhner K, Bair E et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. NEJM. 2004;350(16):1605-16.
5. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. Blood. 2016;127(1):29-41.
6. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomic of Acute Myeloid Leukemia and Pathways. J Clin Oncol. 2017;35(9):934-46.
7. Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. Nature. 2018;562(7728):526-31.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposals for the classification of the acute leukaemia French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976;33(4):451-8.

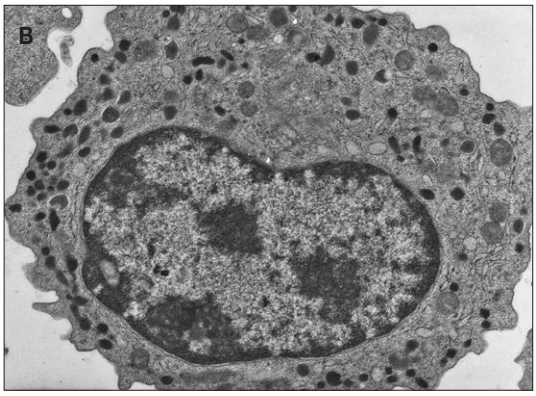
9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med. 1985;103(4):620-5.
10. Jaffe ES, Harris NL & Vardiman JW. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 3rd ed. IARC Press, Lyon. 2001.
11. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114(5):937-51.
12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.
13. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th edn. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon 2017.
14. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424-47.
15. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2016;374(23):2209-21.
16. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. N Engl J Med. 2009;361(11):1058-66.
17. Ley TJ, Miller C, Ding L et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukaemia. N Engl J Med. 2013;368(22):2059-74.
18. Bain BJ, Benè MC. Morphological and Immunophenotypic clues to the categories of Acute Myeloid Leukemia. Acta Haematol. 2019;141(14):232-44.
19. Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Schuurhuis GJ. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. Br J Hematol. 2011;153(4):421-36.
20. Merino A, Boldù L, Ermens A. Acute Myeloid leukaemia: how to combine multiple tools. Int J Lab Hematol. 2018;40(Suppl. 1):109-19.
21. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(1):44-54.
22. Galera PK, Jiang C, Braylan R. Immunophenotyping of Acute Myeloid Leukemia. Methods Mol Biol. 2019;2032:281-96.
23. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. Blood. 2018;131(12):1275-91.
24. Gonzalez Garcia JR, Meza-Espinoza JP. Use of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Blood. 2006;108(12):3952-3.
25. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2018;378(13):1189-99.
26. Voso MT, Ottone T, Lavorgna S et al. MRD in AML: The Role of New Techniques. Front Oncol. 2019;9:655.
27. Ediriwickrema A, Aleshin A, Reiter JG et al. Single-cell mutational profiling enhances the clinical evaluation of MRD. Blood Adv. 2020;4(5):943-52.
28. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalfof the European LeukemiaNet. Blood. 2009;113(9):1875-91.
29. Lo-Coco F, Ammatuna E, Montesinos P et al. Acute promyelocytic leukaemia: recent advances in diagnosis and management. Semin Oncol. 2008;35(4):401-9.
30. Bacher U, Shumilov E, Flach J et al. Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine. Blood Cancer J. 2018;8(11):113.
31. Yu J, Li Y, Li T et al. Gene mutational analysis by NGS and its clinical significance in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Exp Hematol Oncol. 2020;9:2.
32. Narajanan D, Weimberg OK. How I investigate Acute Myeloid Leukemia. Int J Lab Hematol. 2020;42(1):3-15.
33. Haferlach T and Schmidts I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2020;188(1):36-48.
34. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. Blood Rev. 2017;31(1):63-76.
35. Lagunas-Rangel FA, Chavez-Valencia V, Gomez-Guijosa MA et al. Acute myeloid leukemia-genetic alterations and their clinical prognosis. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2017;11(4):328-39.
36. Van den Berghe H. Morphologic, Immunologic, and Cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Second MIC Cooperative Study Group. Br J Haematol 1988;68(4):487-94.
37. Hrusák O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. Leukemia 2002;16(7):1233-58.
38. Shang L, ChenX, LiuY et al. The immunophenotypic characteristics and flow cytometric scoring system of acute myeloid leukemia with t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1. Int J Lab Hematol. 2019;41(1):23-31.
39. Iriyama N, Hatta Y, Takeuchi J et al. CD56 expression is an independent prognostic factor for relapse in acute myeloid leukemia with t(8;21). Leuk Res. 2013;37(9):1021-6.
40. Rahman K, Gupta R, Singh MK et al. The triple-negative (CD34-/HLA-DR-/CD11b-) profile rapidly and specifically identifies an acute promyelocytic leukemia. Int J Lab Hematol. 2018;40(2):144-51.
41. Ferrara F, Morabito F, Martino B, et al. CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans-retinoic acid and chemotherapy. J Clin Oncol. 2000;18(6):1295-300.
42. Albano F, Mestice A, Pannunzio A et al. The biological characteristics of CD34+ CD2+ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34 CD2 hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes. Haematologica. 2006;91(3):311-6.
43. Cicconi L, Divona M, Ciardi C et al. PML-RARα kinetics and impact of FLT3-ITD mutations in newly diagnosed acute promyelocytic leukaemia treated with ATRA and ATO or ATRA and chemotherapy. Leukemia. 2016;30(10):1987-92.
44. Sainty D, Liso V, Cantù-Rajnoldi A et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. Blood. 2000;96(4):1287-96.
45. Paietta E, Wiernik PH, Andersen J et al. Acute myeloid leukemia M4 with inv(16) (p13q22) exhibits a specific immune-phenotype with CD2 expression. Blood. 1993;82(8):2595.
46. Albano F, Anelli L, Zagaria A et al. Acute myeloid leukemia with t(16;16) (p13;q22) showing a new CBFB-MYH11 fusion transcript associated with an atypical leukemic blasts morphology. Hum Pathol. 2014;45(3):643-7.
47. Oyarzo MP, Lin P, Glassman A et al. Acute myeloid leukemia with t(6;9) (p23;q34) is associ- ated with dysplasia and a high frequency of flt3 gene mutations. Am J Clin Pathol. 2004;122(3):348-58.
48. Medeiros BC, Kohrt HE, Arber DA, et al. Immuno-phenotypic features of acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2). Leuk Res. 2010;34(5):594-7.
49. Lion T, Haas OA, Harbott J et al. The translocation t(1;22)(p13;q13) is a nonrandom marker specifically associated with acute megakaryocytic leukemia in young children. Blood. 1992;79(12):3325-30.
50. Konoplev S, Yin CC, Kornblau SM et al. Molecular characterization of de novo Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma. 2013;54(1):138-44.
51. Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med. 2005;352(3):254-66.

52. Falini B, Macijewski K, Weiss T et al. Multilineage dysplasia has no impact on biologic, clinicopathologic, and prognostic features of AML with mutated nucleophosmin (NPM1). Blood. 2010;115(18):3776-86.
53. Bain BJ, Heller M, Toma S et al. The cytological features of NPM1-mutated acute myeloid leukemia. Am J Hematol. 2015;90(6):560.
54. Carluccio P, Mestice A, Pastore D et al. Immunophenotypic and molecular features of 'cuplike' acute myeloid leukemias. Eur J Haematol. 2014;92(2):121-6.
55. Chen W, Rassidakis GZ, Li J, et al. High frequency of NPM1 gene mutations in acute myeloid leukaemia with prominent nuclear invaginations ("cuplike" nuclei). Blood. 2006;108(5):1783-4.
56. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. Blood. 2009;114(14):3024-32.
57. Mason EF, Kuo FC, Hasserjian RP et al. A distinct immunophenotype identifies a subset of NPM1-mutated AML with TET2 or IDH1/2 mutations and improved outcome. Am J Hematol. 2018;93(4):504-10.
58. Mannelli F, Ponziani V, Bencini S et al. CEBPA-double-mutated acute myeloid leukemia displays a unique phenotypic profile: a reliable screening method and insight into biological features. Haematologica. 2017;102(3):529-40.
59. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukaemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. J Clin Oncol. 2011;29(10):1364-72.
60. Vardiman J, Reichard K. Acute Myeloid Leukemia With Myelodysplasia-Related Changes. Am J Clin Pathol. 2015;144(1):29-43.
61. Godley LA, Larson RA. Therapy-related myeloid leukemia. Semin Oncol. 2008;35(4):418-29.
62. Walter RB, Othus M, Burnett AK et al. Significance of FAB subclassification of "acute myeloid leukemia NOS" in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. Blood. 2013;121(13):2424-31.
63. Po-Shen K,Yao-Chung L, Chiu-Mei Y et al. The uniqueness of morphological features of pure erythroid leukemia in myeloid neoplasm with erythroid predominance: A reassessment using criteria revised in the 2016 World Health Organization classification. Plos One. 2017;12(2):1-14.
64. Almond LM, Charalampakis M, Ford SJ et al. Myeloid Sarcoma: Presentation, Diagnosis, and Treatment. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2017;17(5):263-7.
65. Magdy M, Abdel Karim N, Eldessouki I et al. Myeloid Sarcoma. Oncol Res Treat. 2019;42(4):224-9.
66. Dalland JC, Meyer R, Ketterling RP et al. Myeloid Sarcoma With CBFB-MYH11 Fusion (inv(16) or t(16;16)) Prevails in the Abdomen. Am J Clin Pathol. 2020;153(3):333-41.
67. Roy A, Roberts I, Vyas P. Biology and management of transient abnormal myelopoiesis (TAM) in children with Down syndrome. Semin Fetal Neonatal Med. 2012;17(4):196-201.
68. Obrochta E, Godley LA. Identifying patients with genetic predisposition to acute myeloid leukemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2018;31(4):373-8.
69. Green CL, Koo KK, Hills RK et al. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. J Clin Oncol. 2010;28(16):2739-47.
70. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukaemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. J Clin Oncol. 2012;30(25):3109-18.
71. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukaemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. J Clin Oncol. 2011;29(10):1364-72.
72. Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. Blood. 2012;119(9):2114-21.
73. Montalban-Bravo G, DiNardo CD. The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia. Future Oncol. 2018;14(10):979-93.
74. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. Blood. 2014;124(23):3441-9.
75. Mead AJ, Linch DC, Hills RK et al. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2007;110(4):1262-70.
76. Liu SB, Dong HJ, Bao XB et al. Impact of FLT3-ITD length on prognosis of acute myeloid leukemia. Haematologica. 2019;104(1):e9-e12.
77. Haferlach C, Alpermann T, Schnittger S et al. Prognostic value of monosomal karyotype in comparison to complex aberrant karyotype in acute myeloid leukemia: a study on 824 cases with aberrant karyotype. Blood. 2012;119(9):2122-2125.
78. Anelli L, Pasciolla C, Zagaria A et al. Monosomal karyotype in myeloid neoplasias: a literature review. Onco Targets Ther. 2017;10:2163-71.
79. Perl AE. The role of targeted therapy in the management of patients with AML. Blood Adv. 2017;1(24):2281-94.
80. Papayannidis C, Sartor C, Marconi G et al. Acute Myeloid Leukemia Mutations: Therapeutic implications. Int. J. Mol. Sci. 2019;20(11):2721.
81. Sami SA, Darwish NHE, Barile ANM et al. Current and Future Molecular Targets for Acute Myeloid Leukemia Therapy. Curr Treat Options Oncol. 2020;21(1):3.
82. Schlenk RF, Taskesen E, van Norden Y et al. The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favourable acute myeloid leukaemia with double mutant CEBPA. Blood. 2013;122(9):1576-82.
83. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group; Study Alliance Leukemia. N Engl J Med. 2013;369(2):111-21.
84. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford, BL et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. N Engl J Med. 2017;377(5):454-64.
85. Levis MJ, Perl AE, Altma JK et al. A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with FLT3-ITD mutations. Blood Adv. 2018;2(8):825-31.
86. Schwind S, Jentzsch M, Bach E et al. Use of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia Therapy. Curr Treat Options Oncol. 2020;21(1):8.
87. Brunetti C, Anelli L, Zagaria A et al. Droplet Digital PCR Is a Reliable Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukemia. J Mol Diagn. 2017;19(3):437-44.
88. DiNardo CD, Stein EM, de Botton Set al. Durable remissions with Ivosidenib in IDH1-mutated relapsed or refractory AML. N Engl J Med. 2018;378(25):2386-98.
89. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. Blood. 2017;130(6):722-731.
90. Cortes J, Perl AE, Döhner H et al. Quizartinib, an FLT3 inhibitor, as monotherapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2018;19(7):889-903.
91. Zimmerman EI, Turner DC, Buaboonnam J et al. Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. Blood. 2013;122(22):3607-15.

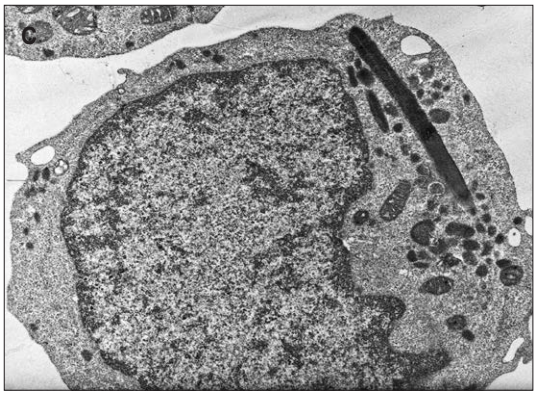
92. Goldberg AD, Collins RH, Stone RM et al. Addition of Crenolanib to Induction Chemotherapy Overcomes the Poor Prognostic Impact of Co- Occurring Driver Mutations in Patients with Newly Diagnosed FLT3-Mutated AML. Blood. 2018;132(Suppl. 1):1436.
93. Perl AE, Altman JK, Cortes J et al. Selective inhibition of FLT3 by gilteritinib in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a multicentre, first-in-human, open-label, phase 1-2 study. Lancet Oncol. 2017;18(8):1061-75.
94. Lambert J, Pautas C, Terré C et al. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. Haematologica. 2019;104(1):113-9.
95. Fournier E, Duployez N, Ducourneau B et al. Mutational profile and benefit of gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. Blood. 2020;135(8):542-6.
96. Testa U, Pelosi E, Castelli G. CD123 as a Therapeutic Target in the Treatment of Hematological Malignancies. Cancers. 2019;11(9).
97. Wang YW, Tsai CH, Lin CC et al. Cytogenetics and mutations could predict outcome in relapsed and refractory acute myeloid leukemia patients receiving BCL-2 inhibitor venetoclax. Ann Hematol. 2020;99(3):501-11.
98. Lachowiez CA, Loghavi S, Kadia TM et al. Outcomes of older patients with NPM1-mutated AML: current treatments and the promise of venetoclax-based regimens. Blood Adv. 2020;4(7):1311-20.
99. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2019;133(1):7-17.
100. Eide CA, Kurtz SE, Kaempf A et al. Simultaneous kinase inhibition with ibrutinib and BCL2 inhibition with venetoclax offers a therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. Leukemia. 2020. doi: 10.1038/s41375-020-0764-6. Epub ahead of print.
101. Wei AH, Montesinos P, Ivanov V et al. Venetoclax plus LDAC for patients with untreated AML ineligible for intensive chemotherapy: phase 3 randomized placebo-controlled trial. Blood. 2020. pii: blood.2020004856. Epub ahead of print.



LMA M1: blasti mieloidi al microscopio elettronico a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



LMA M3: promielocita al microscopio elettronico a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



LMA M1: corpo di Auer in un blasto mieloide al microscopio elettronico a trasmissione (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Leucemie Acute Mieloidi, Morfologia, Genetica Molecolare, Biomarkers Prognostici, Target Molecolari.

Indirizzi per la corrispondenza

Giorgina Specchia
Tel.: 3391684398
E-mail: specchiagiorgina@gmail.com

Linfomi maligni



Marco Paulli

Sezione di Anatomia Patologica, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Pavia e Fondazione IRCCS, Ospedale S. Matteo, Pavia (PV)

Introduzione

Nell'ultimo quarto del XX secolo, una serie di significativi avanzamenti tecnico-scientifici ha permesso di migliorare la nostra comprensione delle caratteristiche bio-funzionali del sistema emolinfopoietico e dei possibili meccanismi della linfomagenesi. Questo si è tradotto in profondi mutamenti nel nostro approccio classificativo alle neoplasie del sistema emolinfopoietico, prima fondato sull'applicazione di criteri esclusivamente morfologici.

La prima tra le classificazioni a intuire i possibili benefici apportati da questi progressi conoscitivi fu la classificazione di Kiel, ideata nell'ormai lontano 1974 dal Prof. Karl Lennert [1], e quindi progressivamente aggiornata sino alla sua ultima versione, l'*Update Kiel Classification of non Hodgkin lymphoma* (1988, modificata nel 1992) [2].

Nel 1994, Peter Isaacson e Harald Stein sul versante europeo, Elen Jaffe e Nancy Harrison su quello americano, si fecero promotori di una rivisitazione di alcune parti della classificazione di Kiel integrandola, fra l'altro, con un capitolo dedicato ai linfomi extranodali, questi ultimi solo parzialmente contemplati nella Kiel. Vide così la luce la cosiddetta *R.E.A.L classification (Revised European American Lymphoma Classification)* [3].

Lo stesso Karl Lennert, nel 1995, in un commento sulla rivista Histopathology si espresse positivamente sulla *R.E.A.L. classification* sottolineandone la rilevanza anche politica, in quanto suggellava un miglioramento nella collaborazione scientifica tra le due sponde dell'oceano.

La *R.E.A.L. Classification* supera definitivamente il tradizionale approccio classificativo ai linfomi, e il dato morfologico viene ora integrato da una serie di parametri derivati in parte dalla clinica, in parte dagli avanzamenti tecnologici sui versanti immunoistochimico e citogenetico-molecolare.

Nel 2001, la *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues* [4], che da ora per brevità definiremo come *WHO Lymphoma Classification*, si sostituisce alla *R.EA.L. classification* quale gold standard classificativo delle neoplasie del sistema emolinfopoietico.

La *WHO classification* riesce nell'intento di integrare nel blue book i principi fondanti della Kiel con il più moderno approccio classificativo espresso della *R.E.A.L. classification*.

Nella *WHO Lymphoma Classification*, ogni singolo linfoma è ora definito in base a una serie di specifiche caratteristiche morfologiche, immunoistochimiche, citogenetico-molecolari, e cliniche: la combinazione di questi dati, tradotti in algoritmi diagnostici, è la conditio sine qua non per un corretto inquadramento classificativo. Ciascuna delle entità così definite è stata in seguito oggetto di validazione mediante studi clinico-epidemiologici che ne hanno confermato la rilevanza clinico-prognostica.

La *WHO Lymphoma Classification* ha beneficiato di due revisioni, la prima nel 2008 [5], la seconda nel 2017 [6], che hanno consentito l'inserimento di nuovi dati soprattutto citogenetico-molecolari, molti dei quali con importanti ricadute prognostico-terapeutiche.

Le note a seguire si propongono di descrivere le caratteristiche clinico-patologiche di alcuni dei principali sottotipi di linfoma (Tabella 1), anche alla luce dei più recenti avanzamenti sul versante bio-molecolare.

Disordini/neoplasie linfoidi a basso potenziale di malignità

L'impiego estensivo delle indagini, soprattutto immunoistochimiche e citogenetico-molecolari, ha consentito di identificare una vasta gamma di proliferazioni linfoidi clonali, soprattutto a fenotipo B ma anche a fenotipo T cellulare. Tali proliferazioni, pur condividendo alcune anomalie genetiche e/o fenotipiche con alcuni specifici sottotipi linfomatosi, non sembrano tuttavia soddisfare pienamente i criteri necessari alla formulazione di una diagnosi certa di linfoma maligno.

Forme di derivazione B cellulare

Sono comprese in quest'ambito rispettivamente la linfocitosi B monoclonale (MBL), le neoplasie follicolari in situ (ISFN), e le neoplasie mantellari in situ (ISMCN). Nel caso delle ISFN e delle ISMCN, il termine di linfoma in situ è stato sostituito con la dizione neoplasia in situ; obbiettivo della modifica è quello di sottolinearne la natura di proliferazioni clonali con un ancora non ben definito potenziale evolutivo in linfoma franco. Si raccomanda comunque che queste diagnosi siano formulate solo dopo un'accurata stadiazione tesa ad escludere la presenza di un eventuale concomitante linfoma

Disordini/neoplasie linfoidi a basso potenziale di malignità
Linfocitosi B monoclonale
Neoplasia follicolare in situ
Neoplasia mantellare in situ
Disordine linfoproliferativo T a piccole/medie cellule CD4+
Linfoma T primitivo cutaneo acrale CD8+
Disordine linfoproliferativo T indolente del tratto gastroenterico
Linfomi non-Hodgkin B a basso grado di malignità
Linfoma linfoplasmacitico/macroglobulinemia di Waldenström
Linfoma della zona marginale
Linfoma a cellule del mantello
Linfoma follicolare e sue varianti Linfoma follicolare prevalentemente diffuso con del1p36 Linfoma follicolare di tipo duodenale Linfoma follicolare di tipo testicolare Linfoma follicolare di tipo pediatrico
Linfomi non-Hodgkin B ad alto grado di malignità
Linfoma B diffuso a grandi cellule, non altrimenti specificato
Linfoma B diffuso a grandi cellule EBV+, non altrimenti specificato
Ulcera mucocutanea EBV+
Linfoma B a grandi cellule di alto grado Linfoma B a grandi cellule di alto grado con riarrangiamenti di MYC e BCL2 e/o BCL6 Linfoma B a grandi cellule di alto grado, non altrimenti specificato
Linfoma di Burkitt
Linfoma B a grandi cellule del mediastino
Linfoma B inclassificabile con caratteristiche intermedie tra un linfoma B diffuso a grandi cellule e un linfoma di Hodgkin classico
Linfomi non-Hodgkin T
Linfoma T periferico, non altrimenti specificato
Linfoma a grandi cellule anaplastico ALK+
Linfoma a grandi cellule anaplastico ALK-
Linfoma a grandi cellule anaplastico associato a protesi mammaria
Linfoma T associato a enteropatia
Linfoma T intestinale monomorfo epiteliotropo
Linfoma T intestinale, non altrimenti specificato
Linfoma T epatosplenico
Linfoma T/NK extranodale “nasal-type”
Linfoma T sistemico EBV+ dell’infanzia
Infezione cronica attiva da EBV a cellule T e NK, forma sistemica
Linfomi non-Hodgkin T primitivi cutanei
Micosi fungoide
Sindrome di Sezary
Papulosi linfomatoide (tipo A, B, C, D, E, F, forme borderline)
Linfoma primitivo cutaneo CD30+ a grandi cellule anaplastiche
Linfoma T primitivo cutaneo simil-panniculitico
Linfomi T cutanei, forme rare
Linfomi non-Hodgkin B primitivi cutanei
Linfoma B primitivo cutaneo della zona marginale
Linfoma B primitivo cutaneo centro-follicolare
Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, “leg-type”
Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, non altrimenti specificato
Linfomi di Hodgkin
Linfoma di Hodgkin nodulare a predominanza linfocitaria
Linfoma di Hodgkin classico

***Tabella 1** - Lista delle entità descritte nel presente articolo*

in altra sede. La scelta di adottare questa modifica terminologica è stata anche di tipo prudenziale, motivata dalla necessità di non provocare inutili stati ansiogeni ai pazienti, e soprattutto di evitare danni da *over treatment* in soggetti di fatto asintomatici.

A questo si aggiunge che alcuni studi hanno dimostrato come sia possibile, impiegando tecniche ad elevata sensibilità, rilevare la presenza di t(14;18) in più del 70% dei soggetti di età > 50 anni; nonostante la dimostrazione nel periferico di un alto carico mutazionale possa suggerire una tendenza evolutiva in linfoma follicolare (FL), la presenza della sola traslocazione non può essere comunque considerata di per sé come indicativa di FL.

Linfocitosi B monoclonale (MBL): L'impiego estensivo delle indagini di citometria a flusso ha permesso di individuare in alcuni individui, peraltro asintomatici e con normale conta del periferico, la presenza a bassi livelli di una popolazione B clonale circolante con profilo fenotipico simile a quello della leucemia linfatica cronica (LLC) [7].

La definizione di linfocitosi B monoclonale (MBL) prevede che questa popolazione risulti inferiore a $5x10^9$/L (5000/μL), rimanendo altresì documentabile per almeno 3 mesi, in individui comunque clinicamente asintomatici. La MBL è distinta in forme ad alta conta (≥ 0.5-$5.0x10^9$/L), e a bassa conta (< $0.1x10^9$/L). Le MBL ad alta conta si osservano più spesso in soggetti con una storia familiare di LLC, e si caratterizzano per uno spettro mutazionale delle IGHV simile a quello della LLC, confermando lo stretto legame biologico tra queste entità. Questo legame è rafforzato dalla presenza (sia pur a basso livello) nelle MBL correlate alla LLC, di anomalie quali la del(13q), la +12, e la del(17p); questo indicherebbe che tali anomalie potrebbero rappresentare degli eventi precoci nel processo di evoluzione clonale, peraltro non prognosticamente rilevanti in assenza di una consistente linfocitosi [8].

Oggi sappiamo che la gran parte delle LLC è preceduta da una MBL; l'incidenza di progressione in LLC delle MBL ad alta conta è di circa l'1-2% annuo con il fattore di rischio maggiore costituito dal valore della conta della popolazione B clonale alla presentazione. Le MBL a bassa conta, senza linfocitosi all'esordio, non sembrano invece meritevoli di uno stretto monitoraggio clinico. Ricordiamo infine la esistenza di MBL con fenotipo non LLC-correlato, a suggerirne invece una possibile relazione biologica con il linfoma B della zona marginale (MZL) (Figura 1 A-B).

Neoplasie follicolari in situ (ISFN): La definizione di FL in situ, ora modificata in neoplasia follicolare in situ (ISFN), richiede la dimostrazione, in un linfonodo per il restante di aspetto reattivo, di alcuni centri germinativi con una popolazione centrofollicolare atipica, positiva per CD10 e Bcl-2, e con t(14;18)(*IgH/BCL-2*), questa ultima dimostrabile nell'80-85% dei casi di FL nodale classico; nelle forme in "situ" sono invece poco frequenti altri tipi di anomalie citogenetiche presenti nei FL clinicamente manifesti. I dati relativi alla possibile progressione dei ISFN non sono definitivi; alcuni studi stimano questo rischio intorno al 5% nei soggetti che, alla diagnosi, sono privi di sintomi clinici di un FL [9,10].

Neoplasie mantellari in situ (ISMCN): Analogamente ai ISFN, le ISMCN sono dei reperti incidentali, riconoscibili con certezza dal patologo solo con l'ausilio di indagini immunoistochimiche che identificano, nei mantelli dei follicoli iperplastici, una quota minoritaria di elementi B ciclina D-1 positivi; opportuna per conferma, la ricerca con tecnica FISH della t(11;14) (q13;q32) tipica del linfoma mantellare. Nonostante l'ISMCN possa talora progredire in un

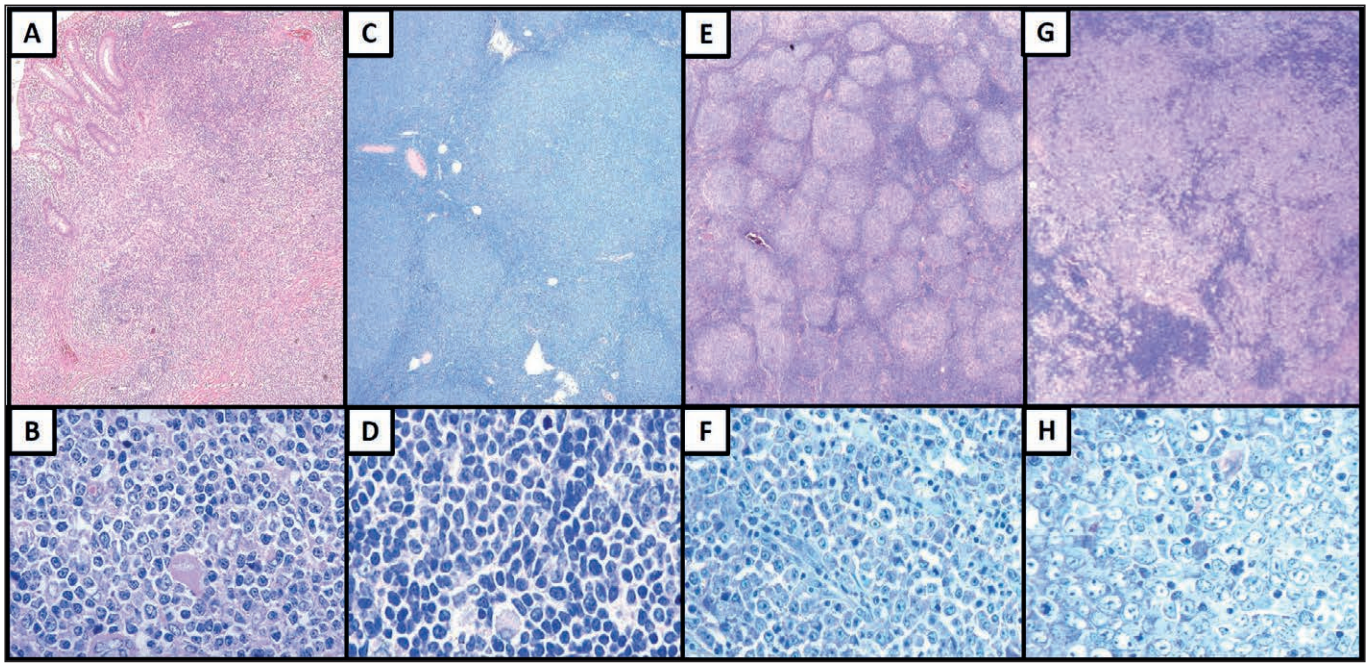


***Figura 1** - Esempi istopatologici di architettura e morfologia dei linfomi di linea B-cellulare. A-B: Linfoma della zona marginale extranodale (A: Ematossilina-eosina, 4x; B: Giemsa, 40x); C-D: Linfoma a cellule del mantello (C: Giemsa. 4x; D: Giemsa, 40x); E-F Linfoma follicolare (E: Giemsa, 4x; F: Giemsa, 40x); G-H: Linfoma B diffuso a grandi cellule (G: Giemsa, 4x; H: Giemsa, 40x).*

franco linfoma a cellule del mantello (MCL), la gran parte di queste forme ha un decorso indolente, e non richiede chemioterapia [11].
Nelle forme in situ, l'espressione di SOX-11 è variabile (50% circa dei casi); se presente, è ritenuta da alcuni autori come un indicatore di aumentato rischio di progressione. La ISMCN deve essere distinta in prima istanza da un MCL con pattern di crescita mantellare. Nella ISMCN, il numero delle cellule ciclina D-1 positive è modesto, e gli elementi positivi tendono a concentrarsi nella porzione più interna del mantello, per il restante di aspetto normale o solo moderatamente espanso. Ricordiamo che la presenza in un linfonodo di una ISMCN può essere concomitante ad un MCL leucemico, non-nodale (spesso SOX-11 negativo), o con un MCL a primitività extranodale, situazioni entrambe da escludersi su base clinica [12].

Forme di derivazione T cellulare

Anche nell'ambito delle proliferazioni T cellulari sono state identificate alcune forme *provisional*, incluse in precedenza tra i linfomi, ma riclassificate nella WHO 2017 [6] come disordini linfoproliferativi, o come proliferazioni neoplastiche clinicamente indolenti. Ci riferiamo ai disordini linfoproliferativi T CD4+ a piccole e medie cellule, ai linfomi T CD8+ a primitività acrale, e ai disordini linfoproliferativi T indolenti del tratto gastrointestinale.
Disordini linfoproliferativi T CD4+ a piccole e medie cellule (CD4+ SMT-LPD): Si tratta di una proliferazione di piccole/medie cellule spesso pleomorfe, a fenotipo T CD4+, che si presenta clinicamente in forma di lesioni solitarie, nodulari, localizzate preferenzialmente nella regione testa-collo. Caratteristiche clinicopatologiche del tutto simili sono però descritte anche nei cosiddetti pseudolinfomi T con pattern nodulare, a rendere in alcuni casi impossibile una diagnosi differenziale certa tra le due forme [13].
Ne consegue che il termine CD4+ SMT-LPD deve essere considerato in una accezione estensiva a comprendere anche gli pseudolinfomi T; questa interpretazione è motivata dal fatto che sia l'outcome (favorevole) che il trattamento (escissione +/- radioterapia) sono sovrapponibili nelle due forme.
Linfomi CD8+ a primitività acrale (CD8+ ATCL): Si presenta in forma di noduli, solitari o bilaterali, in sedi acrali (orecchie, volto, estremità inferiori) [14].
Istologicamente si compone di un denso infiltrato dermico, non epidermotropo, spesso con una *green zone*, la popolazione linfomatosa è costituita da medie cellule, con nuclei spesso pleomorfi, a fenotipo CD3+, CD8+, Tia-1+, betaF1+. Nonostante nella pressoché totalità dei casi sia dimostrabile un riarrangiamento dei geni del TCR, il decorso è indolente, con un outcome estremamente favorevole. Non si può escludere che, in un prossimo futuro, anche questa forma possa venir ricondotta nell'ambito dei disordini linfoproliferativi monoclonali a incerto potenziale evolutivo.
Disordini linfoproliferativi T indolenti del tratto gastrointestinale (T-LPD-GI): Un disordine T clonale a fenotipo T CD8+ (più raramente CD4+) che può localizzarsi in varie sedi lungo il tratto gastroenterico, ma più spesso a livello del piccolo intestino e del colon. La lesione è costituita da un infiltrato di piccole-medie cellule, a fenotipo periferico (CD2+, CD3+, CD4-/+, CD8+/-, CD5+, TIA-1+/-, CD103-/+) che interessa la lamina propria, con risparmio dell'epitelio [15].
Endoscopicamente le lesioni possono mostrare un aspetto polipoide. La gran parte dei casi riarrangia per i geni del TCR, ma questo sembra non influenzare la prognosi; il decorso clinico è generalmente indolente, anche se tende ad essere cronico, e con una scarsa risposta ad eventuali chemioterapie. Secondo alcuni studi (dati da confermarsi) il fenotipo CD4 sarebbe associato ad un più elevato rischio di progressione in linfoma.

Linfomi non-Hodgkin B indolenti

Linfoma linfoplasmacitico (LPL) / Macroglobulinemia di Waldenström (WM): La presenza di aspetti di modulazione in senso secernente è comune a vari sottotipi di linfomi B indolenti, costituiti prevalentemente da piccole cellule. Questo, unitamente all'assenza di marcatori istotipo specifici e ai frequenti fenomeni di overlapping nel profilo immunofenotipico, rendono complessa la diagnostica differenziale tra questi linfomi [16]. Paradigmatica la difficoltà nel differenziare tra un LPL e un MZL, entrambi caratterizzati da frequenti aspetti differenziativi in senso plasmacitico.
Non sorprende quindi che, nella precedente classificazione (WHO 2008) [5], la diagnosi di LPL era di fatto considerata una diagnosi di esclusione, a comprendere quei LNH B con citologia di basso grado e aspetti di differenziazione plasmacitica, privi di caratteristiche utili a collocarli in un altro specifico sottotipo. La ricerca della mutazione *MYD88* L265P può quindi rivelarsi un utile strumento diagnostico [17], essendo dimostrabile in buona parte dei LPL ma, al contrario, solo raramente nei MZL. Ricordiamo che MYD 88 è una *adapter protein* nell'ambito del signalling per TLR4 (*tool-like-receptor 4*) e per il recettore di interleuchina 1 (IL1R), in grado di intervenire nei meccanismi che portano all'attivazione di NFkB. È utile però sottolineare che la mutazione di MYD88 non è da ritenersi esclusiva del LPL, essendo presente anche nel 15% dei linfomi marginali splenici [18], nel 25% dei linfomi marginali degli annessi oculari [19], e nel 30% circa dei linfomi B diffusi a grandi cellule (DLBCL) non GCB [20]. *MYD88* è stato inoltre dimostrato in alcune varianti extranodali del DLBCL (SNC, testicolo, gamba) [21-24].
Linfoma splenico della zona marginale (SMZL): Forma rara (< 2% di tutti i linfomi), con interessamento splenico, midollare e spesso ematico [25]; colpisce soggetti con un'età media di 69 anni. Lo SMZL e il linfoma splenico con linfociti villosi sono di fatto ritenuti una stessa entità. In alcuni pazienti la diagnosi è incidentale, e segue il riscontro di una linfocitosi sul periferico. Nelle fasi più avanzate della malattia i pazienti possono presentare splenomegalia (milza di peso variabile, da 400 a oltre 2000 gr.) e citopenia; nel 20% dei casi, coesistono manifestazioni di una patologia autoimmune quali anemia emolitica autoimmune, trombocitopenia autoimmune, crioglobulinemia, etc. In una quota minoritaria di pazienti è stata dimostrata un'associazione con il virus dell'epatite C [26]. Lo SMZL ha un decorso clinico usualmente indolente con una sopravvivenza mediana di circa 8-10 anni; ciononostante il 30% circa dei pazienti

mostra un andamento meno favorevole, a comprendere un 5-10% di casi con progressione in DLBCL.
La diagnosi di SMZL e la sua differenziazione dagli altri linfomi indolenti con istologie similari può risultare complessa, soprattutto se basata sul solo esame della biopsia ossea e sui dati fenotipici.
Il gold standard diagnostico è costituito dall'esame istologico della milza, che non è però sempre praticabile. In caso di splenectomia, la superficie di sezione mostra il tipico pattern multi-micronodulare, miliariforme con punteggiature di colore biancastro. Lo SMZL si sviluppa nella polpa bianca, con un aspetto bifasico. Elementi B monocitoidi di medie dimensioni si dispongono intorno ai follicoli con un pattern simil-MZ, mentre la componente centrocito-simile tende a cancellare la zona mantellare e a colonizzare i centri germinativi. Non è infrequente osservare aspetti di modulazione in senso plasmacitico. In seguito si assiste ad una infiltrazione della polpa rossa, sia in forma *patchy* che diffusa, con progressiva estensione alle strutture sinusali.
Possono essere presenti grandi cellule di aspetto centroblastico/immunoblastico, usualmente con distribuzione sparsa e in quantità limitata; la presenza di una componente di grandi cellule numericamente più rilevante e con tendenza alla formazione di ampi *sheets* coesivi suggerisce una potenziale evolutività in alto grado. La popolazione reattiva comprende spesso istiociti epitelioidi, talora in numero consistente, e con formazione di granulomi multipli su tutto l'ambito. Nelle biopsie osteomidollari è caratteristico (anche se non definitivamente specifico) il pattern di infiltrazione sinusale, in combinazione con un infiltrato nodulare e/o interstiziale.
Il fenotipo dello SMZL non è specifico, con positività per CD20, CD79a, Bcl-2, IgM di superficie, espressione di IgD di superficie (variabile), e DBA44. Una quota minoritaria di casi può risultare CD5+. Usualmente modesta la frazione di crescita (< 5%) con un peculiare pattern distribuzionale degli elementi positivi, definito a bersaglio (*targetoid picture*).
Sul versante genetico circa il 30% degli SMZL mostra una delezione eterozigote a carico del cromosoma 7q; i geni bersaglio sono tuttavia ancora non ben definiti. Mutazioni di *NOTCH2* e *KLF2* sono state segnalate rispettivamente nel 10-25% e nel 10-40% degli SMZL. Si tratta di informazioni con significative ricadute cliniche in quanto i casi di SMZL con questa tipologia mutazionale sembrano avere una prognosi meno favorevole [27].
Linfoma a cellule del mantello (MCL): Gli studi più recenti indicano nel MCL una eterogeneità clinica superiore a quanto sin qui ritenuto [28-30] (Figura 1 C-D). Si riconoscono oggi due sottotipi di MCL, con distinte caratteristiche clinico-patologiche: una forma classica ed una forma leucemica, non-nodale. Il MCL nella sua forma classica è costituito da una popolazione B (*IGHV-unmutated* o minimamente mutata) positiva per CD5, ciclina D1 e SOX-11, quest'ultimo di grande utilità nell'identificazione dei rari casi di MCL classico ciclina D-1 negativi. L'andamento clinico è variabile con interessamento linfonodale ma spesso anche extra-nodale.
I casi con una modesta conta mitotica (< 10 mitosi per 15 HPF) e una bassa frazione di crescita (< 30%) hanno spesso un andamento clinico meno aggressivo, talora comparabile a quello di un linfoma indolente. Nel MCL leucemico, non nodale, la popolazione B (*hypermutated IGHV*) è negativa per SOX-11, ha una frazione di crescita molto modesta, in assenza di significative alterazioni molecolari fatta salva la presenza della t(11;14). Il decorso clinico è indolente, con interessamento del sangue periferico; raro il coinvolgimento nodale, mentre sono possibili localizzazioni spleniche e/o midollari. A queste forme ben definite, si devono aggiungere alcuni casi di MCL che originano primitivamente in sedi extranodali soprattutto MALT-correlate che sembrano anch'essi caratterizzarsi per un decorso clinico relativamente indolente (dati personali). Una quota variabile delle forme indolenti può andare incontro a una progressione di malattia riconducibile alla comparsa di ulteriori alterazioni molecolari (ad es. cariotipo complesso, traslocazione di *MYC*, alterazioni di *TP53/17p*) che si accompagnano ad una trasformazione della citologia neoplastica che assume aspetti di tipo blastoide e/o pleomorfo. Sul versante molecolare, sono state identificate nel MCL una serie di alterazioni a carico di *ATM, CCND1, NOTCH1, e NOTCH2*, utili a una migliore comprensione dei meccanismi della linfomagenesi. In una significativa quota di MCL con negatività per ciclina D1 sono invece presenti traslocazioni a carico di CCND2, la cui presenza è quindi utile ai fini di una conferma diagnostica.
Linfoma Follicolare (FL) e sue varianti: Il FL racchiude un ampio spettro di entità con caratteristiche clinico-biologiche e di outcome, talora molto diverse, fortemente influenzate dalla sede anatomica di presentazione della malattia (nodale *versus* extranodale) [31] (Figura 1 E-F).
L'approccio diagnostico al FL nodale è rimasto invariato, con il mantenimento dei precedenti schemi di grading e di definizione del pattern di crescita predominante (follicolare *versus* diffuso) espresso in valori percentuali [32]. Sono state invece introdotte una serie di puntualizzazioni in merito ad alcune specifiche varianti quali i FL CD10- (spesso positivi per IRF-4/MUM-1), e i FL privi della t(14;18) (*IGH/BCL-2*). Sono stati anche acquisiti nuovi dati sull'eterogeneità genetica dei FL: oltre alla tipica t(14;18) [33]. sono state documentate anche alterazioni di *CREBBP, MLL2, TNFRSF14*, e *EZH2* [34]. In particolare, le alterazioni a carico di CREBBP potrebbero rendere ragione della capacità dei FL, almeno nella loro fase iniziale di sviluppo, di eludere la sorveglianza del sistema immune.
Di seguito una breve descrizioni delle principali varianti di FL.

- *FL prevalentemente diffuso, con delezione 1p36:* Si presenta come una voluminosa massa inguinale, ed è costituito da una popolazione linfomatosa di centrociti e centroblasti (grading I-II), con un pattern di crescita diffuso, in assenza di nodularità. All'interno della proliferazione linfomatosa possono residuare alcuni follicoli reattivi con centri chiari Bcl-2 negativi; questa variante non ha la t(14;18)(q32;q21) mentre è presente la delezione 1p36, un'alterazione comunque non del tutto specifica, potendosi osservare sia in alcuni casi di FL classico che in altri istotipi linfomatosi [35].
- *FL di tipo duodenale (DFL):* Le caratteristiche citologiche ed immunofenotipiche (CD10+, BCL-2+, BCL-6+) di questa variante sono simili a quelle del FL nodale indolente. Il duodeno è la sede più colpita, ma le lesioni possono localizzarsi in ogni segmento

dell'intestino tenue. La presenza di una citologia di alto grado, associata a immagini di infiltrazione della muscolare, deve sempre far considerare la possibilità di una localizzazione secondaria in corso di forma sistemica, da escludersi mediante stadiazione clinica. Le recidive locali sono possibili, ma la prognosi complessiva rimane eccellente [36].

- *FL di tipo testicolare:* Variante molto rara, ancora poco caratterizzata, osservata inizialmente in età pediatrica, ma successivamente descritta anche in soggetti adulti [37]. Nonostante una citologia di alto grado, la gran parte dei casi segnalati sembra caratterizzata da una buona prognosi. Altra caratteristiche distintive rispetto al FL tradizionale sono la negatività immunoistochimica per BCL2 e l'assenza della t(14;18)(q32;q21).
- *FL di tipo pediatrico:* La dizione è stata modificata da pediatrico a tipo pediatrico, essendosi osservati anche casi in soggetti adulti [38]. Colpisce comunque soprattutto giovani, prevalentemente di sesso maschile, con interessamento mono-stazionale (soprattutto testa-collo) [39]. I follicoli sono espansi, di aspetto serpiginoso, con riduzione dei mantelli; la popolazione linfomatosa ha una citologia blastoide piuttosto che centroblastica, e sono spesso interposti macrofagi, a configurare un aspetto *starry sky*. Per queste forme non è previsto un grading citologico. Non sono presenti riarrangiamenti di *BCL2, BCL6 e MYC*. Variabile l'espressione della proteina BLC2. Nonostante la citologia e la frazione di crescita elevata, l'andamento clinico è indolente, e la semplice escissione è spesso curativa. È bene precisare che si tratta di una diagnosi non semplice, e che queste forme devono essere differenziate da un lato dai linfomi ad alto grado, dall'altro da quadri reattivi con una spiccata iperplasia follicolare. Studi futuri su casistiche più ampie consentiranno di meglio precisare le caratteristiche biomolecolari di questa variante di FL [40].

Alcuni autori suggeriscono già oggi di riposizionare questa forma tra le proliferazioni clonali benigne, a basso potenziale di malignità.

Linfomi non-Hodgkin B aggressivi

In questa categoria, sono state numerose le modifiche apportate dalla WHO 2017 [6], sia in termini classificativi che di approccio diagnostico, quali in particolare: A) la ricerca della *cell of origin* (COO) dei linfomi B diffusi a grandi cellule (DLBCL) estesa ora alla pratica diagnostica routinaria [41], B) la introduzione di una nuova categoria di linfomi di alto grado, definiti come double- o triple-hit, connotati dalla presenza di riarrangiamenti a carico di *MYC* e *BCL2* e/o *BCL6*, C) la rivisitazione, basata sulle nuove evidenze citogenetico-molecolari, dei DLBCL NOS, dei linfomi ad alto grado inclassificabili (HGLUC), e del linfoma di Burkitt (BL) [42,43].

Linfomi B diffusi a grandi cellule (DLBCL) NOS: Sulla base della COO sono suddivisi in forme germinal center (GCB) e activated (ABC). Questa distinzione ha importanti ricadute prognostico-terapeutiche, correlandosi anche a possibili differenti meccanismi molecolari di linfomagenesi [44] (Figura 1 G-H).

Con riferimento ai trattamenti immuno-chemioterapici convenzionali, le forme GCB sembrano caratterizzate da un oucome più favorevole rispetto a quelle ABC [45]. Oltre a metodiche avanzate (*gene expression profiling*, etc.) sicuramente molto sensibili ma non sempre disponibili in contesti non specialistici, la COO può essere ricercata efficacemente anche con tecniche immunoistochimiche su sezioni in paraffina, seguendo schemi ben collaudati quali l'algoritmo di Hans. Le tecniche di *next generation sequencing* (NGS) hanno fornito dati aggiuntivi sul panorama mutazionale dei DLBCL, consentendo l'identificazione di due differenti profili per le forme GCB e ABC. Alcune mutazioni quali *CREBBP*, *BCL6*, e *TP53* sono condivise tra i due sottotipi, altre sono invece più tipo specifiche. Le forme GCB si associano ad alterazioni *PTEN*, *EZH2*, e nella proteina G, in combinazione con pathways inibitori (GNA13 e SIPR2). Le anomalie delle forme ABC sono generalmente correlate all'attivazione dei signaling di NFkB e di blocco della maturazione B, con mutazioni a carico di *CDKN2A/2B*, *CARD11*, CD79a/CD79b, *MYD88*, e *TNFAIP3*.

Linfoma B a grandi cellule primitivo del mediastino timico (PMBL): Forma relativamente rara (2-3% di tutti i LNH) colpisce soprattutto giovani adulti (media 35 anni) con una predilezione per il sesso femminile (rapporto F-M 2:1) [46,47].

La sede tipica è il mediastino antero superiore, occupato da una massa bulky (diametro ≥ 10 cm), spesso con infiltrazione per contiguità delle strutture adiacenti (pleura-polmone, pericardio-cuore, grossi vasi); frequente l'interessamento del linfonodo sovraclaveare, che può costituire una possibile sede di biopsia diagnostica, in alternativa al prelievo dalla massa mediastinica, talora indaginoso, specie nei casi in cui il paziente si presenti in una situazione di criticità clinica. La malattia non ha una particolare tendenza alla diffusione extra-toracica ma, quando questo accade, le sedi colpite sono spesso non usuali (reni, surreni, SNC, fegato, utero). Il midollo è solitamente negativo. Sul versante clinico i pazienti si presentano spesso con sintomi di durata < ai 3 mesi, con tosse secca, stizzosa, dispnea e, non infrequentemente, con una sindrome da compressione della vena cava superiore; in alcuni casi l'esordio è acuto, a configurare una vera emergenza clinica [48]. L'istologia è caratterizzata da una certa variabilità; è frequente la fibrosi, sia in tralci talora grossolani che in forma di fibrosi fine, interstiziale; usualmente la popolazione neoplastica è costituita da grandi cellule, spesso centroblasto-simili, talora multilobate; meno frequente la presenza di una componente anaplastica e HRS-like a determinare aspetti tipo *gray-zone lymphoma* con i conseguenti problemi di diagnosi differenziale verso il LH. In una discreta quota di casi gli elementi neoplastici mostrano un ampio citoplasma chiaro, aspetto riconducibile ad artefatti da disomogenea fissazione (la fibrosi ostacola infatti la penetrazione del fissativo).

Caratteristico il profilo immunoistochimico della popolazione linfomatosa, con espressione di LCA/CD45, CD20, CD79a, CD23 e CD30; frequente anche l'espressione di IRF-4/MUM-1; Bcl-2 e Bcl-6 sono positivi rispettivamente nel 50-80% dei casi, e nel 50-100% dei casi.

È presente un riarrangiamento per i geni delle immunoglobuline, che può risultare *class switched* e con un alto carico di ipermutazioni somatiche, in assenza di attività sul versante delle *ongoing mutation*.

Caratteristico il profilo di espressione genica del PMBL, differente rispetto a quello degli altri linfomi B a grandi cellule, ma con evidenti analogie con il Linfoma di Hodgkin Classico (CHL). Sul versante citogenetico, il 50% circa dei casi di PMBL presenta riarrangiamenti o mutazioni a carico del transattivatore CIITA nel complesso maggiore di istocompatibilità (MCH) di classe II, interessanti il cromosoma 16p13.13. A questo si aggiungono, in circa il 75% dei casi, anomalie (perdite e/o amplificazioni) a carico del cromosoma 9p24.1, con coinvolgimento dei loci di *JAK2/PDCD1LG2/PDCD1LG1*, che rendono ragione della frequente over-espressione di PDL1 e PDL2 nel PMBL. Il complesso delle alterazioni descritte rende il PMBL unico rispetto agli altri linfomi a grandi cellule, rimarcandone invece le possibili correlazioni biologiche con il CHL.
In linea generale la prognosi del PMBL è per certi versi più favorevole rispetto alle altre forme di DLBCL (questo indipendentemente dalla COO); l'interessamento di organi limitrofi e la presenza di versamenti pleurico e/o pericardico sono considerati indicatori prognostici sfavorevoli.
Linfoma B inclassificabile, con caratteristiche intermedie tra il DLBCL e il CHL: Forme rare, colpiscono soprattutto soggetti di età compresa tra i 20 e i 40 anni [49]. La sede più comune di presentazione è il mediastino [50]. La malattia può estendersi agli organi limitrofi ma non è frequente il coinvolgimento linfonodale in sedi periferiche o profonde. Frequente invece l'interessamento midollare. L'istologia pone problemi di diagnosi differenziale tra un DLBCL, soprattutto di tipo mediastinico, ed un CHL [51]. In queste forme è frequente il riscontro di elementi con citologia HRS-like, nonché la presenza di fibrosi in tralci grossolani che mimano una sclerosi nodulare. Variazioni in termini di composizione dell'infiltrato cellulare si possono osservare anche in aree diverse all'interno della stessa lesione. Le complesse problematiche di diagnostica differenziale sconsigliano fortemente un approccio diagnostico ago-bioptico, stante l'alto rischio di ottenere materiale quantitativamente e qualitativamente non adeguato. Il fenotipo della popolazione neoplastica è spesso solo parzialmente dirimente in quanto, a fronte di una reattività per l'LCA/CD45, non è infrequente la coespressione di CD30 e CD15; anche il PAX-5 può risultare positivo, ma talora con un pattern di reattività di non univoca interpretazione in termini di intensità. La presenza di un riarrangiamento dei geni delle Ig è dimostrabile nella gran parte casi.
Sul versante citogenetico molte delle anomalie rilevate sono simili a quelle già descritte nel PMBL. Sul versante clinico si tratta di una forma aggressiva, con una prognosi usualmente più sfavorevole sia rispetto al PMBL che al CHL.
Linfomi B ad alto grado con riarrangiamento di MYC e BCL2 e/o BCL6 (High Grade B Cell Lymphoma - HGBCL, Diffuse Histiocytic/True Histiocytic - DH/TH): costituiscono una nuova entità che comprende uno spettro di linfomi a grandi cellule accomunati dalla presenza di un riarrangiamento di *MYC* e *BCL2* e/o *BCL6* [52]. Questi linfomi hanno una discreta variabilità morfologica: da casi con citologia blastoide, simile a quella di un linfoma mantellare, al linfoma di Burkitt (BL), al linfoma linfoblastico, sino ad aspetti tipo DLBCL NOS [53]. La gran parte di questi linfomi ha una COO di tipo GCB, una frazione di crescita molto elevata (tra il 90 e il 100%), e si caratterizzano clinicamente per un comportamento meno favorevole sia rispetto ai DLBCL che alle forme *double expressor* (vedere più sotto).
Studi retrospettivi hanno evidenziato un outcome sfavorevole nei pazienti con DHL o THL trattati con R-CHOP; una sopravvivenza migliore sembra invece correlarsi all'impiego della combinazione rituximab-EPOCH (etoposide, prednisone, vincristina, ciclofosfamide, e doxorubicina) o di trattamenti comunque più intensivi. Sono esclusi dalla categoria degli HGBCL DH/TH, sia i linfomi follicolari che i linfomi linfoblastici nei quali il riarrangiamento DH potrebbe essere ricondotto ad alterazioni insorte nella fase di progressione da un precedente FL.
Linfomi B ad alto grado inclassificabili (HGBCL NOS): questa categoria comprende un gruppo ristretto di linfomi caratterizzati da una citologia che viene percepita dal patologo come di alto grado, spesso con un'elevata frazione di crescita [54], e per i quali è verosimilmente necessario un approccio terapeutico particolarmente aggressivo.
Da questa categoria sono escluse per definizione le forme DH/TH e il B.
Linfomi *double expressor* (DE): la WHO 2017 [6] distingue i linfomi HGBCL DH, dai cosiddetti linfomi "double expressor" (DE), i quali non costituiscono tuttavia un'entità distinta.
I linfomi DE sono caratterizzati da un aumento dell'espressione delle proteine BCL2 e MYC, in assenza però della doppia traslocazione. Si tratta spesso di DLBCL appartenenti al sottotipo ABC, nei quali l'andamento prognostico, meno favorevole, potrebbe essere riconducibile non solo al profilo DE ma, almeno in parte, anche alla COO di tipo ABC.
Linfoma di Burkitt (BL): la definizione di BL è rimasta sostanzialmente immodificata.
Accanto al BL tipico [55], è stata però riconosciuta l'esistenza di una forma (*provisional*) Burkitt-like, simile per citologia e fenotipo al BL ma caratterizzata oltreché dall'assenza del riarrangiamento di *MYC*, dalla presenza di aberrazioni a carico dell'11q, da cui deriva la denominazione di (BL11q) [56]. Si tratta di forme più frequenti in età pediatrica, con interessamento nodale piuttosto che extranodale. L'andamento clinico è aggressivo, ma la risposta alla terapia può essere buona. Le aberrazioni di 11q sono tipiche di questa variante, ma comunque non specifiche, potendosi osservare anche in casi di BL con traslocazione di MYC.

Altri linfomi B aggressivi

Linfoma DLBCL Epstein-Barr virus (EBV) positivo non altrimenti specificato (DLBCL EBV+ NOS): la precedente specificazione di *elderly* [57] è stata sostituita con la definizione di non altrimenti specificato (NOS) [58], ad escludere da questa categoria tutti gli altri casi nei quali la diagnosi può essere formulata con maggior dettaglio sia sul versante delle caratteristiche cliniche che eventualmente eziopatogenetiche (ad es. la cosiddetta *lymphomatoid granulomatosis*). Si tratta di linfomi ad alto grado che insorgono in

soggetti apparentemente immunocompetenti, di età generalmente > 50 anni, con frequente interessamento extranodale; l'andamento è più aggressivo rispetto ai DLBCL EBV negativi. La modifica nella definizione di questo linfoma è stata suggerita anche dalla segnalazione di casi insorti in soggetti giovani nei quali è più frequente la localizzazione nodale, lo spettro morfologico appare più ampio e, soprattutto, il comportamento clinico risulta più favorevole.

Ulcere cutaneo-mucose EBV+ (EBVMCU): una nuova categoria di lesioni inserite come *provisional*, anche per differenziarle nettamente dal DLBCL EBV+ NOS, rispetto al quale mostrano un andamento più favorevole, talora autolimitantesi, senza necessità di ricorrere a trattamenti aggressivi [59]. Si tratta di lesioni localizzate che interessano soprattutto il cavo orale (gengive) ma talora anche la cute e la mucosa intestinale; possono colpire soggetti con una diminuita capacità di risposta all'EBV a seguito dell'età avanzata o di una condizione di immunodepressione su base iatrogena o infettiva (ad es. HIV).

Linfomi non-Hodgkin T

Linfomi T periferici (PTCL) NOS: Recenti studi di *gene expression profiling* (GEP) e NGS hanno consentito l'acquisizione di dati genetico-molecolari innovativi con una serie di conseguenti riaggiustamenti dei criteri diagnostici e classificativi di molti linfomi a cellule T-nodali ed extranodali, nonché delle forme natural-killer (NK). In particolare, sono state dimostrate una serie di mutazioni ricorrenti in una buona parte dei casi di linfoma T-angioimmunoblastico che hanno consentito di identificarne la COO nelle cellule T-helper follicolari (TFH). Mutazioni simili sono state osservate anche in vari casi di PTCL NOS, con fenotipo TFH, definizione quest'ultima che richiede la dimostrazione dell'espressione di almeno due o tre fra i seguenti antigeni: CD279/PD1, CD10, bcl-6, CXCL13, ICOS, SAP, e CCR5.

La presenza di queste analogie citogenetico-molecolari ha quindi permesso di includere, in un unico spettro lesionale, il linfoma T follicolare angioimmunoblastico [60,61], il linfoma T follicolare [62] e il linfoma T periferico nodale con fenotipo TFH [63].

Le più frequenti analogie in termini di alterazioni citogenetico-molecolari riscontrate in questo gruppo di linfomi comprendono mutazioni a carico di *TET2, IDH, DNMT3, RHOA*, e CD28, nonché fusioni dei geni *ITK-SYK* o *CTLA4-CD28*. Tutte queste alterazioni sono coinvolte, a vario titolo, nei meccanismi della linfomagenesi, potendo nel contempo costituire il bersaglio per possibili *tailored therapies*. Il rimanente gruppo dei PTCL NOS rimane tutt'ora un gruppo di entità molto eterogeneo sia sul versante morfologico e fenotipico che su quello clinico. Studi di GEP sembrano indicare una *signature* comune, vicina a quella dei linfociti T attivati. In un altro studio, sempre di GEP, sono stati identificati invece almeno 3 sottotipi, caratterizzati dalla sovraespressione di GATA 3, TBX21, e di alcuni geni legati alla citotossicità, con corrispondente espressione proteica dimostrabile con tecniche immunoistochimiche. Questi sottotipi sembrano caratterizzarsi per alcune differenze sul versante clinico-prognostico: in particolare, il sottotipo GATA3, identificabile anche immunoistochimicamente, sembra essere correlato ad un andamento prognostico meno favorevole, associandosi a un livello elevato di citochine del tipo Th2. Gli studi con NGS, sia pur in una fase ancora preliminare, iniziano tuttavia a fornire una serie di informazioni utili non solo ai fini puramente classificativi, ma anche terapeutici. I primi dati hanno evidenziato mutazioni di mediatori epigenetici (*KMT2D, TET2, KDM6A, ARID1B, DNMT3, CREBBP, MLL, e ARID2*), di geni coinvolti nel signaling di alcuni pathways (*TNFAIP3, APC, CHD8, ZAP70, NF1, TNFRSF14, TRAF3*) e nell'azione suppressor verso il tumore (*TP53, FOXO1, BCORL1, ATM*)

Linfoma a grandi cellule anaplastiche (ALCL): si presenta istologicamente come una proliferazione di elementi atipici, di grandi dimensioni, con tipica citologia anaplastica, caratterizzati da una crescita coesiva, in ampi *sheets*; almeno l'80% della popolazione linfomatosa mostra una intensa reattività per l'antigene Ki-1/CD30, con il classico pattern di reattività di membrana e/o paranucleare golgiana, *dot-like*. Frequente anche l'espressione del CD25, dell'EMA e di molecole citotossiche quali TIA-1, Granzyme B, e perforina [64]. Il linfoma ALCL deve essere differenziato dai PTCL NOS nei quali la componente cellulare anaplastica è assente o sporadica, e la percentuale di elementi CD30+ è solitamente modesta; infrequente è anche l'espressione dei marcatori citotossici, mentre ALK ed EMA sono costantemente negativi. È fondamentale distinguere gli ALCL in forme ALK+ ed ALK-. I linfomi ALCL ALK+ hanno infatti una sopravvivenza a 5 anni del 70%, superiore sia alla forma ALK- (49%) che ai PTCL-NOS (32%).

ALCL ALK+: Le forme ALK+ (Figura 2 C-D) sono più frequenti nei bambini e nei giovani adulti (media 34 anni), con un certa prevalenza nel sesso maschile (rapporto M:F 3:2). I pazienti si presentano spesso con sintomi B, e malattia in fase già avanzata alla diagnosi (III-IV nel 65% circa dei casi). La malattia interessa i linfonodi ma sono frequenti (60% circa dei casi) anche le localizzazioni extranodali, con una predilezione per la cute, i tessuti molli, e l'osso. Raro l'interessamento del sistema nervoso centrale. Come sopra riportato, la prognosi a 5 anni di questi linfomi è relativamente favorevole con un *overall-survival* compreso tra il 70 e l'85% [65].

Sono state descritte 3 principali varianti morfologiche [6]: la forma classica, *common type*, la più frequente (60%), a sua volta suddivisa nei sottotipi citologici monomorfo e polimorfo (tipo I e II sec. Chan), la variante linfoistiocitica (10%), e la variante con predominanza di piccole cellule (5-10%). Altre varianti più rare sono quella sarcomatoide, quella Hodgkin-like, e quella ricca in granulociti eosinofili. In circa il 15% dei casi si possono osservare forme composite, con presenza, in differenti aree della stessa lesione, di aspetti riferibili alle varianti appena descritte. Le varianti linfoistiocitica e quella con predominanza di piccole cellule sono tipiche dell'età pediatrica. Sul versante immunoistochimico, oltre al CD30, la popolazione linfomatosa è ALK positiva con un pattern di immunoreattività variabile (nucleare, di membrana, citoplasmatico, misto) che si correla alla tipologia della traslocazione (classica o varianti). La gran parte delle forme ALK+ ha un

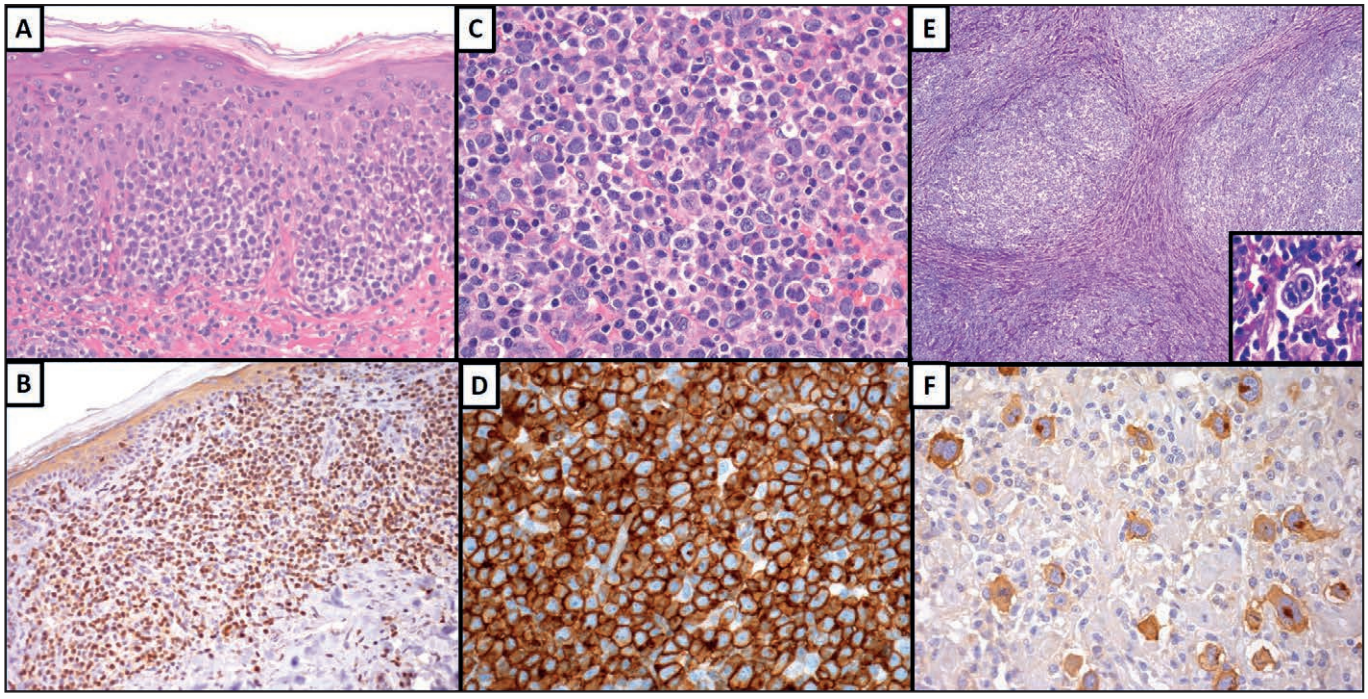


***Figura 2** - Esempi istopatologici di architettura, morfologia e fenotipo dei linfomi di linea T-cellulare e di Hodgkin. A-B: Micosi fungoide (A: Ematossilina-eosina, 10x; B: CD3, 10x); C-D: Linfoma a grandi cellule anaplastico ALK+ (C: Ematossilina-eosina 40x; D: CD30, 40x); E-F Linfoma di Hodgkin classico [E:Ematossilina-eosina 4x (inserto 60x); E: CD30, 40x].*

fenotipo T, talora aberrante, con riarrangiamento clonale del TCR in circa il 90% dei casi; una quota ridotta di casi ha invece un fenotipo *null*, non T, non B. Costante l'espressione di marcatori citotossici; frequente anche l'espressione di PDL-1. Fino all'80% delle forme ALK+ si associa alla t(2;5)(p23;q35) il cui prodotto è costituito dalla proteina di fusione NPM-ALK.

Nel 20% dei casi sono documentabili traslocazioni *variant*, tra il gene ALK e geni partner, localizzati rispettivamente sui cromosomi 1,2,3,17,19,22 e X, con conseguente up-regolazione di *ALK*. Gli studi di GEP hanno evidenziato profili distinti tra le forme ALK+ e quelle ALK-. I geni sovraespressi nelle forme ALK+ comprendono *BCL6, PTPN12, SERPINA1* e *CEBPB*.

ALCL ALK-: Nell'attuale classificazione questa forma non è più ritenuta *provisional*[66], ma è considerata un'entità distinta [6]. Colpisce più frequentemente soggetti adulti, anziani (massima incidenza nella 6° decade), con una prevalenza nel sesso maschile (rapporto M:F 3:2). I pazienti mostrano spesso sintomi B, con malattia in stadio già avanzato alla diagnosi; possibili le localizzazioni extranodali (cute, polmoni, fegato) anche se meno frequenti rispetto alle forme ALK+. La prognosi a 5 anni è variabile, compresa tra il 17 ed il 90%, con un valore medio del 49%. Le caratteristiche citomorfologiche e immunofenotipiche dell'ALCL ALK- sono sostanzialmente sovrapponibili a quelle delle forme ALK+; le uniche differenze riguardano la minor frequenza, in questa forma, di alcune varietà istologiche (linfoistiocitica e con predominanza di piccole cellule) nonché ovviamente la negatività immunoistochimica per ALK. Anche nelle forme ALK-, la gran parte dei casi mostra un riarrangiamento monoclonale per i geni del TCR. Le caratteristiche citogenetiche della forma ALK- sono eterogenee, essendo documentabili una traslocazione a carico di *DUSP22* (6p25.3) [67] (30% dei casi), e una traslocazione a carico di p63 (3q28) (8% dei casi) [68]. Questi riarrangiamenti genici sono mutualmente esclusivi.

I rimanenti 2/3 circa dei casi di ALCL ALK- sono da considerarsi tripli negativi (negatività per *ALK*, *DUSP22*, e *TP63*). La presenza/assenza di queste traslocazioni influisce significativamente sulla prognosi delle forme ALK-: nei casi riarrangiati per *DUSP22* la sopravvivenza a 5 anni si colloca intorno al 90%, risultando addirittura più favorevole rispetto alle forme AL+/-; nelle forme triple negative la sopravvivenza a 5 anni è del 42%, che scende al 17% nei casi con riarrangiamento per *TP63*. Questi dati confermano la necessità di una differenziazione classificativa tra ALCLs CD30+/ALK- e PTCL-NOS con variabile espressione del CD30.

Linfoma a grandi cellule anaplastiche (ALCL) associato ad impianto di protesi mammaria *(provisional)*: Variante rara, associata all'impianto di protesi mammarie (un caso ogni 500.000-3 milioni di donne con impianto protesico mammario), descritta per la prima volta nel 1997.

Si presenta generalmente come un sieroma, causato dall'accumulo di liquido nello spazio tra l'impianto protesico e la circostante capsula fibrosa. L'insorgenza del linfoma è stata osservata sia in caso di impianto di protesi con soluzione salina sia di protesi con gel di silicone; il tempo di latenza tra impianto protesico e insorgenza del linfoma è di circa 10 anni. L'esame citologico del liquido può consentire la identificazione rapida delle cellule tumorali; l'asportazione

della capsula evidenzia come gli elementi linfomatosi tendano a rivestire o talora anche ad infiltrare la capsula; in alcuni casi si verifica la formazione di una vera e propria massa tumorale, palpabile all'esame ispettivo. Le caratteristiche istopatologiche ed immunofenotipiche lesionali sono simili a quelle dell'ALCL ALK-. L'andamento prognostico è usualmente favorevole, con sopravvivenze mediane intorno ai 12 anni, anche previa semplice escissione chirurgica. La formazione di una massa tumorale è ritenuta un fattore prognostico sfavorevole, tale da consigliare il ricorso a una terapia sistemica [69,70].

Linfomi T- intestinali

Nella recente WHO 2017 [6] anche grazie ai dati ottenuti dall'impiego delle tecniche di *whole-genome analysis* e di sottotipizzazione dell'HLA, i linfomi T a primitività intestinale sono stati oggetto di un aggiornamento classificativo. Oggi sono distinti in due entità ben definite, che vanno a sostituire i sottotipi I e II compresi nella precedente definizione di *enteropathy-associated T-cell lymphoma* (EATL). L'EATL di tipo I è ora denominato semplicemente come EATL, a confermarne la stretta associazione con la malattia celiaca, con una prevalenza nei soggetti di origine nordeuropea. L'EATL di tipo II è stato invece ridenominato come Linfoma intestinale T monomorfo epiteliotropo (MEITL), non associato a una storia di malattia celiaca, e con certa prevalenza nei soggetti di origine asiatica e ispanica [71]. Entrambe queste forme devono essere poi differenziate dai cosiddetti disordini linfoproliferativi indolenti del tratto gastrointestinale già descritti in un precedente paragrafo.

Linfoma T associato a enteropatia (EATL): Rappresenta i 2/3 circa di tutti i linfomi T intestinali, e colpisce soprattutto soggetti nella sesta e settima decade di vita, con una certa preponderanza nel sesso maschile. Si è già detto della stretta correlazione con la malattia celiaca della quale costituisce una complicanza rara, ma di estrema gravità [72].

Nel 90% dei casi la malattia interessa il piccolo intestino, soprattutto il tratto digiuno-ileale; altre sedi potenzialmente interessate sono il grosso intestino e lo stomaco; rare le localizzazioni extra-intestinali (linfonodi, midollo, fegato, milza, cute, sistema nervoso centrale). L'esordio clinico è quello di un dolore addominale, talora accompagnato da diarrea e sintomi da malassorbimento; i pazienti possono accusare perdita di peso, anoressia, senso di fatica, vomito; in alcuni casi sono presenti sintomi da ostruzione, o ancora quadri di addome acuto da perforazione, a configurare quelle rare situazioni nelle quali i linfomi rappresentano una vera emergenza clinica. Tra il 16 e il 40% dei pazienti sviluppa una sindrome emofagocitica. La durata della sintomatologia antecedente l'esordio è variabile, spesso < 3 mesi, e, in alcuni casi, l'esordio è preceduto da una storia di malattia celiaca refrattaria associata a digiuno-ileite ulcerativa. L'aspetto istologico prevede una popolazione con citologia variabile, da cellule pleomorfe, a medio-grandi, a anaplastiche, citologia quest'ultima prevalente nel 40% dei casi. Frequenti gli aspetti angiocentrici e angiodistruttivi con necrosi; l'infiltrato infiammatorio d'accompagnamento può risultare molto intenso, sino a oscurare la componente linfomatosa. L'EATL ha un fenotipo CD3+, CD5-, CD7+, CD4-, CD8-, CD103+, con espressione di molecole citotossiche; il CD8 è positivo sino a circa il 30% dei casi. Pressoché costante la presenza di un riarrangiamento clonale dei geni del TRB o del TRG. Si possono inoltre osservare *gains* a carico del cromosoma 9q34 dove si localizzano vari proto-oncogeni (*NOTCH1*, *ABL1*, e *VAV2*), o delezioni a carico del cromosoma 16q12.1. Sono descritte (18% dei casi) perdite a carico del cromosoma 9p; il 56% dei casi mostra perdita di eterozigosità (LOH) del locus 9p21, che ha come bersaglio la *CDKN2A/B*, inibitore del ciclo cellulare. A fronte di un'espressione nucleare aberrante di p53, presente nel 75% dei casi, perdite a carico del cromosoma 17p12.13.2, coinvolgenti la regione che codifica per il gene *tumour suppressor TP53*, sono state documentate invece nel 23% circa dei casi. Sul versante clinico, l'EATL è estremamente aggressivo, con una sopravvivenza di 7 mesi, che raggiunge, ad 1 anno, un valore compreso tra il 31 e il 39%.

È importante sottolineare come la malattia celiaca refrattaria possa costituire un precursore dell'EATL. La malattia celiaca refrattaria è definita come una combinazione di persistenza di sintomi gastrointestinali e di anomalie architetturali dei villi della mucosa del piccolo intestino, con incremento dei linfociti intraepiteliali, questo nonostante l'adozione di una dieta stretta glutine-priva per 6-12 mesi. Si distinguono due forme di malattia celiaca refrattaria, rispettivamente la tipo I e la tipo II, quest'ultima caratterizzata dalla presenza di linfociti con fenotipo aberrante (perdita di CD5 e/o di altri antigeni di linea T) e severa (totale o sub-totale) atrofia dei villi. L'outcome della forma di tipo II è sfavorevole (sopravvivenza a 5 anni compresa tra il 44 ed il 58%) e una percentuale di questi pazienti è destinata a sviluppare un EATL nel corso di 4-5 anni.

Linfoma intestinale T monomorfo epiteliotropo (MEITL): questo tipo di linfoma intestinale non ha correlazioni con la malattia celiaca; si osserva con maggior frequenza in Asia e nei soggetti di origine ispanica, con una preponderanza nel sesso maschile (M:F circa 2:1) [73].

Si localizza nel piccolo intestino, soprattutto a livello digiunale; possibile l'interessamento dei linfonodi mesenterici, dello stomaco (5%) e del grosso intestino (16%). Si presenta come una massa tumorale +/- ulcerata, con dolori addominali, diarrea, sanguinamento, e sintomi da occlusione o perforazione. La popolazione neoplastica è costituita da medie cellule, di aspetto monomorfo, con nuclei tondeggianti, regolari, cromatina dispersa, e una rima di citoplasma chiaro; è presente uno spiccato epiteliotropismo, con distorsione dell'architettura dei villi che appaiono espansi. Nel MEITL, l'infiltrato infiammatorio reattivo è minimo o assente; infrequente la necrosi. La popolazione linfomatosa esprime CD3, CD8, CD56 e TIA-1; gli altri marcatori citotossici sono negativi così come il CD5. Il TCR-gamma è spesso positivo ma qualche caso risulta positivo per il TCR-beta. Nel 20% dei casi si può osservare l'espressione aberrante del CD20. La gran parte dei MEITL (90%) mostra un riarrangiamento clonale del TCR [74].

Sul versante genetico si possono documentare, in circa il 75% dei casi, *extra signals* per *MYC* a carico del cromosoma 8q24 e *gains* a carico del cromosoma 9q34.3. Si tratta di un linfoma aggressivo con una sopravvivenza media di circa 7 mesi, e del 46% a 5 anni.

Linfoma intestinale T non altrimenti specificato (NOS): Questa definizione si applica a tutti quei linfomi T intestinali che non sono inquadrabili nelle due categorie sopra descritte. Nei rari casi segnalati, predomina l'interessamento del colon, e la popolazione linfomatosa, citologicamente eterogenea, mostra un fenotipo citotossico. Si tratta di forme aggressive, spesso disseminate, e non si può escludere che, in alcuni di questi casi, quella intestinale sia da considerarsi solo come una localizzazione secondaria di una malattia sistemica.

Linfoma T epato-splenico (HSTL): È un linfoma raro (1-2% di tutti i LNH T periferici) [75] caratterizzato da un interessamento epato-splenico, in assenza di linfoadenopatie. Clinicamente aggressivo, ha una sopravvivenza mediamente < 2 anni. Costante l'interessamento midollare, che fa sì che la gran parte dei pazienti si trovi in stadio IV di Ann Arbor, già al momento della diagnosi. Colpisce soprattutto adolescenti e giovani adulti (età media di 35 anni alla presentazione), con una certa prevalenza nei soggetti di sesso maschile. Presente sia nei paesi occidentali che in Asia, si associa, nel 20% dei casi, ad un setting di immunodepressione, quale il trapianto d'organo, del quale ne rappresenta una possibile complicanza tardiva. In alcuni pazienti è presente una storia di Morbo di Crohn trattato con azatioprina e infliximab; in altri casi sono state segnalate in anamnesi psoriasi e/o artrite reumatoide trattate con inibitori del TNF e immunomodulatori. Istologicamente, i sinusoidi epatici sono infiltrati da una popolazione linfomatosa di medie cellule, di aspetto monotono, con citoplasma chiaro e nuclei relativamente regolari con nucleoli incospicui; rari gli aspetti pleomorfi; in fase di progressione possono comparire elementi grandi, atipici, di aspetto blastico. Il parenchima splenico mostra atrofia della polpa bianca, mentre la popolazione linfomatosa infiltra i seni e i cordoni della polpa rossa; anche nel midollo l'interessamento è prevalentemente sinusale e può determinare alcuni problemi di diagnosi differenziale con la leucemia T a *large granular lymphocytes* (LGL). Le cellule tumorali sono positive per CD3, per il recettore Tgamma/delta ed esprimono TIA-1; variabile (-/+) la positività per CD4 e CD56; negativi il recettore Talfa/beta, il CD5, e le molecole citotossiche Granzyme-B e perforina. Sono descritti rari casi Talfa/beta [76]. Le forme Tgamma/delta mostrano un riarrangiamento dei geni TRG con riarrangiamento bi-allelico dei geni TRD. In buona parte dei casi è documentabile la presenza dell'isocromosoma 7q.

Linfomi T-EBV +

Linfoma T/NK extranodale *nasal type*: La forma più comune in quest'ambito è costituita dal linfoma T/NK extranodale definito come nasal type [77]. Nonostante sia più frequente in Asia, in Centro e Sud-America, questo linfoma può essere osservato con minor incidenza anche in Europa e nei paesi occidentali più in generale. La sede più colpita è il tratto aero-digestivo superiore, con lesioni che possono interessare cavità nasale, nasofaringe, seni paranasali, e palato. Possibili anche localizzazioni in altre sedi extranodali (cute, tessuti molli, tratto gastroenterico, polmoni, testicoli). Istologicamente si presenta come un infiltrato diffuso, che tende ad ulcerare le mucose interessate; tipici gli aspetti angiocentrici e angio-distruttivi, con necrosi fibrinoide e numerosi sparsi corpi apoptotici. Gli elementi linfomatosi hanno dimensioni variabili con frequente commistione di piccole e grandi cellule; in alcuni casi è presente un intenso infiltrato infiammatorio reattivo che, soprattutto nelle forme con citologia prevalente a piccole cellule, può determinare problemi di diagnostica differenziale con una lesione infiammatoria. Sono forme di derivazione soprattutto NK o, in minor misura, T-citotossica. Il tipico profilo immunofenotipico include espressione di CD2, CD56, e CD3-epsilon; nel subset a derivazione T-citotossica si può osservare espressione di CD5, CD8, e TCR (gamma/delta o alfa/beta). Comune, indipendentemente dall'origine, la positività per le molecole citotossiche; l'antigene CD30 è espresso in circa il 30% dei casi. Fondamentale la dimostrazione della presenza di EBV, soprattutto con tecniche di ibridizzazione in situ (ISH), in assenza del quale la formulazione di una diagnosi di T/NK nasal-type deve essere valutata con particolare cautela. Nonostante siano state descritte varie aberrazioni citogenetiche, non è stata tuttavia dimostrata una traslocazione specificamente associata a questo tipo di linfoma. La prognosi del linfoma T/NK *nasal-type* è variabile; si tratta di un linfoma generalmente aggressivo, con una sopravvivenza a 5 anni stimata intorno al 30-40%. Esistono tuttavia casi con andamento meno sfavorevole, caratterizzati da una discreta risposta terapeutica comprendente anche eventuali trattamenti radioterapici. La presenza di una componente citologica di alto grado, trasformata, unitamente ad una frazione di crescita elevata (>40%), sono ritenuti indicatori prognostici sfavorevoli [78].

Altri disordini linfoproliferativi e Linfomi T cellulari EBV+ La WHO 2017 [6] ha inserito, accanto al linfoma NK/T *nasal type*, una serie di altre patologie T EBV correlate, tutte relativamente rare, che sono qui di seguito descritte sinteticamente.

- **Linfoma T sistemico EBV+ del bambino:** Colpisce bambini e giovani adulti in aree asiatiche (Giappone, Taiwan e Cina) [79] e più raramente in Centro e Sud America; origina da una proliferazione clonale T EBV+, con fenotipo attivato, citossico. Può seguire un'infezione primaria acuta da EBV, o manifestarsi in corso di un'infezione cronica attiva sempre da EBV.
  È un linfoma sistemico, con interessamento multiorgano (fegato, milza, linfonodi, midollo, cute, polmoni). La popolazione neoplastica è costituita da piccole cellule, prive di significative atipie o, più raramente, da cellule medio-grandi, pleomorfe. In sede epato-splenica è tipico l'interessamento sinusale, talora con emofagocitosi, quest'ultima osservabile anche in sede midollare. Le cellule linfomatose sono CD2+, CD3+, CD56-, TIA-1+; il fenotipo CD8 prevale nei casi insorti dopo infezione acuta da EBV. Fondamentale la ricerca dell'EBV, soprattutto mediante ISH. La prognosi è generalmente infausta, in alcuni casi con un andamento fulminante.
- **Infezione sistemica cronica attiva da EBV (CAEBV) a cellule T/NK:** La distribuzione epidemiologica è simile a quella del linfoma sistemico EBV+; si tratta di un disordine linfoproliferativo a derivazione T (CD4+, CD8+ citotossici, NK, raramente Tgamma/delta) [80], poli (5%), oligo (11% riarrangiamento geni TR), o più

spesso monoclonale (84% riarrangiamento geni TR); la sintomatologia è variabile, talora *mononucleosi-like*, con sintomi datanti da almeno tre mesi, aumentati livelli serici di EBV DNA, e quadri altrettanto variabili di danno d'organo, con dimostrazione di EBV nelle sedi lesionali. Non devono essere presenti in anamnesi pregresse condizioni di immunodeficienza, neoplasie, o malattie autoimmuni. Esistono anche forme della malattia a localizzazione cutanea, che vanno dal disordine linfoproliferativo definito come *Hydroa vacciniforme-like* [81,82] alla *Severe mosquito bite allergy* [83], con un decorso tendenzialmente cronico, indolente, ma con una serie di potenziali rischi correlati sia al possibile sviluppo di una sindrome emofagocitica, che ad una eventuale progressione sistemica in linfoma/leucemia [84].

La diagnosi istologica di infezione sistemica cronica da EBV a cellule T/NK è complessa, in quanto la popolazione linfoide può non evidenziare modificazioni immediatamente indicative per una forma linfoproliferativa. Sul versante immunofenotipico la popolazione EBV infettata è costituita da elementi T in più del 50-55% dei casi, da cellule NK (40%), o da una popolazione mista T/NK (4% circa dei casi); rari (< 2%) i casi di CAEBV a cellule a fenotipo B. La prognosi di queste forme è variabile (tra il 59 e l'87% a 5 anni), a confermare trattarsi di uno spettro lesionale complesso che comprende forme a diverso potenziale evolutivo, alcune con un andamento indolente/cronico altre con tendenza alla progressione in linfoma/leucemia.

Linfomi primitivi cutanei (PCL)

La definizione di linfoma primitivo cutaneo (PCL) include quei linfomi che si presentano primitivamente a livello cute, in assenza di altre localizzazioni al momento della diagnosi e nei sei mesi a questa successivi. Il termine temporale di sei mesi è però da ritenersi solo indicativo, e una diagnosi certa di primitività cutanea richiede sempre di essere confermata dalla stadiazione clinica.

I PCL sono la seconda più frequente forma di linfoma extranodale, e presentano caratteristiche clinico-patologiche e biologiche [6] talora molto diverse rispetto alle corrispondenti forme linfonodali; differenti sono anche l'andamento clinico prognostico e la gestione terapeutica che in taluni casi non richiede trattamenti aggressivi [85]. A differenza delle forme nodali, nei PCL le forme a fenotipo T/NK rappresentano il 65-75%, il restante 25-35% è costituito da forme B.

Linfomi primitivi cutanei T (CTCL)

La micosi fungoide (MF)

Rappresenta da sola il 50% circa di tutti i PCL (Figura 2 A-B); nella sua forma classica si presenta in forma di chiazze +/- eritematose che possono evolvere in placche infiltrate e quindi, nelle fasi avanzate della malattia, in vere e proprie lesioni nodulo-tumorali [86]. In rari casi la malattia può mostrare lesioni nodulo-tumorali già all'esordio (cosiddetta MF *tumour d'emblée*). La MF ha generalmente un decorso cronico, indolente, con sopravvivenze a 5 anni > 90%, soprattutto nei casi in cui predominano le lesioni in chiazza e/o con placche di limitata estensione. La prognosi è invece sfavorevole nella fase tumorale, con un andamento clinico aggressivo e una possibile diffusione extra-cutanea; in questa fase una delle cause di mortalità è spesso costituita da una sepsi, secondaria alla infezione delle lesioni nodulo-tumorali che vanno incontro a ulcerazione. L'istologia tipica della MF consiste in un infiltrato epidermotropo di linfociti T, prevalentemente di piccole dimensioni, con nuclei irregolari, pleomorfi, convoluti, che tendono a disporsi lungo la giunzione dermo-epidermica; possibile la presenza di aggregati intraepidermici di elementi T atipici, a costituire i cosiddetti *microascessi di Pautrier*. Con il progredire della malattia la citologia dell'infiltrato tende a modificarsi, e aumenta in particolare il numero delle medie e talora grandi cellule, sempre pleomorfe. Nelle fasi avanzate della malattia la popolazione neoplastica può andare incontro a una trasformazione in una forma ad alto grado, spesso con presenza di una componente anaplastica. Nell'attuale schema classificativo, una MF può definirsi istologicamente trasformata quando almeno il 25% della popolazione neoplastica sia composta da grandi cellule. La WHO 2017 [6] ha limitato a tre il numero delle varianti della MF [87], rispettivamente:

a) la variante follicolare (10% dei casi), nella quale l'infiltrato linfomatoso ha un atteggiamento spiccatamente folliculotropo, con esocitosi dei linfociti atipici nell'epitelio dei follicoli; la prognosi è ritenuta meno favorevole rispetto alla MF classica;
b) la variante granulomatosa, *slack skin*, con una clinica peculiare, con vistose lesioni di aspetto cadente interessanti le sedi plicali (soprattutto ascellare e inguinale); l'infiltrato T linfomatoso è frammisto a una ricca componente istiocitaria, con sparse cellule giganti multinucleate; la comparsa delle lesioni plicali è favorita oltreché dal peso dell'infiltrato lesionale dall'azione degli enzimi elastolitici prodotti localmente, che causano una frammentazione delle fibre elastiche;
c) la varietà *pagetoid reticulosis*, definita anche come malattia di Woringer-Kolopp [88]. Clinicamente indolente, si presenta in forma di lesioni solitarie, a lenta crescita, di aspetto psoriasiforme, spesso nelle sedi acrali; istologicamente si caratterizza per un infiltrato linfomatoso spiccatamente epidermotropo. Questa variante deve essere differenziata dalla *pagetoid reticulosis* disseminata, meglio conosciuta come malattia di Ketron-Goodman [89], nella quale l'infiltrato linfomatoso è anch'esso spiccatamente epidermotropo. Nelle forme tipo Ketron-Goodman, l'andamento clinico è invece sfavorevole, e questi casi sono oggi collocati nell'ambito dei linfomi T CD8+ epidermotropi aggressivi o nella categoria dei linfomi T cutanei Tgamma/delta.

Sindrome di Sezary (SS)

Forma clinicamente aggressiva, dove l'interessamento cutaneo, eritrodermico associato a un intenso prurito, si accompagna a una componente leucemica e a una linfoadenopatia, spesso generalizzata [90]. Gli elementi T neoplastici hanno nuclei cerebriformi (cellule di Sezary), e sono documentabili sia nella cute che nel periferico dove la conta deve risultare ≥ 1000/microlitro. Gli elementi linfomatosi hanno un fenotipo CD3+; CD4+; CD8-; CD26-; PD1+, con espressione dell'antigene linfoide cutaneo (CLA) e dei recettori di *homing cutaneo* CCR4 e CCR7 [91].

Disordini linfoproliferativi primitivi cutanei CD30+ (CD30+ PCLD)

Sono la seconda più frequente (25% circa) categoria di linfomi T a primitività cutanea [92].

Questa definizione racchiude uno spettro di lesioni con marcate analogie morfologiche, immunofenotipiche e citogenetico-molecolari. Lo spettro comprende la papulosi linfomatoide (LyP), il linfoma a grandi cellule anaplastiche (ALCL), e alcuni casi definiti come *borderline lesions* (BL), con caratteristiche intermedie tra LyP e ALCL [6].

In linea generale la prognosi dei pazienti affetti da CD30+ PCLD è estremamente favorevole e, nella gran parte dei casi, non richiede un approccio terapeutico aggressivo [93]. È comunque utile sottoporre questi pazienti ad un follow-up, in quanto alcuni studi hanno riportato un rischio aumentato di associazione o di successivo sviluppo di un linfoma (MF, LH, ALCL). È anche importante che i CD30+ PCLD vengano differenziati sia da alcune lesioni cutanee di natura infiammatoria e/o infettiva, nonché da altri linfomi T cutanei con variabile espressione del CD30 da parte della popolazione neoplastica.

Papulosi linfomatoide (LyP)

Si presenta in forma di lesioni papulari multiple, talora ricorrenti, istologicamente maligne, ma clinico benigne, con auto-regressione completa in circa 2-3 settimane. Questa è di fatto la definizione coniata originalmente da Mac Cauley, nell'ormai lontano 1968, tutt'ora insuperata per chiarezza e capacità di sintesi. Le tipiche lesioni della LyP sono papule (diametro da pochi mm sino a 1 cm) che spesso interessano l'intera superficie con esclusione del palmo delle mani e della pianta dei piedi. Le papule vanno incontro a necrosi, inizialmente nella porzione centrale, e l'evoluzione lesionale si completa in esiti varicelliformi, seguiti da una completa *restitutio ad integrum* della superficie cutanea. Nel corso degli anni, la definizione originale di LyP è stata modificata, nel senso di un progressivo allargamento dello spettro lesionale, che conta oggi ben 6 distinte varianti: la LyP di tipo A (corrispondente alla forma classica della malattia), e le LyP rispettivamente di tipo B, C, D, E, e F. Alcune di queste varianti sono tuttavia particolarmente rare, e saranno verisimilmente oggetto di future più precise caratterizzazioni sul versante biomolecolare [94,95].

- *LyP tipo A (forma classica):* Rappresenta >80% delle LyP; le caratteristiche cliniche sono quelle appena sopra descritte; istologicamente si osserva un infiltrato dermico, con un pattern tipicamente *V-shaped*, a composizione polimorfa; all'interno di una popolazione infiammatoria quantitativamente predominante di piccoli linfociti, granulociti spesso eosinofili, e plasmacellule, sono presenti alcuni elementi atipici, con citologia da simil-HRS ad anaplastica. Gli elementi atipici sono in numero limitato, isolati, con disposizione "sparsa"; talora si aggregano in piccoli clusters (non più di 3-5 cellule) [96].
  Gli elementi atipici esprimono il CD30 (pattern tipico di membrana e/o golgiano, *dot-like*) il CD25, vari marcatori di linea T, con prevalenza delle forme CD4+, e sono positivi per le molecole citotossiche. Negative la colorazione per ALK e la ricerca della t(2;5) (p23;q35). La negatività per PAX-5 è utile nella diagnostica differenziale con le rare localizzazioni cutanee secondarie in corso di linfoma di Hodgkin. La ridotta quota di elementi atipici ostacola la dimostrazione di un riarrangiamento clonale del TCR con PCR su materiale da *whole section*; risultati più affidabili si ottengono solo ricorrendo a tecniche di *single cell PCR* previa microdissezione laser, metodica peraltro non attuabile nella diagnostica routinaria.
- *LyP tipo B:* <5% dei casi di LyP; si discosta dalla forma classica in quanto l'infiltrato, caratterizzato da un "pattern" prevalentemente epidermotropo, è costituito da piccoli linfociti +/- pleomorfi, tra l'altro spesso CD30 negativi. L'aspetto istologico è più simile a quello di una MF nella sua fase in placca, con la quale va posta in diagnosi differenziale [97].
- *LyP tipo C:* rappresenta il 10% circa dei casi di LyP; l'infiltrato è costituito da una discreta quota di elementi atipici CD30+, nettamente più numerosi rispetto a quelli presenti nella LyP di tipo A; la crescita degli elementi atipici tende ad essere coesiva, in ampi aggregati, che ricordano il linfoma ALCL (vedere più sotto), rispetto al quale l'infiltrato infiammatorio reattivo d'accompagnamento è tuttavia più intenso; frequenti le aree di necrosi; il fenotipo degli elementi atipici è simile a quello della forma classica. In questa variante, ritenuta da alcuni coincidente con le lesioni *borderline*, l'epidermide sovrastante l'infiltrato è spesso ulcerata, e sono osservabili fenomeni di eliminazione transepidermica degli elementi CD30+; l'epidermide sia sovra che immediatamente peri-lesionale, mostra spesso una marcata iperplasia pseudo-epiteliomatosa, stimolata dal rilascio locale di citochine [98].
- *LyP tipo D:* corrisponde a meno del 5% dei casi di LyP [99]; l'infiltrato è almeno in parte simile a quello della LyP di tipo B, rispetto al quale l'epidermotropismo appare ancora più marcato, con aspetti di tipo pagetoide. Gli elementi atipici, di piccole e medie dimensioni, pleomorfi, esprimono però sempre il CD30; il fenotipo prevalente è CD8+, a mimare un linfoma T citotossico epidermotropo, con il quale va posta in diagnosi differenziale. Alcuni casi di LyP tipo D hanno un fenotipo gamma/delta.
- *LyP tipo E:* Forma estremamente rara, caratterizzata da un infiltrato spiccatamente angiocentrico e angiodistruttivo, costituito da piccole e/o più spesso medie cellule pleomorfe, positive per CD30 e CD8. Frequenti necrosi [100] e emorragie determinate dall'occlusione microtrombotica e dalla distruzione dei vasi, fenomeni questi responsabili del quadro clinico lesionale. Le lesioni si presentano in forma di papule-noduli singole o comunque in numero limitato, che vanno rapidamente incontro a una rapida ulcerazione con estesa necrosi e formazione di un'escara che tende all'autorisoluzione con completa *restitutio ad integrum*.
- *LyP tipo F:* Anch'essa estremamente rara, colpisce soprattutto soggetti anziani in forma di lesioni più spesso singole, localizzate. L'infiltrato mostra spesso un aspetto da nodulare a diffuso, ed è costituito da cellule T CD30+, variabili per dimensioni, pleomorfe, con una certa tendenza epidermotropa; l'aspetto citoarchitetturale complessivo può ricordare quello di una MF in fase di trasformazione. La caratteristica identificativa di questa variante di LyP è costituita dalla presenza del riarrangiamento *DUSP22-IRF4*, con un riarrangiamento cromosomico coinvolgente il locus DUSP22-IRF4 sul cromosoma 6p25.3 [101].

- *Lesioni borderline (BL):* Si tratta di lesioni con caratteristiche clinico-patologiche intermedie tra quelle della LyP di tipo classico e quelle del linfoma CD30+ ALCL. Clinicamente, i pazienti presentano lesioni più spesso papulo-nodulari o nodulari, di dimensioni maggiori rispetto a quelle della LyP classica; l'ulcerazione è frequente così come l'autorisoluzione lesionale (completa o parziale). Le caratteristiche istologiche ed immunofenotipiche della popolazione atipica sono simili a quelle descritte per la LyP, di tipo C.
  In passato, casi con le caratteristiche della LyP di tipo C e delle lesioni *borderline* erano spesso definiti come *atypical regressing histiocytosis* (RAH) o ancora come *primary cutaneous CD30+ ALCL with regressing features*.

Linfoma primitivo cutaneo CD30+ a grandi cellule anaplastiche (CD30+ C-ALCL)

È il secondo più frequente tipo di linfoma T cutaneo; colpisce soprattutto soggetti adulti e anziani (età media 60 anni); rari i casi pediatrici. Clinicamente si presenta in forma di noduli-tumori, solitari o comunque localizzati; sedi preferenziali sono il tronco, il volto, e le estremità. La malattia è confinata alla cute ma in alcuni casi può essere dimostrabile l'interessamento di un singolo linfonodo contiguo (loco-regionale) che, in assenza di altre localizzazioni, non inficia tuttavia la diagnosi di primitività cutanea [102]. L'infiltrato neoplastico è costituito da una proliferazione grossolanamente nodulare e/o diffusa, spesso dermo-ipodermica, di elementi atipici di grandi dimensioni, a crescita coesiva. Gli elementi atipici hanno una citologia variabile, più spesso anaplastica; in alcuni casi sono presenti aspetti immunoblastici e/o pleomorfi; si possono anche osservare elementi HRS-simili [6]. L'epidermotropismo è variabile, analogamente all''intensità dell'infiltrato infiammatorio reattivo. L'antigene CD30 è intensamente espresso, così come il CD25, in almeno il 70-80% della popolazione linfomatosa, quest'ultima caratterizzata da un fenotipo T, più spesso CD4+, con positività per le molecole citotossiche. Nella gran parte dei casi è presente un riarrangiamento clonale del TCR. La proteina ALK è negativa, con assenza della t(2;5)(p23;q35); sono stati segnalati casi sporadici, anche in età pediatrica, di CD30+ ALCL cutanei con positività citoplasmatica per ALK, associata una traslocazione *variant* del gene ALK.
La estrema rarità di questi casi impone tuttavia alcune cautele diagnostiche. Una diagnosi di CD30+/ALK+ ALCL a primitività cutanea deve essere formulata solo dopo una stadiazione clinica approfondita, a escludere una localizzazione cutanea precoce di una forma sistemica, ancora clinicamente occulta. Nel 25% dei casi di ALCL CD30+ cutaneo si osserva un riarrangiamento del locus *DUSP22-IRF4* sul cromosoma 6p25.3 [103]. La presenza dello stesso riarrangiamento in alcuni casi di LyP, ne riduce tuttavia l'utilità ai fini di una diagnostica differenziale tra queste forme. Peraltro la presenza di questo riarrangiamento sembra, al momento, sostanzialmente influente in termini prognostici. Al contrario la presenza del riarrangiamento di *TP63*, dimostrata in un numero comunque limitato di casi di CD30+ ALCL cutaneo, sembra invece correlata a un andamento clinico di maggiore aggressività. Gli studi di GEP sin qui condotti hanno dimostrato, in comparazione con le forme nodali, una elevata espressione dei geni che codificano per i recettori chemochinici di *homing* cutaneo (*CCR10* e *CCR8*), nonché altre differenze in termini di espressione genica sempre correlate al microambiente locale; questi dati potrebbero, sia pur solo in parte, contribuire a spiegare il comportamento clinico assolutamente favorevole (90% di sopravvivenza a 10 anni) delle forme primitive cutanee rispetto a quello delle forme nodali.

Altri tipi di linfomi T primitivi cutanei

Linfoma T sottocutaneo simil-panniculitico (SPTCL): Raro (< 1% di tutti i LNH), colpisce tutte le età, con una mediana di 35 anni [104]; è però importante segnalare che il 20% circa di questi linfomi insorge in soggetti di età < 20 anni, compresi alcuni casi in età pediatrica [105]. Una quota significativa di questi pazienti ha una storia di patologie autoimmuni, spesso un lupus eritematoso sistemico, di qui le problematiche di diagnostica differenziale con una panniculite lupus correlata [106,107]. Le lesioni, variabili per dimensioni da pochi millimetri ad alcuni centimetri, sono costituite da noduli e/o placche sottocutanee; le sedi più frequenti sono il tronco e le estremità; le lesioni più grandi possono andare incontro a necrosi e talora (più raramente) ulcerazione; il 50% circa dei pazienti ha sintomi sistemici e con alterazione dei valori ematochimici (leucopenia, alterazione dei test di funzionalità epatica); nel 15-20% dei casi si assiste all'insorgenza di una sindrome emofagocitica.
Istologicamente, l'infiltrato linfomatoso interessa i lobuli del tessuto adiposo sottocutaneo, con risparmio dei setti; analogamente risparmiati sono il derma e l'epidermide. La popolazione neoplastica è costituita da piccole-medie cellule, con nuclei irregolari, pleomorfi, spesso picnotici, con citoplasma talora discreto; tipica la distribuzione a corona (*rimming*) delle cellule linfomatose, che tendono a circoscrivere i singoli adipociti; si possono inoltre osservare numerosi istiociti-macrofagi, spesso vacuolati, in associazione a focolai di steatonecrosi, questi ultimi sostituiti poi da una fibrosi riparativa. L'assenza di plasmacellule e di altri elementi infiammatori, presenti invece nelle panniculiti su base autoimmune, può essere di aiuto nella diagnostica differenziale tra queste forme. Il SPTCL ha un profilo T periferico CD8+alfa/beta, con espressione di molecole citotossiche e negatività per CD56; nella gran parte dei casi è presente un riarrangiamento clonale del TCR; l'EBV è costantemente negativo. La prognosi del SPLTC è relativamente favorevole, con valori di sopravvivenza stimati in circa l'80% a 5 anni; meno buona la prognosi dei casi complicati dall'insorgenza di una sindrome emofagocitica. È fondamentale differenziare il SPTCL dal linfoma Tgamma/delta a localizzazione sottocutanea, precedentemente ed erroneamente annoverato tra i SPTCL. Il linfoma Tgamma/delta è infatti clinicamente molto più aggressivo, differenziandosi dal SPTCL per un atteggiamento spiccatamente infiltrativo nei confronti sia del derma che dell'epidermide, con necrosi anche estesa, e ulcerazioni. La positività per CD56 e la frequente negatività per il CD8 sono utili nella diagnostica differenziale tra le due entità.
Forme rare di linfomi T primitivi cutanei: Rappresentano < 1%

di tutti i linfomi T cutanei; abbiamo già sopra brevemente accennato al linfoma primitivo cutaneo Tgamma/delta che colpisce più spesso soggetti adulti, avendo le estremità quali sedi preferenziali; oltre al pattern sottocutaneo, questo linfoma può mostrare un pattern dermico o ancora un pattern epidermotropo; questi aspetti possono presentarsi anche in forma combinata. Si tratta, salvo rare eccezioni, di una forma aggressiva, e il coinvolgimento sottocutaneo è ritenuto prognosticamente sfavorevole. Un'altra forma rara è costituita dal linfoma primitivo cutaneo CD8+ citotossico, epidermotropo, che colpisce anch'esso soggetti adulti in forma di lesioni cutanee, localizzate o generalizzate; possibile anche l'interessamento mucosale. La popolazione neoplastica ha un aspetto variabile (da piccole-medie a grandi cellule), e si caratterizza per uno spiccato epidermotropismo; è compresa in questo istotipo la già citata malattia di Ketron-Goodman, in passato ritenuta una forma disseminata della MF pagetoide.
Sul versante fenotipico questo linfoma esprime il recettore alfa/beta, con positività per CD3, CD8, e per le molecole citotossiche; il CD56 è negativo; analogamente negativa è la ricerca di EBV. La variante con pattern epidermotropo deve essere differenziata rispettivamente da una MF e da una papulosi linfomatoide di tipo D. Le rimanenti forme rare di linfoma T cutaneo (linfoma T primitivo cutaneo CD8+ acrale e linfoma primitivo cutaneo a piccole/medie cellule CD4+) sono state già state descritte in un precedente paragrafo.

Linfomi primitivi cutanei B

Linfoma primitivo cutaneo della zona marginale (PCMZL)

Un linfoma indolente che si presenta clinicamente in forma di piccoli noduli/placche, +/- infiltrate, spesso circondate da un alone eritematoso; le sedi preferenziali sono il tronco e gli arti superiori; tra le presentazioni cliniche inusuali ricordiamo quella anetodermica (in associazione a patologie autoimmuni), quella tipo rosacea granulomatosa, nonché più raramente quella lipoma-like, in forma di noduli sottocutanei, e tipicamente associata a infezione da HCV [108].
Le caratteristiche cito-architetturali del PCMZL sono correlate alla cronologia e all'andamento clinico lesionale. Inizialmente, l'infiltrato è modesto, limitato al derma, e con un pattern di crescita nodulare; frequente la presenza di residui follicoli reattivi, la cui presenza determina notevoli, e talora non risolvibili, problemi di diagnostica differenziale nei confronti di un infiltrato reattivo (pseudolinfoma) [109,110]. Con il progredire della malattia, i noduli tendono a confluire, sino a una crescita diffusa, spesso con estensione anche ipodermica. La popolazione linfomatosa è costituita da elementi con citologia marginale, da centrocito-simile a monocitoide, talora con aspetti di modulazione in senso secernente, e presenza di una componente plasmacellulare monotipica. In alcuni casi la componente monocitoide può risultare preponderante. Se presente, la componente modulata in senso secernente e plasmacellulare tende spesso a disporsi alla periferia dell'infiltrato. Caratteristica la presenza di un infiltrato linfocitario reattivo T cellulare, talora marcato, e tale da oscurare la componente B linfomatosa, complicando ancora una volta la diagnostica differenziale con una forma reattiva. Anche nel caso dei PCMZL non sono disponibili marcatori immunoistochimici specifici. Il PCMZL esprime CD20 e BCL-2 con negatività per BCL-6; variabile l'espressione di CD23; in caso di presenza di componente modulata in senso secernente e plasmacellulare, opportuna la ricerca di un eventuale restringimento monotipico delle catene leggere delle immunoglobuline. Generalmente modesta la frazione di crescita, valutata con Mib-1/Ki-67. Sul versante citogenetico la traslocazione IGH/*MALT1*(t14;18)(q32q21) si osserva solo raramente nel PCMZL, mentre più spesso assenti sono le altre traslocazioni coinvolgenti rispettivamente IGH, *BCL10, MALT-1, BCL-2*, e *BIRC3*. Si distinguono oggi due sottotipi di PCMZL. Il primo, definito *imunoglobulin class-switched form*, ha un pattern di crescita di tipo più spesso *patchy*, perivascolare e periannessiale, talora nodulare (piccoli noduli); è presente una componente plasmacellulare che esprime IgG, IgA, o IgE; significativo l'infiltrato T linfocitario reattivo. Gli eventuali follicoli residui esprimono IgD, mentre la popolazione B è negativa per CXCR3 [111]. Il secondo sottotipo, definito *imunoglobulin non class-switched form*, mostra invece un pattern di infiltrazione nodulare (noduli di maggiori dimensioni), spesso con tendenza alla confluenza; la popolazione B esprime CXCR3 in circa il 50% dei casi; gli eventuali follicoli residui sono IgM; l'infiltrato T reattivo è solitamente modesto. Si ritiene attualmente che la forma *imunoglobulin non class-switched form* sia da considerarsi linfomatosa mentre la categoria *imunoglobulin class-switched form* comprenderebbe soprattutto lesioni di natura reattiva. La dimostrazione della presenza di una popolazione con restringimento monotipico delle catene leggere è sicuramente utile a confermare un sospetto di linfoma. Il dato relativo alla clonalità non può essere tuttavia considerato definitivamente diagnostico, almeno in prima istanza, necessitando la dimostrazione della presenza dello stesso clone in test ripetuti. Pertanto, nei casi dubbi, si suggerisce l'adozione di un approccio prudenziale, richiedendo oltre a uno stretto "follow-up", eventuali ulteriori controlli bioptici finalizzati anche alla ripetizione dei test di clonalità. La prognosi dei PCMZL è di solito estremamente favorevole (>98% a 5 anni), a ribadire come una parte di questi casi siano in realtà delle lesioni di natura reattiva. Le recidive locali sono relativamente frequenti, ma non si può escludere che una parte di esse siano ascrivibili a una incompleta asportazione della lesione cutanea iniziale, piuttosto che a una vera recidiva.

Linfoma primitivo cutaneo centro-follicolare (PCFCL)

Conosciuto anche come linfoma di Crosti, dal nome del dermatologo milanese che fu il primo a riconoscerne l'esistenza. È considerato un'entità distinta, e non una semplice variante del FL nodale. È il più frequente linfoma B a primitività cutanea [112], colpisce soggetti con un'età media intorno ai 50 anni, senza una specifica prevalenza di sesso; le sedi più colpite sono la regione testa collo e il dorso. Le lesioni, più spesso solitarie o con distribuzione regionale, sono nodulo-tumorali o in placca, e sono generalmente circondate da un alone eritematoso. L'infiltrato neoplastico è costituito da elementi di derivazione centrofollicolare; sono descritti tre patterns principali di crescita, rispettivamente follicolare, follicolare e diffuso, diffuso. Nelle

forme con pattern nodulare i noduli/follicoli neoplastici sono costituiti prevalentemente da centrociti, in assenza di macrofagi con corpi tingibili; il pattern diffuso non costituisce sempre una progressione da un precedente pattern follicolare, ma può esordire come tale de novo. La popolazione neoplastica è formata da centrociti, da medio a grandi, e da una variabile quota centroblastica; nelle forme con pattern diffuso, non è infrequente osservare elementi con citologia fusata *spindle* determinata, almeno in parte, da fenomeni distorsivi correlati alla fibrosi reattiva interstiziale. A differenza delle forme nodali, il *grading* lesionale, ovvero la quantificazione della componente di grandi cellule di tipo centroblastico, è prognosticamente ininfluente. Ciononostante, la presenza di una ricca quota centroblastica deve far considerare una diagnosi differenziale sia nei confronti dei linfomi B primitivi cutanei a grandi cellule (PCDLBCL) *Leg-type* (LT), sia nei confronti dei PCDLBCL non altrimenti specificati (NOS). Nei PCFCL, la popolazione neoplastica esprime CD20, CD79a, Pax-5, e BCL-6. La positività per BCL-2, tipica delle corrispondenti forme nodali è presente solo in una percentuale variabile tra il 10 ed il 40% dei casi; solo in circa il 18% dei casi con espressione immunoistochimica di BCL-2, la metodica FISH consente di dimostrare la concomitante presenza della t(14;18). L'espressione immunoistochimica di BCL-2 non sembra influenzare negativamente la prognosi; nelle forme traslocate l'incidenza di recidive sembra maggiore, e l'andamento prognostico risulta relativamente meno favorevole. Si tratta di dati, questi ultimi, che richiedono di essere verificati su casistiche più ampie, ma che confermano come la negatività immunoistochimica per BCL-2 non possa più essere ritenuta come sinonimo di primitività cutanea. La colorazione con anti-CD21 è utile per dimostrare la presenza di un residuo *meshwork* dendritico, più evidente nei casi con pattern follicolare. Variabile la frazione di crescita, comunque nettamente inferiore a quella osservabile nei follicoli reattivi e, in quanto tale, parametro utile nella diagnostica differenziale nei confronti di un eventuale pseudolinfoma B con pattern follicolare. In più del 90% dei casi è presente un riarrangiamento monoclonale per le IgH. Nonostante l'incidenza di recidive possa raggiungere valori prossimi al 40%, la prognosi dei PCFCL rimane ottima con valori di sopravvivenza > al 90% a 5 anni; una estensione extracutanea della malattia è stata osservata in circa il 10% dei casi a comprendere un interessamento dei linfonodi locoregionali [113]. Si discostano in parte da questo andamento favorevole alcuni casi di PCFCL ad insorgenza negli arti inferiori, nonché parte delle forme con citologia *spindle*, associate in alcuni studi a un maggior rischio di spread extracutaneo [114]. Ribadiamo infine come sia importante che il patologo indichi sempre lo stato dei margini in caso di biopsia escissionale; una parte delle recidive locali è infatti riconducibile ad una incompleta asportazione lesionale.

Linfoma primitivo cutaneo B diffuso a grandi cellule, tipo gamba (PCLBCL-LT)

Un linfoma a grandi cellule costituito esclusivamente da centroblasti e/o immunoblasti localizzato più frequentemente a livello della gamba [6]. Rappresenta circa il 20% di tutti i linfomi B primitivi cutanei; sono colpiti soggetti con un'età mediana collocata nell'ottava decade, con una certa prevalenza nel sesso femminile (rapporto F: M di circa 3:1). La gran parte dei casi si localizza agli arti inferiori, ma nel 15-20% dei casi possono essere interessate altre sedi cutanee. Le lesioni sono costituite da noduli/tumori, a rapida crescita, di colore rosso-bluastro, con tendenza all'ulcerazione. La popolazione neoplastica di centroblasti e/o immunoblasti ha una crescita coesiva, in ampi *sheets*, con numerose figure mitotiche, e *nuclear debris*; frequente la necrosi; non si evidenzia un significativo epidermotropismo; generalmente scarso e periferico l'eventuale infiltrato reattivo linfocitario [115]. Gli elementi linfomatosi esprimono CD20, CD79a, BCL-2, MUM-1, e MYC, con frequente positività citoplasmatica per IgM (coespressione di IgD nel 50% dei casi); BCL-6 è negativo, o solo debolmente espresso; il CD10 è negativo; sempre molto elevata la frazione di crescita. Sul versante genetico il PCLBCL-LT mostra numerose analogie con il DLBCL nodale/sistemico; si possono documentare sia amplificazione di BCL-2 che traslocazioni coinvolgenti i geni rispettivamente di *MYC* [116], *BCL-6* e delle IgH. Le analogie in termini di profilo di espressione genica e di alterazioni citogenetiche (a comprendere le traslocazioni e mutazioni attivanti NF-kB) rendono il PCLBCL-LT una sorta di controparte cutanea del DLBCL nodale con COO *activated B-cell-like*. Le possibili diagnosi differenziali comprendono, oltre a un secondarismo in corso di forma sistemica, i PCFL ricchi in grandi cellule, e i PCDLBCL NOS.

Oltre al quadro clinico lesionale e alla citologia sono utili, nella diagnostica differenziale, alcune differenze di espressioni sul versante immunofenotipico, il valore della frazione di crescita, l'entità e la disposizione dell'infiltrato reattivo, nonché l'estensione della necrosi. Una corretta diagnosi è clinicamente rilevante, in considerazione delle significative differenze tra queste forme, sia sul versante prognostico che su quello terapeutico. La sopravvivenza a 5 anni nel PCLBCL-LT è stimata in circa il 50%. Studi in corso (osservazioni personali) sembrano indicare nell'ambito dei PCLBCL-LT l'esistenza di forme particolarmente aggressive e con tendenza alla diffusione sistemica, caratterizzate da un fenotipo "DE" e/o da alterazioni genetiche simili a quelle riscontrabili nei linfomi "DH" e "TH" nodali.

Linfoma B primitivo cutaneo a grandi cellule non altrimenti specificato (PCLBCL NOS)

Si tratta di DLBCL a primitività cutanea, attualmente non ancora contemplati dalla WHO come entità distinta, e che mostrano solo parziali analogie con le forme DLBCL tipo gamba [117].

Oltre a una più frequente presentazione in sedi non gamba, le principali differenze riscontrabili riguardano la composizione della popolazione infiltrato linfomatosa, più eterogenea, a comprendere una serie di varianti morfologiche (centroblastica, ma anche anaplastica, plasmoblastica, ricca in linfociti T ed istiociti, etc.,).

L'infiltrato reattivo è tipicamente più intenso rispetto alla forma tipo gamba, ed è commisto alla cellularità neoplastica. Le differenze immunofenotipiche comprendono, in circa il 65-70% dei casi, una costante positività per BCL-6 con coespressione di MUM-1, nonché la uniforme negatività per BCL-2. Studi recenti sembrano indicare anche in questa forma l'importanza della ricerca della COO.

Sembrerebbe infatti che i PCLBCL NOS con una COO *germinal-center-like* abbiano un decorso più favorevole (simile a quello dei PCFL), a fronte di un comportamento più aggressivo (simile alle forme tipo gamba) dei casi con una COO tipo *activated B-cell-like*. Valgono anche per queste forme le problematiche di diagnostica differenziale già descritte a proposito del PCLBCL-LT.

Linfoma di Hodgkin (LH)

Rimane immodificata nella WHO 2017 [6] la distinzione del linfoma di Hodgkin (LH) nei due tipi, prevalenza linfocitaria nodulare (NLPHL) e forma classica (C), quest'ultima suddivisa a sua volta in quattro varianti: sclerosi nodulare, cellularità mista, ricca in linfociti, e deplezione linfocitaria.

- ***NLPHL:*** Rappresenta il 5% circa dei LH; generalmente a decorso indolente (80-85% dei casi) [118]. In un numero più limitato di pazienti (15-20%) la malattia può invece presentarsi in fase avanzata alla diagnosi, comprendendo in questo gruppo alcune recidive, anche tardive, già in fase di progressione (sintomi B, LDH elevato, linfoadenopatie, epato-splenomegalia, talora lesioni ossee). In fase avanzata la gestione clinico-terapeutica diviene complessa, e la prognosi è spesso sfavorevole. Nel tentativo di identificare precocemente le forme a maggior potenziale evolutivo, alcuni studi hanno sottolineato l'importanza di una accurata analisi delle caratteristiche cito-architetturali lesionali. A questo scopo sono stati individuati, nell'ambito della NLPHL, ben 6 differenti pattern istologici (da A ad F) che sono stati correlati all'incidenza delle recidive e/o di una franca progressione. I dati ottenuti sembrano indicare, nei pattern compresi tra C e F, quelli più spesso associati a un potenziale evolutivo.
  Fattore comune a questi patterns la progressiva tendenza della cellularità hodgkiniana (cellule linfoistiocitiche/L&H e cellule *pop-corn*) a fuoriuscire dai noduli, rapportandosi con la cellularità reattiva in modo simile a quanto accade nei linfomi B a grandi cellule ricchi in istiociti e linfociti T reattivi (THRLBCL). Questo non stupisce in quanto sono ormai ampiamente dimostrate le analogie biologiche tra il NLPHL ed il THRLBCL, al punto che una diagnosi differenziale di assoluta certezza tra queste forme può rivelarsi molto complessa, sia sul versante clinico che su quello istopatologico [119].
- ***LH Classico (CHL):*** Rappresenta il 90-95% circa dei LH (Figura 2 E-F); la diagnosi richiede la presenza della tipica cellularità hodgkiniana (cellule di HRS) in uno specifico contesto reattivo, polimorfo (linfociti T reattivi, plasmacellule, granulociti eosinofili, istiociti, variabile fibrosi); la numerosità della cellularità hodgkiniana, e la composizione qualitativa e quantitativa della popolazione reattiva, sono la base per la distinzione della quattro varietà del LH classico. Sul versante diagnostico, è fondamentale l'utilizzo del PAX-5 (reattività di tipo diffuso, e di debole intensità rispetto al controllo interno fornito dai normali linfociti B) in combinazione con i tipici marcatori della cellularità hodgkiniana (CD15 e CD30, entrambi con reattività di membrana e/o paranucleare golgiana *dot-like*). Utile anche la ricerca dell'espressione di marcatori dell'infezione da EBV (EBER e EBV-LMP). Il ruolo linfomagenico dell'EBV rimane oggetto di studio [120]. L'LMP1 (*latent membrane protein 1*) è una proteina essenziale per consentire l'inizio del processo di trasformazione EBV-mediato; nelle cellule B infettate da EBV, LMP-1 può determinare effetti molteplici, mediante vari meccanismi che conducono all'attivazione del pathway di NF-kB. Quest'ultimo può peraltro venir attivato anche nei casi EBV negativi; in questi casi l'attivazione è resa possibile da una mutazione genica (IKB-alfa). La presenza/assenza di infezione da EBV nel LH è correlata ad alcune differenze sia sul versante patogenetico che su quello clinico-epidemiologico. Le forme EBV positive sono più frequenti in età pediatrica, con una predilezione per il sesso maschile, e si caratterizzano per un andamento prognostico meno favorevole. Il dibattito sul ruolo dell'EBV e sui suoi meccanismi linfomagenici è aperto: secondo alcuni, le forme EBV negative potrebbero risultare tali solo per la nostra incapacità di evidenziare un genoma eventualmente difettivo, o ancora per una possibile integrazione nel DNA dell'ospite di frammenti del genoma virale. È stata ipotizzata anche una doppia via eziopatogenetica: una EBV correlata, l'altra EBV indipendente (ad esempio correlata alla mutazione IKB-alfa). La prima via sarebbe quella più comune nei paesi in via di sviluppo, dove l'infezione da EBV tende a manifestarsi più precocemente, e in una condizione di non completo sviluppo del sistema immune. La seconda via, sarebbe invece quella preferenziale nei paesi sviluppati, dove il ruolo linfomagenico del virus si espleterebbe in una fase più tardiva, e in soggetti di età più avanzata, con possibili difetti di funzionalità del sistema immune causati dall'invecchiamento. In ambito genetico, studi di *comparative genomic hybridization* (CGH) hanno dimostrato, nel LH classico, la presenza di *gains* in alcune sotto regioni dei cromosomi 2p, 9q, 12q, 16p, 17q, e 20q, dove i loci interessati contengono geni coinvolti nel pathway di NF-kB, quali *REL*, *CD40*, e *MAP3K14*.
  Nel LH classico è stata anche osservata un'alta incidenza di mutazioni in PDL1 e PDL2, con conseguente sovraespressione di entrambe queste proteine, e blocco della funzionalità dei linfociti T intra-tumorali PD-1 positivi. Su questa base, un approccio terapeutico basato su di un'azione di blocco del signalling di PD1 potrebbe rivelarsi efficace, soprattutto nei pazienti con LH non responsivo, o in progressione [121]. Nella pratica diagnostica, il LH classico può determinare problemi di diagnostica differenziale sia nei confronti di alcuni linfomi T (linfoma T periferico con cellule simil-RS (EBV+/-), e linfoma a grandi cellule anaplastiche CD30+), sia verso il linfoma B a primitività mediastinica (timico). Una diagnosi differenziale certa tra queste entità può essere difficile, spingendo la WHO ad inserire, quale entità distinta, la categoria dei linfomi B inclassificabili, con caratteristiche intermedie tra un DLBCL ed un LH di tipo classico. Buona parte di questi casi rientra nel gruppo dei cosiddetti linfomi della zona grigia, caratterizzati dalla presenza di una massa mediastinica e dalla possibile presenza, nell'ambito della stessa lesione, sia di aree con aspetto hodgkiniano che di altre più francamente B linfomatose. Sul versante clinico-terapeutico i pazienti affetti da queste forme intermedie possono beneficiare di target therapy di relativamente recente introduzione, con anti-CD30 e PD1/PDL-1 [122].

Bibliografia

1. Lennert K. Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticuloses. Acta Neuropathol Suppl. 1975;Suppl 6:1-16.
2. Lennert K, Feller AC. Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas, Based on the Updated Kiel Classification. Springer-Verlag. 1992.
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood. 1994;84(5):1361-92.
4. Jafie ES, Harris NL, Stein H, et al. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press 2001.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
6. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2017.
7. Nardi V, Kuo FC, Hasserjian RP. Premalignant Clonal Hematopoietic Proliferations. Am J Clin Pathol. 2019;152(3):347-58.
8. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. Br J Haematol. 2005;130(3):325-32.
9. Pillai RK, Surti U, Swerdlow SH. Follicular lymphoma-like B cells of uncertain significance (in situ follicular lymphoma) may infrequently progress, but precedes follicular lymphoma, is associated with other overt lymphomas and mimics follicular lymphoma in flow cytometric studies. Haematologica. 2013;98(10):1571-80.
10. Jegalian AG, Eberle FC, Pack SD, et al. Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. Blood. 2011;118(11):2976-84.
11. Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. Haematologica. 2012;97(2):270-8.
12. Federmann B, Frauenfeld L, Pertsch H, et al. Highly sensitive and specific in situ hybridization assay for quantification of SOX11 mRNA in mantle cell lymphoma reveals association of TP53 mutations with negative and low SOX11 expression. Haematologica. 2020;105(3):754-64.
13. Beltzung F, Ortonne N, Pelletier L, et al. Primary Cutaneous CD4+ Small/Medium T-Cell Lymphoproliferative Disorders: A Clinical, Pathologic, and Molecular Study of 60 Cases Presenting With a Single Lesion: A Multicenter Study of the French Cutaneous Lymphoma Study Group. Am J Surg Pathol. 2020;44(7):862-72.
14. Hathuc VM, Hristov AC, Smith LB. Primary Cutaneous Acral CD8(+) T-Cell Lymphoma. Arch Pathol Lab Med. 2017;141(11):1469-75.
15. Perry AM, Warnke RA, Hu Q, et al. Indolent T-cell lymphoproliferative disease of the gastrointestinal tract. Blood. 2013;122(22):3599-606.
16. Yoshino T, Tanaka T, Sato Y. Differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma and other indolent lymphomas, including mantle cell lymphoma. J Clin Exp Hematop. 2020.
17. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. Nature. 2011;470(7332):115-9.
18. Kalpadakis C, Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, et al. Detection of L265P MYD-88 mutation in a series of clonal B-cell lymphocytosis of marginal zone origin (CBL-MZ). Hematol Oncol. 2017;35(4):542-7.
19. Pulido JS, Salomao DR, Frederick LA, et al. MyD-88 L265P mutations are present in some cases of vitreoretinal lymphoma. Retina. 2015;35(4):624-7.
20. Tadic L, Marjanovic G, Macukanovic-Golubovic L, et al. The importance of Myd88 L265P mutation, clinical and immunohistochemical prognostic factors for the survival of patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma treated by immunochemotherapy in southeast Serbia. J BUON. 2016;21(5):1259-67.
21. Nakamura T, Tateishi K, Niwa T, et al. Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas. Neuropathol Appl Neurobiol. 2016;42(3):279-90.
22. Kraan W, van Keimpema M, Horlings HM, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in primary testicular diffuse large B-cell lymphoma. Leukemia. 2014;28(3):719-20.
23. Oishi N, Kondo T, Nakazawa T, et al. High prevalence of the MYD88 mutation in testicular lymphoma: immunohistochemical and genetic analyses. Pathol Int. 2015;65(10):528-35.
24. Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, et al. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. J Invest Dermatol. 2012;132(8):2118-20.
25. Santos TSD, Tavares RS, Farias DLC. Splenic marginal zone lymphoma: a literature review of diagnostic and therapeutic challenges. Rev Bras Hematol Hemoter. 2017;39(2):146-54.
26. Szynglarewicz B, Matkowski R, Smorag Z, et al. Hepatitis C virus infection and locally advanced splenic marginal zone lymphoma. Pathol Oncol Res. 2007;13(4):382-4.
27. Arcaini L, Rossi D, Paulli M. Splenic marginal zone lymphoma: from genetics to management. Blood. 2016;127(17):2072-81.
28. Jain P, Wang M. Mantle cell lymphoma: 2019 update on the diagnosis, pathogenesis, prognostication, and management. Am J Hematol. 2019;94(6):710-25.
29. Ladha A, Zhao J, Epner EM, et al. Mantle cell lymphoma and its management: where are we now? Exp Hematol Oncol. 2019;8:2.
30. Kumar A, Sha F, Toure A, et al. Patterns of survival in patients with recurrent mantlecell lymphoma in the modern era: progressive shortening in response duration and survival after each relapse. Blood Cancer J. 2019;9(6):50.
31. Lackraj T, Goswami R, Kridel R. Pathogenesis of follicular lymphoma. Best Pract Res Clin Haematol. 2018;31(1):2-14.
32. Dada R. Diagnosis and management of follicular lymphoma: A comprehensive review. Eur J Haematol. 2019;103(3):152-63.
33. Tellier J, Menard C, Roulland S, et al. Human t(14;18)positive germinal center B cells: a new step in follicular lymphoma pathogenesis? Blood. 2014;123(22):3462-5.
34. Green MR. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. Blood. 2018;131(6):595-604.
35. Katzenberger T, Kalla J, Leich E, et al. A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36. Blood. 2009;113(5):1053-61.
36. Marks E, Shi Y. Duodenal-Type Follicular Lymphoma: A Clinicopathologic Review. Arch Pathol Lab Med. 2018;142(4):542-7.
37. Bacon CM, Ye H, Diss TC, et al. Primary follicular lymphoma of the testis and epididymis in adults. Am J Surg Pathol. 2007;31(7):1050-8.
38. Du XY, Huang R, Cao L, et al. Clinical observation of five pediatric-type follicular lymphoma in adult. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2019;40(5):393-7.
39. Koo M, Ohgami RS. Pediatric-type Follicular Lymphoma and Pediatric Nodal Marginal Zone Lymphoma: Recent Clinical, Morphologic, Immunophenotypic, and Genetic Insights. Adv Anat Pathol. 2017;24(3):128-35.
40. Agostinelli C, Akarca AU, Ramsay A, et al. Novel markers in pediatric-type follicular lymphoma. Virchows Arch. 2019;475(6):771-9.
41. Scott DW, Wright GW, Williams PM, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Blood. 2014;123(8):1214-7.
42. Rosenthal A, Rimsza L. Genomics of aggressive B-cell lymphoma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2018;2018(1):69-74.

43. Dunleavy K, Gross TG. Management of aggressive B-cell NHLs in the AYA population: an adult vs pediatric perspective. Blood. 2018;132(4):369-75.

44. Suzuki R. Diffuse Large B-Cell Lymphoma in 2016. J Clin Exp Hematop. 2016;56(2):69-70.

45. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. Cancer Cell. 2020;37(4):551-68.e14.

46. Dabrowska-Iwanicka A, Walewski JA. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. Curr Hematol Malig Rep. 2014;9(3):273-83.

47. Eule C, Arora N, Li HC, et al. Presentation and management of primary mediastinal large B-cell lymphoma: a retrospective cohort analysis. Acta Oncol. 2020;1:1-3. https://doi.org/10.1080/0284186X.2020.1744718

48. Giulino-Roth L. How I treat primary mediastinal B-cell lymphoma. Blood. 2018;132(8):782-90.

49. Gualco G, Natkunam Y, Bacchi CE. The spectrum of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: a description of 10 cases. Mod Pathol. 2012;25(5):661-74.

50. Iwaki N, Sato Y, Kurokawa T, et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma without mediastinal disease: mimicking nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma. Med Mol Morphol. 2013;46(3):172-6.

51. Evens AM, Kanakry JA, Sehn LH, et al. Gray zone lymphoma with features intermediate between classical Hodgkin lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: characteristics, outcomes, and prognostication among a large multicenter cohort. Am J Hematol. 2015;90(9):778-83.

52. Ziemba JB, Wolf Z, Weinstock M, et al. Double-Hit and Triple-Hit Follicular Lymphoma. Am J Clin Pathol. 2020;153(5):672-85.

53. Scott DW, King RL, Staiger AM, et al. High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. Blood. 2018;131(18):2060-4.

54. Kanagal-Shamanna R, Medeiros LJ, Lu G, et al. High-grade B cell lymphoma, unclassifiable, with blastoid features: an unusual morphological subgroup associated frequently with BCL2 and/or MYC gene rearrangements and a poor prognosis. Histopathology. 2012;61(5):945-54.

55. Ferry JA. Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis. Oncologist. 2006;11(4):375-83.

56. Gonzalez-Farre B, Ramis-Zaldivar JE, Salmeron-Villalobos J, et al. Burkitt-like lymphoma with 11q aberration: a germinal center-derived lymphoma genetically unrelated to Burkitt lymphoma. Haematologica. 2019;104(9):1822-9.

57. Lu TX, Liang JH, Miao Y, et al. Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma predict poor outcome, regardless of the age. Sci Rep. 2015;5:12168.

58. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol. 2018;93(7):953-62.

59. Ikeda T, Gion Y, Yoshino T, et al. A review of EBV-positive mucocutaneous ulcers focusing on clinical and pathological aspects. J Clin Exp Hematop. 2019;59(2):64-71.

60. Loghavi S, Wang SA, Medeiros LJ, et al. Immunophenotypic and diagnostic characterization of angioimmunoblastic T-cell lymphoma by advanced flow cytometric technology. Leuk Lymphoma. 2016;57(12):2804-12.

61. Zheng YY, Chen G, Zhou XG, et al. Morphologic and immunophenotypic analysis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2009;38(3):173-7.

62. Hu S, Young KH, Konoplev SN, et al. Follicular T-cell lymphoma: a member of an emerging family of follicular helper T-cell derived T-cell lymphomas. Hum Pathol. 2012;43(11):1789-98.

63. Siaghani PJ, Song JY. Updates of Peripheral T Cell Lymphomas Based on the 2017 WHO Classification. Curr Hematol Malig Rep. 2018;13(1):25-36.

64. Montes-Mojarro IA, Steinhilber J, Bonzheim I, et al. The Pathological Spectrum of Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL). Cancers (Basel). 2018;10(4):107.

65. Ferreri AJ, Govi S, Pileri SA, et al. Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive. Crit Rev Oncol Hematol. 2012;83(2):293-302.

66. Ferreri AJ, Govi S, Pileri SA, et al. Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative. Crit Rev Oncol Hematol. 2013;85(2):206-15.

67. King RL, Dao LN, McPhail ED, et al. Morphologic Features of ALK-negative Anaplastic Large Cell Lymphomas With DUSP22 Rearrangements. Am J Surg Pathol. 2016;40(1):36-43.

68. Wang X, Boddicker RL, Dasari S, et al. Expression of p63 protein in anaplastic large cell lymphoma: implications for genetic subtyping. Hum Pathol. 2017;64:19-27.

69. Moellhoff N, Frank K, Wiggenhauser PS, et al. An algorithmic approach for diagnosis and treatment of breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma. Handchir Mikrochir Plast Chir. 2020;52(2):67-74.

70. Sharma B, Jurgensen-Rauch A, Pace E, et al. Breast Implant-associated Anaplastic Large Cell Lymphoma: Review and Multiparametric Imaging Paradigms. Radiographics. 2020;17:190198.

71. Van Vliet C, Spagnolo DV. T- and NK-cell lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract: review and update. Pathology. 2020;52(1):128-141.

72. Chander U, Leeman-Neill RJ, Bhagat G. Pathogenesis of Enteropathy-Associated T Cell Lymphoma. Curr Hematol Malig Rep. 2018;13(4):308-317.

73. Chen CN, Wang Z, Jiang Y, et al. Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma: a clinicopathological analysis of twelve cases. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2020;49(1):17-21.

74. Tomita S, Kikuti YY, Carreras J, et al. Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma with T-cell receptor (TCR) of silent phenotype shows rearrangement of TCRβ or TCRγ gene. Pathol Int. 2019;69(2):117-118.

75. Gowda L, Foss F. Hepatosplenic T-Cell Lymphomas. Cancer Treat Res. 2019;176:185-193.

76. Macon WR, Levy NB, Kurtin PJ, et al. Hepatosplenic alphabeta T-cell lymphomas: a report of 14 cases and comparison with hepatosplenic gammadelta T-cell lymphomas. Am J Surg Pathol. 2001;25(3):285-96.

77. Cai Q, Cai J, Fang Y, et al. Epstein-Barr Virus-Positive Natural Killer/T-Cell Lymphoma. Front Oncol. 2019;9:386.

78. Montes-Mojarro IA, Kim WY, Fend F, et al. Epstein-Barr virus positive T and NK-cell lymphoproliferations: Morphological features and differential diagnosis. Semin Diagn Pathol. 2020;37(1):32-46.

79. Zhu YY, Duan YT, Song LL, et al. Clinicopathological Analysis of Children's Systemic EBV-Positive T-Cell Lymphoma. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2019;27(4):1131-1137.

80. Kimura H, Cohen JI. Chronic Active Epstein-Barr Virus Disease. Front Immunol. 2017;8:1867.

81. Wang L, Su Y, Zhang J, et al. Hydroa Vacciniforme-Like Lymphoma with Systemic Symptoms: Two Case Reports. Indian J Dermatol. 2019;64(6):493-496.

82. Guo N, Chen Y, Wang Y, et al. Clinicopathological categorization of hydroa vacciniforme-like lymphoproliferative disorder: an analysis of prognostic implications and treatment based on 19 cases. Diagn Pathol. 2019;14(1):82.

83. Miyake T, Iwatsuki K, Hirai Y, et al. The aim of the measurement of Epstein-Barr virus DNA in hydroa vacciniforme and hypersensitivity to mosquito bites. J Med Virol. 2020. https://doi.org/10.1002/jmv.25811

84. Jiang S, Manandhar U, Zheng KP, et al. A case of nodal marginal zone lymphoma with hypersensitivity to mosquito bites as initial symptom. J Cutan Pathol. 2019;46(10):769-74.

85. Willemze R, Hodak E, Zinzani PL, et al. Primary cutaneous lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2018;29(Suppl. 4):iv30-iv40.

86. Maredia H, Rozati S. Advanced Mycosis Fungoides. N Engl J Med. 2020;382(14):e27

87. Willemze R. Mycosis fungoides variants-clinicopathologic features, differential diagnosis, and treatment. Semin Cutan Med Surg. 2018;37(1):11-7.

88. Haghighi B, Smoller BR, LeBoit PE, et al. Pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp disease): an immunophenotypic, molecular, and clinicopathologic study. Mod Pathol. 2000;13(5):502-10.

89. Steffen C. Ketron-Goodman disease, Woringer-Kolopp disease, and pagetoid reticulosis. Am J Dermatopathol. 2005;27(1):68-85.

90. Foss FM, Girardi M. Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. Hematol Oncol Clin North Am. 2017;31(2):297-315.

91. Spicknall KE. Sézary syndrome-clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. Semin Cutan Med Surg. 2018;37(1):18-23.

92. Kempf W. A new era for cutaneous CD30-positive T-cell lymphoproliferative disorders. Semin Diagn Pathol. 2017;34(1):22-35.

93. Shinohara MM, Shustov A. How I treat primary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders. Blood. 2019;134(6):515-24.

94. Wiznia LE, Cohen JM, Beasley JM, et al. Lymphomatoid papulosis. Dermatol Online J. 2018;24(12).

95. Wagner G, Rose C, Klapper W, et al. Lymphomatoid papulosis. J Dtsch Dermatol Ges. 2020;18(3):199-205.

96. Sioutos N, Asvesti C, Sivridis E, et al. Lymphomatoid papulosis type A: clinical, morphologic, and immunophenotypic study. Int J Dermatol. 1997;36(7):514-7.

97. Bouhamidi A, Hassam B. Type B lymphomatoid papulosis. Pan Afr Med J. 2018;30:138.

98. Schwartz Z, Coleman M, Toyohara JP, et al. Oral Lymphomatoid papulosis type C: A diagnostic pitfall, often confused with T-cell lymphoma. Ann Diagn Pathol. 2017;31:50-5.

99. Barrett MM, Strikwerda AM, Somers K, et al. Lymphomatoid Papulosis Type D: Report of a Case in a Child and Review of the Literature. Pediatr Dermatol. 2016;33(2):e52-6.

100. Pindado-Ortega C, Fonda-Pascual P, Buendía-Castaño D, et al. An unusual case of lymphomatoid papulosis type E with extensive necrosis. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2018;84(4):515-7.

101. Heymann WR. The Alphabetization of Lymphomatoid Papulosis: Focus on "F". Skinmed. 2018;16(4):259-60.

102. Stein H, Foss HD, Dürkop H, et al. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. Blood. 2000;96(12):3681-95.

103. Onaindia A, Montes-Moreno S, Rodríguez-Pinilla SM, et al. Primary cutaneous anaplastic large cell lymphomas with 6p25.3 rearrangement exhibit particular histological features. Histopathology. 2015;66(6):846-55.

104. Baxi KD, Rathod SP, Chaudhary RG, et al. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2020. doi: 10.4103/ijdvl.IJDVL_635_18.

105. Goto H, Hirano N, Kadowaki H, et al. Clinical features of infantile subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. Pediatr Int. 2019;61(12):1261-2.

106. Sitthinamsuwan P, Pattanaprichakul P, Treetipsatit J, et al. Subcutaneous Panniculitis-Like T-Cell Lymphoma Versus Lupus Erythematosus Panniculitis: Distinction by Means of the Periadipocytic Cell Proliferation Index. Am J Dermatopathol. 2018;40(8):567-74.

107. LeBlanc RE, Tavallaee M, Kim YH, et al. Useful Parameters for Distinguishing Subcutaneous Panniculitis-like T-Cell Lymphoma From Lupus Erythematosus Panniculitis. Am. J. Surg. Pathol. 2016;40(6):745-54.

108. Wilcox RA. Cutaneous B-cell lymphomas: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and management. Am J Hematol. 2018;93(11):1427-30.

109. Malachowski SJ, Sun J, Chen PL, et al. Diagnosis and Management of Cutaneous B-Cell Lymphomas. Dermatol Clin. 2019;37(4):443-54.

110. Nicolay JP, Wobser M. Cutaneous B-cell lymphomas - pathogenesis, diagnostic workup, and therapy. J Dtsch Dermatol Ges. 2016;14(12):1207-24.

111. Carlsen ED, Swerdlow SH, Cook JR, et al. Class-switched Primary Cutaneous Marginal Zone Lymphomas Are Frequently IgG4-positive and Have Features Distinct From IgM-positive Cases. Am J Surg Pathol. 2019;43(10):1403-12.

112. Skala SL, Hristov B, Hristov AC. Primary Cutaneous Follicle Center Lymphoma. Arch Pathol Lab Med. 2018;142(11):1313-21.

113. Costa EPW, Lucena BD, Amin GA, et al. Primary cutaneous follicle center lymphoma. An Bras Dermatol. 2017;92(5):701-3.

114. Elwan NM, Abdel Salam S, Radwan NS. Spindle B-cell lymphoma: a rare variant of follicle center lymphoma. J Cutan Pathol. 2016;43(5):451-5.

115. Naoya F, Yosuke O, Azusa S, et al. Primary Cutaneous Diffuse Large B-cell Lymphoma, Leg Type. Intern Med. 2020;2.

116. Menguy S, Laharanne E, Prochazkova-Carlotti M, et al. Challenges in Assessing MYC Rearrangement in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg-Type. Am J Surg Pathol. 2020;44(3):424-7.

117. Felcht M, Klemke CD, Nicolay JP, et al. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, NOS and leg type: Clinical, morphologic and prognostic differences. J Dtsch Dermatol Ges. 2019;17(3):275-85.

118. Hartmann S, Hansmann ML. Update on nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma and related lesions. Pathologe. 2017;38(1):3-10.

119. Rets AV, Gottesman SR. Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma versus T-Cell/Histiocyte-Rich Large B-Cell Lymphoma: A Diagnostic Challenge. Case Rep Pathol. 2014;2014:956217.

120. Aoki T, Steidl C. Novel Biomarker Approaches in Classic Hodgkin Lymphoma. Cancer J. 2018;24(5):206-14.

121. Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol. 2018;93(5):704-15.

122. Cirillo M, Borchmann S. An update on disease biomarkers for Hodgkin lymphoma. Expert Rev Hematol. 2020;2:1-8.

Parole Chiave

Linfocitosi, Linfomi B, Linfomi T, Linfomi aggressivi,
Linfomi indolenti, Linfoma non-Hodgkin, Linfoma di Hodgkin,
Linfomi primitivi cutanei.

Indirizzi per la corrispondenza

Marco Paulli
Direttore Anatomia Patologica - Dipartimento Medicina Diagnostica
Segreteria di Direzione: tel. 0382.987845; fax: 0382.525866
E-mail: marco.paulli@unipv.it
Via Forlanini n. 14 - 27100 Pavia

Ematologia Oncologica

Titoli pubblicati e disponibili

2014
Sindromi mielodisplastiche
Emergenze in ematologia
Diagnosi difficili e rare

2015
Il mieloma multiplo nell'era dei nuovi farmaci
Farmaci bersaglio (I)
Linfoma follicolare

2016
Farmaci bersaglio (II)
Trapianto Allogenico
Terapia di supporto in oncoematologia

2017
Sindromi rare
Lesioni genetiche ed evoluzione clonale
Nuove strategie di immunoterapia

2018
Linfomi a grandi cellule
Mielofibrosi
Controversie nel Mieloma Multiplo

2019
Anemie: recenti acquisizioni
Malattia Minima Residua nelle Leucemie
Disordini linfoplasmacellulari

2020
Neoplasie dell'anziano

La rivista è scaricabile dai siti web:

Ematologia oncologica
www.ematologiaoncologica.it

Fondazione Matarelli
www.fondazionematarelli.it

Società Italiana di Ematologia (SIE)
www.siematologia.it

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)
www.siesonline.it

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini
www.beat-leukemia.com

Nel prossimo numero: Anno 7 - Numero 3 - 2020

La Trombosi nelle Neoplasie Ematologiche

Patogenesi della trombosi

Microangiopatie

Le coagulopatie delle leucemie acute

Trombosi catetere-correlata

Profilassi e terapia anti-trombotica

Con il supporto non condizionante di

Celgene | Bristol Myers Squibb™ Company