

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di medicina e chirurgia

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

U.O.C. DI ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Ch.mo Prof. Angelo Paolo Dei Tos

TESI DI LAUREA

**ESPRESSIONE DI CD23 NEL LINFOMA
LINFOPLASMOCITICO: IMPATTO DIAGNOSTICO E
CORRELAZIONI CLINICO-BIOLOGICHE**

RELATORE: Prof. Marco Pizzi

CORRELATORE: Dr. Federico Scarmozzino

LAUREANDA: Martina Pinto

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1. LE NEOPLASIE LINFOIDI	5
1.1.1. <i>Definizione e caratteristiche generali delle neoplasie linfoidi</i>	<i>5</i>
1.1.2. <i>Caratteristiche generali dei linfomi non-Hodgkin a cellule B.....</i>	<i>5</i>
1.2. LINFOMA LINFOPLASMOCITICO	5
1.2.1. <i>Definizione</i>	<i>5</i>
1.2.2. <i>Epidemiologia</i>	<i>6</i>
1.2.3. <i>Eziologia</i>	<i>6</i>
1.2.4. <i>Presentazione clinica</i>	<i>6</i>
1.2.5. <i>Alterazioni laboratoristiche associate a LPL/WM.....</i>	<i>7</i>
1.2.6. <i>Profilo genetico del LPL/WM</i>	<i>8</i>
1.2.7. <i>Caratteristiche istologiche del LPL/WM</i>	<i>9</i>
1.2.8. <i>Work-up diagnostico del LPL/WM.....</i>	<i>10</i>
1.2.9. <i>Stratificazione prognostica</i>	<i>11</i>
1.2.10. <i>Cenni di terapia del LPL/WM.....</i>	<i>12</i>
1.3. LINFOMA DELLA ZONA MARGINALE (MZL)	14
1.3.1. <i>Linfoma della zona marginale nodale (NMZL).....</i>	<i>14</i>
1.3.2. <i>Linfoma splenico della zona marginale (SMZL).....</i>	<i>15</i>
1.3.3. <i>Linfoma della zona marginale extra-nodale (EMZL)</i>	<i>16</i>
1.4. DIAGNOSI DIFFERENZIALE TRA LPL E MZL.....	17
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	20
3. MATERIALI E METODI	21
3.1. POPOLAZIONE DELLO STUDIO	21
3.2. RACCOLTA DEI DATI CLINICI	21
3.3. VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEI CAMPIONI DI MIDOLLO OSSEO	21
3.4. ANALISI DEI DATI E STUDI STATISTICI	22
4. RISULTATI.....	24
4.1. CARATTERISTICHE CLINICHE DELLA POPOLAZIONE DELLO STUDIO ..	24
4.2. CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE DEI CAMPIONI DI MIDOLLO OSSEO	24
4.3. CARATTERISTICHE IMMUNOFENOTIPICHE DEL LPL	25
4.4. CORRELAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE E MOLECOLARI	28
4.5. CONFRONTO TRA LPL E MZL	29
4.6. SCORE CLINICO-PATOLOGICO PER LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE TRA LPL E MZL	30
5. DISCUSSIONE.....	32
6. CONCLUSIONI.....	35
7. BIBLIOGRAFIA.....	36

RIASSUNTO

Presupposti dello studio. Il linfoma linfoplasmocitico (LPL) è un raro linfoma non-Hodgkin a cellule B periferiche, costituito da linfociti maturi di piccola taglia, plasmacellule e linfociti plasmocitoidi. La valutazione istologica del midollo osseo ha un ruolo fondamentale nella diagnosi del LPL. La presenza di immunofenotipi aberranti e reperti morfologici non completamente specifici possono, tuttavia, complicare il *work-up* diagnostico e la diagnosi differenziale con i linfomi della zona marginale (MZL). Studi di citofluorimetria hanno suggerito elevati tassi di positività per CD23 nel LPL, ma poco si sa sull'espressione immunoistochimica (IHC) di questa proteina e sulla sua eventuale utilità nella diagnosi differenziale con il MZL.

Scopo dello studio. Scopi del presente studio sono: (i) descrivere le caratteristiche cliniche, morfologiche e immunofenotipiche di una ampia serie di LPL; (ii) valutare l'espressione di CD23 in campioni midollari di LPL, identificando possibili correlazioni tra fenotipi clinici, immunoistochimici e molecolari; (iii) valutare il ruolo di CD23 e di altri parametri istologici nella diagnosi differenziale tra LPL e MZL.

Materiali e metodi. Questo studio ha considerato una serie retrospettiva di 81 casi di LPL, diagnosticati presso l'U.O.C. di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedale Università di Padova tra il 2017 e il 2023. Ai fini dello studio, sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione: (i) diagnosi di LPL basata su criteri internazionali; (ii) disponibilità di dati clinici e di laboratorio alla diagnosi; (iii) *follow-up* clinico >6 mesi; (iv) disponibilità di campioni di midollo osseo adeguati alla revisione morfologica e immunoistochimica. I reperti istologici sono stati correlati con dati clinico-laboratoristici e con lo stato mutazionale per *MYD88* e *CXCR4*. Il confronto tra LPL e MZL è stato condotto considerando un'ulteriore serie di 73 casi di MZL con coinvolgimento midollare alla diagnosi. Le analisi statistiche sono state condotte considerando *test* non-parametrici per variabili quantitative (test di Wilcoxon-Mann-Whitney) e qualitative (test esatto di Fisher). Uno *score* diagnostico integrato è stato realizzato mediante analisi di regressione logistica e studi con curve ROC e stima delle AUC. Per tali analisi, sono stati considerati come statisticamente significativi valori di $p < 0.05$.

Risultati. La popolazione dello studio includeva 81 pazienti affetti da LPL con età mediana alla diagnosi di 71 anni e rapporto M:F di 1,8. La valutazione morfologica ha documentato vari *pattern* di infiltrazione midollare (interstiziale, intrasinusoidale, paratrabecolare, centrolacunare e diffuso). La caratterizzazione immunohistochimica ha dimostrato positività parziale/focale per CD23 in 59/81 (72,8%) casi. L'espressione di CD23 era significativamente associata a più esteso coinvolgimento midollare e a più frequenti tassi della mutazione L265P di *MYD88*. Il confronto con la coorte di MZL ha evidenziato più alti livelli di espressione della componente monoclonale sierica e di CD23 nel LPL. Uno *score* integrato che considerasse tali parametri, la presenza/assenza di linfadenopatie/organomegalia e di reti di cellule follicolari dendritiche nel midollo consentiva la diagnosi differenziale tra LPL e MZL con ottimi valori predittivi positivi e negativi.

Conclusioni. Il LPL è una malattia clinicamente e istologicamente eterogenea, caratterizzata da frequente espressione di CD23. La positività per tale marcatore correla con specifiche caratteristiche cliniche e biologiche e (insieme ad altri parametri) supporta la diagnosi differenziale con il MZL.

ABSTRACT

Background. Lymphoplasmacytic lymphoma (LPL) is a rare non-Hodgkin B-cell lymphoma consisting of mature lymphocytes, plasma cells, and plasmacytoid lymphocytes. Bone marrow biopsy plays a key role for the diagnosis of LPL. Aberrant phenotypes and not fully specific morphological features may hinder the diagnostic workup and the differential diagnosis with marginal zone lymphoma (MZL). Flow cytometry studies have suggested high rates of CD23 positivity in LPL, yet little is known on the immunohistochemical (IHC) expression of this marker and on its possible role in the differential diagnosis with MZL.

Study aims. This study is aimed at: (i) describing the clinical, morphological and immunohistochemical features of a larger series of LPL; (ii) evaluating CD23 expression in LPL, also considering possible correlations among the disease clinical, phenotypic and molecular features; (iii) evaluating the role of CD23 and other markers in the differential diagnosis between LPL and MZL.

Materials & methods. This study considered a retrospective series of 81 cases of LPL, diagnosed at the Pathology Unit of Padua University Hospital between 2017 and 2023. The following inclusion criteria were adopted: (i) diagnosis of LPL based on international consensus criteria; (ii) availability of clinical and laboratory data at diagnosis; (iii) clinical follow-up >6 months; (iv) availability of adequate bone marrow samples for morphological and immunochemical review. Bone marrow biopsy findings were correlated with clinical-laboratory data and with *MYD88* and *CXCR4* mutational status. Comparison between LPL and MZL was conducted considering a further series of 73 cases of MZL with bone marrow involvement. Statistical analyses were conducted by non-parametric tests for quantitative (Wilcoxon-Mann-Whitney test) and qualitative variables (Fisher's exact test). An integrated diagnostic score was produced by logistic regression with ROC curve and AUC studies. Statistical significance was considered for p values <0.05.

Results. The study population included 81 LPL patients with median age at diagnosis of 71 years and M:F ratio of 1.8. Morphological evaluation disclosed a variety of infiltration patterns (interstitial, intrasinusoidal, paratrabecular, non-paratrabecular and diffuse). Partial/focal positivity for CD23 was documented in 59/81 (72.8%) cases. CD23 expression was significantly associated with more extensive bone marrow infiltration and with higher *MYD88*^{L265P} mutational rates.

Comparison with MZL showed higher serum monoclonal component and higher CD23 expression in LPL. An integrated score considering such parameters as well as the presence/absence of adenopathy/splenomegaly and of follicular dendritic cell meshworks could distinguish LPL from MZL with high diagnostic yield.

Conclusions. LPL is a clinically and histologically heterogeneous disease, featuring frequent CD23 expression. Positivity for CD23 correlates with specific clinical and biological features and (together with other markers) supports the differential diagnosis between LPL and MZL.

1. INTRODUZIONE

1.1. Le neoplasie linfoidi

1.1.1. Definizione e caratteristiche generali delle neoplasie linfoidi

Linfomi e leucemie linfoidi sono proliferazioni neoplastiche derivate da linfociti B, T o da cellule NK. Le neoplasie derivanti da cellule mature rappresentano le forme più frequenti. Il decorso clinico varia da quadri indolenti a estremamente aggressivi. Per quanto tali patologie interessino più spesso organi linfoidi secondari (i.e. linfonodi e milza), esse possono insorgere in ogni distretto corporeo.

Le neoplasie linfoidi vengono classificate in linfomi di Hodgkin (HL) e linfomi non-Hodgkin (nHL); questi ultimi, a loro volta, si dividono in linfomi/leucemie dei precursori (i.e. linfomi/leucemie linfoblastiche a cellule B e T) e in linfomi a cellule B o T periferiche.

1.1.2. Caratteristiche generali dei linfomi non-Hodgkin a cellule B

La categoria dei linfomi non-Hodgkin a cellule B periferiche è molto vasta e il loro decorso clinico molto variabile. Tradizionalmente si distinguono forme indolenti (anche asintomatiche) e forme aggressive, rapidamente letali se non trattate [29]. Le prime includono il linfoma follicolare, la leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti, il linfoma della zona marginale (MZL), la leucemia a cellule capellute e le sue varianti e il linfoma linfoplasmocitico (LPL). Le seconde comprendono il linfoma diffuso a grandi cellule B (primitivo o secondario a forme indolenti), il linfoma mantellare, il linfoma di Burkitt e gli *high-grade B-cell lymphomas* (*double hit* o non altrimenti specificati) [29].

1.2. Linfoma linfoplasmocitico

1.2.1. Definizione

Il LPL è un raro linfoma non-Hodgkin a cellule B periferiche, costituito da linfociti maturi di piccola taglia, plasmacellule e cellule con caratteristiche intermedie (c.d. linfociti plasmocitoidi) [8]. La malattia interessa principalmente il midollo osseo, mentre coinvolge raramente linfonodi e milza [12]. Nella maggior parte dei casi si ha una paraproteinemia monoclonale di tipo IgM [41].

La maggior parte degli LPL presenta caratteristiche del tipo Macroglobulinemia di Waldstrom (MW), ossia coinvolgimento del midollo osseo e paraproteinemia IgM

[3]. Più raramente si hanno LPL associati a gammopatia monoclonale IgA o IgG, LPL non secernenti o LPL senza infiltrazione del midollo [7, 3].

1.2.2. Epidemiologia

Il LPL rappresenta meno del 5% di tutte le neoplasie linfoidi, insorge nell'età adulta o anziana (età mediana alla diagnosi di 65 anni) e ha una maggior prevalenza nel sesso maschile. Il tasso di incidenza aggiustato per età è di circa 7 casi/1.000.000 negli uomini e 4 casi/1.000.000 nelle donne. Le popolazioni caucasiche sono più colpite delle popolazioni di origine asiatica, medio-orientale o africana. Tanto il LPL quanto la WM hanno decorso clinico protratto e generalmente indolente [1].

1.2.3. Eziologia

L'eziologia del LPL è sconosciuta, per quanto sembra giochino un ruolo patogenico rilevante sia fattori genetici che ambientali ed acquisiti. I primi sono suggeriti dalla presenza di *clusters* di famiglie affette da questa patologia [42]. I secondi potrebbero comprendere invece infezioni virali croniche (e.g. infezione da HCV) e disordini autoimmuni [3, 44].

Per quanto riguarda la cellula di origine del LPL, il fenotipo e le caratteristiche genetiche delle cellule neoplastiche (i.e. presenza di mutazioni somatiche dei geni della regione variabile delle catene delle immunoglobuline) suggeriscono come controparte normale un linfocita B post-centro germinativo in avanzato stadio di differenziazione verso la plasmacellula [43]. In tale contesto, la stimolazione cronica da parte di antigeni self o non-self potrebbe contribuire alla degenerazione neoplastica di cloni di linfociti B [45,46].

1.2.4. Presentazione clinica

Il LPL è una neoplasia clinicamente indolente, spesso asintomatica o con solo lieve anemia alla diagnosi. Il decorso clinico è lento e progressivo con una sopravvivenza mediana di circa 5-10 anni. Una minoranza di casi può evolvere a linfoma diffuso a grandi cellule B.

Le manifestazioni cliniche del LPL possono dipendere da (i) infiltrazione midollare/extra-midollare o (ii) proprietà immunologiche e/o biochimiche della componente monoclonale IgM [4,3]. Tra i segni e i sintomi derivanti da infiltrazione neoplastica del midollo osseo vi sono le citopenie, astenia, faticabilità e sintomi B (i.e.

febricola, sudorazione notturna e calo ponderale) [4]. L'anemia è particolarmente frequente e (oltre che da infiltrazione midollare) può dipendere da emolisi immunomediata o alterato metabolismo del ferro, secondario ad elevati livelli epcidina [33]. Leucopenia e trombocitopenia sono più rare, essendo documentate in circa il 15% dei pazienti [3,4].

Tra le manifestazioni da infiltrazione extra-midollare vi sono linfadenopatie, epato/splenomegalia, versamenti pleurici o addominali [47]. In circa l'1% dei pazienti si possono sviluppare inoltre la sindrome di Bing-Neel (infiltrazione diffusa del sistema nervoso centrale con conseguenti disturbi neurologici) [48] e la sindrome di Schnitzler (quadri orticarioidi ricorrenti da interessamento cutaneo e segni di infiammazione sistemica) [8].

I quadri correlati alla paraproteinemia monoclonale IgM comprendono anemia emolitica autoimmune, malattia da agglutinine fredde o crioglobulinemia di tipo I [8] con manifestazioni prevalentemente cutanee, quali fenomeno di Raynaud, acrocianosi, ulcere, porpora e orticaria da freddo [52]. Più raramente possono aversi depositi tissutali di sostanza amiloide. Di grande rilevanza è, inoltre, la sindrome da iperviscosità, che si verifica in circa il 10-15% dei pazienti quando i livelli sierici di IgM raggiungono o superano i 3 g/dL [50]. In tali casi, l'elevata osmolarità sierica determina alternazioni del microcircolo, determinando cefalea, alterazioni del sensorio, disturbi della visione e sanguinamento mucoso [49,50,51].

I depositi di IgM, la presenza di autoanticorpi, la crioglobulinemia e l'amiloidosi possono inoltre provocare vari quadri di polineuropatia periferica [53]. Una delle forme più caratteristiche di polineuropatia associata a LPL/WM è la sindrome da anticorpi anti-MAG, dovuta ad auto-anticorpi diretti contro la guaina mielinica dei nervi periferici. Tale sindrome colpisce circa il 10% dei pazienti con LPL e causa una polineuropatia demielinizzante periferica, soprattutto a livello degli arti inferiori, generalmente sensitiva, ma (nei casi più gravi) anche motoria [54].

1.2.5. Alterazioni laboratoristiche associate a LPL/WM

Come precedentemente accennato, nel 50-70% dei pazienti è presente anemia normocitica normocromica. La presenza di paraproteinemia può determinare inoltre la formazione di *rouleaux* di eritrociti all'esame microscopico dello striscio di sangue periferico. La conta leucocitaria è tendenzialmente entro i limiti di norma, per quanto analisi citofluorimetriche possano documentare piccole popolazioni di

linfociti circolanti monoclonali [4]. All'esame microscopico, tali cellule sono di piccole dimensioni con cromatina addensata. Comune è inoltre la presenza di linfociti plasmocitoidi con citoplasma basofilo abbondante e nuclei eccentrici [8]. La conta piastrinica è generalmente entro i limiti di norma, per quanto trombocitopenia possa verificarsi negli stadi avanzati di malattia.

La componente monoclonale IgM può interferire con la funzione piastrinica, determinando un'alterazione dei parametri coagulativi (tempi di sanguinamento e di coagulazione). La VES è solitamente aumentata [4], mentre gli indici di funzionalità renale ed epatica sono quasi sempre nella norma. L'iperuricemia è comune mentre l'ipercalcemia si verifica solo nel 5% dei casi [55,56]. Elevati livelli di beta2-microglobulina sono presenti nella maggior parte dei pazienti con WM sintomatica.

Il profilo elettroforetico delle proteine sieriche evidenzia frequenti gammopatie monoclonali, che possono essere confermate mediante test di immunofissazione [3]. A queste possono aggiungersi proteinuria di Bence Jones, agglutinine fredde o crioglobuline, che dovrebbero essere sempre ricercate alla diagnosi. Prognosticamente è molto importante la valutazione delle catene leggere libere sieriche, in quanto pazienti con livelli > 80 mg/L hanno decorso clinico progressivo e sopravvivenza libera da trattamento più breve [57].

1.2.6. Profilo genetico del LPL/WM

Come in tutte le neoplasie a cellule B, anche nel LPL si ha riarrangiamento monoclonale dei geni delle immunoglobuline. Nel 90% dei casi si ha inoltre ipermutazione somatica delle regioni variabili delle catene leggere e pesanti delle immunoglobuline [58].

Per quanto riguarda le alterazioni citogenetiche, nel 63% dei casi è presente una delezione del braccio lungo del cromosoma 6. Tale alterazione è relativamente specifica di LPL ed è stata associata a prognosi molto sfavorevole [59]. Altri eventi citogenetici comprendono trisomia del cromosoma 4, del(13q14), del(17p23), del(11q22), la trisomia del cromosoma 8 e la traslocazione t(9;14)(p13;q32) [60,61,62,63,64].

Grazie a studi di *whole genome sequencing* (WGS) sono state identificate mutazioni somatiche ricorrenti, frequentemente associate a LPL/WM [65]. Di queste, la più frequente e utile ai fini diagnostici è la mutazione L265P di *MYD88* (*MYD88*^{L265P}),

riscontrata nel 90% dei pazienti [66]. Tale mutazione non è tuttavia specifica di LPL, essendo documentata in altri disordini linfoproliferativi, quali la leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti B, il MZL, il linfoma mantellare e alcuni linfomi diffusi a grandi cellule B [4]. Mutazioni alternative di *MYD88* possono essere riscontrate in una minoranza di pazienti [67]. Da un punto di vista funzionale, le mutazioni di *MYD88* risultano patogeniche in quanto determinano attivazione costitutiva delle chinasi associate al recettore per IL-1 (IRAK), promuovendo l'attivazione della Bruton tirosin chinasi (BTK) e la proliferazione dei linfociti B. I pazienti senza mutazioni di *MYD88* presentano altre mutazioni attivanti la via di NF-kB, in grado di provocare deregolazione epigenomica e danni nei meccanismi di riparo del DNA. Questi pazienti hanno prognosi più sfavorevole con più alti tassi di progressione a linfoma diffuso a grandi cellule B [68].

Nel 30-40% dei pazienti sono presenti mutazioni attivanti il recettore chemochinico CXCR4. L'attivazione di tale recettore promuove cascate intracellulari di PI3K, ERK, Akt, responsabili della chemiotassi, migrazione, proliferazione e staminalità dei linfociti B [65,70]. La maggior parte delle mutazioni di *CXCR4* introduce un codone di STOP prematuro o un *frame-shift* che rimuove la porzione C-terminale della proteina, evitandone la degradazione e prolungandone l'attività. L'iperfunzione di CXCR4 è in grado di favorire la sopravvivenza, la migrazione nel midollo osseo e la produzione di livelli elevati di IgM nel siero. La presenza di mutazioni di *CXCR4* è stata inoltre associata a una riduzione dell'efficacia terapeutica degli inibitori di BTK [71,72].

Oltre alle mutazioni di *MYD88* e *CXCR4*, nel 17-20% dei casi sono riportate mutazioni somatiche del gene *ARID1A*, che correlano con malattia in stadio avanzato. Mutazioni di *TP53* sono presenti in meno del 5% dei casi e si associano a prognosi severa. Possono aversi, inoltre, mutazioni attivanti di *CD79A* e *CD79B*, che determinano attivazione costitutiva del B-cell receptor. Mutazioni meno frequenti coinvolgono geni quali *KMTD2* e *MYBBP1A* [73,74,41,76].

1.2.7. Caratteristiche istologiche del LPL/WM

Nella midollo osseo, il LPL ha pattern di infiltrazione interstiziale o in aggregati paratrabecolari e non paratrabecolari. La popolazione neoplastica è composta da piccoli linfociti B, linfociti plasmocitoidi e plasmacellule con solo rari blasti. Sono comuni cellule con corpi di Dutcher (i.e. pseudoinclusi nucleari di

immunoglobuline) e mastociti [8]. I follicoli linfoidi e le reti di cellule follicolari dendritiche (FDC) sono rari. In caso di interessamento linfonodale, l'architettura nodale può essere conservata e l'infiltrazione neoplastica può limitarsi alle aree interfollicolari con un'espansione paracorticale di piccoli linfociti e con un numero variabile di plasmacellule. I seni sottocapsulari e della midollare rimangono pervi. In alternativa, si possono avere follicoli iperplastici e un'architettura nodale sovvertita da una proliferazione diffusa o vagamente nodulare di elementi linfoplasmocitici con numerosi istiociti epitelioidi [77]. A livello splenico il linfoma linfoplasmocitico coinvolge sia la polpa bianca sia la rossa con pattern di crescita diffuso [4].

L'immunofenotipo delle cellule neoplastiche è relativamente aspecifico e si sovrappone a quello dei MZL. Le cellule neoplastiche risultano positive per i marcatori pan-B (CD20, CD79a, CD19, CD22) e negative per CD5, CD10, Ciclina D1 e Bcl2, con variabile espressione di MUM1/IRF4 e MNDA [10]. Le plasmacellule esprimono CD138 e sono ristrette per le catene leggere kappa o lambda delle immunoglobuline [9]. In un sottogruppo consistente di LPL, sono segnalate aberrazioni fenotipiche, quali positività per CD5, CD10 e/o CD23. Tali aberrazioni sono state documentate prevalentemente in studi condotti con citometria a flusso (FC) e variano dal 1% al 61% dei casi, a seconda dei *cut-off* selezionati [11,13,14].

1.2.8. Work-up diagnostico del LPL/WM

La diagnosi di LPL/WM può rivelarsi difficile a causa dell'assenza di marcatori morfologici, immunofenotipici o cromosomici assolutamente specifici. In tale contesto, solo l'integrazione di dati clinici, laboratoristici, istologici e molecolari consente di arrivare a un inquadramento preciso [5,2].

Il work-up diagnostico del LPL/WM prevede:

- Un'anamnesi accurata, che consideri segni/sintomi correlati a malattia, familiarità per LPL/WM e l'identificazione di fattori di rischio per una adeguata stratificazione prognostica e gestione clinica del paziente;
- Esami ematochimici, che considerino emocromo con formula leucocitaria, pannello metabolico completo, protidogramma e valori delle immunoglobuline e delle catene leggere sieriche, elettroforesi con

immunofissazione, dosaggio della β 2-microglobulina, proteinuria delle 24h e ricerca di proteinuria di Bence Jones;

- Test sierologici per infezioni pregresse/in atto da HBV, HIV, HCV;
- Ove clinicamente indicato, ricerca e dosaggio delle crioglobuline, delle agglutinine fredde e della viscosità sierica, con *screening* per malattia di Von Willebrand;
- Test laboratoristici per valutare marcatori di danno d'organo (e.g. dosaggio delle troponine cardiache e NT-proBnP);
- Ove clinicamente indicato, elettromiografia e ricerca di autoanticorpi correlati a neuropatia periferica (anti-MAG; anti-GM1);
- Studio completo del midollo osseo con: (i) biopsia osteo-midollare (caratterizzazione morfologica e immunoistochimica); (ii) analisi fenotipica con FC multiparametrica; analisi molecolari per ricerca della mutazione *MYD88*^{L265P} e di mutazioni di *CXCR4*; (iii) analisi citogenetiche e, ove disponibili, FISH per del(6q21) e del(17p);
- Stadiazione mediante TC *total body* (soprattutto in pazienti selezionati per la terapia);
- PET-TC, se vi è il sospetto di progressione di malattia.

L'insieme di questi studi consente un preciso inquadramento della biologia e delle condizioni cliniche del paziente, supportando la diagnosi differenziale tra LPL/WM e suoi potenziali mimi clinici/istologici.

1.2.9. Stratificazione prognostica

Come precedentemente accennato, il LPL/WM è una neoplasia indolente e sostanzialmente incurabile, con una sopravvivenza mediana alla diagnosi di 5-10 anni. Le principali cause di morte associate a malattia includono la progressione clinica, la trasformazione a linfoma di alto grado e complicanze infettive.

Vari parametri clinici e laboratoristici sono stati associati a una prognosi sfavorevole. Tra questi, vi sono l'età avanzata, bassi livelli di emoglobina e di albumina sierica, elevati livelli di β 2-microglobulina e di componente monoclonale, leucopenia, trombocitopenia e organomegalia. Inoltre, specifiche aberrazioni cromosomiche correlano con un peggior outcome (e.g. delezione 6q).

Tali parametri sono stati integrati in uno *score* prognostico specifico per il LPL/WM, noto come *International Prognostic Scoring System for Waldstrom*

Macroglobulinemia (ISSWM). L'ISSWM stratifica i pazienti in gruppi di rischio sulla base dei seguenti parametri: (i) età > 65 anni; (ii) concentrazione di emoglobina $\leq 11,6$ g/dL; conta piastrinica $\leq 100,00/\mu\text{L}$; (iii) valori di $\beta 2$ -microglobulina >3 mg/L; (iv) titolo di IgM monoclonali >7 g/dL. Le classi di rischio comprendono i seguenti gruppi:

- Basso rischio: <2 fattori di rischio (esclusa l'età); tale categoria di pazienti ha una sopravvivenza mediana di 14 anni;
- Medio rischio: 2 fattori di rischio o età > 65 anni; tale categoria di pazienti ha sopravvivenza mediana di 8 anni;
- Alto rischio: >2 fattori di rischio; tale categoria di pazienti ha sopravvivenza mediana di 4 anni.

L'ISSWM è particolarmente utile per stratificare la prognosi di pazienti candidati a regimi terapeutici [78].

Recentemente, alla luce dell'introduzione di nuove strategie terapeutiche, è stato sviluppato anche un *revised* IPSSWM (rIPSSWM), che considera i seguenti parametri: (i) età ≥ 76 anni; (ii) livelli di $\beta 2$ -microglobulina ≥ 4 mg/L; (iii) albumina sierica <3,5 g/dL; e (iv) livelli di LDH ≥ 250 IU/L (ULN < 225). Sulla base di questi parametri sono stati identificati cinque gruppi prognostici con un tasso di mortalità correlato a malattia pari a 0%, 10%, 14%, 38% e 48% ($p < 0,001$) e un tasso di sopravvivenza a 10 anni dell'84%, 59%, 37%, 19%, 9%, rispettivamente [4].

1.2.10. Cenni di terapia del LPL/WM

Dato il decorso cronico e spesso indolente della malattia, non tutti i pazienti affetti da LPL/WM necessitano di terapie citoriduttrive. Il ricorso a terapia è invece necessario nel caso di sintomi secondari all'infiltrazione di organi e tessuti o alla presenza di IgM monoclonali. Indicazioni specifiche per il ricorso a terapie comprendono: (i) sintomi/segni di iperviscosità, (ii) sintomi B, (iii) presenza di linfadenopatie e/o di malattia *bulky*, (iv) presenza di neuropatia periferica, (v) organomegalia sintomatica, (vi) presenza di anemia sintomatica o da agglutinine fredde o emolitica autoimmune (emoglobina ≤ 10 g/dL), (viii) presenza di trombocitopenia (piastrine $< 100 \times 10^9/\text{L}$), (ix) livelli sierici di IgM >60 g/L [35].

Particolare attenzione deve essere inoltre prestata a pazienti asintomatici con paraproteina >50 g/L, che potrebbero presentare alterazioni del microcircolo a causa dell'iperviscosità sierica. In tali casi, è bene ricorrere all'esame del *fundus*

oculi (utilizzato come marcatore di danno del microcircolo), che permette di definire il momento opportuno per iniziare le terapie, anche in assenza di sintomatologia conclamata [3].

Il LPL/WM è una malattia rara e, per questo motivo, vi sono pochi trial randomizzati che confrontino i vari approcci terapeutici. Pertanto, il trattamento viene derivato principalmente da studi di fase 2 o retrospettivi [36]. Secondo il Panel NCCN, per i pazienti che necessitano di un controllo immediato della malattia, come quelli con sintomi da iperviscosità, è indicata la plasmateresi; successivamente, si può procedere al trattamento sistemico [37].

Durante la terapia iniziale, è necessario evitare gli agenti che potrebbero limitare i trattamenti futuri: se si considera un possibile trapianto autologo di cellule staminali, è necessario evitare gli alchilanti orali e gli analoghi nucleosidici. Questi ultimi sono associati a un aumento del rischio di trasformazione della malattia, sindromi mielodisplastiche e leucemia mieloide acuta secondaria [38,39].

Secondo le linee guida NCCN, la terapia di scelta come prima linea comprende bendamustina/rituximab, inibitori delle BTK associati o meno a rituximab, o bortezomib/desametasone/rituximab nei pazienti con sintomi da iperviscosità o che necessitano di una rapida riduzione dei valori di IgM monoclonali. Altri regimi includono bendamustina, rituximab come agente singolo o associato a desametasone o ciclofosfamide e gli inibitori BTK [36].

Dopo la terapia di prima linea, il Panel NCCN raccomanda di valutare la risposta al trattamento. L'obiettivo è alleviare i sintomi e ridurre il danno d'organo. Se sono stati utilizzati inibitori delle BTK, il trattamento deve essere protratto fino alla progressione della malattia o alla comparsa di tossicità inaccettabile. Se non vi è risposta, si procede con una terapia alternativa che può includere agenti di una classe di farmaci diversa, sia da soli che in combinazione [36].

Ai fini di valutare l'effetto delle terapie, sono stati identificati specifici criteri di risposta al trattamento, che comprendono: (i) risposta completa (CR): scomparsa della proteina IgM monoclonale nel siero e nelle urine mediante immunofissazione; risoluzione di tutti i sintomi presentati dal paziente; conferma dei risultati a distanza di 6 settimane; assenza di cellule neoplastiche alla biopsia del midollo osseo; (ii) risposta parziale (PR): riduzione di almeno il 50% della IgM monoclonale sierica all'elettroforesi; riduzione di almeno il 50% della linfoadenopatia e organomegalia all'esame fisico o TC; risoluzione dei segni e sintomi; (iii) recidiva di malattia:

ricomparsa della proteina monoclonale sierica all'immunofissazione confermata in 2 misurazioni; ricomparsa di segni e sintomi; comparsa di complicanze correlate alla malattia; (iv) malattia in progressione: aumento di > 25% dei livelli di IgM monoclonale sierica rispetto al miglior valore di risposta raggiunto con la terapia (valutazione confermata in 2 misurazioni a distanza di 3 settimane l'una dall'altra); peggioramento di anemia, trombocitopenia, leucopenia, linfocitosi, linfadenopatie e/o organomegalia; comparsa di sintomi associati alla neoplasia, quali febbre, sudorazioni notturne, perdita di peso, neuropatia, nefropatia, crioglobulinemia sintomatica o amiloidosi [3].

1.3. Linfoma della zona marginale (MZL)

I MZL rappresentano un gruppo eterogeneo di linfomi a cellule B periferiche, derivati dalle zone marginali dei follicoli linfoidi. La classificazione dei MZL identifica 3 forme principali di malattia: (i) MZL primitivi nodali (NMZL); (ii) MZL splenici (SMZL); e (iii) MZL extra-nodali (EMZL). Questi ultimi interessano in particolare il tratto gastroenterico, le ghiandole salivari, la cute, i polmoni e gli annessi oculari [79].

L'eziologia dei MZL è solo parzialmente conosciuta, ma si ritiene giochino un ruolo fondamentale fattori di tipo infiammatorio, infettivo o autoimmunitario in grado di innescare una cascata oncogenetica che porta a proliferazione incontrollata delle cellule B [28,80]. Tale stimolazione può essere di lunga durata e può portare all'insorgenza di una condizione pre-maligna, nota come linfocitosi B monoclonale di tipo marginale. Questa è definita dalla presenza nel sangue periferico di linfociti B neoplastici (<5000/ μ L) con fenotipo MZL, in assenza di lesioni tissutali [86].

I MZL sono globalmente considerati neoplasie indolenti, per quanto la sopravvivenza dei pazienti vari a seconda dei sottotipi di malattia (EMZL: sopravvivenza a 5 anni >80%; NMZL: sopravvivenza a 5 anni compresa tra il 55% e il 75%) [81,82]. La diagnosi si basa sull'esame istologico degli organi affetti e sulla caratterizzazione fenotipica delle popolazioni linfoidi atipiche. A causa dell'eterogeneità morfologica della neoplasia e dell'assenza di marcatori fenotipici e genotipici specifici, la diagnosi è spesso essere complessa e si basa sull'esclusione di altre entità [26,27].

1.3.1. Linfoma della zona marginale nodale (NMZL)

Il NMZL è definito come un MZL primitivo linfonodale, senza evidenza di localizzazioni spleniche o extra-nodali. Il NMZL rappresenta la forma meno comune di MZL, ha età mediana alla diagnosi di 50-60 anni [25] e tassi di incidenza simili tra pazienti di sesso maschile e femminile [83].

Da un punto di vista istologico, il NMZL ha morfologia eterogenea: sono, infatti, presenti piccoli linfociti, linfociti monocitoidi (i.e linfociti di media taglia con citoplasma chiaro) e linfociti plasmocitoidi, con pattern di crescita nodulare o diffuso. Il NMZL può essere indistinguibile da localizzazioni linfonodali di LPL [24]. Il profilo immunohistochimico della neoplasia dimostra positività per *markers* pan-B e negatività per CD5, Bcl6 e CD10 nella maggior parte dei casi. Il NMZL può esprimere CD43 (20-75% dei casi), IRTA1 (54-75% dei casi) e MNDA (43-73% dei casi) [84, 85, 86, 87, 88]. La positività per CD23 nelle cellule neoplastiche è rara, mentre sono solitamente presenti reti distorte di FDC CD23-positivo [89, 90].

Da un punto di vista genetico, i NMZL si associano a mutazioni ricorrenti di geni quali *KMT2D* (34% dei casi), *PTPRD* (20% dei casi), *NOTCH2* (20% dei casi) e *KLF2* (17% dei casi). Di queste, le mutazioni di *PTPRD* sono considerate relativamente specifiche di NMZL, per quanto le alterazioni genetiche di tale linfoma siano largamente sovrapponibili a quelle dei SMZL [31].

1.3.2. Linfoma splenico della zona marginale (SMZL)

Il SMZL è un linfoma non-Hodgkin a cellule B periferiche che origina dalla polpa bianca della milza e diffonde frequentemente al midollo osseo [91, 92, 93]. L'età media alla diagnosi è di circa 69 anni [24] e i pazienti di sesso maschile sono lievemente più colpiti della popolazione di sesso femminile [83].

I sintomi più frequentemente riscontrati comprendono splenomegalia e anemia secondaria a coinvolgimento del midollo osseo. Possono aversi adenomegalie dell'ilo splenico, ma altri linfonodi sono raramente coinvolti [24].

Da un punto di vista istologico, la milza dimostra un'espansione della polpa bianca con un caratteristico aspetto "bifasico" o "a bersaglio", dovuto all'alternanza di linfociti maturi di piccola taglia (follicoli e manelli residui) e di linfociti monocitoidi con ampio citoplasma chiaro (linfociti neoplastici). Tali cellule infiltrano diffusamente la polpa rossa formando microaggregati interstiziali o intra-

sinusoidali. I linfonodi ilari splenici hanno un'architettura sovvertita da un infiltrato linfoide simile a quello documentato nei NMZL [24,6].

L'esame istologico del midollo osseo ha importanza fondamentale nella diagnosi di SMZL ed è parte integrante del *wokwup* diagnostico. Alla biopsia osteomidollare, si ha solitamente un pattern di infiltrazione interstiziale, intrasinusoidale e in aggregati prevalentemente centrolacunari. Come per gli altri MZL, le cellule neoplastiche hanno fenotipo poco specifico, esprimendo markers pan-B con negatività per CD5, Bcl6, CD10, CD23 e Ciclina D1. MNDA è positivo nel 25-100% dei casi, mentre IRTA1 è più raro (0-50% dei casi) [84, 85, 86, 87, 88, 79,92]. Il profilo molecolare del SMZL è caratterizzato da mutazioni ricorrenti in *KLF2*, *NOTCH2*, *TNFAIP3*, *KMT2D* e *TP53*, che possono supportare la diagnosi [29]. Mutazioni di *MYD88* e *CXCR4* sono rare.

1.3.3. Linfoma della zona marginale extra-nodale (EMZL)

Gli EMZL sono linfomi indolenti a cellule B periferiche, originati dal tessuto linfoide associato alle mucose (MALT). Gli EMZL sono i più frequenti MZL, colpiscono l'età adulta-anziana e dimostrano simile incidenza tra pazienti di sesso maschile e femminile [83]. Nella maggior parte dei casi, la malattia è localizzata in sede puramente extra-nodale e il coinvolgimento linfonodale è raro.

Per quanto (come precedentemente accennato) qualsiasi organo possa essere affetto, gli EMZL interessano più frequentemente il tratto gastro-enterico, la tiroide, le ghiandole salivari, la cute, il polmone e gli annessi oculari. *Trigger* patogenetici di tali linfomi sono infezioni batteriche e malattie autoimmuni. Tra i fattori di rischio di tipo infettivo riconosciamo, in particolare, *H. Pylori* per gli EMZL gastrici, *C. Psittaci* per gli EMZL degli annessi oculari, *B. Burgdorferi* per le forme cutanee, *C. Jejuni* per gli EMZL del piccolo intestino (anche noti come *immunoproliferative small intestinal disease*) e *A. Xylooxidans* per gli EMZL polmonari [83, 40, 69, 75].

Indipendentemente dalla sede anatomica, gli EMZL hanno caratteristiche istologiche simili, essendo caratterizzati da una proliferazione di linfociti B di piccola/media taglia con nuclei rotondi o leggermente irregolari, cromatina matura e variabile quantità di citoplasma chiaro. Lesioni linfoepiteliali (e.g interruzione della continuità ghiandolare secondaria a infiltrazione di linfociti neoplastici) sono frequenti soprattutto nelle forme gastriche e parotidiche. Le cellule maligne possono

anche invadere i centri germinativi di follicoli linfoidi residui, determinando distorsione delle reti di FDC [24].

Il fenotipo degli EMZL è largamente sovrapponibile a quello dei NMZL e SMZL. In particolare, l'espressione di MNDA e IRT1A è riportata rispettivamente nel 61%-95% e 52%-93% dei casi [84, 85, 26, 87, 88].

Da un punto di vista citogenetico, sono state evidenziate traslocazioni ricorrenti, che portano alla disregolazione della *pathway* di NF-κB. Tali alterazioni comprendono t(11; 18)(q21; q21), t(14; 18)(q32; q21), t(1; 14)(p22; q32) e possono contribuire alla stratificazione prognostica dei pazienti. Infatti, la fusione *BIRC3::MALT1* (25% degli EMZL gastrici) si associa a malattia disseminata e mancata risposta a terapia antibiotica [22, 23, 30]. Il profilo mutazionale degli EMZL è simile a quello degli altri MZL e chiaramente distinto dal LPL (rare mutazioni di *MYD88* e *CXCR4*) [24].

1.4. Diagnosi differenziale tra LPL e MZL

Da quanto discusso nei paragrafi precedenti, il LPL/WM e i MZL hanno caratteristiche istologiche largamente sovrapponibili, che possono renderne complessa la diagnosi differenziale nel midollo osseo, soprattutto quando i MZL si associano a paraproteinemia.

Secondo dati di letteratura, criteri utili alla diagnosi differenziale istologica tra LPL/WM e MZL comprendono: (i) il pattern di crescita della popolazione linfoide nel midollo; (ii) la composizione della popolazione neoplastica; (iii) le cellule di accompagnamento; e (iv) dati molecolari relativi a mutazioni di *MYD88* e *CXCR4* [16].

Per quanto riguarda i pattern di crescita, il LPL presenta tipicamente aggregati paratrabecolari e interstiziali, mentre i MZL hanno più spesso pattern di crescita intrasinusoidale e centrolacunare [32,17]. Il LPL dimostra inoltre una maggiore tendenza alla differenziazione plasmacellulare e le plasmacellule neoplastiche sono frammiste alla popolazione B di piccola taglia e agli elementi plasmocitoidi. I MZL, invece, hanno di rado una ricca quota di plasmacellule e queste (quando presenti) si distribuiscono alla periferia dell'infiltrato linfoide. Per quanto riguarda la composizione del microambiente tumorale, i LPL sono associati a una più ricca quota di mastociti interstiziali, mentre i MZL hanno più spesso follicoli linfoidi con reti di FDC distorte [34]. Infine, il profilo mutazionale di tali linfomi è nettamente

distinto, in quanto la mutazione *MYD88*^{L265P} e mutazioni di *CXCR4* sono più tipiche del LPL e solo di rado riscontrate in MZL.

Da quanto riportato, emerge la poca rilevanza della caratterizzazione immunoistochimica per la diagnosi differenziale tra LPL e MZL. In base a dati di letteratura, tali neoplasie condividono infatti l'espressione di numerosi marcatori fenotipici e possono associarsi a una medesima espressione di marcatori aberranti (e.g. CD5, CD10 e/o CD23) [16]. Nella pratica istopatologica, tuttavia, osservazioni preliminari hanno identificato un elevato tasso di positività per CD23 in quote variabili di linfociti di LPL. Tale fenomeno non è stato documentato nei MZL e potrebbe costituire un ulteriore contributo alla diagnosi differenziale tra LPL e MZL.

1.5 Caratteristiche biologiche ed espressione di CD23 nel LPL

CD23 è un recettore a bassa affinità per le IgE (Fc epsilon RI), codificato dal gene *FCER2* sul cromosoma 19p13.2. Tale proteina svolge importanti funzioni immunologiche, contribuendo alla proliferazione e alla maturazione dei linfociti B e regolando la produzione delle IgE [108].

CD23 è fisiologicamente espresso in FDC e in linfociti B naïve attivati dalla stimolazione antigenica [108]. Nell'ambito delle neoplasie linfoidi, questo antigene è tipicamente espresso dalle cellule neoplastiche della leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti B da rare forme di linfoma follicolare, solitamente inguinali da alcuni linfomi B di alto grado (i.e. linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino; rari linfomi a grandi cellule B non altrimenti specificati) e da occasionali altri casi di linfoma B di basso grado [13].

La maggior parte dei dati pubblicati in letteratura riporta bassi livelli di espressione di CD23 nel LPL. Tali risultati risentono tuttavia di potenziali limiti quali (i) la bassa numerosità delle casistiche esaminate, (ii) la variabilità di *cutoff* utilizzati per definire la positività per CD23, e (iii) il ricorso ad analisi di FC per la valutazione dell'espressione di CD23, senza considerare il contributo degli studi immunoistochimici [11,13]. Tali discrepanze giustificano l'estrema variabilità dei tassi di espressione di CD23 in LPL/WM riportati in letteratura (positività variabile da <5% al 61% dei casi) [13,11].

Una più precisa definizione dell'espressione di CD23 nel LPL e, più in generale, una più completa caratterizzazione immunoistochimica di tale linfoma potrebbero

contribuire a identificare nuovi marcatori utili per il suo riconoscimento e per la diagnosi differenziale con il MZL. La correlazione tra fenotipi clinici, immunohistochimici e molecolari di malattia potrebbe inoltre aumentare la comprensione della biologia di questo linfoma, identificando potenziali sottogruppi di malattia con caratteristiche clinico-biologiche peculiari.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Scopi del presente studio sono:

- Descrivere le caratteristiche clinico-patologiche del LPL/WM;
- Valutare l'espressione di CD23 in campioni midollari di LPL, identificando possibili correlazioni tra fenotipi clinici, immunistochimici e molecolari;
- Valutare il ruolo di CD23 e di altri parametri istologici nella diagnosi differenziale tra LPL e MZL.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Popolazione dello studio

Lo studio ha considerato una serie retrospettiva di LPL/WM, diagnosticati presso l'Unità Operativa Complessa di Anatomia Patologica dell'Ospedale Universitario di Padova tra il 2017 e il 2023. I criteri di inclusione sono stati definiti come segue: (i) diagnosi di LPL basata sui criteri del Consensus Internazionale IWWM del 2022 [2]; (ii) disponibilità alla diagnosi di dati clinici e di laboratorio; (iii) *follow-up* clinico >6 mesi; (iv) disponibilità di campioni di midollo osseo adeguati per la revisione morfologica e immunochimica. Complessivamente, 81 casi hanno soddisfatto i criteri di inclusione. Il confronto con le caratteristiche istologiche dei MZL è stato condotto considerando un'ulteriore serie di 73 casi di MZL con coinvolgimento midollare, diagnosticati e trattati nello stesso periodo presso l'Azienda Ospedaliera di Padova. Tale serie includeva 47/73 (61,6%) SMZL, 13/73 (17,8%) di NMZL e 13/73 (17,8%) EMZL.

3.2. Raccolta dei dati clinici

Per ciascun caso, sono stati raccolti i seguenti dati clinico-laboratoristici: (i) presentazione clinica (presenza/assenza di sintomi sistemici, sindrome di iperviscosità, splenomegalia, linfadenopatie e/o lesioni extranodali); (ii) emocromo e conta leucocitaria alla diagnosi; (iii) presenza/entità della componente monoclonale di IgM; (iv) analisi di funzionalità renale; (v) dati di FC sui campioni di midollo osseo alla diagnosi; (vi) stato mutazionale per *MYD88* e *CXCR4*; (vii) tipologia ed esito dei trattamenti; (viii) dati di outcome e durata del *follow-up*.

3.3. Valutazione istologica dei campioni di midollo osseo

I campioni di biopsia osteo-midollare sono stati recuperati dagli archivi dell'Unità Operativa Complessa di Anatomia Patologica dell'Ospedale Universitario di Padova. La revisione istologica è stata eseguita da due patologi esperti di malattie oncoematologiche, non a conoscenza dei dati clinici, di laboratorio e molecolari. La rivalutazione istologica ha considerato i seguenti parametri: (i) pattern di crescita (diffuso, interstiziale, intra-sinusoidale, paratrabecolare e aggregati non paratrabecolari); (ii) composizione citologica dell'infiltrato linfoide; (iii) entità dell'infiltrato neoplastico, riportata come valore percentuale della cellularità

midollare totale; (iv) immunofenotipo delle cellule neoplastico, valutato mediante caratterizzazione immunoistochimica (IHC).

Le analisi IHC sono state eseguite su sezioni di tessuto dello spessore di 4 μm , utilizzando il coloratore automatico BOND-MAX (Leica Biosystems) [15]. Ai fini della caratterizzazione immunoistochimica sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-CD20 (L26; Dako), anti-CD3 (LN10; Leica Biosystems), anti-CD5 (4C7; Leica Biosystems), anti-CD10 (DAK-CD10; Dako), anti-Bcl6 (LN22; Leica Biosystems), anti-MUM1 (MUM1p; Dako), anti-MNDA (253A; Abcam), anti-CD23 (1B12; Leica Biosystems), anti-Ciclina D1 (EP12; Leica Biosystems), catene leggere kappa (polyclonal; Dako) e lambda (polyclonal; Dako).

Le immunoreazioni per CD5 e CD10 sono state considerate positive in caso di espressione in $>10\%$ delle cellule neoplastiche. L'espressione di CD23 è stata semiquantitativamente valutata utilizzando uno *score*, definito come segue: (i) *score* 0 (colorazione negativa): nessuna cellula positiva per CD23; (ii) *score* 1+: 1-10% di cellule positive; (iii) *score* 2+: 11-30% di cellule positive; (iv) *score* 3+: $>30\%$ di cellule positive. L'analisi dei dati istologici e l'acquisizione delle immagini sono state realizzate utilizzando la fotocamera digitale Leica DFC295, il software LAS-X (Leica Microsystems) e il processore Intel 9920x.

3.4. Analisi dei dati e studi statistici

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante test non parametrici per variabili qualitative (test esatto di Fisher e test del Chi-quadro, a seconda dei casi) e variabili quantitative (test di Wilcoxon-Mann-Whitney). Gli studi di concordanza tra analisi IHC immunoistochimica e FC sono stati realizzati mediante coefficiente kappa di Cohen.

Per la produzione dello *score* clinico-patologico finalizzato alla diagnosi differenziale tra LPL e MZL, i parametri statisticamente significativi sono stati selezionati mediante analisi di regressione logistica. I valori assoluti e i segni dei moltiplicatori sono stati derivati dalle *odds ratio* di ciascun parametro. La curva ROC (i.e. *Receiver Operating Characteristic*) e l'area sotto la curva (AUC) sono state utilizzate per valutare il potere discriminante dello *score*. Il *cut-off* ottimale per la discriminazione tra LPL e MZL è stato determinato calcolando l'indice di Youden. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di $p < 0,05$.

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (versione 29.0. Armonk, NY; IBM Corp). Lo studio è stato notificato al Comitato Etico locale (ID: 456n/AO/24), in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e con le normative nazionali relative alla ricerca clinica e alla tutela della *privacy*.

4. RISULTATI

4.1. Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio

La popolazione dello studio includeva 81 pazienti affetti da LPL con età mediana alla diagnosi di 71 anni (intervallo interquartile [IQR]: 65-79 anni) e rapporto M:F di 1,8. Alla diagnosi erano presenti splenomegalia e/o linfadenopatia in 15/81 (18,5%) casi. Il livello sierico mediano di emoglobina e la conta piastrinica erano rispettivamente di 127,0 g/L (IQR: 109-140 g/L) e 234,0 x10⁹/L (IQR: 185-297 x10⁹/L). Componenti monoclonali sieriche erano presenti in tutti i casi alla diagnosi (valore mediano: 12,1 g/L; IQR: 7,3-21,2 g/L) (Tabella I).

I valori mediani di PCR e creatinina nel siero erano rispettivamente di 5,0 mg/L (IQR: 3,0-15,0) e 76,0 μmol/L (IQR: 64,0-92,0). La mutazione *MYD88*^{L265P} è stata identificata in 67/73 (91,8%) pazienti, mentre mutazioni di *CXCR4* sono state documentate in 7/46 (15,2%) casi analizzati.

Complessivamente, 39/81 (48,1%) pazienti sono stati trattati con terapie di prima linea (Rituximab-Bendamustina: 20/39 [51,3%]; Rituximab come agente singolo: 15/39 [38,5%]; inibitori di BTK: 4/39 [10,3%]). Una risposta completa (CR) è stata ottenuta in 27/39 (69,2%) pazienti. Dopo un *follow-up* mediano di 25 mesi (IQR: 11-43 mesi), tutti i pazienti erano in vita e affetti da malattia (*overall survival* e *progression free survival* non raggiunti).

4.2. Caratteristiche istologiche dei campioni di midollo osseo

La valutazione istologica del midollo osseo ha documentato una variabile combinazione di *pattern* di infiltrazione da parte del LPL. Una crescita puramente paratrabecolare è stata documentata in 11/81 (13,6%) casi, mentre crescita paratrabecolare e centrolacunare è stata riportata in 24/81 (29,6%) casi. Infiltrazione intrasinusoidale era presente in 22/81 (27,2%) casi, spesso in associazione con altri *pattern* (14/22 [63,6%] casi). Infiltrazione diffusa del midollo osseo è stata riportata, invece, in 17/81 (21,0%) campioni.

In ciascun caso, la popolazione neoplastica era composta da linfociti maturi di piccola taglia con cromatina addensata, nel cui contesto erano presenti linfociti plasmocitoidi e quantità variabili di plasmacellule (Figura 1).

Nel contesto dell'infiltrato linfoide erano inoltre presenti rari mastociti, mentre reti di FDC (positive dall'immunoreazione per CD23 e/o CD21) erano presenti in 11/81 (13,6%) casi.

Tabella I. Caratteristiche clinico-patologiche dei LPL e MZL

Caratteristiche	LPL (n=81)	MZL (n=73)	p-value
Età mediana (y)	71 (IQR: 65-79)	71 (IQR: 64-76)	n.s
Rapporto M:F	1.8	1.1	n.s
Linfoadenopatia e/o splenomegalia (%)	15/81 (18.5)	44/61 (72.1)	<0.01
MC mediana (g/L)	12.1 (IQR: 7.3-21.2)	2.2 (IQR: 1.1-6.8)	<0.01
Mutazione <i>MYD88</i> ^{L265P} (%)	67/73 (91.8)	1/15 (0.7)	<0.01
Espressione di CD23 (%)	59/81 (72.8)	25/73 (34.2)	<0.01
Espressione di CD5(%)	13/81 (16.0)	8/73 (11.0)	n.s
Espressione di CD10 (%)	3/81 (3.7)	0/73 (-)	n.s
Reticoli FDC (%)	11/81 (13.6)	38/73 (52.1)	<0.01
Fibrosi BM (%)			
MF0-1	72/81 (88.8)	68/73 (93.2)	n.s
MF2-3	9/81 (11.1)	4/73 (5.5)	n.s

Abbreviazioni. MC= componente monoclonale; FDC= cellule dendritiche follicolari; BM= midollo osseo; IQR= intervallo interquartile; LPL= linfoma linfoplasmocitico; MZL = linfoma della zona marginale.

L'entità dell'infiltrazione midollare variava dal 2% al 95% della cellularità totale (valore mediano: 18%). Fibrosi midollare era presente in 81/81 (100%) casi ed era solitamente di grado lieve (MF-1) o moderata (MF-2) (Tabella I).

4.3. Caratteristiche immunofenotipiche del LPL

L'analisi IHC sui campioni di midollo osseo ha rivelato positività diffusa per CD20 in linfociti B di piccola taglia, linfociti plasmocitoidi e in quota di plasmacellule. L'immunoreazione per CD3 è risultata positiva in rari linfociti T di accompagnamento. Debole/moderata positività per MUM1 in linfociti B è stata documentata in 69/81 (85,2%) casi (Figura 1), mentre l'espressione di MNDA era presente in 17/28 (61%) dei casi testati. Intensa e diffusa positività per CD10 è stata documentata in 3/81 (3,7%) casi, mentre debole/parziale espressione di Bcl6 era presente in 19/81 (23,4%) casi. L'immunoreazione per Ciclina D1 è risultata invariabilmente negativa. Positività per CD5 è stata documentata in 13/81 (16,0%) casi, con intensità solitamente inferiore a quella dei linfociti T di accompagnamento (Figura 2).

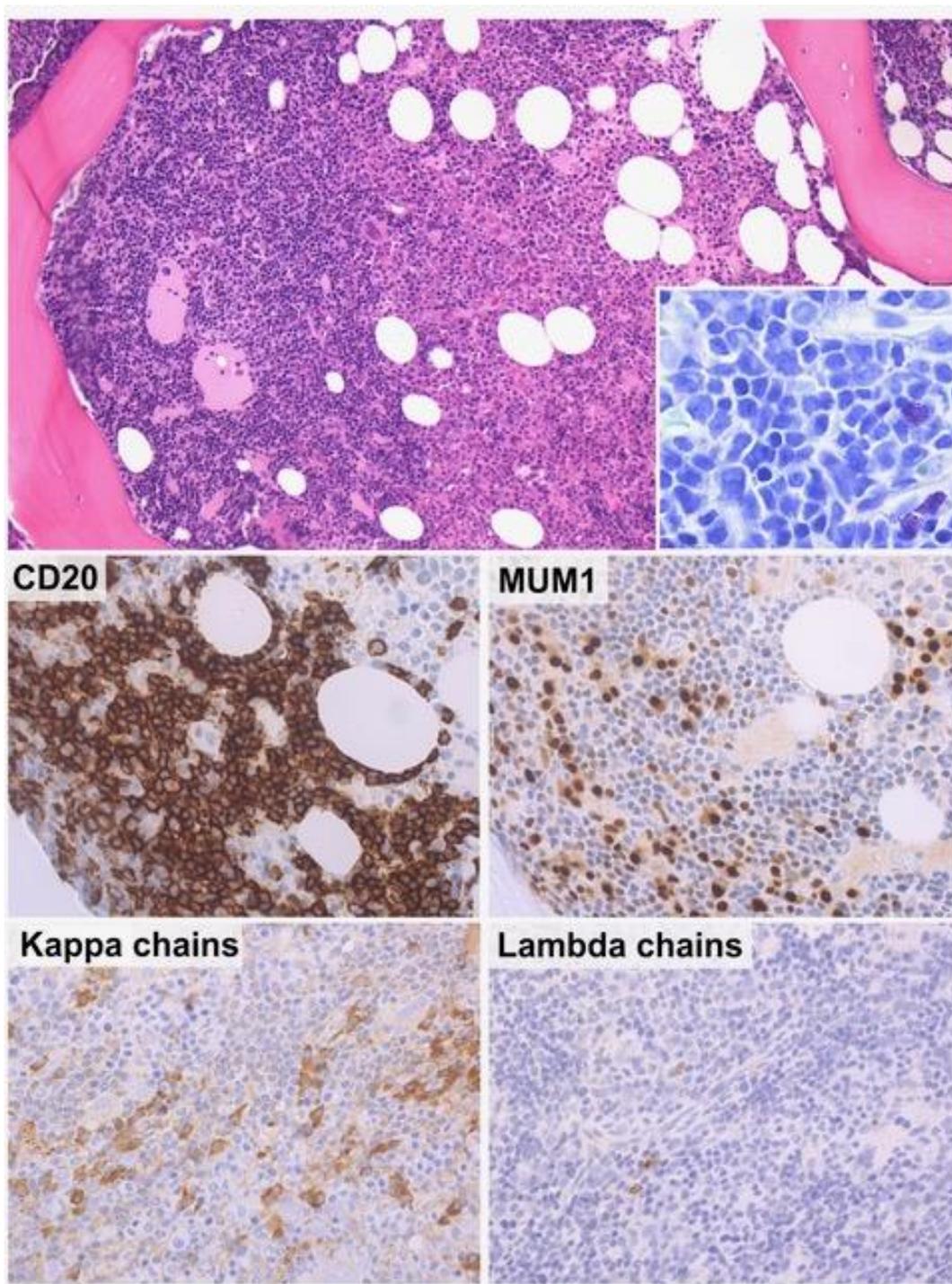


Figura 1. Caratteristiche istologiche del LPL nel midollo osseo. Le localizzazioni midollari di LPL si caratterizzano per aggregati linfoidi paratrabecolari (pannello superiore), composti da linfociti maturi di piccola taglia con rare plasmacellule e mastociti (pannello superiore, inserto). Le cellule neoplastiche sono positive per i marcatori pan-B (CD20; pannello centrale a sinistra) con espressione variabile di MUM1 nelle plasmacellule e nei linfociti (pannello centrale a destra). Restrizione delle catene leggere delle immunoglobuline può essere documentata nelle plasmacellule neoplastiche (rapporto kappa/lambda >10:1 in questo caso; pannello inferiore). (Colorazioni con ematossilina-eosina, Giemsa e immunoperossidasi; ingrandimento originale, x10, x40, x63).

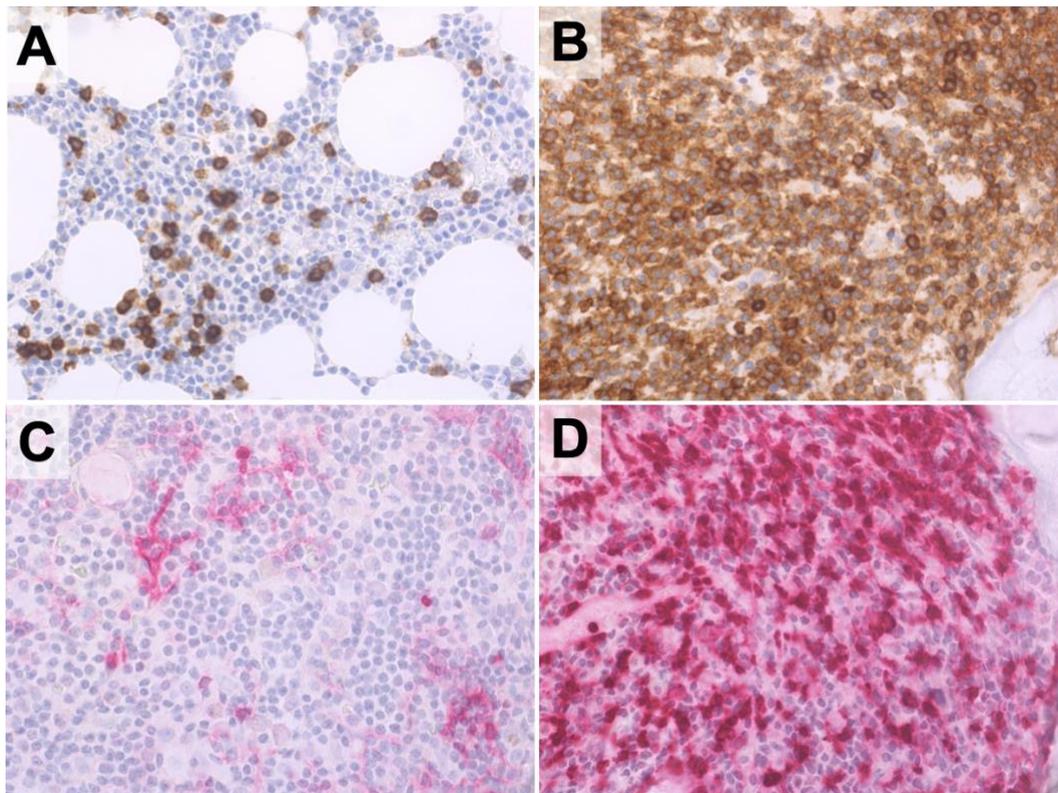


Figura 2. Espressione di CD5 e CD10 nel LPL. A-B. La colorazione per CD5 è risultata negativa in 68/81 (84,0%) casi (A) e positiva in 13/81 (16,0%) casi (B). Anche nei casi positivi, l'espressione di CD5 era più debole rispetto ai linfociti T di accompagnamento. C-D. La colorazione per CD10 è risultata negativa in 78/81 (96,3%) casi (C) e positiva in 3/81 (3,7%) casi (D). (Colorazione con immunoperoxidasi; ingrandimento originale, 40x).

La maggior parte dei casi (59/81 [72,8%]) ha dimostrato positività per CD23 in quote variabili di linfociti B maturi, linfociti plasmocitoidi e plasmacellule (*range* della positività variabile dal 2% al 70% delle cellule neoplastiche di ciascun caso). Nel dettaglio, l'espressione di CD23 nei LPL/WM ha dimostrato la seguente distribuzione: (i) *score* 1+ in 36/81 (44,4%) casi; (ii) *score* 2+ in 15/81 (18,5%) casi; (iii) *score* 3+ in 8/81 (9,9%) casi (Figura 3; Tabella II).

I risultati delle analisi IHC erano in gran parte coerenti con i dati della caratterizzazione mediante FC, con tassi di concordanza sostanziali (kappa di Cohen >0,6) anche per l'espressione aberrante di CD5 e CD10. Tassi di concordanza più bassi (kappa di Cohen= 0,31) sono stati invece registrati per l'espressione di CD23, verosimilmente a causa dei diversi *cut-off* di positività adottati dalle analisi IHC e in FC (1% *versus* 20% delle cellule neoplastiche, rispettivamente).

4.4. Correlazioni clinico-patologiche e molecolari

Per identificare possibili correlati biologici dell'espressione di CD23, abbiamo confrontato le caratteristiche cliniche, laboratoristiche e molecolari dei LPL/WM stratificati per espressione di CD23 (i.e. *score 0 versus score 1+, 2+ o 3+*). I casi di LPL/WM positivi per CD23 hanno dimostrato più severa infiltrazione midollare ($p= 0,03$), minor espressione di CD5 ($p= 0,04$) e più frequente mutazione *MYD88^{L265P}* ($p= 0,05$) dei casi CD23-negativi. È stata inoltre osservato un *tend* di significatività statistica verso più elevati livelli di PCR ($p= 0,07$), beta2-microglobulina ($p= 0,06$) e componente monoclonale sierica ($p= 0,14$) nei casi CD23-positivi (Tabella III).

Tabella II. Score di positività per CD23 in LPL e MZL

	LPL	MZL	<i>p</i> -value
Score 0	22/81 (27.2%)	49/73 (67.1%)	<0.01
Score 1+ (1-10%)	36/81 (44.4%)	20/73 (27.4%)	0.03
Score 2+ (11-30%)	15/81 (18.5%)	3/73 (4.1%)	0.01
Score 3+ (>30%)	8/81 (9.9%)	1/73 (1.4%)	0.04

Tabella III. Caratteristiche clinico-patologiche di LPL CD23-positivi e CD23-negativi

Caratteristiche	CD23-positivi (n = 59)	CD23-negativi (n = 22)	<i>p</i> -value
Età mediana (y)	73 (66-80)	70 (63-73)	n.s
Linfoadenopatia e/o splenomegalia (%)	10/58 (17.2)	1/22 (4.5)	n.s
Necessità di terapia (%)	26/59 (44.0)	13/22 (59.1)	n.s
Piastrine mediane (x10 ⁹ /L)	235.0 (IQR: 190.0-299.0)	227.0 (IQR: 181.0-294.0)	n.s
Emoglobina mediana (g/L)	130.0 (IQR: 108.0-137.0)	120.0 (IQR: 114.0-142.0)	n.s
MC mediano (g/L)	12.0 (IQR: 7.4-23.6)	9.3 (IQR: 7.1-16.7)	0.14
CRP mediano (mg/L)	7.3	2,9	0.07

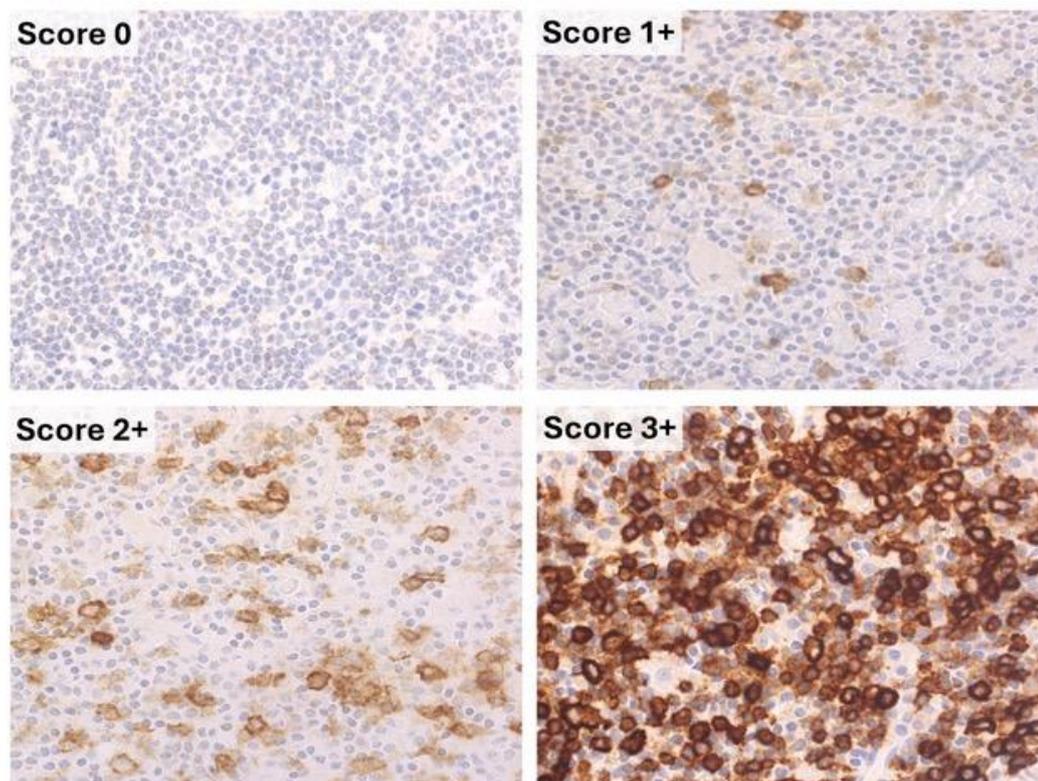


Figura 3. Espressione immunoistochimica di CD23 nel LPL. L'immunoreazione per CD23 nel LPL varia da completamente negativa (A) a gradi variabili di positività (B-D). *Score 1+* è stato assegnato a casi con 1-10% di cellule CD23-positivo (B), *score 2+* a casi con 11-30% di cellule positive (C) e *score 3+* ai casi con >30% di cellule positive (D). (Colorazione con immunoperoxidasi; ingrandimento originale, x40).

4.5. Confronto tra LPL e MZL

Per valutare se l'espressione di CD23 possa supportare la diagnosi differenziale tra LPL/WM e MZL, abbiamo confrontato il fenotipo dei LPL/WM della nostra serie con quello di un'ampia coorte di MZL, diagnosticati su biopsie osteo-midollari nello stesso arco temporale (SMZL, n= 47/73 [61,6%]; NMZL, n= 13 [17,8%]; EMZL, n=13 [17,8%]).

La coorte di MZL era composta da 73 pazienti con età mediana alla diagnosi di 71 anni (IQR: 64-76 anni) e rapporto M:F di 1,1 (Tabella I). In linea con i dati di letteratura [16], i casi di MZL hanno rivelato più frequenti linfadenopatie e/o splenomegalia e componenti monoclonali di minor entità rispetto ai LPL/WM. Le analisi molecolari hanno inoltre documentato maggior frequenza della mutazione *MYD88*^{L265P} nei LPL/WM rispetto ai MZL (Tabella I).

Le caratteristiche istologiche dei MZL nel midollo osseo erano in gran parte sovrapponibili a quelle dei LPL/WM, anche se i MZL erano più frequentemente

associati a *pattern* di crescita intrasinusoidale (41/73 [56,2%] *versus* 22/81 [27,2%]; $p < 0,01$) e alla prevalenza di reti di FDC all'interno degli aggregati linfoidi (38/73 [52,1%] *versus* 11/81 [13,6%]; $p < 0,01$). Un *pattern* di crescita puramente paratrabecolare è stato invece documentato più di frequente nei LPL/WM (11/81 [13,6%] *versus* 2/73 [2,7%]; $p = 0,02$).

Considerando le caratteristiche IHC dell'infiltrato linfoide, i MZL erano caratterizzati da positività per CD20 e Bcl2, con prevalente negatività per CD10, Bcl6 e MUM1. Ciclina D1 era negativa in tutti i casi e il rapporto catene leggere kappa/lambda sbilanciato in casi con evidente differenziazione plasmacellulare. L'espressione di CD23 è stata documentata in una minoranza di casi (25/73 [34,2%]).

Il confronto tra profilo IHC dei LPL/WM e dei MZL ha rivelato più frequente espressione di CD23 nei (59/81 [72,8%] *versus* 25/73 [34,2%]; $p < 0,01$). Tale differenza rimaneva valida anche confrontando LPL e MZL per singoli *score* di positività per CD23 (Tabella II). Nessun altro marcatore IHC differiva significativamente tra le due entità (Tabella I).

4.6. Score clinico-patologico per la diagnosi differenziale tra LPL e MZL

Poiché nessun parametro distingue LPL/WM da MZL in modo altamente sensibile e specifico, è stata considerata una serie di variabili clinico-patologiche la cui combinazione potesse meglio supportare la diagnosi differenziale tra tali entità.

A questo scopo, sono state inizialmente identificate variabili significativamente associate alla diagnosi di MZL o LPL mediante studi di regressione logistica. A tali parametri sono stati poi associati moltiplicatori, calcolati sulla base della forza dell'associazione con la diagnosi di LPL (moltiplicatori di segno positivi) o MZL (moltiplicatori di segno negativo) (*cfr* paragrafo 3.4). Ciò ha portato alla definizione di uno *score* clinico-patologico integrato, che includesse: (i) positività per CD23 nei linfociti B neoplastici (+1,5 punti); (ii) presenza di reti di FDC negli aggregati linfoidi (-2,5 punti); (iii) presenza di componenti monoclonali $\geq 2,5$ g/L (+3 punti); (iv) presenza di linfadenopatie e/o splenomegalia (-3 punti) (Tabella IV).

Adottando un *cutoff* di 0, lo *score* così definito consentiva di discriminare LPL (punteggio > 0) da MZL (punteggio ≤ 0) con elevata sensibilità (94%), specificità (90%), valore predittivo positivo (92%) e valore predittivo negativo (NPV: 93%).

Tabella IV. Score integrato per la diagnosi differenziale tra LPL e MZL.

Variabili	Punteggio
Presenza di cellule B neoplastiche CD23-positive	+1.5
Presenza di reticoli FDC in aggregati linfoidi osteomidollari	-2.5
MC Sierico ≥ 2.5 g/L	+3
Presenza di splenomegalia e/o linfadenopatia	-3

Interpretazione dello score

-Valori >0 punti sono associati a LPL

-Valori ≤ 0 punti sono associati a MZL

5. DISCUSSIONE

La valutazione morfologica del midollo osseo è fondamentale per porre diagnosi di LPL/WM. Nonostante questo, i dati di letteratura relativi all'immunofenotipo del LPL/WM e alle caratteristiche istologiche che differenziano il LPL/WM dal MZL sono discrepanti e inconclusivi.

Per chiarire le incongruenze che ancora esistono sul tema, il presente studio ha considerato una serie retrospettiva di LPL/WM, analizzandone l'immunofenotipo e correlando i dati istologici con le caratteristiche cliniche e molecolari della malattia. Criteri utili alla diagnosi differenziale tra LPL/WM e MZL sono stati valutati considerando una ulteriore serie di MZL e paragonando multipli parametri istologici al fine di combinarli in uno *score* diagnostico integrato (Tabella IV).

In linea con i dati della letteratura [12,14,16, 17, 18, 19], la coorte dei LPL/WM era composta da pazienti adulti-anziani con netta prevalenza del sesso maschile (rapporto M:F di 1,8). La mutazione *MYD88*^{L265P} era presente nella maggior parte dei casi, mentre mutazioni di *CXCR4* sono state documentate in 7/46 (15,2%) casi. Il tasso di mutazioni di *CXCR4* è risultato inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura [2]. Nonostante le ragioni di tale discrepanza non siano chiare, possibili cause possono essere ricondotte alla limitata numerosità e a peculiarità nella composizione e nel *background* genetico della coorte dello studio.

La valutazione morfologica dell'infiltrazione midollare ha rivelato una varietà di *pattern*, tra cui infiltrati interstiziali, intrasinusoidali, paratrabeolari, centrolacunari e diffusi. Di questi, un *pattern* puramente paratrabeolare è risultato altamente specifico di LPL/WM, essendo documentato solo di rado nei MZL. Al contrario, infiltrati intrasinusoidali (isolati o in combinazione con altri *pattern*) erano più frequenti nei MZL. Ancora più specifica di MZL era, inoltre, la presenza di reti di FDC nel contesto degli aggregati linfoidi neoplastici (Tabella I).

Tali risultati sono in linea con precedenti studi di letteratura, che indicano i *pattern* paratrabeolare e intrasinusoidale come specifici rispettivamente di LPL/WM e MZL [16, 17, 18]. Nonostante questo, la sola valutazione dei *pattern* non permette di distinguere LPL/WM da MZL in modo inequivocabile. Ciò conferma la necessità di integrare dati morfologici, fenotipici e (ove disponibili) genetici per porre una solida diagnosi di LPL e MZL.

Muovendo da queste considerazioni, sono state valutate le caratteristiche immunofenotipiche dei LPL/WM della nostra serie, concentrandosi su dati

immunoistochimici piuttosto che citofluorimetrici. Tale scelta si deve al fatto che l'IHC (i) è di gran lunga più accessibile della FC nella maggior parte dei laboratori di Anatomia Patologica e (ii) fornisce informazioni più dettagliate sulla presenza e topografia di popolazioni neoplastiche anche minoritarie. Tale approccio ha consentito il più ampio studio finora condotto sulle caratteristiche IHC del LPL/WM.

I risultati del presente studio confermano la presenza di fenotipi aberranti in una consistente quota di LPL/WM [11,13,14,20], con positività per CD5 e CD10 in 13/81 (16,0%) e 3/81 (3,7%) casi, rispettivamente. Un risultato sorprendente del nostro studio è l'alto tasso di espressione di CD23 (53/75 [70,7%]). In linea con studi precedenti [11], nella maggior parte dei casi è stata riscontrata positività solo focale/parziale per questo marcatore. Il tasso di positività per CD23 nella nostra serie è risultato, tuttavia, più alto rispetto a casistiche precedenti [11, 12, 13]. Ciò si deve probabilmente a (i) differenze nei *cutoff* adottati per definire la positività per CD23 e (ii) alla diversità delle metodiche utilizzate per valutare l'espressione di CD23 (IHC *versus* FC).

Diversamente da studi precedenti, per la presente casistica non è stato stabilito un valore percentuale minimo per definire la positività per CD23, poiché osservazioni preliminari indicavano *pattern* di espressione molto eterogenei e sub-clonali, che avrebbero reso qualsiasi soglia arbitraria [11]. Abbiamo pertanto preferito registrare qualsiasi livello di positività nei linfociti neoplastici, considerando sia la percentuale di linfociti B CD23-positivi che sottogruppi di malattia distinti per livelli di espressione della proteina. Questo ci ha permesso di rilevare profili di espressione di CD23, associati a possibili correlati clinici e biologici.

Da un punto di vista clinico, i nostri risultati indicano CD23 come un nuovo marcatore per la diagnosi differenziale tra LPL/WM e MZL, con tassi di espressione significativamente più elevati nel primo rispetto al secondo (Tabella I; Tabella II). Poiché la sola positività per CD23 non è completamente specifica di LPL/WM, abbiamo identificato una serie di variabili significativamente associate a LPL/WM (espressione di CD23; componente monoclonale sierica $\geq 2,5$ g/L) o MZL (reti di FDC in aggregati linfoidi; presenza di linfadenopatia e/o splenomegalia), la cui combinazione ha consentito di produrre uno *score* diagnostico, caratterizzato da ottima sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo (Tabella IV). La validità di tale *score* è supportata indirettamente da precedenti studi, che

identificano nelle reti di FDC, nell'organomegalia e in elevati livelli di componente monoclonale parametri utili per la diagnosi differenziale tra LPL/WM e MZL [16, 20]. La combinazione di queste variabili con l'espressione di CD23 aumenta ulteriormente il loro valore diagnostico, specialmente nei casi in cui non siano disponibili o non possano essere eseguite analisi mutazionali per *MYD88* e/o *CXCR4*.

Da un punto di vista patobiologico, la positività eterogenea per CD23 nel LPL/WM e la sua associazione con specifiche caratteristiche cliniche e genetiche suggeriscono possibili correlati biologicamente rilevanti. Nella nostra serie, l'espressione di CD23 era significativamente associata a più estesa infiltrazione midollare e a più elevata frequenza della mutazione *MYD88*^{L265P} (Tabella III). È stato inoltre osservato un *trend* di associazione statistica tra la positività per CD23 e più elevati valori di componente monoclonale, in linea con quanto riportato in precedenti studi [13, 16].

Muovendo da simili osservazioni e dall'eterogeneità dell'espressione di CD23, alcuni autori hanno ipotizzato che i LPL/WM CD23-positivi siano un sottogruppo di malattia con caratteristiche biologiche peculiari [13]. I nostri risultati supportano questa ipotesi e sono in linea con recenti studi sulla biologia del LPL/WM mediante analisi *single-cell* [21].

Studi di *single-cell RNA sequencing* di campioni di LPL hanno, infatti, identificato un'eterogenea combinazione di sottopopolazioni sia in casi *MYD88*^{L265P}-mutati che in casi *MYD88*^{WT}. Di questi, i LPL mutati in *MYD88*^{L265P} erano caratterizzati da un più alto grado di eterogeneità clonale, dimostrando fino a sei sottopopolazioni cellulari corrispondenti a diversi stadi di maturazione del linfocita B [21]. In tale contesto, è di rilievo notare come uno dei geni più differenzialmente espressi nel LPL mutato per *MYD88*^{L265P} sia *FCER2*, ossia il gene che codifica per CD23. Nel complesso, questi dati possono contribuire a spiegare i nostri risultati da un punto di vista biologico: è infatti possibile che i LPL/WM mutati in *MYD88*^{L265P} siano variabilmente arricchiti in cellule CD23-positive, a seconda della loro composizione sub-clonale [21].

6. CONCLUSIONI

Il LPL/WM è un linfoma non-Hodgkin a cellule B periferiche con peculiari caratteristiche clinico-patologiche e molecolari. La valutazione istologica di biopsie osteomidollari in pazienti con LPL/WM ha documentato una rilevante quota di casi con fenotipo aberrante (positività per CD5 e/o CD10) e un alto tasso di positività per CD23. Nella maggior parte dei casi, l'espressione di CD23 è focale/parziale, suggerendo la presenza di sottopopolazioni neoplastiche con caratteristiche fenotipiche/biologiche peculiari. Insieme ad altri parametri clinici e istologici, l'espressione di CD23 supporta la diagnosi differenziale tra LPL/WM e MZL. Uno *score* integrato che consideri parametri istologici (espressione di CD23; presenza di reti di FDC) e clinici (presenza di linfadenopatie/organomegalia; componente monoclonale >2,5 g/L) consente di discriminare il LPL/WM dal MZL con elevata sensibilità, specificità e valori predittivi positivo e negativo. Ulteriori studi su più ampie coorti di pazienti sono necessari per confermare i nostri risultati e per chiarire la biologia dell'espressione di CD23 nel LPL/WM.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1) McMaster ML. The epidemiology of Waldenström macroglobulinemia. *Semin Hematol.* 2023 Mar;60(2):65-72. doi: 10.1053/j.seminhematol.2023.03.008.
- 2) Treon SP, Tedeschi A, San-Miguel J et al. Report of consensus Panel 4 from the 11th International Workshop on Waldenström's macroglobulinemia on diagnostic and response criteria. *Semin Hematol.* 2023 Mar;60(2):97-106. doi: 10.1053/j.seminhematol.2023.03.009.
- 3) Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A. et al. Waldenström's macroglobulinemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18(4):747-65. doi: 10.1016/j.beha.2005.01.028.
- 4) Askari E, Rodriguez S, Garcia-Sanz R. et al. Waldenström's Macroglobulinemia: An Exploration into the Pathology and Diagnosis of a Complex B-Cell Malignancy. *J Blood Med.* 2021 Aug 30;12:795-807. doi: 10.2147/JBM.S267938.
- 5) Dogliotti I, Jiménez C, Varettoni M. et al. Diagnostics in Waldenström's macroglobulinemia: a consensus statement of the European Consortium for Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia.* 2023 Feb;37(2):388-395. doi: 10.1038/s41375-022-01762-3.
- 6) Dufresne, S. D., Felgar, R. E., Sargent, R. L., Surti, U., Gollin, S. M., McPhail, E. D., ... & Swerdlow, S. H. (2010). Defining the borders of splenic marginal zone lymphoma: a multiparameter study. *Human pathology, 41*(4), 540-551.
- 7) Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia.* 2022 Jul;36(7):1720-1748. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2.

- 8) Naderi N, Yang DT. Lymphoplasmacytic lymphoma and Waldenström macroglobulinemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2013 Apr;137(4):580-5. doi: 10.5858/arpa.2012-0034-RS.
- 9) Fend F, Dogan A, Cook JR. Plasma cell neoplasms and related entities- evolution in diagnosis and classification. *Virchows Arch.* 2023 Jan;482(1):163-177. doi: 10.1007/s00428-022-03431-3.
- 10) Righi S, Novero D, Godio L. et al. Myeloid nuclear differentiation antigen: an aid in differentiating lymphoplasmacytic lymphoma and splenic marginal zone lymphoma in bone marrow biopsies at presentation. *Hum Pathol.* 2022 Jun;124:67-75. doi: 10.1016/j.humpath.2022.03.008.
- 11) Konoplev S, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE et al. Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia. *Am J Clin Pathol.* 2005 Sep;124(3):414-20. doi: 10.1309/3G1X-DX0D-VHBN-VKB4.
- 12) Morice WG, Chen D, Kurtin PJ et al. Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenström's macroglobulinemia. *Mod Pathol.* 2009 Jun;22(6):807-16. doi: 10.1038/modpathol.2009.34.
- 13) Hunter ZR, Branagan AR, Manning R et al. CD5, CD10, and CD23 expression in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma.* 2005 Mar;5(4):246-9. doi: 10.3816/clm.2005.n.008.
- 14) Owen RG, Barrans SL, Richards SJ et al. Waldenström macroglobulinemia. Development of diagnostic criteria and identification of prognostic factors. *Am J Clin Pathol.* 2001 Sep;116(3):420-8. doi: 10.1309/4LCN-JMPG-5U71-UWQB
- 15) Pizzi M, Agostinelli C, Righi S. et al. Aberrant expression of CD10 and BCL6 in mantle cell lymphoma. *Histopathology.* 2017 Nov;71(5):769-777. doi: 10.1111/his.13286.

- 16) García-Abellás P, Ferrer Gómez A, Bueno Sacristán D. et al. Lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma involving bone marrow: A diagnostic dilemma. Useful clinicopathological features to accurate the diagnosis. *Eur J Haem.* 2022 Oct 5;3(4):1181-1187. doi: 10.1002/jha2.573.
- 17) Garcia-Reyero J, Martinez Magunacelaya N, Gonzalez de Villambrosia S. et al. Diagnostic value of bone marrow core biopsy patterns in lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinaemia and description of its mutational profiles by targeted NGS. *J Clin Pathol.* 2020 Sep;73(9):571-577. doi: 10.1136/jclinpath-2019-206282
- 18) Danesin N, Lo Schirico M, Scapinello G. et al. Waldenström Macroglobulinemia in Very Elderly (≥ 75 -year-old) Patients: A 33-year-retrospective Cohort Study in an Italian University Hospital. *Hemasphere.* 2023 Oct 3;7(10):e964. doi: 10.1097/HS9.0000000000000964.
- 19) Danesin N, Bonaldi L, Martines A. et al. Impact of the presence and number of chromosomal abnormalities on the clinical outcome in Waldenström Macroglobulinemia: a monocentric experience. *Ann Hematol.* 2024 Apr 30. doi: 10.1007/s00277-024-05770-4.
- 20) Bassarova A, Trøen G, Spetalen S. et al. Lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma in the bone marrow: paratrabecular involvement as an important distinguishing feature. *Am J Clin Pathol.* 2015 Jun;143(6):797-806. doi: 10.1309/AJCP6ZODWV1CIDME
- 21) Bagratuni T, Aktypi F, Theologi O. et al. Single-cell analysis of MYD88L265P and MYD88WT Waldenström macroglobulinemia patients. *Hemasphere.* 2024 Feb 8;8(2):e27. doi: 10.1002/hem3.
- 22) Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Mullauer L et al (2004) Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. *Leukemia* 18:1722–1726

- 23) Remstein ED, Dogan A, Einerson RR et al (2006) The incidence and anatomic site specificity of chromosomal translocations in primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) in North America. *Am J Surg Pathol* 30:1546–1553
- 24) Laurent, C., Cook, J.R., Yoshino, T. *et al.* Follicular lymphoma and marginal zone lymphoma: how many diseases?. *Virchows Arch* 482, 149–162 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03432-2>
- 25) Luis M. Juárez-Salcedo, Jorge J. Castillo, Lymphoplasmacytic Lymphoma and Marginal Zone Lymphoma, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, Volume 33, Issue 4, 2019, Pages 639-656, ISSN 0889-8588, ISBN 9780323682251, <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2019.03.004>.
- 26) Wang Z, Cook JR. IRTA1 and MNDA Expression in Marginal Zone Lymphoma: Utility in Differential Diagnosis and Implications for Classification. *Am J Clin Pathol*. 2019 Feb 4;151(3):337-343. doi: 10.1093/ajcp/aqy144. PMID: 30346478.
- 27) Jun-ichiro Ikeda, Masaharu Kohara, Yoko Tsuruta, Satoshi Nojima, Shinichiro Tahara, Kenji Ohshima, Masako Kurashige, Naoki Wada, Eiichi Morii, Immunohistochemical analysis of the novel marginal zone B-cell marker IRTA1 in malignant lymphoma, *Human Pathology*, Volume 59, 2017, Pages 70-79, ISSN 0046-8177, <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.09.011>.
- 28) Larissa Sena Teixeira Mendes, Andrew Wotherspoon, Marginal zone lymphoma: Associated autoimmunity and auto-immune disorders, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, Volume 30, Issues 1–2, 2017, Pages 65-76, ISSN 1521-6926, <https://doi.org/10.1016/j.beha.2016.07.006>.
- 29) Elias Campo, Elaine S. Jaffe, James R. Cook, Leticia Quintanilla-Martinez, Steven H. Swerdlow, Kenneth C. Anderson, Pierre Brousset, Lorenzo Cerroni, Laurence de Leval, Stefan Dirnhofer, Ahmet Dogan, Andrew L. Feldman, Falko Fend, Jonathan W. Friedberg, Philippe Gaulard, Paolo Ghia, Steven M. Horwitz, Rebecca L. King, Gilles Salles, Jesus San-Miguel, John F. Seymour, Steven P. Treon, Julie M. Vose, Emanuele Zucca, Ranjana Advani, Stephen Ansell, Wing-Yan

- Au, Carlos Barrionuevo, Leif Bergsagel, Wing C. Chan, Jeffrey I. Cohen, Francesco d'Amore, Andrew Davies, Brunangelo Falini, Irene M. Ghobrial, John R. Goodlad, John G. Gribben, Eric D. Hsi, Brad S. Kahl, Won-Seog Kim, Shaji Kumar, Ann S. LaCasce, Camille Laurent, Georg Lenz, John P. Leonard, Michael P. Link, Armando Lopez-Guillermo, Maria Victoria Mateos, Elizabeth Macintyre, Ari M. Melnick, Franck Morschhauser, Shigeo Nakamura, Marina Narbaitz, Astrid Pavlovsky, Stefano A. Pileri, Miguel Piris, Barbara Pro, Vincent Rajkumar, Steven T. Rosen, Birgitta Sander, Laurie Sehn, Margaret A. Shipp, Sonali M. Smith, Louis M. Staudt, Catherine Thieblemont, Thomas Tousseyn, Wyndham H. Wilson, Tadashi Yoshino, Pier-Luigi Zinzani, Martin Dreyling, David W. Scott, Jane N. Winter, Andrew D. Zelenetz; The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* 2022; 140 (11): 1229–1253. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2022015851>
- 30) Vela V, Juskevicius D, Dirnhofer S et al (2022) Mutational landscape of marginal zone B-cell lymphomas of various origin: organotypic alterations and diagnostic potential for assignment of organ origin. *Virchows Arch* 480:403–413. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03186-3>
- 31) Valeria Spina, Hossein Khiabani, Monica Messina, Sara Monti, Luciano Cascione, Alessio Bruscaggini, Elisa Spaccarotella, Antony B. Holmes, Luca Arcaini, Marco Lucioni, Fabrizio Tabbò, Sakellarios Zairis, Fary Diop, Michaela Cerri, Sabina Chiaretti, Roberto Marasca, Maurilio Ponzoni, Silvia Deaglio, Antonio Ramponi, Enrico Tiacci, Laura Pasqualucci, Marco Paulli, Brunangelo Falini, Giorgio Inghirami, Francesco Bertoni, Robin Foà, Raul Rabadan, Gianluca Gaidano, Davide Rossi; The genetics of nodal marginal zone lymphoma. *Blood* 2016; 128 (10): 1362–1373. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-696757>
- 32) Boveri E, Arcaini L, Merli M, Passamonti F, Rizzi S, Vanelli L, et al. Bone marrow histology in marginal zone B-cell lymphomas: correlation with clinical parameters and flow cytometry in 120 patients. *Ann Oncol*. 2009;20(1):129–36. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18718888/>
- 33) Ciccarelli BT, Patterson CJ, Hunter ZR, Hanzis C, Ioakimidis L, Manning R, Yang G, Xu L, Zhou Y, Sun J, Liu X, Tseng H, Cao Y, Sheehy P, Rodig SJ, Treon SP. Hepsidin is produced by lymphoplasmacytic cells and is associated with anemia in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011 Feb;11(1):160-3. doi: 10.3816/CLML.2011.n.038. PMID: 21454222.

- 34) Kyrtsolis M-C, Levidou G, Korkolopoulou P, Koulieris E, Bartzi V, Maltezas D, et al. CD138 expression helps distinguishing Waldenström's macroglobulinemia (WM) from splenic marginal zone lymphoma (SMZL). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(1):99–102. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21454203/>
- 35) Robert A. Kyle, Steven P. Treon, Raymond Alexanian, Bart Barlogie, Magnus Björkholm, Madhav Dhodapkar, T. Andrew Lister, Giampaolo Merlini, Pierre Morel, Marvin Stone, Andrew R. Branagan, Véronique Leblond, Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia, *Seminars in Oncology*, Volume 30, Issue 2, 2003, Pages 116-120, ISSN 0093-7754, <https://doi.org/10.1053/sonc.2003.50038>.
- 36) Kumar SK, Callander NS, Adekola K, Anderson LD Jr, Baljevic M, Baz R, Campagnaro E, Castillo JJ, Costello C, D'Angelo C, Derman B, Devarakonda S, Elsedawy N, Garfall A, Godby K, Hillengass J, Holmberg L, Htut M, Huff CA, Hultcrantz M, Kang Y, Larson S, Lee H, Liedtke M, Martin T, Omel J, Robinson T, Rosenberg A, Sborov D, Schroeder MA, Sherbenou D, Suvannasankha A, Valent J, Varshavsky-Yanovsky AN, Snedeker J, Kumar R. Waldenström Macroglobulinemia/Lymphoplasmacytic Lymphoma, Version 2.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2024 Jan;22(1D):e240001. doi: 10.6004/jnccn.2024.0001. PMID: 38244272.
- 37) Schwartz, J., Padmanabhan, A., Aqui, N., Balogun, R. A., Connelly-Smith, L., Delaney, M., ... & Shaz, B. H. (2016). Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice—evidence-based approach from the writing committee of the American society for apheresis: the seventh special issue. *Journal of clinical apheresis*, 31(3), 149-338.
- 38) Leleu X, Soumerai J, Roccaro A, Hatjiharissi E, Hunter ZR, Manning R, Ciccarelli BT, Sacco A, Ioakimidis L, Adamia S, Moreau AS, Patterson CJ, Ghobrial IM, Treon SP. Increased incidence of transformation and myelodysplasia/acute leukemia in patients with Waldenström macroglobulinemia treated with nucleoside analogs. *J Clin Oncol*. 2009 Jan 10;27(2):250-5. doi: 10.1200/JCO.2007.15.1530. Epub 2008 Dec 8. PMID: 19064987.

- 39) Meletios A, Dimopoulos, Constantinos Zervas, Athanasios Zomas, George Hamilos, Dimitra Gika, Eleni Efstathiou, Panayiotis Panayiotidis, Elina Vervessou, Nikolaos Anagnostopoulos, John Christakis, Extended Rituximab Therapy for Previously Untreated Patients with Waldenström's Macroglobulinemia, *Clinical Lymphoma*, Volume 3, Issue 3, 2002, Pages 163-166, ISSN 1526-9655, <https://doi.org/10.3816/CLM.2002.n.022>.
- 40) Vannata B, Piroso MC, Bertoni F, Rossi D, Zucca E. Bacterial infection-driven lymphomagenesis. *Curr Opin Oncol*. 2022;34(5):454-463. <https://doi.org/10.1097/cco.0000000000000886>
- 41) Varettoni, M., Boveri, E., Zibellini, S., Tedeschi, A., Candido, C., Ferretti, V. V., ... & Arcaini, L. (2019). Clinical and molecular characteristics of lymphoplasmacytic lymphoma not associated with an IgM monoclonal protein: A multicentric study of the Rete Ematologica Lombarda (REL) network. *American Journal of Hematology*, 94(11), 1193-1199.
- 42) McMaster M. Familial Waldenström's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 146–152.
- 43) Kriangkum J, Taylor BJ, Treon SP, et al. Molecular characterization of Waldenström's macroglobulinemia reveals frequent occurrence of two B-cell clones having distinct IgH VDJ sequences. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2005–2013.
- 44) Giordano TP, Henderson L, Landgren O, et al. Risk of non-hodgkin lymphoma and lymphoproliferative precursor diseases in US veterans with hepatitis C virus. *JAMA*. 2007;297(18):2010–2017.
- 45) Aoki H, Takishita M, Kosaka M, Saito S. Frequent somatic mutations in D and/or JH segments of ig gene in Waldenström's macroglobulinemia and chronic lymphocytic leukemia (CLL) with Richter's syndrome but not in common CLL. *Blood*. 1995;85(7):1913–1919.

- 46) Wagner SD, Martinelli V, Luzzatto L. Similar patterns of Vj gene usage but different degrees of somatic mutation in hairy cell leukemia, prolymphocytic leukemia, Waldenström's macroglobulinemia, and myeloma. *Blood*. 1994; 83(12):3647–3653.

- 47) Banwait R, Aljawai Y, Cappuccio J, et al. Extramedullary Waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol*. 2015;90 (2):100–104. doi:10.1002/ajh.23880

- 48) Castillo JJ, Treon SP. How we manage Bing-Neel syndrome. *Br J Haematol*. 2019;187(3):277–285. doi:10.1111/bjh.16167

- 49) Gertz MA. Acute hyperviscosity: syndromes and management. *Blood*. 2018;132(13):1379–1385. doi:10.1182/blood-2018-06- 846816

- 50) Crawford J, Cox EB, Cohen HJ. Evaluation of hyperviscosity in monoclonal gammopathies. *Am J Med*. 1985;79(1):13–22.

- 51) MacKenzie MR, Lee TK. Blood viscosity in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 1977;49(4):507–510.

- 52) Brouet JC, Clauvel JP, Danon F et al. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. *Am J Med* 1974; 57: 775–788.

- 53) Dellagi K, Dupouey P, Brouet JC et al. Waldenström's macroglobulinemia and peripheral neuropathy: a clinical and immunologic study of 25 patients. *Blood* 1983; 62: 280–285.

- 54) Ropper AH & Gorson KC. Neuropathies associated with paraproteinemia. *N Engl J Med* 1998; 338: 1601–1607.

- 55) Dimopoulos MA & Alexanian R. Waldenstro'm's Macroglobulinemia. *Blood* 1994; 83: 1452–1459.
- 56) Kyle RA & Garton JP. The spectrum of IgM monoclonal gammopathy in 430 cases. *Mayo Clin Proc* 1987; 62: 719–731.
- 57) Itzykson R, Le Garff-Tavernier M, Katsahian S, Diemert MC, Musset L, Leblond V. Serum-free light chain elevation is associated with a shorter time to treatment in Waldenstro'm's macroglobulinemia. *Haematologica*. 2008;93(5): 793–794
- 58) Martin-Jimenez P, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, et al. Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenstro'm's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*. 2007;92(5):635–642.
- 59) Chang H, Qi X, Xu W, Reader JC, Ning Y. Analysis of 6q deletion in Waldenstro'm macroglobulinemia. *Eur J Haematol*. 2007;79(3):244–247.
- 60) Terre' C, Nguyen-Khac F, Barin C, et al. Trisomy 4, a new chromosomal abnormality in Waldenstro'm's macroglobulinemia: a study of 39 cases. *Leukemia*. 2006;20(9):1634–1636.
- 61) Schop RF, Fonseca R. Genetics and cytogenetics of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003;30(2):142–145. doi:10.1053/sonc.2003.50075
- 62) Ocio EM, Hernandez JM, Mateo G, et al. Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenstrom's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2005;5 (4):241–245. doi:10.3816/CLM.2005.n.007
- 63) Chang H, Samiee S, Li D, et al. Analysis of IgH translocations, chromosome 13q14 and 17p13.1(p53) deletions by fluorescence in situ hybridization in

- Waldenstrom's macroglobulinemia: a single center study of 22 cases. *Leukemia*. 2004;18(6):1160–1162. doi:10.1038/sj.leu.2403369
- 64) Nguyen-Khac F, Lambert J, Chapiro E, et al. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica*. 2013;98 (4):649–654. doi:10.3324/haematol.2012.070458
- 65) Hunter ZR, Xu L, Yang G, et al. The genomic landscape of Waldenstrom macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood*. 2014;123 (11):1637–1646. doi:10.1182/blood-2013-09-525808
- 66) Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367 (9):826–833. doi:10.1056/NEJMoa1200710
- 67) Treon SP, Xu L, Hunter Z. MYD88 Mutations and Response to Ibrutinib in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2015;373(6):584–586. doi:10.1056/NEJMc1506192
- 68) Hunter ZR, Xu L, Tsakmaklis N, et al. Insights into the genomic landscape of MYD88 wild-type Waldenström macroglobulinemia. *Blood Adv*. 2018;2(21):2937–2946. doi:10.1182/bloodadvances.2018022962
- 69) Zucca E, Bertoni F. The spectrum of MALT lymphoma at different sites: biological and therapeutic relevance. *Blood*. 2016;127(17): 2082-2092. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-624304>
- 70) Schmidt J, Federmann B, Schindler N, et al. MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity. *Br J Haematol*. 2015;169(6):795–803. doi:10.1111/bjh.13361

- 71) Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(11):2927–2931. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2329
- 72) Kaiser LM, Hunter ZR, Treon SP, Buske C. CXCR4 in Waldenström's Macroglobulinemia: chances and challenges. *Leukemia.* 2021;35(2):333–345. doi:10.1038/s41375-020-01102-3
- 73) Treon SP, Xu L, Guerrero ML, et al. Genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia and its impact on treatment strategies. *J Clin Oncol.* 2020;38(11):1198–1208. doi:10.1200/JCO.19.02314
- 74) Hunter ZR, Yang G, Xu L, Liu X, Castillo JJ, Treon SP. Genomics, signaling, and treatment of Waldenström macroglobulinemia. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):994–1001. doi:10.1200/JCO.2016.71.0814
- 75) Zucca E, Bertoni F, Vannata B, Cavalli F. Emerging role of infectious etiologies in the pathogenesis of marginal zone B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(20):5207-5216. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-0496>.
- 76) Jiménez C, Prieto-Conde MI, García-Álvarez M, et al. Unraveling the heterogeneity of IgM monoclonal gammopathies: a gene mutational and gene expression study. *Ann Hematol.* 2018;97(3):475–484.
- 77) Lin P, Molina TJ, Cook JR, Swerdlow SH. Lymphoplasmacytic lymphoma and other non-marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(2):195–210. doi:10.1309/AJCP8FOIVTB6LBER
- 78) Morel P, Duhamel A, Gobbi P, et al. International prognostic scoring system for Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2009;113 (18):4163–4170. doi:10.1182/blood-2008-08-174961

- 79) Rossi D, Bertoni F, Zucca E. Marginal-zone lymphomas. *N Engl J Med*. 2022;386(6):568-581. <https://doi.org/10.1056/nejmra2102568>
- 80) Zinzani PL. The many faces of marginal zone lymphoma. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:426e32.
- 81) Isaacson P. Extranodal marginal zone lymphoma: MALT lymphoma. In: Harris N, Jaffe E, Vardiman J, Campo E, Arber D, editors. *Hematopathology*. 1st ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2011. p. 291e305.
- 82) Isaacson PCA, Nakamura S, et al. Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). In: Campo E, Swerdlow S, Harris N, et al., editors. *WHO classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon, France: IARC; 2008. p. 214e7.
- 83) Cerhan, J. R., & Habermann, T. M. (2021). Epidemiology of marginal zone lymphoma. *Annals of lymphoma*, 5.
- 84) Ikeda JI, Kohara M, Tsuruta Y et al (2017) Immunohistochemical analysis of the novel marginal zone B-cell marker IRTA1 in malignant lymphoma. *Human Pathology* 59:70–79. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.09.011>
- 85). Falini B, Agostinelli C, Bigerna B et al (2012) IRTA1 is selectively expressed in nodal and extranodal marginal zone lymphomas. *Histopathology* 61:930–941
- 86) Aliko Xochelli, David Oscier, Kostas Stamatopoulos, Clonal B-cell lymphocytosis of marginal zone origin, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, Volume 30, Issues 1–2, 2017, Pages 77-83, ISSN 1521-6926, <https://doi.org/10.1016/j.beha.2016.08.028>.

- 87) Metcalf RA, Monabati A, Vyas M et al (2014) Myeloid cell nuclear differentiation antigen is expressed in a subset of marginal zone lymphomas and is useful in the differential diagnosis with follicular lymphoma. *Hum Pathol* 45:1730–1736. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.04.004>
- 88) Kanellis G, Roncador G, Arribas A et al (2009) Identification of MNDA as a new marker for nodal marginal zone lymphoma. *Leukemia* 23:1847–1857. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.108>
- 89) Naresh KN (2008) Nodal marginal zone B-cell lymphoma with prominent follicular colonization - difficulties in diagnosis: a study of 15 cases. *Histopathology* 52:331–339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02951.x>
- 90) Nann D, Ramis-Zaldivar JE, Müller I et al (2020) Follicular lymphoma t(14;18)-negative is genetically a heterogeneous disease. *Blood Adv* 4:5652–5665. <https://doi.org/10.1182/BLOOD ADVANCES.2020002944>
- 91) Mollejo M, Rodríguez-Pinilla MS, Montes-Moreno S, Algara P, Dogan A, Cigudosa JC, Juarez R, Flores T, Forteza J, Arribas A, Piris MA. Splenic follicular lymphoma: clinicopathologic characteristics of a series of 32 cases. *Am J Surg Pathol*. 2009 May;33(5):730-8. doi: 10.1097/PAS.0b013e318193fcef. PMID: 19194277.
- 92) Cook JR. Splenic B-Cell Lymphomas/Leukemias. *Surg Pathol Clin*. 2010 Dec;3(4):933-54. doi: 10.1016/j.path.2010.09.004. Epub 2010 Nov 27. PMID: 26839295.
- 93) Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A, Felman P, Franco V, Iannitto E, Mollejo M, Papadaki T, Remstein ED, Salar A, Solé F, Stamatopoulos K, Thieblemont C, Traverse-Glehen A, Wotherspoon A, Coiffier B, Piris MA. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*. 2008 Mar;22(3):487-95. doi: 10.1038/sj.leu.2405068. Epub 2007 Dec 20. PMID: 18094718.