# A.O. Ordine Mauriziano
# S.S. di Laboratorio di Immunopatologia

## Progetto di ricerca: validazione di un test di screening in citometria a flusso per la diagnosi e il follow-up della Leucemia Mieloide Cronica.

### Relazione finale

La leucemia mieloide cronica (CML) è un disordine mieloproliferativo clonale caratterizzato da un'aumentata proliferazione e dall'accumulo di cellule mieloidi immature nel sangue periferico (PB) e nel midollo osseo (BM). La sua incidenza è da uno a due casi su 100.000 adulti e rappresenta circa il 15% dei casi di leucemia di nuova diagnosi. L'aumento dei precursori mieloidi è dovuto ad una specifica alterazione genetica acquisita nel DNA delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) che si comportano come cellule staminali leucemiche (LSC) iniziatrici della malattia, ottenendo un vantaggio proliferativo e/o una capacità di differenziazione aberrante rispetto alla controparte normale per dare origine al comparto mieloide espanso.
La CML è una delle leucemie meglio caratterizzate a livello molecolare. La traslocazione t(9;22)(q34;q11), che porta alla formazione del cromosoma Philadelphia (Ph) e della proteina di fusione BCR-ABL1, si trova fino al 95% dei pazienti affetti da CML, altri riarrangiamenti complessi si trovano nel 5-10% dei pazienti rimanenti. I criteri per una diagnosi appropriata di CML consistono nel documentare, in presenza di leucocitosi persistente e inspiegabile, la presenza del cromosoma Ph mediante analisi citogenetica o le anomalie molecolari BCR-ABL1 legate al Ph mediante ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) o mediante studi molecolari. Tuttavia, in alcuni casi può essere difficile differenziare la CML da altre sindromi mieloproliferative o mielodisplastiche che possono presentare la proteina di fusione BCR-ABL1, inoltre, sia le analisi citogenetiche sia quelle molecolari sono costose e richiedono diversi giorni per essere completate.
Un approccio alternativo per la diagnosi di CML è costituito dalla ricerca della proteina di fusione BCR-ABL mediante citometria a flusso, tuttavia, questo metodo richiede una procedura analitica molto lunga e pertanto non può sostituire i test citogenetici o molecolari come analisi di routine; inoltre, trattandosi di un test ancora focalizzato sulla ricerca del prodotto BCR-ABL, sembra ridondante rispetto ai test standard per la CML.
Un passo avanti nello sviluppo di uno strumento diagnostico rapido per la CML potrebbe essere rappresentato dalla valutazione diretta in citometria a flusso delle LSC della CML, in modo da superare anche la variabilità tra i pazienti CML a livello del trascritto BCR-ABL.
Le LSC della LMC risiedono presumibilmente all'interno della frazione di cellule CD34+/CD38–/Lin– e da recenti dati della letteratura sembrano essere specificamente identificabili per l'espressione dell'antigene CD26. Due gruppi indipendenti (Herrmann et al. E Valent et al.) hanno identificato l'antigene CD26 (dipeptidilpeptidasi IV) come un potenziale marcatore in grado di identificare e isolare le LSC di CML in campioni di BM di pazienti con CML. Il CD26, a differenza di altri antigeni testati che sono coespressi sulle LSC di CML, leucemia mieloide acuta (AML) e cellule staminali emopoietiche normali, era l'unico marcatore presente sulle LSC del midollo osseo in tutti i pazienti con CML, mentre risultava assente sulle cellule CD34+/CD38- nei midolli di soggetti normali o sulle LSCs di altre neoplasie mieloidi.
Più recentemente, la presenza di CD26 sul comparto delle LSC della LMC è stata dimostrata anche su sangue periferico sia alla diagnosi, sia durante il trattamento con inibitori della tirosin-chinasi, risultando un marcatore affidabile e di semplice approccio metodologico.

Lo scopo del presente studio è quello di analizzare su sangue periferico l'espressione di CD26 nel comparto delle LSC in una ampia casistica di pazienti con LMC e altri disordini mieloproliferativi e

mielodisplastici al fine di validare l'impiego di CD26 stesso come potenziale marcatore di CML e di stabilire i valori soglia della sua espressione per la massima specificità e sensibilità.
Inoltre, sfruttando le potenzialità dell'analisi multiparametrica in citometria a flusso, verificare se esistono altri marcatori in grado di ulteriormente aumentare il grado di sensibilità e specificità del test.

In questo studio abbiamo osservato che nella LMC vi è un'elevata espressione di CD26 in un numero elevato di campioni, i quali possono essere campioni trattati o campioni che hanno subito il trattamento di citoriduzione ma non ancora il trattamento con gli inibitori della tirosina chinasi.
Abbiamo creato il seguente protocollo analitico (Fig.1) su un campione di sangue periferico che non presenta malattia.

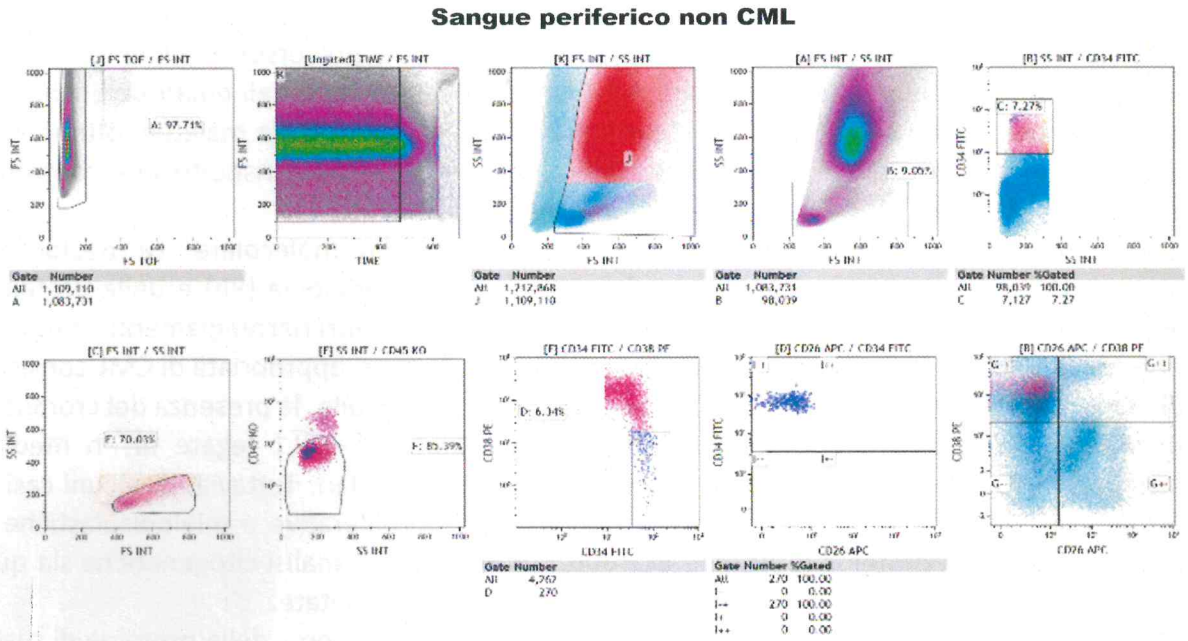



*Figura 1*

Questo protocollo ci permette di identificare nell'ambito delle cellule CD34+ (isolate attraverso la sequenza di finestre analitiche "C and F and I" e che rappresentano i precursori ematopoietici) le cellule CD38 negative (nella finestra D) che sono una frazione minoritaria delle CD34 totali e rappresentano il comparto delle staminali ematopoietiche. Su queste viene valutata l'espressione di CD26 che risulta praticamente assente nei soggetti normali.
Successivamente il medesimo protocollo è stato applicato su campioni di LMC in cui si osserva l'espressione di CD26+ (Fig.2)

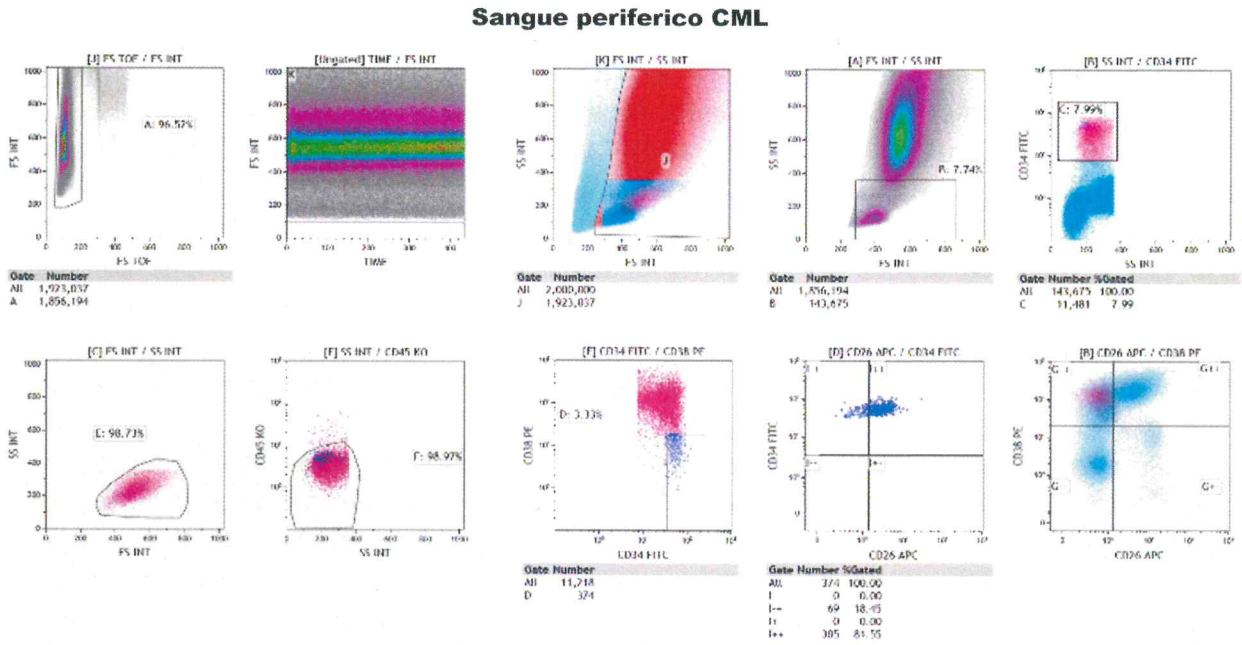



*Figura 2*

Abbiamo utilizzato 111 campioni che presentano patologie differenti e che sono riportate in dettaglio nella tabella seguente (Fig.3)

**Casistica (n = 111)**

| | | | CD34% | Prog CD34+38-% | CD26+/Prog % | CD26+/CD34+ % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Leucocitosi | n=42 | (SVP:28, AM:14) | 0,77 | 15,16 | 0,95 | 0,10 |
| Mieloprolifertive JA | n=22 | (SVP:12, AM:10) | 0,84 | 19,14 | 1,17 | 0,36 |
| LMMC | n=6 | (SVP:3, AM:3) | 1,53 | 21,73 | 0,48 | 0,07 |
| MDS | n=5 | (SVP:4, AM:1) | 0,48 | 3,67 | 4,36 | 0,08 |
| LAM | n=6 | (SVP:3, AM:3) | 2,08 | 15,43 | 4,26 | 0,39 |
| LMC | n=23 | (SVP:12, AM:11) | 0,49 | 10,23 | 46,12 | 3,89 |
| LMC post terapia | n=7 | (SVP:2, AM:5) | 0,40 | 15,16 | 0,66 | 0,06 |

**33 (29.7%) campioni con n eventi CD26 = 0**
**44 (39,6%) campioni con n eventi CD26 <10**
**11 (9,9%) campioni con n eventi CD26 ≥10<20**
**6 (5,4%) campioni con n eventi CD26 ≥20<50**
**17 (15,3%) campioni con n eventi CD26 ≥50**

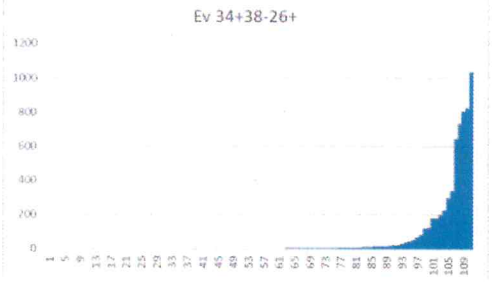
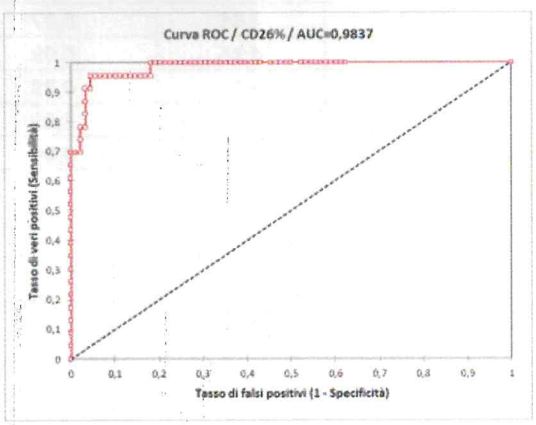



*Figura 3*

Dei 111 campioni totali (ottenuti sia da sangue venoso periferico - SVP, sia da aspirato midollare - AM) 30 erano rappresentati da LMC (23 alla diagnosi e 7 post terapia), gli altri erano delle leucocitosi periferiche di natura indeterminata (42), sindromi mieloproliferative JAK2+ (22), leucemie mielomonocitiche croniche (LMMC, 6), mielodisplasie (MDS, 5) e leucemie acute mieloidi (LAM, 6). Il valore medio di cellule CD34+ totali era compreso tra lo 0,40 e il 2,08%, mentre la frequenza relativa di staminali emopoietiche (Prog CD34+38-) era compresa tra il 3.67 e il 21,73% delle CD34 totali. La percentuale di cellule CD26+ nel comparto dei ProgCD34+38- risultava

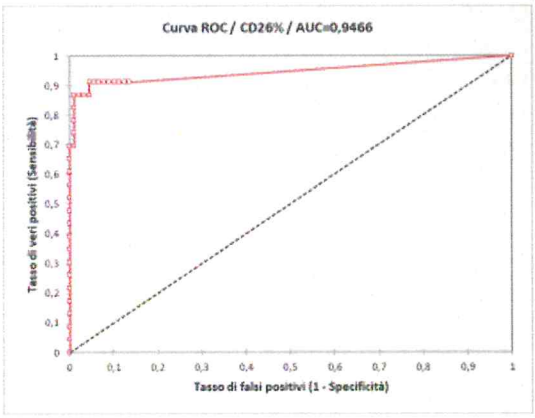
significativamente aumentata soltanto nelle LMC (46,12% in media) alla diagnosi e non superava il valore medio del 4,36% in tutti gli altri tipi di patologia.
Nel grafico successivo è mostrata la distribuzione del numero totale di cellule CD26+ nel comparto dei ProgCD34+38- indipendentemente dalla diagnosi. Come si evince dalla tabella associata, soltanto in una minoranza di campioni (17, pari al 15,3%) il numero di cellule CD26 identificate nel comparto ProgCD34+38- è superiore a 50, mentre in ben 88 campioni (79,3%) il numero di cellule CD26+ nei ProgCD34+38- è risultato inferiore a 20. Dal punto di vista statistico in citometria a flusso questo dato costituisce un elemento di criticità, essendo per convenzione considerato "affidabile" ai fini statistici e per l'individuazione di una popolazione cellulare specifica un cluster costituito da almeno 20 eventi. In casi particolari, in cui il cluster risulta facilmente isolabile (come nel caso presente) è sufficiente raccogliere 10 eventi per individuare con certezza la popolazione di interesse.
E' ovvio che in assenza di cellule positive al marcatore in esame non sarà possibile raccogliere un numero di eventi che si avvicini alla soglia di 10 a meno di acquisire milioni di eventi totali (in questo caso gli eventi raccolti rappresentano il "rumore di fondo" e vengono definiti come il "limite del Bianco", dall'inglese "limit of Blank" o LOB) e in ogni caso sarebbero percentualmente irrilevanti.
Tuttavia, dal momento che le cellule CD26+ nell'ambito dei ProgCD34+38- sono una frazione molto piccola delle cellule totali (anche inferiore allo 0,01%) è necessario da un lato analizzare un elevato numero di eventi (generalmente almeno $10^6$), e dall'altro definire un "valore soglia" di eventi positivi che sia sufficientemente restrittivo per la definizione di positività.
Tenendo in considerazione questi elementi, infine, è stata eseguita l'analisi statistica dei valori di cellule CD26+ nei ProgCD34+38- mediante le curve ROC che consentono di ottenere per il test in questione sia i valori di sensibilità e di specificità sia il valore soglia che meglio definisce i veri positivi rispetto a falsi negativi e/o falsi positivi.

**CD26+ tutti i valori**




Valore soglia: 6,59%
Sens.: 95,6%
Specif.: 95,4%
FP: 4
FN: 1

**CD26+ >10 eventi**




Valore soglia: 1,79%
Sens.: 91,3%
Specif.: 95,4%
FP: 4
FN: 2

*Figura 4*

La figura 4 riporta le due curve ROC ottenute considerando "positivi" tutti i casi con qualunque numero di cellule CD26+, nel secondo, invece considerando "positivi" soltanto i casi con più di 10

eventi CD26. Nel secondo caso il valore soglia si abbassa notevolmente a scapito di una modesta riduzione della sensibilità (che comporta un caso falso negativo in più), mentre la specificità rimane invariata e molto alta (95,4%).

In conclusione, si può ritenere che l'impiego di questo test citofluorimetrico sia sufficientemente robusto per essere utilizzato come screening nei casi di leucocitosi di natura non specificata per indirizzare il percorso clinico diagnostico per confermare od escludere una diagnosi di LMC, oppure, nei pazienti con diagnosi consolidata di LMC, può essere impiegato come test di monitoraggio nel corso della terapia per identificare precocemente il rischio di recidiva.
Infine, la sensibilità e specificità possono essere ulteriormente aumentate mediante l'impiego delle tecniche di NGF (Next Generation Flow) che prevedono la ricerca di eventi rari mediante l'acquisizione di milioni di eventi (da 2 a 10) in modo da rendere ulteriormente certa l'individuazione di popolazioni cellulari di interesse clinico.

Torino, 31/08/2023

Titolare borsa di studio
Cocchiara Giada

Responsabile del progetto
Geuna Massimo