

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO DE FIN DE GRADO EN MEDICINA**



**Caracterización inmunofenotípica y molecular de la
leucemia mielomonocítica crónica. Implicaciones en la
práctica clínica, diagnóstico diferencial y estratificación de
la enfermedad.**

AUTOR: ESCUDERO SOLER, MARÍA TERESA

TUTOR: FERNÁNDEZ ABELLÁN, PASCUAL

COTUTOR: TARÍN RODRIGO, FABIÁN

Departamento de Medicina Clínica. Área de Hematología.

Curso 2022-2023

Convocatoria de junio 2023

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	3
Palabras clave.....	4
<i>ABSTRACT</i>	5
Key words	6
<i>INTRODUCCIÓN</i>	7
Definición y formas clínicas	7
Datos epidemiológicos	7
Manifestaciones clínicas	8
Diagnóstico	8
Pronóstico y tratamiento.....	12
<i>HIPÓTESIS</i>	12
<i>OBJETIVOS</i>	12
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	13
Diseño	13
Pacientes y muestras.....	13
Técnicas	15
Metodología estadística	17
<i>RESULTADOS</i>	17
Análisis inmunofenotípico en sangre periférica	17
Análisis por NGS en sangre periférica de controles y monocitosis.....	20
Recuento de blastos en médula ósea.....	21
Análisis por NGS en médula ósea de pacientes con LMMC, SMD y LA	22
Análisis de mutaciones detectadas en los diferentes subtipos de LMMC	24
<i>DISCUSIÓN</i>	26
<i>CONCLUSIONES</i>	29
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	30

RESUMEN

Los avances recientes en diferentes técnicas de diagnóstico avanzado están permitiendo profundizar en el conocimiento de la biología de las diferentes neoplasias hematológicas y trasladar los conocimientos adquiridos a la práctica clínica. Con el objetivo de investigar la utilidad de la citometría de flujo (CMF) y la secuenciación masiva de última generación (NGS) en la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) hemos diseñado un estudio retrospectivo analizando muestras de controles sanos, monocitosis persistentes, pacientes con LMMC y de diferentes neoplasias hematológicas por ambas técnicas. Nuestros resultados muestran que los monocitos de pacientes con LMMC poseen una firma fenotípica prácticamente propia (partición anormal de sus poblaciones maduras) muy diferente a los controles sanos y al resto de patologías estudiadas. Además, aunque no existen mutaciones específicas, describimos un perfil mutacional muy característico de la LMMC dominado por mutaciones múltiples en genes relacionados con la epigenética y el splicing. Ambas características (partición anormal y paisaje mutacional) se relacionan estrechamente y están presentes en un porcentaje significativo de pacientes con monocitosis crónicas persistentes, postulándose que estos últimos podrían corresponder a formas iniciales de LMMC. Además, los hallazgos descritos pueden ser de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de la LMMC respecto otras neoplasias hematológicas con posible participación monocítica. La citometría permite cuantificar de forma objetiva y reproducible las poblaciones inmaduras en médula ósea estratificando mejor a los pacientes en relación al grupo de riesgo molecular que el sistema de estadiaje tradicional basado en el conteo de blastos por técnicas morfológicas. Por último, aunque se demuestra que la CMF y la NGS resultan de gran utilidad en el cribaje, diagnóstico diferencial y en la estratificación de la LMMC, se discute la necesidad de un uso protocolizado de las mismas para su aplicación racional e implementación en la rutina clínica.

Palabras clave

Leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica aguda, síndromes mielodisplásicos, secuenciación molecular masiva, citometría de flujo, diagnóstico, estratificación, pronóstico, marcadores moleculares, monocitosis.



ABSTRACT

Recent advances in different advanced diagnostic techniques are allowing to deepen the knowledge of the biology of the different hematological malignancies and to transfer the knowledge acquired to clinical practice. In order to investigate the usefulness of flow cytometry (FCM) and next-generation massive sequencing (NGS) in chronic myelomonocytic leukemia (CMML), we have designed a retrospective study analyzing controlled healthy samples, persistent monocytosis, patients with CMML and different hematological malignancies by both techniques. Our results show that the monocytes of patients with CMML have a phenotypic signature practically on their own (abnormal partition of their mature populations), very different from the controlled healthy samples and other pathologies studied. In addition, although there are no specific mutations, we describe a characterized mutational profile of CMML dominated by multiple mutations in genes related to epigenetics and splicing. Both characteristics (abnormal partition and mutational landscape) are closely related and are present in a significant percentage of patients with persistent chronic monocytosis, postulating that the latter could correspond to initial forms of CMML. Furthermore, the findings described may be beneficial in the differential diagnosis of CMML with respect to other hematologic malignancies with possible monocytic involvement. Flow cytometry allows to quantify in an objective and reproducible way the immature populations in bone marrow, stratifying patients better in relation to the molecular risk group than the traditional staging system based on blast counting by morphological techniques. Finally, although it is demonstrated that FCM and NGS are beneficial in screening, differential diagnosis and stratification of CMML, the need for protocolized use of them for their rational application and implementation in clinical routine is debatable.

Key words

Chronic myelomonocytic leukemia, acute myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes, massive molecular sequencing, flow cytometry, diagnosis, staging, prognosis, molecular markers, monocytosis.



INTRODUCCIÓN

Definición y formas clínicas

Las leucemias monocíticas constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas caracterizadas por la participación de monocitos maduros o sus precursores en la clona leucémica e incluyen las variantes de leucemia aguda mielomonocítica y monoblástica (subtipos M4 y M4 respectivamente) así como la Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC).¹ La LMMC es una patología poco frecuente, reconocida inicialmente como una variante de síndrome mielodisplásico (SMD) a principios de los años 80 por la clasificación French-American British (FAB).² Se trata de una neoplasia clonal hematológica maligna que se caracteriza por monocitosis mantenida, signos de mielodisplasia en sangre periférica y médula ósea y un curso clínico variable, pero generalmente desfavorable con tendencia a desarrollar una fase final de citopenias críticas, infiltración monocítica de diferentes tejidos y aumento de células blásticas hasta la agudización.^{1,3} En 1994, en función del recuento el grupo FAB distinguió dos subtipos de LMMC subtipo mielodisplásico (LMMC-MD) con una cifra de leucocitos baja ($<13.000/\text{mcrl}$) y el subtipo proliferativo (LMMC-MP) en el que predominaba la leucocitosis $\geq 13.000/\text{mcrl}$. Actualmente ambas formas se siguen considerando variantes de la misma entidad y se incluyen en la categoría de Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas de la Clasificación de neoplasias mieloides de la OMS.¹

Datos epidemiológicos

La incidencia de la LMMC es aproximadamente de 1 a 2 casos por 100 000 habitantes por año presentándose con mayor frecuencia en adultos mayores con una mediana de edad de 73-75 años y predominando ligeramente en el sexo masculino (ratio de 1,5).⁴ Existe una forma juvenil en niños de 0 a 14 años extremadamente rara (incidencia 0.13/100.000 en este grupo de edad) de curso generalmente desfavorable.⁴ La incidencia de la LMMC puede estar infraestimada probablemente por la heterogeneidad e inespecificidad en su presentación, dificultades

diagnósticas y a la no posible confirmación de algunos casos de sospecha en pacientes mayores y frágiles.⁵

Manifestaciones clínicas

La presentación de esta enfermedad es variable y puede asociar diferentes manifestaciones. Es destacable que casi un 20% de los pacientes se encuentran asintomáticos y son detectados como monocitosis aislada sin o con citopenias discretas en analíticas rutinarias. En las formas sintomáticas, la LMMC-MD presenta sintomatología derivada de las citopenias (astenia, infecciones y hemorragias) mientras que en la LMMC-MP la sintomatología es similar a las neoplasias mieloproliferativas (anorexia, fiebre, sudoración nocturna, hepatoesplenomegalia, infiltrados cutáneos, insuficiencia renal, y en raras ocasiones leucostasis o infiltración de diferentes tejidos y de sistema nervioso central). Además, la LMMC asocia con frecuencia diferentes fenómenos de autoinmunidad, así como un riesgo aumentado de desarrollar diferentes neoplasias que pueden aparecer de forma sincrónica o a lo largo de la evolución de la enfermedad.⁶

Diagnóstico

El signo diagnóstico guía más frecuente de la LMMC es presencia de monocitosis con o sin otras alteraciones en el hemograma (anemia normocítica o macrocítica leve, neutropenia o trombocitopenia moderada). En estos casos es imprescindible realizar un estudio morfológico en sangre periférica y una valoración clínica adecuada incluyendo un extenso diagnóstico diferencial (*Tabla 1*).

Tabla 1. Diagnóstico diferencial de la LMMC

CAUSAS DE MONOCITOSIS	
REACTIVAS	
Procesos hematológicos primarios	Neutropenia cíclica, agranulocitosis congénita, fase de recuperación de neutropenia
Infecciones crónicas	Tuberculosis, endocarditis bacteriana subaguda, infecciones fúngicas, brucelosis, Kala-azar, tripanosomiasis
Infecciones víricas	Citomegalovirus, virus varicela-zóster
Enfermedades autoinmunes	Artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, poliarteritis, colitis ulcerosa, sarcoidosis
Inducidas por medicamentos	Corticoesteroides, factor de crecimiento mieloide
Neoplasias de órgano sólido	Ovario, estómago
Otras	Ejercicio físico, estrés, embarazo, esplenectomía, IAM
CLONALES	
Neoplasias hematológicas malignas	Leucemia mielomonocítica aguda, Síndromes mielodisplásicos, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin

Cuando se requiere, es necesario confirmar el diagnóstico de la LMMC mediante el estudio de médula ósea donde generalmente se observan diferentes grados de displasia que puede afectar a las tres series, hiperplasia granulocítica, monocitos anormales y un aumento de blastos de estirpe mielomonocítica, cuyo recuento es necesario para el estadiaje de la enfermedad ($\geq 5\%$ LMMC-1 y entre el 5-19% LMMC-2 incluyendo mieloblastos, monoblastos y promonocitos). Las alteraciones citogenéticas pueden detectarse en un tercio de los pacientes mediante cariotipo convencional o hibridación “in situ” fluorescente (con frecuencia trisomía 8, anomalías en el cromosoma 7 y delección Y) aunque poseen escaso valor en el diagnóstico diferencial de la enfermedad.⁷ Por último, los avances en la secuenciación molecular masiva (NGS) han permitido identificar diferentes mutaciones patogénicas en genes relacionados con la epigenética, splicing o vías de señalización en la práctica totalidad de los enfermos.⁷ Para establecer criterios comunes de diagnóstico de las diferentes neoplasias hematológicas se han

desarrollado diferentes clasificaciones consenso al amparo de la Organización Mundial de la Salud que contemplan la LMMC y que ha introducido cambios significativos en su revisión más reciente (2022) respecto a la previa (2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de la clasificación WHO 2016 y 2022

WHO 2016	WHO 2022
PRE-REQUISITO	
<p>Monocitosis persistente absoluta ($\geq 1 \times 10^9$ /L) y relativa ($\geq 10\%$ de los leucocitos de sangre periférica).</p>	<p>Monocitosis persistente absoluta ($\geq 0.5 \times 10^9$ / L) y relativa ($\geq 10\%$ de los leucocitos de sangre periférica).</p>
	<p>Si $< 1 \times 10^9$/L:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Detección de una o más anomalías citogenéticas clonales o alteraciones moleculares. <li style="text-align: center;">+ - Displasia en al menos una línea hematológica.
	<p>Si $> 1 \times 10^9$/L:</p> <p><u>Dos o más de los siguientes:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Detección de una o más anomalías citogenéticas clonales o alteraciones moleculares. - Displasia en al menos una línea hematológica. - Partición anormal de monocitos.
TIPOS (SEGÚN RECUENTO DE LEUCOCITOS)	
<p>Tipo proliferativo: $\geq 13 \times 10^9$/L leucocitos</p> <p>Tipo displásico: $< 13 \times 10^9$/L leucocitos</p> <p>Estas diferencias se han visto relacionadas con aberrancias en las vías de señalización RAS/MAPK</p>	<p>LMMC mielodisplásica (LMMC-MD): leucocitos $< 13 \times 10^9$/L</p> <p>LMMC mieloproliferativa (LMMC-MP): leucocitos $\geq 13 \times 10^9$/L.</p>

TIPOS (SEGÚN PORCENTAJE DE BLASTOS)	
LMMC-0: <2% blastos en SP y <5% en MO	LMMC-1: 2-4% blastos en SP y 5-9% en MO
LMMC-1: 2-4% blastos en SP y 5-9% en MO	LMMC-2: 5%-19% blastos en SP y 10-19% en MO, y/o cuando hay presencia de bastones de Auer.
LMMC-2: 5%-9% blastos en SP y 10-19% en MO, y/o cuando hay presencia de bastones de Auer.	
SE DEBEN EXCLUIR	
Reordenamientos BCR-ABL1, PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 o PCM1-JAK2	

Aunque la actualización de los criterios diagnósticos descritos supone un indudable avance a nivel de consenso diagnóstico implica varias dificultades y desafíos prácticos. Destacaríamos los siguientes:

- Aumento de la necesidad de cribaje de pacientes con monocitosis, por reducción del requisito de estudio necesario a la cifra de 500 monocitos/ μ L.
- La introducción del valor de la citometría de flujo (CMF) como técnica diagnóstica para identificar la partición monocítica (normal vrs anormal) como criterio diagnóstico de apoyo.
- La posible identificación de monocitosis clonales de significado incierto que cumplan criterios de partición anormal, pero no satisfagan los criterios de LMMC, con la incertidumbre diagnóstica y evolutiva que ello conlleva.⁸

Además, es notable la necesidad de desarrollar tecnología compleja para realizar un diagnóstico correcto, con el incremento notable de coste económico que ello conlleva. Abordar estos aspectos es clave para el enfoque clínico de la enfermedad, pero requiere un notable esfuerzo

de actualización y organización de las unidades diagnósticas que deben contemplar un uso racional de sus recursos.

Pronóstico y tratamiento

El pronóstico de la LMMC es en general desfavorable debido al curso progresivo de la enfermedad, las limitaciones derivadas de la edad y comorbilidades que sufren la mayoría de los pacientes, y fatal por las complicaciones de las citopenias y del aumento de leucocitos. La supervivencia mediana es de 10-70 meses con transformación a leucemia mieloide aguda del 20-40% a los 5 años.⁷ Existen distintos índices pronósticos destacando el índice pronóstico internacional basado en los hallazgos citogenéticos y moleculares (CPSS-mol) que contempla cuatro grupos de riesgo (bajo, intermedio-1, intermedio-2 y alto).⁹ Si el paciente presenta un curso asintomático, sólo se procede a la observación y seguimiento de la enfermedad. La mayoría de pacientes son subsidiarios a terapia hipometilante con 5-azacitidina o citorreductora con hidroxiurea, obteniendo un beneficio clínico limitado.¹⁰ En pacientes seleccionados el único tratamiento potencialmente curativo es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) que permite una supervivencia libre de enfermedad a largo plazo del 20-40%.¹¹

HIPÓTESIS

La aplicación de citometría de flujo y NGS permite realizar un cribaje eficaz de las monocitosis y es de utilidad en el diagnóstico diferencial y estratificación pronóstica de la LMMC.

OBJETIVOS

- Validar una estrategia de CMF que permita diferenciar las monocitosis reactivas de las formas neoplásicas.

- Desarrollar una estrategia de diagnóstico diferencial entre la LMMC y otras neoplasias hematológicas con participación monocítica.
- Describir las características fenotípicas y mutacionales de la LMMC identificando las posibles diferencias entre las diferentes etapas evolutivas de la enfermedad.
- Discutir una estrategia racional de aplicación de las técnicas indicadas en las unidades diagnósticas de referencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Estudio observacional retrospectivo de cohortes realizado en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital General Universitario Dr. Balmis de Alicante, participando la Sección de Hematología Clínica y la Unidad de citometría, citogenética y biología molecular del propio Servicio, de referencia provincial en el diagnóstico avanzado de las neoplasias hematológicas.

Pacientes y muestras

El estudio se realizó en muestras de sangre periférica de controles sanos y pacientes con monocitosis, así como de sangre periférica y aspirados de médula ósea obtenidos de pacientes con LMMC, SMD y leucemia mieloide aguda (LAM) en la provincia de Alicante desde enero del 2019. Los controles sanos fueron seleccionados entre pacientes mayores o igual a 60 años de preoperatorios de cirugía común confirmando la normalidad de sus parámetros hematológicos. Dentro de los SMD se seleccionaron solamente los subtipos que pueden plantear mayores dificultades en el diagnóstico diferencial con la LMMC (citopenia refractaria con displasia multilínea con o sin exceso de blastos). De forma similar, los casos de las LAM

seleccionadas fueron las variantes con participación monocítica (M4 y M5). Las características generales de los pacientes y controles se especifican en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Pacientes y muestras

MOTIVO	N	MUESTRA	M/F	EDAD (MEDIANA, RANGO)
C Sanos	20	SP	11/9	71 (60-92)
Monocitosis	22	SP	12/10	70 (47-81)
<1000/ μ L	12		7/5	67 (47-81)
>1000/ μ L	10		5/5	70 (61-81)
LMMC	42	SP/MO	13/19	77 (66-91)
Displásica *	24		14/10	78 (70-91)
Proliferativa *	18		9/9	74 (66-85)
LMMC-1**	28		16/12	76 (66-91)
LMMC-2**	14		7/7	76 (70-85)
SMD***	21	SP/MO	12/9	75 (59-89)
LAM M4/M5 ****	16	SP/MO	7/9	69 (41-81)
* Según criterios de la clasificación WHO/OMS ** clasificadas por conteo morfológico *** subtipos citopenia refractaria con displasia multilínea con/sin exceso de blastos **** variantes de LAM con participación monocitaria				

En la totalidad de controles sanos y monocitosis se requirió el consentimiento informado. En pacientes con patología diagnosticada con anterioridad a 2022 se aceptó la exención del consentimiento informado.

Búsqueda bibliográfica

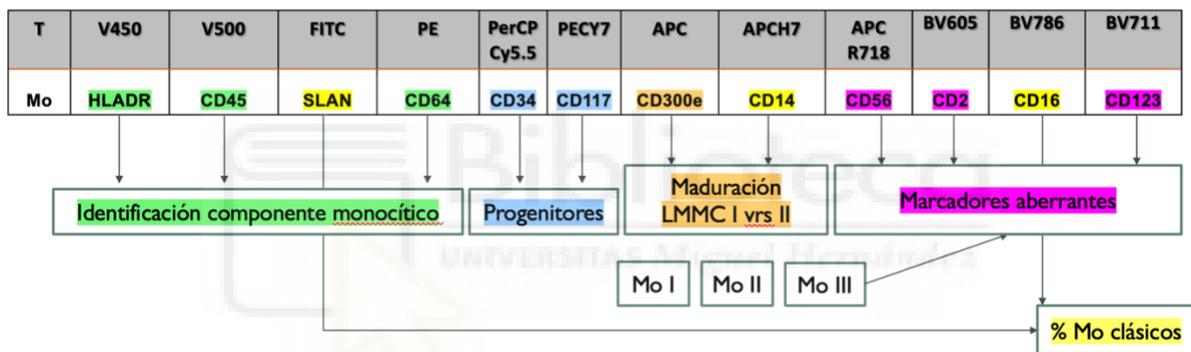
Se realizó una búsqueda en Uptodate y PubMed utilizando descriptores como “Leukemia, Myelomonocytic, Chronic”, “Leukemia, Myelomonocytic, Acute”, “Myelodysplastic Syndromes”, “Flow Cytometry”, “High-Throughput Nucleotide Sequencing”, “Phenotype”, “Mutation”, “Diagnosis Diferencial”, “Prognosis”, “Autoimmune Diseases”.

Técnicas

Citometría de flujo

La citometría de flujo permitió llevar a cabo la caracterización inmunofenotípica de los pacientes mediante un tubo único de 12 colores (HLADR, CD45, SLAN, CD64, CD34, CD117, CD300e, CD14, CD56, CD2, CD16, CD123) en sangre periférica (SP) y en médula ósea (MO) para identificar y cuantificar distintos antígenos de los monocitos de cada paciente y en función de estos diseccionar el componente monocítico tanto en SP como en MO (Figura 1).

Figura 1. Panel de citometría de flujo



La técnica empleada nos debe suministrar la siguiente información:

- Identificación y recuento de los diferentes estadios de la maduración monocitaria; monoblastos (CD64+ HLADR+ CD14- CD300e-), promonocitos (CD64+ HLADR+ CD14+ CD300e-) y monocitos maduros (CD64+ HLADR+ CD14+ CD300e+).¹²
- Subpoblaciones de monocitos maduros: se clasifican en función de la expresión de los antígenos CD14, CD16 y SLAN: Subpoblación MO-1 (monocitos clásicos) que expresan el inmunofenotipo CD14+, CD16-, SLAN-; subpoblación MO-2 (monocitos intermedios) de inmunofenotipo CD14+, CD16+, SLAN-; y subpoblación MO-3

(monocitos no clásicos) que expresan CD14 (débil) y son CD16+, SLAN+^{13,14}. Estas poblaciones definen el concepto de *partición monocitaria* que se considera anormal cuando la proporción de MO-1 es igual o superior al 94% y/o la proporción de MO-3 es igual o inferior al 1.7% de los monocitos maduros.¹⁵

- Identificación de monocitos aberrantes, con anomalías en la expresión de los antígenos CD2, CD56 o CD123. La expresión en una proporción igual o superior del 20% de cualquiera de estos antígenos se considera un fenotipo aberrante.^{13,14}

NGS

Se utilizó el panel de neoplasias mieloides humanas de ADN dirigido Qiaseq DHS-003Z (Qjagen) que permite estudiar los genes mutados en diferentes neoplasias mieloides incluidos los recomendados por el Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (ASXL1, ASXL2, CBL, DNMT1, DNMT3A, EZH2, FLT3, HRAS, JAK1, JAK2, JAK3, KRAS, NF1, NRAS, PDGFRA, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SH2B3, SH2D1A, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, U2AF2, ZRSR2).⁷ Las mutaciones encontradas se clasificaron en los tres grupos que recomienda la guía ASCO¹⁶, es decir, nivel I (mutaciones patogénicas que proveen de información diagnóstica o pronóstica en la patología), nivel II (mutaciones probablemente patogénicas por su comportamiento en otras patologías) y nivel III (mutaciones de significado incierto).

La secuenciación se realizó mediante un secuenciador Nextseq 500 (illumina). La interpretación de resultados se realizó con la plataforma bioinformática QIAseq (Qiagen). Para el análisis e interpretación de los datos obtenidos por la NGS se emplearon dos softwares: CLC Genomics Workbench y QCI Interpret (Qiagen).

Metodología estadística

Los distintos tests estadísticos utilizados en el presente estudio se realizaron a partir del paquete estadístico SPSS versión 13.0. Dado el limitado número de pacientes y controles la estadística descriptiva fue habitualmente referida en medianas y rangos. Para comprobar si existe una asociación estadística significativa entre grupos se realizaron las respectivas tablas de contingencia utilizando el test χ^2 con la corrección de Yates. En todos los casos se consideramos el nivel de significación en $p \leq 0.05\%$.

Aspectos éticos

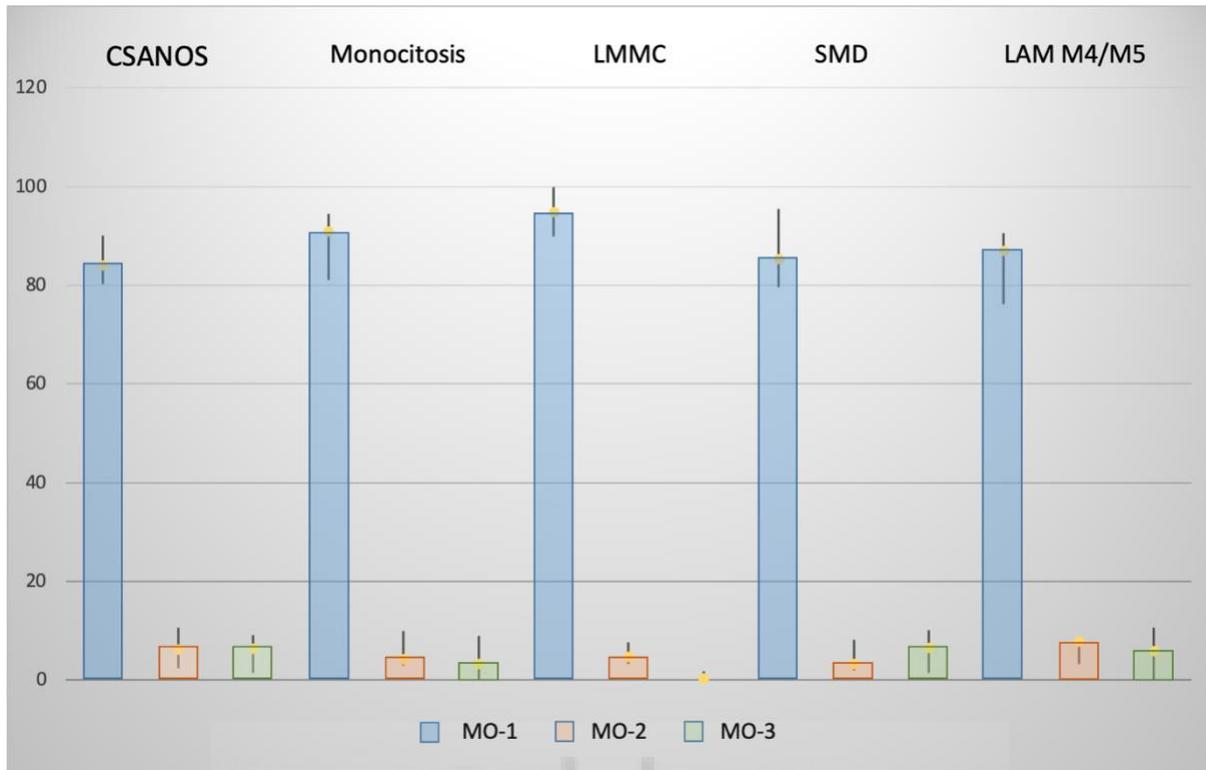
El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las normas de Buena Práctica Clínica y con la Declaración de Helsinki. También fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética para la investigación de medicamentos (CEIm) del Hospital General universitario Dr Balmis de Alicante y por el Código de Investigación Responsable (COIR) TFG.GME.PFA.MTES.230308.

RESULTADOS

Análisis inmunofenotípico en sangre periférica

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis la partición de monocitos mediante citometría de flujo. Los resultados de la distribución de las subpoblaciones MO-1, MO-2 y MO-3 en los diferentes grupos estudiados fueron los siguientes (*Figura 2*):

Figura 2. Partición de monocitos en sangre periférica.



Se observan que los pacientes con LMMC presentan una disminución marcada y en muchos casos casi la desaparición de la subpoblación MO-3 (CD14débil, CD16+, SLAN+) respecto a los controles sanos, pacientes con LAM y SMD. Los pacientes con monocitosis presentan valores intermedios con una importante variación en las cifras extremas incluyendo casos con distribución similar a los controles y otros con reducción de la subpoblación MO-3 similar a la LMMC.

Considerando los puntos de corte que definen la partición anormal recomendados en la literatura ($\geq 94,3\%$ de monocitos clásicos o $\leq 1,7\%$ de monocitos no clásicos)¹⁵, así como la presencia o ausencia de marcadores aberrantes en los mismos (CD2+, CD56+ o CD123+) se compararon los distintos grupos de pacientes. Los resultados se describen en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Análisis inmunofenotípico en sangre periférica

	n	Partición		CD2, CD56 o CD123	
		Normal	Anormal	<20%	≥20%
C Sanos	20	1 (5%)	19 (95%)	20 (100%)	0 (0%)
Monocitosis	22	10 (45,5%)	12 (54,5%)	18 (81,8%)	4 (18,2%)
<1000/μL	12	7 (58,3%)	5 (41,7%)	11 (91,7%)	1 (8,3%)
>1000/μL	10	3 (30%)	7 (70%)	7 (70%)	3 (30%)
LMMC	42	2 (4,8%)	40 (95,2%)	26 (61,9%)	16 (38,1%)
Displásica	24	2 (8,3%)	22 (91,7%)	15 (62,5%)	9 (37,5%)
Proliferativa	18	0 (0%)	18 (100%)	11 (61,1%)	7 (38,9%)
LMMC-1	28	1 (3,6%)	27 (96,4%)	18 (64,3%)	10 (35,7%)
LMMC-2	14	1 (7,1%)	13 (92,9%)	8 (57,1%)	6 (42,9%)
SMD	21	20 (95,2%)	1 (4,8%)	12 (57,1%)	9 (42,9%)
LAM M4/M5	16	14 (87,5%)	2 (12,5%)	5 (31,3%)	11 (68,7%)

PA: partición anómala; **AB:** presencia de marcadores aberrantes CD2, CD56 o CD123 ≥20% de los monocitos

Estos resultados confirman que los controles sanos presentan una partición normal y ausencia de fenotipos aberrantes de forma prácticamente generalizada. Algo más de la mitad de pacientes con monocitosis presentaron asimismo una partición anormal y algunos de ellos marcadores aberrantes. La LMMC muestra de una forma casi constante partición anormal asociada con frecuencia a monocitos aberrantes. Por el contrario, los pacientes con SMD y LA muestran en general una partición normal de monocitos asociada con frecuencia a marcadores aberrantes. El fenómeno de la partición anormal es la única alteración significativa que se da con mayor frecuencia en LMMC respecto al resto de los grupos, comparando con los controles

sanos ($X^2 = 42,9 p < 0.001$), SMD ($X^2 = 50,4 p < 0.001$) y LAM ($X^2 = 27,5 p < 0.001$) respectivamente.

Análisis por NGS en sangre periférica de controles y monocitosis

El análisis por NGS en sangre periférica fue realizado en los controles sanos y monocitosis aisladas clasificando las mismas según los criterios de partición referidos obtenidos por citometría. Dichos resultados se exponen en la *Tabla 5*:

Tabla 5. Estudio por NGS en sangre periférica de controles y monocitosis aislada.

	n	NGS+	TET2	ASXL1	SRSF2	ZRSR2	DNMT3A	OTRAS
Controles sanos	20	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)
Monocitosis aislada	22	13 (59,1%)	7 (31,8%)	4 (18,2%)	5 (22,7%)	3 (13,6%)	2 (9,1%)	8 (36,6%)
<1000/ μ L PN	7	1 (14,3%)	1 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)
<1000/ μ L PA	5	4 (80%)	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)	0 (0%)	2 (40%)
\geq 1000/ μ L PN	3	1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)
\geq 1000/ μ L PA	7	7 (100%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)	3 (42,9%)	2 (28,6%)	1 (14,3%)	4 (57,1%)

Se observa que la presencia de mutaciones es casi constante en pacientes con monocitosis y partición anormal e infrecuente en pacientes con monocitosis y partición normal independientemente del recuento de monocitos (superior o inferior a 1000/ μ L). Las diferencias entre estos dos grupos son claramente significativas ($X^2 = 20,5 p < 0.001$). Los genes mutados con más frecuencia fueron TET2, ASXL1, SRSF2, ZRSR2. Las mutaciones en TET2 fueron con frecuencia múltiples (≥ 1 mutación en 3 pacientes). En ASXL1 las mutaciones se localizaron en el exón 1. Todos los casos de SRSF2 presentaron una mutación en el exón 13. Las mutaciones en ZRSR2 se localizaron en el exón 11.

Recuento de blastos en médula ósea

Se llevó a cabo el recuento mediante análisis inmunofenotípico de muestras de médula ósea para establecer el diagnóstico diferencial entre LMMC-1, LMMC-2 y LAM. Los resultados de los diferentes grupos estudiados fueron los siguientes (*Tabla 6*):

Tabla 6. Recuento de monoblastos en médula ósea

	N	% blastos en MO*		
		<5%	5-19%	≥20%
LMMC	42	22 (52,4%)	20 (47,6%)	0 (0%)
LMMC displásica	24	15 (62,5%)	9 (37,5%)	0 (0%)
LMMC proliferativa	18	7 (38,9%)	11 (61,1%)	0 (0%)
LMMC-1**	28	20 (71,4%)	8 (28,6%)	0 (0%)
LMMC-2**	14	2 (14,3%)	12 (85,7%)	0 (0%)
SMD	21	13 (61,9%)	7 (33,3%)	1 (4,8%)
CRDM***	14	13 (92,9%)	1 (7,1%)	0 (0%)
CRDM/EB****	7	0 (0%)	6 (85,7%)	1 (14,3%)
LAM M4/M5	16	0 (0%)	2 (12,5%)	14 (87,5%)

* Determinados por citometría de flujo, se consideran el total de células mieloides CD34+ CD117+, los monoblastos CD64+ HLADR+ CD14- CD300e- y los promonocitos CD64+ HLADR+ CD14+ CD300e-
 ** clasificadas por conteo morfológico
 *** subtipos citopenia refractaria con displasia multilínea sin exceso de blastos (***) y con exceso de blastos (****)

De la forma prevista, la presencia de un aumento de blastos (>5%) es un fenómeno frecuente en CRDM/EB y LAM. Sin embargo, es llamativo que un porcentaje significativo de los pacientes clasificados como LMMC-1 por conteo morfológico presentan exceso de blastos cuando son analizados por citometría de flujo.

Análisis por NGS en médula ósea de pacientes con LMMC, SMD y LA

El estudio comparativo de frecuencias de las mutaciones encontradas evidencia que la LMMC no presenta mutaciones específicas. Sin embargo, sí que se evidencia que la mayoría de los pacientes presentan un perfil mutacional característico, con alta frecuencia de mutaciones en los genes TET2 (con frecuencia múltiples), SRSF2, ASXL1 y ZRSR2, y con menor frecuencia de las mutaciones en U2AF1 que los SMD (Tabla 7).

Tabla 7. Mutaciones en médula ósea de pacientes con LMMC, SMD y LA.

	LMMC	SMD	LA	χ^2 (p)
NGS+	100	94,7	100	ns
TET2	81,0	42,8	31,2	15,2 (p<0.01)
TET2m	66,7	33,3	18,7	12,7 (p<0.01)
SRSF2	57,1	23,8	6,2	14,7 (p<0,0°)
ASXL1	50	33,3	12,5	7,02 (p=0.03)
ZRSR2	31	9,5	6,2	6,16 (p=0,04)
KRAS	26,2	19,0	12,5	ns
RUNX1	23,8	28,5	18,7	ns
NRAS	16,7	23,8	6,2	ns
SH2B3	16,7	4,7	0	ns
DNMT3A	11,9	23,8	18,8	ns
JAK2	9,5	0	0	ns
SETBP1	9,5	28,5	0	ns
P53	7,1	19,04	12,5	ns
U2AF1	7,1	33,3	6,2	9,7 (p=0,01)
FLT3	4,8	4,7	12,1	ns
IDH2	4,8	4,7	18,7	ns
NPM1	0	0	25	NA
CEBPA	0	4,7	18,7	NA

Otros hallazgos característicos de la LMMC fueron la presencia de mutaciones múltiples en TET2 (2-5 mutaciones por paciente) que pueden localizarse en diferentes posiciones (fundamentalmente los exones 3,5,8,9,11) fundamentalmente en variantes de nucleótido único y deleciones pequeñas. En ASXL1 las mutaciones se localizaron en el exón 1, siendo la más

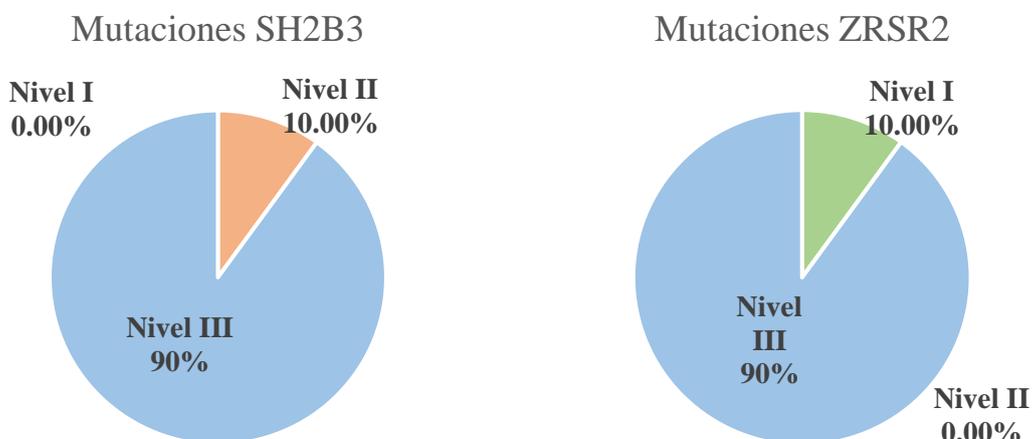
frecuente (80% de los pacientes) una mutación puntual en el nucleótido 1934 (1934dupG). Todos los casos de SRSF2 presentaron una mutación en el exón 13 consistente en la sustitución de la citosina situada en la posición 284 (C>T, C>A, C>G). Las mutaciones en ZRSR2 se localizaron en el exón 11 y en la mayoría de los casos consistieron en una sustitución en el nucleótido 1403 (G>A).

Otras mutaciones frecuentes fueron las implicaban a los genes KRAS (exones 2 y 4) y NRAS (exones 2 y 3) así como en RUNX1. Dichas mutaciones se presentaron con una frecuencia similar en el resto de las patologías estudiadas.

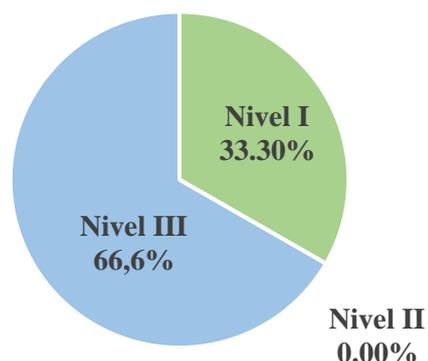
Análisis por niveles de patogenicidad de mutaciones detectadas en LMMC

Atendiendo a la distribución de mutaciones según niveles de patogenicidad, destaca la frecuencia de mutaciones de significado incierto observada en la mayoría de los genes anteriormente descritos, especialmente en SH2B3, ZRSR2 y en menor medida TET2 y DNMT3A. Estos resultados se detallan en la *Figura 3*.

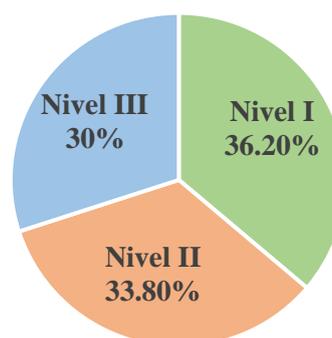
Figura 3. Niveles de patogenicidad de mutaciones en LMMC.



Mutaciones DNMT3A



Mutaciones TET2



Análisis de mutaciones detectadas en los diferentes subtipos de LMMC

Al comparar las alteraciones moleculares en los subtipos displásico y proliferativo de LMMC no hemos hallado diferencias significativas en el perfil mutacional de ambas variantes. Asimismo, la LMMC clasificada según la presencia o ausencia de marcadores aberrantes CD56, CD2 o CD123 tampoco se relacionó con la frecuencia de las diferentes mutaciones investigadas. Los resultados se muestran en la *Tabla 8*:

Tabla 8. Mutaciones en diferentes subtipos de LMMC.

	Variante LMMC		Expresión CD2, CD56 o CD123	
	Displásica (n= 24)	Proliferativa (n= 18)	<20% (n=22)	≥20% (n=20)
TET2	20 (83,3%)	14 (77,8%)	19 (86,4%)	15 (75%)
TET2m	17 (70,8%)	11 (61,1%)	14 (63,6%)	14 (70%)
SRSF2	12 (50%)	12 (66,7%)	13 (59,1%)	14 (70%)
ASXL1	10 (41,6%)	11 (61,1%)	11 (50%)	10 (50%)
ZRSR2	9 (37,5%)	4 (22,2%)	7 (31,8%)	6 (30%)
KRAS	4 (16,7%)	7 (38,9%)	7 (31,8%)	4 (20%)
NRAS	3 (12,5%)	4 (22,2%)	3 (13,6%)	4 (20%)
RUNX1	6 (25%)	4 (22,2%)	5 (22,7%)	5 (25%)

Cuando se comparan los perfiles mutacionales de los estadios LMMC-1 y LMMC-2 determinados por conteaje morfológico tampoco hallaron diferencias significativas entre la frecuencia de las diferentes mutaciones. Sin embargo, cuando el estadiaje se realiza mediante citometría de flujo se evidencia que los pacientes clasificados como LMMC-1 presentan mayor frecuencia de mutaciones múltiples en TET2 que las LMMC-2 ($X^2 = 12,2$ $p < 0,01$) mientras que los clasificados como LMMC-2 presentan con más frecuencia mutaciones en ASXL1 ($X^2 = 6,01$ $p = 0,03$) y KRAS ($X^2 = 6,9$ $p < 0,01$) (Tabla 9).

Tabla 9. Relación entre el conteaje morfológico y fenotípico de los diferentes subtipos de LMMC.

GEN	Subtipo			
	CONTAJE MORFOLÓGICO		CONTAJE FENOTÍPICO	
	LMMC-1 (n=28)	LMMC-2 (n=14)	LMMC-1 (n=22)	LMMC-2 (n=20)
TET2	23 (82,1%)	12 (85,7%)	20 (90,9%)	15 (75%)
TET2m	19 (67,9%)	9 (64,3%)	20 (90,9%)	8 (40%)
SRSF2	17 (60,7%)	7 (50%)	14 (63,6%)	10 (50%)
ASXL1	12 (42,9%)	7 (50%)	6 (27,3%)	13 (65%)
ZRSR2	9 (32,1%)	4 (28,6%)	8 (36,4%)	5 (25%)
KRAS	6 (21,4%)	5 (35,7%)	2 (9,1%)	9 (45%)
NRAS	3 (10,7%)	4 (28,6%)	3 (13,6%)	4 (20%)

Evaluando el riesgo molecular definido por el score CPSS-mol⁹ el 46% de los pacientes con LMMC-1 y el 64% de las LMMC-2 presentaron perfiles moleculares de riesgo intermedio-2 o alto. Sin embargo, no hemos podido demostrar diferencias significativas entre estos grupos

clasificados por conteo morfológico ($X^2 = 0,58$ $p=0,44$). Por el contrario, considerando el conteo de blastos por citometría de flujo, el estadio LMMC-2 se relacionó con mayor frecuencia con perfiles moleculares de riesgo que la LMMC-1 (75% en LMMC2 vrs, 22,7% en LMMC-1, $X^2 = 11,5$ $p < 0,01$) (Tabla 10).

Tabla 10. Riesgo molecular de los distintos subtipos de LMMC en función del conteo morfológico y fenotípico.

CPSS-mol*	Contaje morfológico		Contaje fenotípico	
	LMMC-1	LMMC-2	LMMC-1	LMMC-2
	28	14	22	20
Score bajo o intermedio-1	15 (53,6%)	5 (35,7%)	17 (77,3%)	5 (25%)
Score intermedio-2 o alto	13 (46,4%)	9 (64,3%)	5 (22,7%)	15 (75%)
*CPSS-mol contempla 4 grupos de riesgo según la presencia/ausencia de alteraciones citogenéticas o mutaciones en ASXL1, NRAS, SETBP1 y RUNX1.				

DISCUSIÓN

Históricamente el diagnóstico de LMMC se ha basado en criterios clínicos, analíticos, morfológicos y más recientemente, citogenéticos.^{2,3,17} Sin embargo, estas herramientas presentan importantes limitaciones para identificar las formas tempranas de la enfermedad.⁸ Dado que un porcentaje significativo de pacientes con LMMC debutan con monocitosis aislada, uno de los desafíos más importantes en esta patología es el cribaje adecuado de esta alteración analítica.^{8,13}

Con el desarrollo de la CMF y la NGS diferentes trabajos han demostrado que la LMMC presenta hallazgos fenotípicos y moleculares particulares que pueden ser analizados en pacientes con monocitosis.^{14,18,19,20} En nuestro estudio más de la mitad de las muestras remitidas para estudio de monocitosis persistente presentaron una partición anómala identificable por CMF similar a la detectada en LMMC. Además, casi la totalidad de

monocitosis con partición anómala por CMF presentaron alteraciones moleculares relevantes por NGS, configurando un patrón mutacional muy similar a la LMMC. Estos hechos soportan la hipótesis de que en pacientes con monocitosis aislada los hallazgos fenotípicos se relacionan estrechamente con las alteraciones moleculares propias de la LMMC y pueden ser utilizados como criterio de cribado identificando formas preclínicas de la enfermedad.

Un aspecto que puede complicar la interpretación tanto de los resultados fenotípicos como moleculares es la posibilidad de detectar expansiones clonales en algunos pacientes sin evidencia de patología. Estas formas de acuerdo con los actuales criterios de clasificación^{1,8} incluirían 5 pacientes de nuestra serie con monocitosis $\leq 1000/\mu\text{L}$ que se catalogarían como “monocitosis clonal de significado incierto”⁸ y que no obstante presentan hallazgos moleculares similares a la LMMC. Aunque estos resultados hoy en día sólo pueden aplicarse de forma observacional, es probable que se traten de formas incipientes de la enfermedad.²¹ Los avances en la medicina personalizada podrían facilitar un abordaje correcto en pacientes diagnosticados en estas fases tempranas refinando en la identificación de factores pronósticos y seleccionando candidatos a ensayos clínicos.

Por otra parte, aunque no existen mutaciones específicas de la LMMC²² nuestros resultados demuestran diferencias en los resultados de NGS entre pacientes con LMMC y pacientes afectados de SMD y LA. De forma característica la LMMC muestra con mayor frecuencia una combinación de mutaciones en los genes de reguladores de epigenética TET2 (con frecuencia múltiples) y ASXL1, así como otras que afectan a la maquinaria del espliceosoma (SRSF2 y ZRSR2). Además, se encuentran con frecuencia mutaciones en genes relacionados fundamentalmente con vías de señalización intracelular como NRAS y KRAS o factores de transcripción como RUNX1 que son comunes a SMD y LA. Estos resultados son similares a

los obtenidos por otros autores y reflejan un paisaje mutacional característico de la LMMC, aunque no patognomónico.^{7,9,22}

En cuanto al análisis mutacional de las diferentes variantes de LMMC, las técnicas moleculares no detectaron diferencias significativas claras entre LMMC displásica y proliferativa. Diferentes autores han descrito que las mutaciones en KRAS son más frecuentes de la LMMC proliferativa.⁷ Aunque este dato no ha podido constatarse en nuestro estudio es probable que estuviera condicionado por el limitado número de pacientes de nuestra serie.

Asimismo, tampoco hemos encontrado diferencias entre pacientes con LMMC que presentaron marcadores aberrantes de infidelidad de línea en sus monocitos y los que no lo hicieron. La ausencia o presencia de expresión de estos marcadores, por tanto, no parece corresponder a perfiles moleculares diferenciados ni permite un diagnóstico diferencial adecuado por ser inconstante e inespecífico.

Resulta muy relevante que existan claras diferencias entre los perfiles mutaciones de pacientes con LMMC-1 y LMMC-2 cuando el conteo de blastos fue realizado por citometría de flujo, correspondiendo la LMMC-2 a un score molecular de mayor riesgo, mayor frecuencia de alteraciones citogenéticas y mutaciones en ASXL1 y KRAS. Probablemente, estas diferencias se deben a que una parte de los pacientes considerados como LMMC-1 por conteo morfológico eran en realidad formas de alto riesgo y fueron reclasificados a LMMC-2 por CMF. La conclusión es que estadiaje de la LMMC-1 por morfología es probablemente inexacto y subjetivo e infraestima el riesgo molecular por lo que es preferible un estadiaje por citometría de flujo basado en criterios objetivos.

La principal limitación del estudio es el reducido número de muestras debido a la baja incidencia de la enfermedad que puede afectar a la solidez de algunos datos estadísticos. No se han incluido en el estudio neoplasias mieloproliferativas atípicas que ocasionalmente pueden

plantear dificultades diagnósticas respecto a la LMMC debido a su baja frecuencia. Además, no se han recogido datos clínicos, datos evolutivos, supervivencia ni tratamientos aplicados por lo que no se ha podido evaluar el impacto pronóstico de las alteraciones detectadas. Por último, como todos los estudios retrospectivos, puede haber sesgos derivados de la pérdida de casos o de datos de interés que no han sido recogidos.

Por último, la experiencia acumulada del presente trabajo y de la revisión bibliográfica realizada aconseja un uso racional de la tecnología disponible y una protocolización exhaustiva para el estudio de la patología descrita. En primer lugar, es imprescindible realizar un diagnóstico diferencial clínico de las monocitosis. En monocitosis persistentes o de causa poco clara, la citometría de flujo es una técnica de gran utilidad ya que nos facilita un diagnóstico rápido y nos permite identificar formas clonales subsidiarias de seguimiento. Los estudios moleculares deben ser reservados para pacientes seleccionados en los que se requiera un diagnóstico diferencial preciso, se pueda plantear una decisión terapéutica individualizada o se requiera un seguimiento exhaustivo de la enfermedad.

CONCLUSIONES

- La citometría de flujo es una técnica de gran utilidad para el cribaje de pacientes con monocitosis mantenidas permitiendo la identificación de las formas clonales de causa primaria hematológica.
- La identificación de un patrón de partición anómala de monocitos por citometría de flujo es una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico diferencial con patologías fronterizas a la LMMC como algunos SMD y LA.
- El paisaje mutacional de la LMMC es muy característico, aunque no específico de la enfermedad, aportando datos de gran interés diagnóstico y evolutivo.

- El conteo de blastos por citometría permite una estratificación sencilla, objetiva y reproducible estrechamente relacionada con perfiles mutacionales de riesgo diferenciado.
- Es recomendable un uso racional de la tecnología disponible siguiendo procedimientos protocolizados para el estudio de la patología monocitaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khoury, JD, Solary, E., Abla, O. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1703-1719.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982 Jun;51(2):189-99.
3. Goldman JM. Myeloproliferative and myelodysplastic syndromes: the future. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003 Oct;17(5):1261-9.
4. Patnaik, MM , Tefferi, A. Leucemia mielomonocítica crónica: actualización de 2022 sobre diagnóstico, estratificación de riesgo y manejo . *Soy J Hematol* . 2022; 97 (3): 352 - 372 .
5. Padron E, Gurbuxani S. Chronic myelomonocytic leukemia: Clinical features, evaluation, and diagnosis [Internet]. Uptodate; dec 2022.
6. Montoro, J., Gallur, L., Merchán, B. *et al.* Autoimmune disorders are common in myelodysplastic syndrome patients and confer an adverse impact on outcomes. *Ann Hematol*. 2018 august; 97 (8): 1349–1356.
7. Alfonso A, Alonso E, Alonso S, Álvarez S, Amigó ML, Andreu R *et al.* Guías españolas de SMD y LMMC [Internet]. Barcelona: GESMD; 2020.

8. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1200-1228.
9. Chiara E, Galli A, Such E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2016;128(10):1408-17.
10. Reiser J, Geissler K. Treatment options and survival in real life during the past three decades in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Wien Med Wochenschr*. 2023 Feb;173(1-2):34-40.
11. Sanz MA, Carreras E, Rovira M, Sanz J. *Manual Práctico de Hematología Clínica* [Internet]. 7^o edición. España: Antares; 2022.
12. Matarraz S, Almeida J, Flores-Montero J, Lécresse Q, Guerri V, López A, Bárrena S, Van Der Velden VHJ, Te Marvelde JG, Van Dongen JJM, Orfao A. Introduction to the Diagnosis and Classification of Monocytic-Lineage Leukemias by Flow Cytometry. *Cytometry Part B*. May 2017; 92 (3): 218–227.
13. Lynch DT, Hall J, Foucar K. How I investigate monocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2018 Apr;40(2):107-114.
14. Solary E, Wagner-Ballon O, Selimoglu-Buet D. Incorporating flow cytometry and next-generation sequencing in the diagnosis of CMML. Are we ready for prime? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2020 Jun;33(2):101-134.
15. Tarfi S, Badaoui B, Freynet N, Morabito M, Lafosse J, Toma A, Etienne G, Micol JB, Sloma I, Fenaux P, Solary E, Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O; Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). Disappearance of slan-positive non-classical monocytes for diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia with associated inflammatory state. *Haematologica*. 2020 April; 105 (4): 147-152.

16. Richards S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17 (5): 405-424.
17. Sabattini E, Bacci F, Sagrmoso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica.* 2010 Jun;102(3):83-87.
18. Hudson CA, Burack WR, Bennett JM. Emerging utility of flow cytometry in the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Res.* 2018 Oct; 73:12-15.
19. Harrington AM, Schelling LA, Ordobazari A, Olteanu H, Hosking PR, Kroft SH. Immunophenotypes of Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) Subtypes by Flow Cytometry: A Comparison of CMML-1 vs CMML-2, Myeloproliferative vs Dysplastic, De Novo vs Therapy-Related, and CMML-Specific Cytogenetic Risk Subtypes. *Am J Clin Pathol.* 2016 Aug;146(2):170-181.
20. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, Morabito M, Met E, Debord C, Benayoun E, Nloga AM, Fenaux P, Braun T, Willekens C, Quesnel B, Adès L, Fontenay M, Rameau P, Droin N, Koscielny S, Solary E; Francophone Myelodysplasia Group. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2015 Jun 4;125(23):3618-26.
21. Cargo C, Cullen M, Taylor J, et al. The use of targeted sequencing and flow cytometry to identify patients with a clinically significant monocytosis. *Blood.* 2019; 133(12):1325-1334.
22. Malcovati L, Papaemmanuil E, Ambaglio I, et al. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood.* 2014;124(9):1513-1521.