



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"FARMACOLOGIA ED ONCOLOGIA MOLECOLARE"

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. Antonio Cuneo

Evoluzione clonale in relazione ai fattori prognostici
nella Leucemia Linfatica Cronica

Settore Scientifico Disciplinare MED/15

Dottorando

Dott. DAGHIA GIULIA

Tutore

Prof. CUNEO ANTONIO

Anni 2012/2014

Indice

1 Clinica e biologia della Leucemia linfatica cronica: stato dell'arte	1
1.1 Definizione	1
1.2 Epidemiologia ed eziologia	2
1.3 Biologia della cellula LLC	4
1.3.1 Linfopoiesi B	6
1.3.2 Cellula di origine della LLC	8
1.3.3 Cinetica delle cellule LLC	10
1.3.4 Microambiente	11
1.3.5 Anomalie delle cellule T nella LLC	12
1.4 Quadro clinico	12
1.4.1 Complicanze	13
1.5 Diagnosi	17
1.5.1 Diagnosi differenziale	22
1.6 Fattori prognostici	23
1.6.1 Stadiazione clinica	24
1.6.2 Analisi citofluorimetrica	26
1.6.2.1 CD38	26
1.6.2.2 Zap-70	27
1.6.2.3 CD49d	28
1.6.3 Fattori Prognostici Citogenetici	30
1.6.3.1 Analisi Citogenetica	30
1.6.3.2 FISH	31
1.6.3.2.1 Delezione 13q (13q-)	33
1.6.3.2.2 Trisomia 12 (+12)	34
1.6.3.2.3 Delezione 11q (11q-)	34
1.6.3.2.4 Delezione 17p (17p-)	34
1.6.3.2.5 Delezione 6q (6q-)	35
1.6.3.2.6 Altre anomalie	35
1.6.3.2.7 Traslocazioni	35
1.6.3.2.8 Cariotipo complesso	35
1.6.3.3 Metodiche genetiche molecolari basate su MICROARRAY	36
1.6.3.4 Fattori prognostici molecolari	37
1.6.3.4.1 Analisi mutazionale IGVH	37
1.6.3.4.2 Mutazione TP53	39
1.6.3.4.3 ATM	41
1.6.3.4.4 NOTCH1	41
1.6.3.4.5 SF3B1	42
1.6.3.4.6 BIRC3	43
1.6.3.5 MicroRNA (miRNAs)	43
1.6.3.6 Lunghezza dei telomeri	45
2 Sviluppi delle conoscenze in tema di evoluzione e architettura clonale nella LLC	48
2.1 Introduzione	48

2.2	CONTRIBUTO SPERIMENTALE: Clonal evolution including 14q32/IGH 49translocation in chronic lymphocytic leukemia: analysis of clinicobiologic correlation in 105 patients.	49
2.2.1	Razionale dello studio.....	49
2.2.2	Pazienti e metodi.....	49
2.2.3	Risultati.....	50
2.2.4	Discussione.....	53
2.3	Architettura subclonale.....	54
2.4	CONTRIBUTO SPERIMENTALE: Genetic subclonal complexity and miR25a-5p down-regulation identify a subset of patients with inferior outcome in low risk CLL patients.....	56
2.4.1	Razionale dello studio.....	56
2.4.2	Materiali e metodi.....	56
2.4.3	Risultati.....	57
2.4.4	Discussione.....	59
3	Terapia.....	61
3.1	Indicazioni al trattamento, valutazione della risposta e approccio multidisciplinare al paziente.....	61
3.2	Terapia di prima linea.....	65
3.3	Terapia nei recidivati e refrattari.....	69
3.4	REVISIONE DELLA LETTERATURA: Modern treatment in chronic lymphocytic leukemia: impact on survival and efficacy in high risk group.	72
3.4.1	Razionale della review.....	72
3.4.2	Impatto dei trattamenti sulla sopravvivenza.....	72
3.4.3	Efficacia del trattamento in specifici subset citogenetico-molecolari di LLC....	74
3.4.3.1	17p-/mutazioni TP53.....	78
3.4.3.1.1	BCR-targeted therapy: Ibrutinib.....	78
3.4.3.1.2	Idelalisib (CAL101).....	79
3.4.3.1.3	Antagonisti di BCL2.....	79
3.4.3.1.4	Lenalidomide.....	79
3.4.3.2	11q-.....	79
3.4.3.3	Mutazioni di SF3B1 e NOTCH1.....	80
3.4.4	Conclusioni.....	80
	Bibliografia.....	81

ALEGATO 1:

Clonal evolution including 14q32/IGH translocation in chronic lymphocytic leukemia: analysis of clinicobiologic correlation in 105 patients.

ALLEGATO 2:

Genetic subclonal complexity and miR25a-5p down-regulation identify a subset of patients with inferior outcome in low risk CLL patients.

ALLEGATO 3:

Modern treatment in chronic lymphocytic leukemia: impact on survival and efficacy in high risk group.

1. Clinica e biologia della Leucemia Linfatica Cronica: stato dell'arte

1.1 Definizione

La leucemia linfatica cronica (LLC) è un disordine linfoproliferativo cronico acquisito, di natura clonale, caratterizzato dall'accumulo di piccoli linfociti apparentemente maturi nel sangue periferico, nel midollo osseo, nei linfonodi, in altri tessuti linfatici o più raramente in sedi extralinfatiche (1).

Secondo la vigente classificazione WHO pubblicata nel 2008 la LLC è un tumore dei tessuti linfoidei a cellule B mature (2); tale sistema nosologico definisce la malattia utilizzando i criteri diagnostici riportati dalle linee guida IWCLL del 2008 (3) (Tabella 1).

Tabella 1.

Mature B-cell neoplasms

Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma

B-cell prolymphocytic leukemia

Splenic marginal zone lymphoma

Hairy cell leukemia

Splenic lymphoma/leukemia, unclassifiable

Lymphoplasmacytic lymphoma

Heavy chain diseases

Plasma cell myeloma

Solitary plasmacytoma of bone

Extraosseous plasmacytoma

Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)

Nodal marginal zone lymphoma

Follicular lymphoma

Mantle cell lymphoma

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)

Lymphomatoid granulomatosis

Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma

Intravascular large B-cell lymphoma

ALK-positive large B-cell lymphoma

Plasmablastic lymphoma

Large B-cell lymphoma arising in HHV8-associated multicentric Castleman disease

Primary effusion lymphoma

Burkitt lymphoma

B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma

B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma

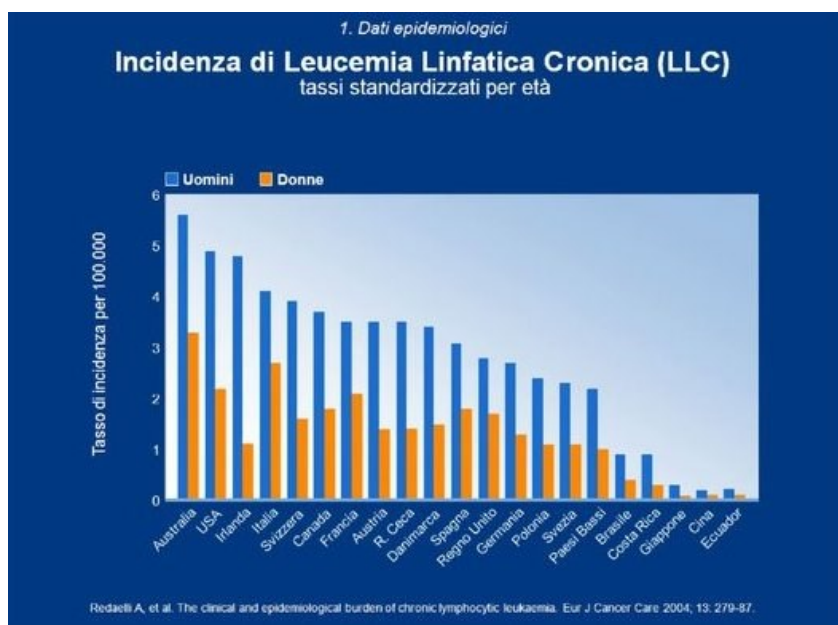
La LLC rappresenta 11% di tutte le neoplasie ematologiche (4) ed è caratterizzata da un'elevata prevalenza nei Paesi industrializzati Occidentali, dove colpisce soprattutto i soggetti adulti con età superiore a 65 anni (5).

Dal punto di vista clinico è una malattia estremamente eterogenea tanto che varia da quadri asintomatici in cui la linfocitosi viene riscontrata accidentalmente in corso di esami ematochimici eseguiti di routine (circa 25%) ad altri con immediata necessità di terapia specifica per insufficienza midollare o sintomi sistemici o linfadenomegalie ed organomegalie massive o sintomatiche (6).

Tale variabilità, naturalmente, impatta anche sul piano prognostico. Infatti, mentre la metà dei pazienti presenta un'aspettativa di vita normale e non necessita di trattamento, nella restante metà dei casi la malattia è particolarmente aggressiva, richiede la somministrazione di terapia specifica e rappresenta la causa di morte del paziente (4).

1.2 Epidemiologia ed Eziologia

La LLC è la forma di leucemia con maggior prevalenza nel mondo Occidentale tanto che rappresenta il 25-35% di tutte le leucemie umane (1); è invece rara nei Paesi Asiatici (7) (Figura 1.2a).



da Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL.
The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia.
Eur J Cancer Care (Engl). 2004 Jul;13(3):279-87

Fig. 1.2a: Incidenza per area geografica (da <http://www.ematologiainprogress.net>; Cuneo A, Rigolin GM)

L'incidenza media annua nella popolazione nordamericana riportata dai registri SEER nel quinquennio 2003-2007 è di 4.2 casi per 100.000 abitanti che aumenta fino a 22.3 casi per 100.000 se si considera la popolazione costituita da soggetti con età superiore ai 65 anni. Infatti, come riportato sopra, la LLC colpisce prevalentemente gli anziani, con una età mediana alla diagnosi di 72 anni e solo con un terzo dei pazienti (31%) con età inferiore a 64 anni alla diagnosi (Figura 1.2b).



Fig. 1.2b: Incidenza per età (da <http://www.ematologiainprogress.net>; Cuneo A, Rigolin GM)

Inoltre, nella popolazione generale la malattia predilige i soggetti di sesso maschile con un rapporto di circa 2:1 rispetto a quelli di sesso femminile. Infatti, si stima un'incidenza di 5.8 casi ogni 100.000 abitanti di sesso maschile e di 3 ogni 100.000 femmine per anno (8) (Figura 1.2c).

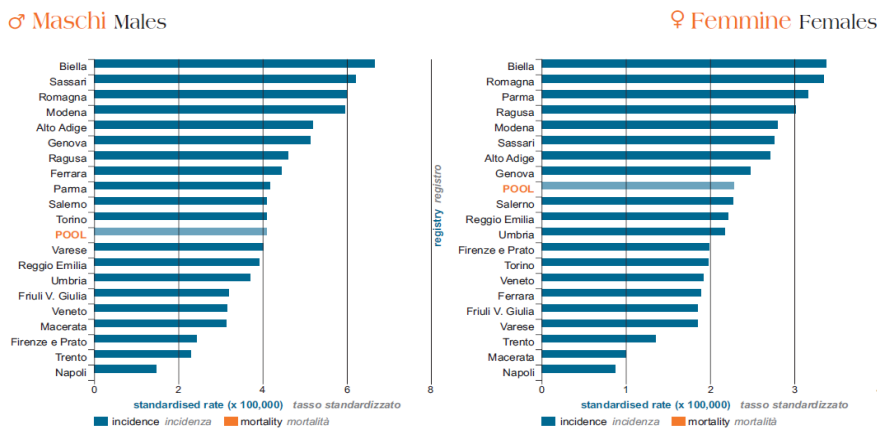


Fig. 1.2c: Incidenza per sesso (da www.airc.it)

La prevalenza e l'incidenza della malattia nel continente Europeo sono sovrapponibili rispetto ai dati americani sopra riportati (9).

Uno studio di popolazione recentemente pubblicato in letteratura, eseguito a Olmsted Country in Minnesota, ha rilevato una riduzione del 33% nell'incidenza annua di LLC (da 10 a 6.8 su 100.000 abitanti) in seguito all'acquisizione e alla diffusione tra gli ematologi dei criteri diagnostici IWCLL pubblicati nel 2008 (Figura 1.2d). Infatti, oggi per porre diagnosi di LLC è necessario un numero maggiore di 5000/ μ l di linfociti B clonali e non più, come previsto nei precedenti criteri NCI-WG del 1996, solo una conta linfocitaria

assoluta maggiore di 5000/ μ l. Nello specifico, quei casi definiti come LLC secondo i vecchi criteri NCI-WG ma caratterizzati da un numero di linfociti B clonali inferiore a 5000/ μ l costituiscono oggi un gruppo di pazienti raggruppato in nuova entità nosologica, riportata anche nella classificazione WHO del 2008, e definita come MBL (“monoclonal B-cell Lymphocytosis) (10) (Figura 1.2d).

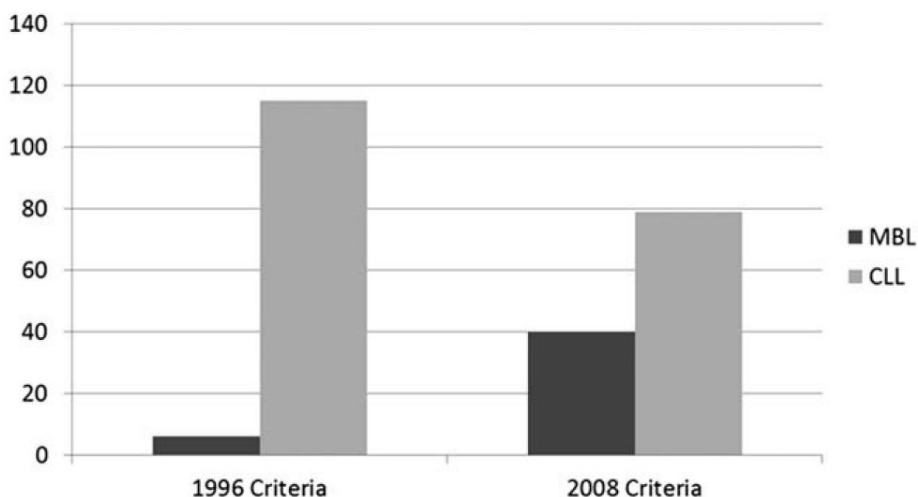


Figura 1.2d Differenze nella classificazione della LLC o della MBL in base ai criteri diagnostici utilizzati.

Nello stesso studio si riportava invece un aumento dell’incidenza di LLC nel periodo tra il 1935 e il 1989 per la diffusione di migliorie nelle metodiche diagnostiche di laboratorio (utilizzo di contattori automatici per l’esecuzione dell’emocromo e la diffusione della citofluorimetria); stabilità nel periodo di tempo compreso tra il 2000 e 2010.

Età avanzata, razza caucasica ed anamnesi familiare positiva per patologia ematologica sono riportati dalla letteratura come fattori di rischio per lo sviluppo di LLC anche se l’eziologia rimane non nota (7).

Sembra esistere una certa predisposizione genetica allo sviluppo della malattia poiché la prevalenza di LLC o di altri disordini linfoproliferativi cronici appare nettamente aumentata in alcune famiglie. Infatti, da studi eseguiti su campioni di popolazione si è rilevato come in circa il 5% dei casi l’anamnesi familiare del paziente fosse positiva per LLC. Inoltre, le forme di LLC “familiare” hanno dimostrato una certa tendenza all’anticipazione dell’età di esordio nelle generazioni successive rispetto a quanto avviene nei casi “sporadici” (pazienti con anamnesi familiare negativa per LLC).

Invece non esistono dati sufficientemente robusti che correlino un rischio aumentato di sviluppare LLC con l’esposizione a fattori ambientali ad effetto leucemogeno noto (radiazioni, chimici, agenti alchilanti...).

Il ruolo predominante giocato dai fattori genetici su quelli ambientali è stato anche dimostrato valutando come il rischio minimo per un soggetto di razza asiatica di sviluppare LLC rimanga persistentemente basso anche quando questi viva in Paesi Occidentali (7).

1.3 Biologia della cellula LLC

Nel mondo Occidentale la maggior parte dei casi di Linfoma non Hodgkin originano da linfociti B (circa 95%), mentre solo il 5% deriva da linfociti T. Questa diversa incidenza probabilmente deriva da specifici fattori che intervengono nella patogenesi dei linfomi a

cellule B visto che fisiologicamente il numero dei linfociti T e di quelli B è sostanzialmente sovrapponibile (11).

I progressi ottenuti negli ultimi vent'anni hanno permesso di individuare la cellula d'origine dei linfomi a cellule B e gli eventi trasformanti cruciali, soprattutto il ruolo delle traslocazioni cromosomiche nella patogenesi di queste malattie. Inoltre, si è rilevato come la crescita della maggior parte dei linfomi B coinvolga fattori chiave nei normali processi di differenziazione e sopravvivenza dei linfociti B.

A tal proposito, è fondamentale sottolineare come fisiologicamente le diverse fasi di differenziazione del linfocita B siano caratterizzate da una struttura specifica del recettore B-cellulare (BCR) e da specifici "pattern" di marcatori di differenziazione. Lo studio di queste strutture di superficie è fondamentale poiché il razionale su cui poggia la classificazione dei Linfomi Non Hodgkin a cellule B (2) si basa sull'osservazione che i linfociti B maligni sembrano "congelati" in un particolare stadio di differenziazione, riflettente la loro origine (11).

Il BCR è costituito da due catene immunoglobuliniche pesanti e due leggere identiche unite tra loro covalentemente da ponti disolfuro e dalle molecole CD79a e CD79b contenenti immunorecettori citoplasmatici con motivi di attivazione tirosina-dipendenti (ITAMs) necessari per la trasmissione del segnale intracellulare. Infatti, le sequenze ITAMs determinano, in seguito alla stimolazione del BCR, l'attivazione di numerose tirosina-chinasi che, agendo a livello citoplasmatico e successivamente nucleare, stabiliscono il destino della cellula B attivata (proseguimento della differenziazione e/o indirizzamento a processi di proliferazione). L'espressione del BCR sulla membrana cellulare è quindi cruciale per il linfocita B poiché rappresenta il principale trasduttore del segnale per le interazioni dei linfociti B con i linfociti T (Figura 1.3a).

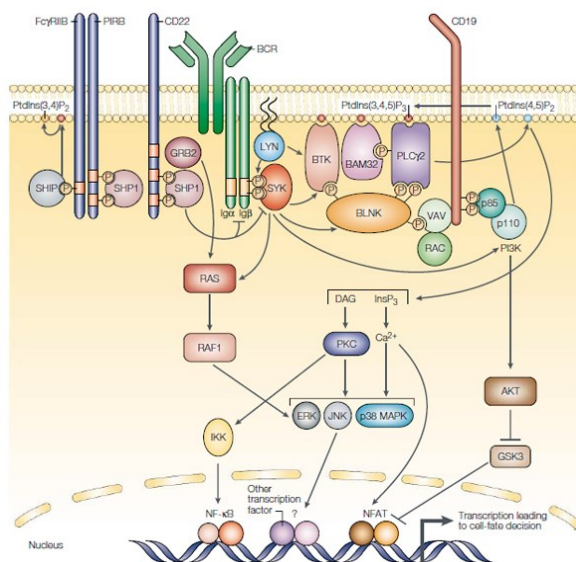


Figura 1.3a Cascata di attivazione del segnale di BCR. Il legame dell'antigene al BCR attiva la trasduzione del segnale chinasi-mediata determinando l'attivazione di secondi messaggeri e, quindi, la trascrizione di fattori di trascrizione che regolano il destino della cellula

L'attivazione del BCR richiede numerosi passaggi che determinano il riarrangiamento dei geni immunoglobulinici. In particolare, il locus genomico codificante per le catene pesanti

delle immunoglobuline si localizza sul braccio lungo del cromosoma 14 (14q32) ed è suddiviso in multipli segmenti genici codificanti per la regione variabile (V), separati tra loro da segmenti non codificanti, segmenti di diversità (D), segmenti di giunzione (J) e segmenti codificanti per la porzione costante della catena (C). Il riarrangiamento dei geni immunoglobulinici è mediato dalla famiglia enzimatica Rag (Recombination Activating Gene), specifica della filiera linfoide, ed avviene secondo una sequenza temporale precisa, definita “ricombinazione V(D)J”, che prevede prima eventi di escissione del DNA seguiti poi dal ricongiungimento dei segmenti separati. In particolare, la sintesi della catena pesante prevede la giustapposizione di sequenze D-J con successiva unione di sequenze V al segmento D-J ed infine la selezione di una specifica sequenza C (11, 12, 1).

Nelle fasi precoci di differenziazione sul linfocita B viene in realtà espressa una molecola, detta “pre-BCR” costituita da una catena pesante μ (μ HC) e due pseudocatene leggere (VpreB e λ 5) unite a CD79a e CD79b. Questo recettore caratterizza il linfocita B nello stadio di differenziazione “pre-B” (1).

1.3.1 Linfopoiesi B

La linfopoiesi ha origine nel midollo osseo da una cellula staminale multipotente che, sotto la stimolazione di Flt-3, perde il potenziale di autorinnovamento e di differenziazione mieloide e diventa quindi un precursore linfoide precoce (CLP). L’indirizzo di queste cellule alla filiera linfoide B viene regolato da due fattori di trascrizione (E2A e EBF) che regolano l’espressione genica precoce per la linea B ed anche i riarrangiamenti dei segmenti genici del locus IgH attivando le Rag. Il precursore in cui si verifica il riarrangiamento delle catene pesanti D-J viene chiamato “pro-B” ed esprime sulla superficie alcune componenti sia strutturali sia funzionali del pre-BCR (pseudocatene leggere e CD79a-CD79b).

E2A e EBF stimolano inoltre l’espressione di PAX-5, un fattore responsabile del cosiddetto “commitment” e cioè della restrizione alla linea B, privando la cellula di ulteriori possibilità differenziative. PAX-5 determina inattivazione di Notch-1 (impedendo quindi una differenziazione verso un linfocita T) e attiva la trascrizione di CD19, un importante marcatore di superficie specifico della filiera B cellulare. CD19 è una proteina di membrana che a livello citoplasmatico interagisce con diverse tirosin-chinasi della famiglia Src, importanti per la differenziazione cellulare. Il precursore che esprime sulla superficie il CD19 e che, stimolato da PAX-5, inizia il riarrangiamento V-DJ con l’espressione di alcune componenti del pre-BCR (pseudocatene leggere ma anche catene pesanti unicamente a livello citoplasmatico) è definito “pre-B”. La cellula pre-B va incontro ad una progressiva differenziazione che determina l’internalizzazione e quindi la degradazione del pre-BCR permettendo così alle Rag di avere accesso ai loci genomici codificanti per le catene leggere. Il riarrangiamento delle catene leggere avviene nei segmenti V-J e solitamente si verifica prima per quelle kappa e poi per le lambda. Inoltre, solo nel caso in cui tale riarrangiamento dia origine ad un prodotto funzionale, in grado di assemblarsi in una immunoglobulina completa sulla superficie cellulare, verrà espresso il BCR; in caso contrario la cellula pre-B andrà incontro ad apoptosi per selezione negativa.

L’espressione del BCR completo e contemporaneamente di CD19, CD22 e CD20 distinguono la cellula B matura “naive” che è quindi pronta ad entrare nel sangue periferico e da qui a spostarsi negli organi linfoidi secondari come linfonodi e milza dove

incontrerà l'antigene. Infatti, la fase sopra descritta del processo della linfopoiesi è definita antigene-indipendente ed è seguita dalla seconda fase che avviene in modo antigene-dipendente (Figura 1.3.1a).

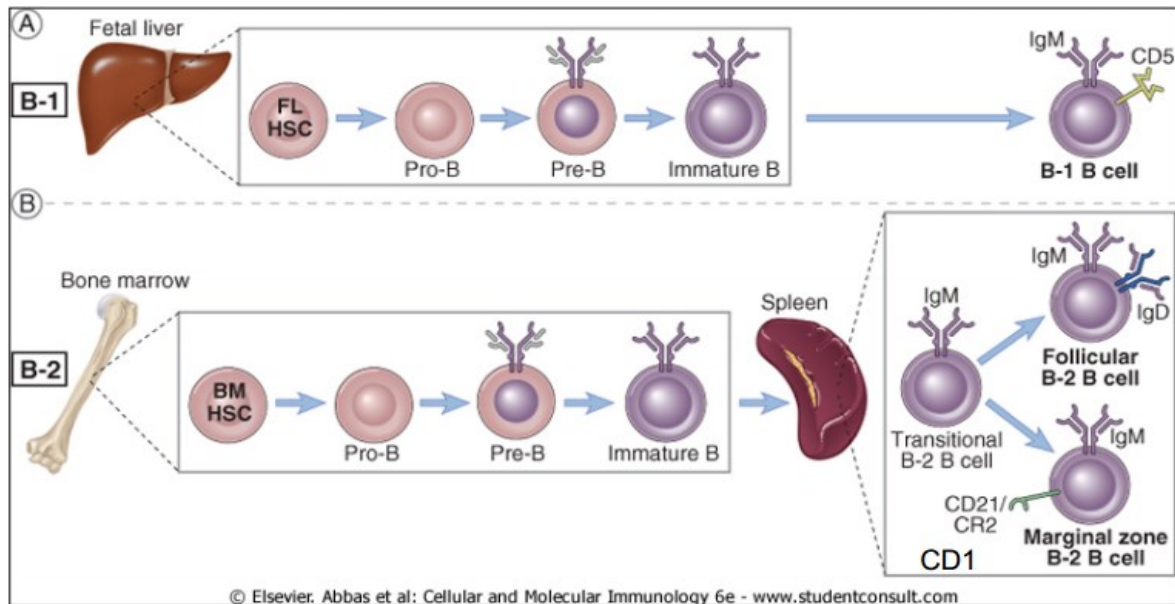


Fig. 1.3.1a: sottopopolazioni di linfociti B

Nella risposta immunitaria dipendente dai linfociti T il legame di un determinato antigene al BCR determina l'attivazione del linfocita B maturo "naive" e la sua successiva espansione clonale all'interno di una struttura chiamata centro germinativo (CG). In questo modo il numero di cellule B capaci di riconoscere l'antigene aumenta. Nel CG la presentazione dell'antigene da parte di cellule T e di cellule follicolari dendritiche provoca ulteriori modificazioni dei geni delle immunoglobuline (ipermutazione somatica) per aumentare la selettività della risposta immunitaria.

La cellula B attivata nel CG dall'incontro con l'antigene, definita centroblasto, subisce il processo di ipermutazione somatica che, sotto il controllo dell'attività enzimatica di AID ("activation-induced-deaminase"), induce l'introduzione di mutazioni puntiformi, delezioni o duplicazioni nelle regioni V dei geni delle immunoglobuline. La maggior parte di queste mutazioni è svantaggiosa per le cellule portando ad una ridotta affinità tra il BCR e l'antigene e per questo tali cellule vanno incontro ad apoptosi. La morte cellulare programmata è il destino che fisiologicamente viene riservato anche a quei linfociti B con BCR ad alta affinità verso antigeni dell'organismo stesso (autoantigeni). Tale processo assicura la tolleranza verso il self.

Invece, nel caso in cui l'affinità sia elevata, si attiva una selezione positiva delle cellule stesse che vanno quindi incontro alla ricombinazione di "class-switch" e cioè sostituiscono la catena pesante del loro BCR (da IgM a IgG o IgA) mediante l'attività di AID per mutare le funzioni effettrici senza però modificare la sequenza di legame dell'antigene, e, quindi, l'affinità. A questo punto, i linfociti B lasceranno il CG come cellule B della memoria (sotto lo stimolo di CD40) o plasmacellule (dalla stimolazione di Blimp-1 e XBP-1).

Nel CG possono essere distinte morfologicamente la zona "scura" e quella "chiar". La prima è costituita prevalentemente da centroblasti e quindi da linfociti che, sotto la stimolazione di BCL-6, hanno bloccato le fasi terminali della loro differenziazione a

vantaggio della proliferazione. Quest'ultima viene favorita, inoltre, dall'espressione di proteine ad effetto anti-apoptotico come BCL-2 e CD40.

Invece, la zona “chiara” è costituita da centrociti e quindi da cellule che sono andate incontro ai processi di selezione positiva; in essi si verifica il “class switch”. Inoltre, alcune di queste cellule riesprimono Rag e sono quindi nuovamente capaci di ricombinazione VDJ, promuovendo la diversificazione del BCR nella porzione variabile in un evento chiamato “receptor editing”.

È importante ricordare una sottopopolazione di linfociti B che esprimono sulla loro superficie CD5, un marcatore solitamente espresso solo sui linfociti T, e capaci di produrre anticorpi “naturali” e cioè non derivati da una stimolazione antigenica T-dipendente. Per questa ragione, essi sono in grado di rispondere ad una serie limitata di antigeni che vengono definiti superantigeni (1).

1.3.2 Cellula d'origine della LLC

L'origine cellulare della LLC è tuttora dibattuta, nonostante questa informazione sia critica per la comprensione della patogenesi.

Durante la costituzione del CG, fisiologicamente si verifica una serie di mutazioni somatiche nella struttura del BCR per aumentarne l'affinità verso uno specifico antigene (1, 11, 12, 13). Circa la metà dei casi di LLC presenta tali mutazioni in IGVH, mentre i restanti casi mostrano IGVH “non-mutato” (14, 15). Questa dicotomia ha un impatto prognostico rilevante, visto che i pazienti con IGVH mutato presentano un decorso della malattia più indolente rispetto a quelli con IGVH non mutato (14, 15). Sulla base di ciò è stata formulata l'ipotesi secondo cui la LLC potrebbe essere distinta in due entità, una derivata da cellule B “naive” (IGVH non-mutato) e l'altra da una cellula B della memoria post-CG (IGVH mutato). In realtà, lo studio del profilo di espressione genica nella LLC ha confermato che entrambe le due forme derivano da una cellula B della memoria (16, 17) (Figura 1.3.2a).

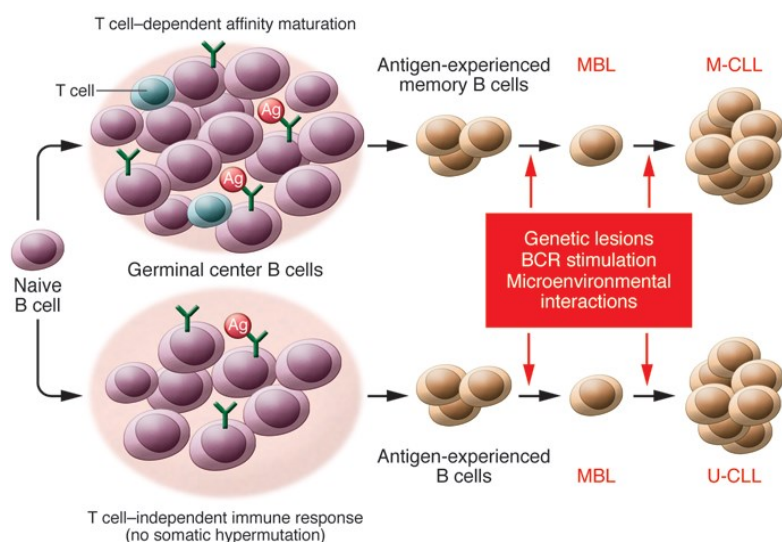


Fig. 1.3.2a: Schema dell'origine cellulare della LLC mutata (M-CLL) e non mutata (U-CLL) (da Gaidano G et al. 2012)

Sono state formulate diverse ipotesi per tentare di comprendere quale meccanismo sottenda alla capacità del 50% delle LLC di evitare le mutazioni IGVH. Secondo una di queste gli antigeni favorirebbero la maturazione delle cellule della LLC in modo indipendente dai linfociti T o dalla formazione del CG evitando così le mutazioni IGVH. Un'altra teoria invece suggerisce un'origine autoreattiva delle cellule della LLC con IGVH non-mutato e quindi destinate teoricamente all'apoptosi da cui evadono attraverso una stimolazione tonica del recettore o per eventi genetici trasformanti (18). Il fatto che il BCR possa legare numerosi antigeni fa ipotizzare che l'affinità di legame per uno specifico antigene sia determinante per stabilire se la risposta sarà di tipo attivante o anergica. In particolare, mentre il legame al BCR nelle LLC non-mutate provoca prevalentemente una risposta di tipo attivante e proliferativo, nelle LLC mutate favorisce anergia ed una risposta anti-apoptotica. L'attivazione e la trasmissione del segnale può inoltre essere direttamente guidata dall'espressione di fattori prognostici avversi come CD38 e ZAP70. Infatti, ad esempio l'espressione di ZAP-70, anomalo nei linfociti B essendo un tipico marcatore dei linfociti T, aumenta l'attivazione del segnale di BCR (12).

Successivi studi, attraverso l'utilizzo di anticorpi monoclonali generati dal BCR di entrambe le forme di LLC, hanno evidenziato come i casi con IGVH-mutato leghino epitopi con motivi aminoacidici ristretti a differenza delle forme non-mutate che riconoscono numerosi epitopi differenti tra loro. Questo ha portato ad ipotizzare che in vivo epitopi strutturalmente differenti possono legarsi al medesimo BCR stimolando così le cellule LLC (19).

Frequente è il riscontro nella LLC di BCR "stereotipati", cioè IGVH con sequenza CDR-3 ("complementary-determining region 3") quasi completamente identica, ricordando che CDR3 è uno dei principali fattori determinanti la specificità antigenica (20). È stato rilevato come la presenza di BCR stereotipati si associ ad un peggioramento della prognosi, indipendentemente dallo stato mutazionale di IGVH, sebbene la stereotipia caratterizzi prevalentemente le forme non-mutate (40%) rispetto a quelle mutate (10%). La stereotipia del BCR è da considerare l'epifenomeno di una pressione selettiva antigenica nella LLC; tuttavia gli anticorpi monoclonali derivati da questi BCR possono essere in vivo sia mono sia poli-reattivi e reagiscono spesso contro epitopi altamente conservati espressi sulle cellule apoptotiche. La selezione di BCR stereotipati può quindi essere relazionata ad una combinazione di pressione antigenica e di maggiore facilità di attivazione del BCR da parte di specifiche sequenze CDR3 (18).

Uno studio recente condotto da Seifert e collaboratori, ha condotto all'identificazione di una nuova sottopopolazione di linfociti B CD5+CD27+, coinvolta nella patogenesi della LLC. L'analisi del trascrittoma delle cellule di LLC e dei principali sottogruppi di cellule B normali, circolanti e spleniche, rivela che le cellule di LLC con configurazione non mutata della regione variabile per le immunoglobuline (IgV) derivano da cellule B CD5+ mature non mutate; al contrario, le cellule di LLC mutate derivano da una distinta popolazione di linfociti B CD5+CD27+, post-centro germinativo (175). I riarrangiamenti stereotipati del gene V sono più numerosi tra i linfociti B CD5+, supportando in maniera indipendente la derivazione della LLC da linfociti B CD5+. Inoltre, queste popolazioni B includono espansioni oligoclonali rinvenute in giovani adulti sani, rappresentando verosimilmente una fase precoce nello sviluppo della LLC, antecedente allo sviluppo della linfocitosi B monoclonale.

1.3.3 Cinetica delle cellule LLC

Inizialmente la LLC veniva definita come un disordine linfoproliferativo in cui la linfocitosi era determinata da un accumulo passivo delle cellule leucemiche per un'alterazione dei normali meccanismi di apoptosi. Quest'ipotesi si poggiava sull'osservazione che più del 98% delle cellule LLC circolanti nel sangue periferico si trovano nelle fasi G0 e G1 precoce del ciclo cellulare, con un'aumentata espressione di proteine anti-apoptotiche. In realtà, molti studi hanno dimostrato un'elevata capacità proliferativa delle cellule LLC. Infatti, come visto sopra, le cellule della LLC con IGH non-mutate reagiscono al legame dell'antigene al BCR con una risposta proliferativa. Numerosi casi di LLC esprimono marcatori di attivazione di superficie (ad esempio CD38, CD49 e CD69).

Diversi studi sono stati eseguiti per confermare la nuova ipotesi confrontando il tasso di "nascita" e di "morte" delle cellule LLC con l'utilizzo di marcatori a fluorescenza incorporati nel DNA nella fase S (21) (Figura 1.3.3a).

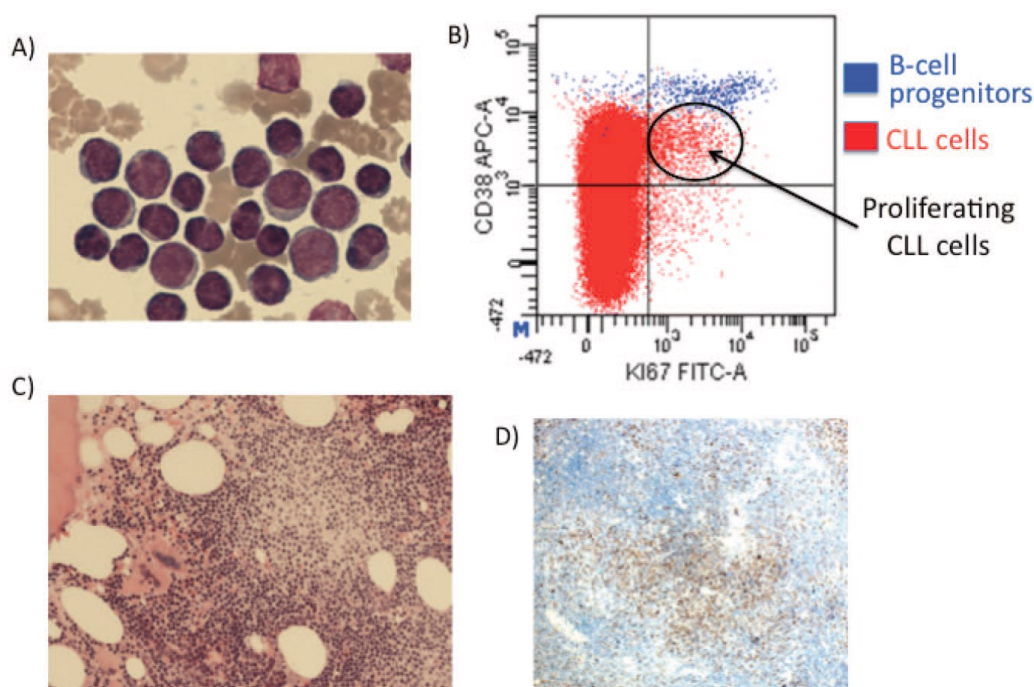


Figura 1.3.3a *Cellule proliferanti nella llc. (A) Cellule del sangue periferico mature con occasionali cellule di maggiori dimensioni. (B) Citofluorimetria identifica il compartimento proliferativo nella llc (Ki-67 e CD38+). (C) BM contenente centri proliferativi. (D) Marcatura Ki-67 conferma cellule LLC nei centri proliferativi.*

Da questi scaturisce la teoria secondo cui le cellule LLC presenti nel sangue periferico assumono un atteggiamento di "cellule senescenti", ma che una volta rientrate nel microambiente tumorale ricevono segnali di attivazione e quindi di proliferazione e sopravvivenza. Questo forte stimolo proliferativo indotto dal compartimento tessutale (midollo osseo, linfonodi e milza) sulla cellula LLC è definito "sinapsi" o "segnalosoma" e si basa sulla stimolazione del BCR e delle sue molecole costimolatorie.

L'elevato numero di divisioni cellulari cui vanno incontro le cellule LLC, soprattutto nelle forme "non-mutate", provoca un importante accorciamento dei telomeri contribuendo così

alla progressione della malattia per l'elevata instabilità genomica associata a questo fenomeno di erosione (22).

Un ruolo fondamentale nello spostamento delle cellule LLC nei diversi compartimenti è giocato da CXCR4 che promuove l'entrata nel microambiente ed è down-regolato quando la cellula rientra nel sangue periferico (18).

1.3.4 Microambiente

Il ruolo del microambiente nel favorire la sopravvivenza e la proliferazione della LLC continua ad essere un importante spunto di ricerca.

Il microambiente tumorale può essere descritto come una nicchia in cui si trovano le cellule leucemiche associate ad una commistione di cellule tra cui quelle del sistema immunitario dell'ospite, cellule vascolari ed elementi stromali con la trasmissione del segnale attraverso la presentazione dell'antigene, interazioni cellula-cellula e vie del segnale paracrino. Nello specifico il microambiente midollare si caratterizza per la presenza di cellule stromali mesenchimali (MSC) all'interno di nicchie "vascolari", mentre quello degli organi linfoidi secondari contiene cellule simil-nutrici (NLC), linfociti T e cellule dendritiche follicolari (Figura 1.3.4a).

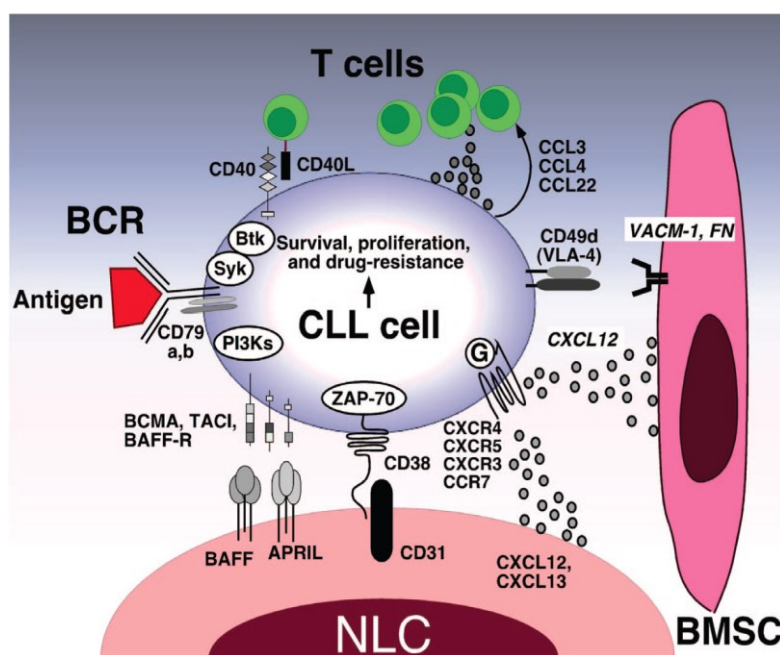


Figura 1.3.4a Ruolo del micromambiente nella LLC (da Burger JA 2011)

Le MSC e le NLC esprimono in modo costitutivo le chemochine CXCL12 e CXCL13 che dai dati derivati da studi in vitro sembrano importanti nella stimolazione della sopravvivenza delle cellule della LLC mediando l'attivazione di diverse chinasi cellulari (ad esempio MAPK, STAT3,..) ed anche di fattori di attivazione intracellulari come NF-kB. Quest'ultima via può inoltre essere attivata anche a livello dei pseudofollicoli dall'interazione tra il CD40 espresso dalle cellule LLC ed il suo ligando CD40L (CD154) sulle cellule T CD4+. Complessivamente, gli esperimenti eseguiti in vitro suggeriscono come il microambiente tumorale con tutte le interazioni sopra descritte possa giocare un ruolo determinante nella resistenza delle cellule LLC all'apoptosi (favorendo la sopravvivenza cellulare) e, dunque, alla chemioterapia (inducendo chemiorefrattarietà).

Anche la componente vascolare della nicchia tumorale viene alterata dall'interazione con le cellule leucemiche. Infatti, diversi studi in vitro hanno dimostrato la capacità delle cellule LLC, attraverso la secrezione paracrina di citochine angiogenetiche (ad esempio VEGF, bFGF, TSP-1), di aumentare la densità dei microvasi.

Recenti studi hanno inoltre evidenziato come le cellule LLC condizionino il microambiente tumorale con la produzione di microvescicole derivate dalla membrana cellulare, capaci di trasmettere un segnale a recettori di superficie, proteine di attivazione del segnale o acidi nucleici in cellule bersaglio. Un numero elevato di microvescicole si rileva prevalentemente nelle LLC correlando con caratteristiche cliniche di aggressività della malattia.

Infine, le cellule LLC esprimono sulla superficie i recettori Toll-like (TLRs). Si tratta di recettori di superficie normalmente espressi dalle cellule del sistema immunitario innato e capaci di legare antigeni microbiologici con struttura altamente conservata, attivando così la risposta immunitaria. Il legame degli antigeni specifici ai TLRs sulle cellule LLC scatena l'attivazione della via mediata da NF- κ B e l'espressione sulla superficie di marker di attivazione come CD25 e CD80 (18).

1.3.5 Anomalie delle cellule T nella LLC

Nella LLC si riscontrano anomalie sia qualitative sia quantitative dei linfociti T che consentono alle cellule leucemiche di evadere la risposta immunitaria cellula-mediata nonostante l'espressione di antigeni tumore-specifici presentati dalle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità.

La LLC si distingue dalla maggior parte dei tumori poiché presenta nei casi non trattati un elevato numero di linfociti T circolanti invece che ridotto come avviene solitamente nelle malattie neoplastiche. Inoltre, i linfociti T, pur essendo numericamente maggiori da 2.5 a 4 volte rispetto alla norma, presentano tuttavia un repertorio significativamente ridotto con sottopopolazioni oligoclonali e monoclonali. Infatti, nella LLC la risposta T Helper è prevalentemente spostata da Th1 ad una risposta anergica Th2, come conseguenza della secrezione da parte delle cellule leucemiche di citochine con funzione immunomodulatoria, come ad esempio IL-6 e TGF- β .

Anche la sottopopolazione di linfociti T regolatori soppressivi (Treg) è maggiore in numero nella LLC rispetto alla norma. Il meccanismo ipotizzato alla base di questo incremento viene ricondotto ad un contatto cellulare diretto tra LLC e linfociti T attraverso CD27 e CD70, favorendo inoltre l'espressione di BCL-2 nei Treg e quindi rendendoli più resistenti all'apoptosi rispetto a quanto avviene nei soggetti sani.

Le anomalie qualitative dei linfociti T evidenziate nella LLC rendono tali cellule incapaci di sviluppare una risposta immunitaria adeguata alterando il riconoscimento dell'antigene e la citotossicità cellulare.

In conclusione, l'alterazione della funzione dei linfociti T descritta nella LLC può essere un'importante causa di progressione tumorale, aumentata suscettibilità alle infezioni e seconde neoplasie (18).

1.4 Quadro clinico

Come visto sopra, la LLC è caratterizzata da un quadro clinico estremamente eterogeneo, comprendendo forme indolenti in cui i pazienti rimangono asintomatici e muoiono per

cause intercorrenti, fino a quadri molto aggressivi in cui la mortalità è legata alla malattia o alle complicanze provocate dalla terapia (1).

In più del 25% dei casi la diagnosi di LLC avviene in pazienti asintomatici in seguito al riscontro casuale di una linfadenopatia o di una linfocitosi assoluta all'emocromo; frequente anche un esordio paucisintomatico (6).

I sintomi clinici legati alla malattia sono definiti "sintomi B" e sono comuni a tutti i disordini linfoproliferativi a cellule B (astenia marcata, calo ponderale superiore al 10% del peso corporeo nell'arco di sei mesi, sudorazioni notturne profuse e febbre persistente). A questi sintomi sistemici si possono aggiungere quelli legati al coinvolgimento di un organo specifico rappresentato più comunemente da linfonodi, milza e fegato o più di rado da sedi extranodali come ad esempio polmone, tratto gastrointestinale, sistema nervoso centrale.

Solo nei casi più aggressivi l'esordio della malattia si manifesta con i sintomi legati alle complicanze infettive provocate dal naturale stato d'immunodeficienza indotto dalla LLC o all'insufficienza midollare legata ad una massiva infiltrazione leucemica (ad esempio astenia ingravescente, scompenso cardiocircolatorio per anemia o sanguinamenti di entità variabile per la piastrinopenia). Questi sintomi tendono invece a diventare dominanti in concomitanza con la progressione della malattia.

L'anomalo accumulo dei linfociti clonali a livello dei linfonodi determina la comparsa di linfadenomegalie che possono variare per dimensioni da minime (definite per diametro di almeno 15 mm all'esame obiettivo) a massive tanto da determinare alterazione locale dell'aspetto del paziente, disfunzione degli organi vicini per compressione o masse "bulky" (adenopatia di diametro maggiore di 10 cm). Le linfadenopatie sono presenti già alla diagnosi in circa 80% dei casi.

La splenomegalia, presente in circa il 50% dei casi di LLC, può essere massiva e sintomatica (dolore in ipocondrio sinistro, senso di ripienezza precoce post-prandiale), associata eventualmente a ipersplenismo con citopenie secondarie (1, 6, 23).

La LLC è meritevole di trattamento solo nei casi in cui sia presente almeno un criterio minimo indicato dalle vigenti linee guida IWCLL (i criteri sono sotto riportati) (3). Da qui si evince l'importanza di un'adeguata comunicazione con il paziente e la definizione del rischio prognostico utilizzando i marcatori clinici e biologici oggi disponibili (4, 24, 25).

La causa di morte nei pazienti affetti da LLC è solitamente attribuibile ad una causa intercorrente, soprattutto nei soggetti più anziani, già gravati da altre comorbidità. I decessi realmente correlabili alla LLC sono solitamente causati dall'insorgenza di una complicanza legata alla malattia o al suo trattamento (6, 23).

1.4.1 Complicanze:

Nel 10-25% dei casi la LLC può essere complicata dall'insorgenza di un disordine autoimmune, dovuto, nella maggior parte dei casi, alla produzione di autoanticorpi diretti contro antigeni espressi sulle cellule del sangue periferico (Tabella 2).

Tab. 2: Complicanze autoimmuni nella LLC

Ematologiche

Test di Coombs +/-
Anemia emolitica
Trombocitopenia autoimmune
Aplasia pura della serie rossa
Neutropenia autoimmune

Non ematologiche

Angioedema
Pemfigoide bolloso/Pemfigo paraneoplastico
Sindrome di Churg-Strauss
Tiroidite autoimmune
Sindrome nefrosica (glomerulo nefrite)
Polineuropatia
Sindrome di Sjogren
Lupus eritematoso sistemico
Sindrome di Raynaud
Artrite reumatoide
Colite ulcerosa
Vasculiti

Infatti, l'anemia emolitica autoimmune rappresenta la forma più frequente di patologia autoimmunitaria associata alla LLC e si rileva con una maggiore prevalenza nei casi con rischio elevato (stadi avanzati, forme in progressione e con IgVH non mutato). Invece, il 2% dei pazienti affetti da LLC sviluppa un quadro di porpora trombocitopenica immune (ITP).

Si definisce Sindrome di Evans la contemporanea presenza di ITP ed anemia emolitica autoimmune, spesso presente nei casi di LLC complicata da eventi disimmuni.

Secondo gli studi pubblicati in letteratura lo sviluppo di autoimmunità nella LLC può essere spiegato dalla presentazione di antigeni aberranti da parte delle cellule leucemiche (26).

I pazienti affetti da LLC sono maggiormente predisposti allo sviluppo di complicanze infettive per l'alterazione del sistema immunitario indotta dalla malattia stessa (Tabella 3).

Tab. 3: Difetti immunitari nella LLC

Primari

Difetti delle cellule B

- Ipogammaglobulinemia
- Scarsa risposta alla vaccinazione

Difetti delle cellule T

- Quantitativi: aumento di numero
- Qualitativi:
 - Diminuito rapporto CD4/CD8
 - Polarizzazione Th2
 - Anomala risposta CD30
 - Difetto acquisito reversibile del CD40L
 - Anomalie nell'espressione genica (citoscheletro, granuli)

Cellule NK

- Mancanza di granuli
- Ridotta attività di Killing

Neutrofilii

- Ridotta attività fagocitica e battericida
- Migrazione e chemiotassi anomale

Monociti/macrofagi

- Ridotta citotossicità

Complemento

- Riduzione dei livelli e difetto di attivazione e legame

Secondari

Insufficienza midollare a causa della patologia avanzata

Tossicità della terapia

L'evento infettivo rappresenta la principale causa di morte nei pazienti affetti da LLC soprattutto con malattia di lunga durata, sottoposti numerose linee di terapia e con malattia attiva. Le forme più comuni di infezione sono quelle batteriche delle basse vie respiratorie (soprattutto *Streptococcus Pneumoniae*, *Staphilococcus Aureus* e *Haemophilus Influenzae*) con un rischio sia per frequenza sia per gravità direttamente correlabile al basso dosaggio delle immunoglobuline, soprattutto di tipo IgG. Invece, nelle LLC sottoposte a chemioimmunoterapia sono più frequenti le infezioni opportunistiche da germi atipici, da miceti e riattivazioni virali (come ad esempio, la riattivazione di CMV nei pazienti sottoposti a terapia con Alemtuzumab) (26).

Un altro gruppo di complicanze, tipiche soprattutto delle fasi più avanzate di malattia, sono quelle legate all'evoluzione della LLC in un disordine linfoproliferativo B più aggressivo sul piano clinico e biologico come nel caso della Sindrome di Richter e della Leucemia Prolinfocitica (1).

Nel 1928 Maurice N. Richter descrisse per la prima volta un quadro di linfoma aggressivo in un paziente affetto da LLC (27).

La classificazione WHO 2008 definisce la Sindrome di Richter (SR) come l'evoluzione di un quadro di LLC in un linfoma più aggressivo rappresentato nella maggior parte dei casi da un Linfoma non Hodgkin B diffuso a grandi cellule (DLBCL) e solo in una minoranza da

un Linfoma di Hodgkin (LH) (2). La SR si verifica nel 2-10% delle LLC, indipendentemente dal precedente trattamento (nel 50% in casi di LLC mai trattata). La mediana di tempo dalla diagnosi di LLC all'evoluzione in SR è compresa tra 1.8 e 5 anni (Figura 1.4.1a).

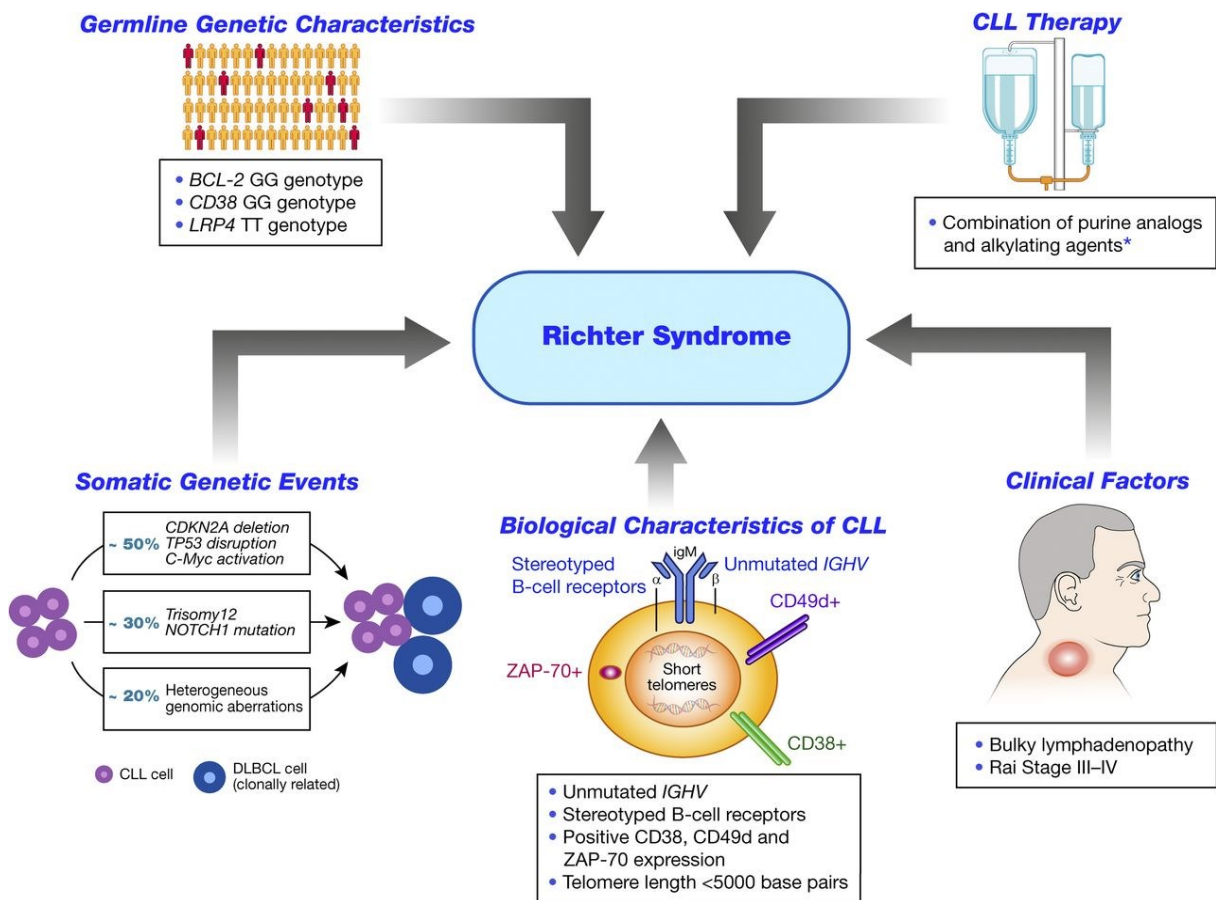


Figura 1.4.1a Fattori di rischio associati allo sviluppo della **Sindrome di Richter** in pazienti con **LLC** (da Sameer A et al. Blood 2014)

Clinicamente la SR si caratterizza per la rapida comparsa di specifici segni e sintomi (febbre elevata, linfadenomegalie, calo ponderale, localizzazioni extranodali come ad esempio a SNC, occhi, testicoli e polmoni, lesioni osteolitiche) e di anomalie ematochimiche (rialzo LDH, componente monoclonale alla diagnosi, ipercalcemia).

La diagnosi si basa sul dato istologico (spesso con biopsia guidata da PET) e, come in tutti i linfomi, è indicata una stadiazione completa (TAC total body, PET, biopsia ossea ed eventuale rachicentesi esplorativa) per guidare la scelta del trattamento specifico.

Lo studio molecolare dei DLBCL evoluti da LLC permette di isolare due sottocategorie: una con “clone correlato” alla LLC (80% dei casi) ed una con “clone non correlato” (20%). Dal punto di vista prognostico la prima sottocategoria possiede una mediana di sopravvivenza inferiore rispetto a quella di un DLBCL di nuova diagnosi (8-14 mesi), mentre nella seconda è comparabile (circa 62 mesi).

Inoltre, lo studio genomico permette di stratificare ulteriormente le SR in 3 diversi sottotipi: nel primo si rileva l'acquisizione di mutazioni di *TP53*, *C-MYC*, *CDKN2A* (50% dei casi); nel secondo (30%) mutazioni di *NOTCH-1* e trisomia 12; nel terzo un profilo di aberrazioni genomiche eterogenee. Il dato maggiormente rilevante è quindi che le

mutazioni a carico di TP53 e CDKN2A sarebbero mutualmente esclusive rispetto alle alterazioni di NOTCH-1 e alla trisomia 12 (27).

Più di rado la LLC si può trasformare in un quadro di Leucemia Prolinfocitica (definita anche come “trasformazione prolinfocitoide”). Questa diagnosi viene posta quando il numero dei prolinfociti alla formula leucocitaria eseguita su sangue periferico al microscopio ottico è superiore al 55% dei leucociti; tali cellule sono differenziabili anche con lo studio immunofenotipico dai linfociti tipici della LLC soprattutto per l’espressione ad elevata intensità delle immunoglobuline di superficie (Figura 1.4.1b).

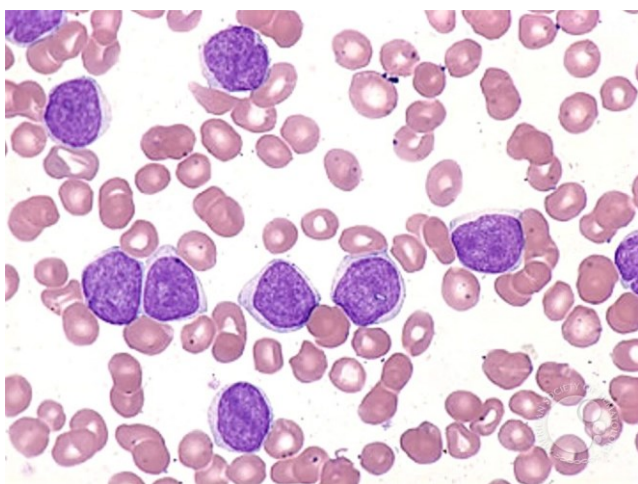


Figura 1.4.1b Leucemia prolinfocitica allo striscio di sangue periferico

Il quadro clinico rileva inoltre un netto decadimento clinico del paziente con riduzione del Performance Status, tendenziale refrattarietà ai trattamenti e splenomegalia ingravescente. In questi pazienti la prognosi è particolarmente infausta poiché la mediana di sopravvivenza è di circa 14 mesi (1,6).

Inoltre, i pazienti affetti da LLC presentano un rischio aumentato (maggiore di 1.2-2 volte rispetto a soggetti della popolazione generale di uguale età) di sviluppare una seconda neoplasia solida di cui le più frequenti sono quelle a carico della prostata, della mammella, del sistema gastrointestinale, del polmone e, infine, il melanoma. Il rischio correla sia con fattori legati al paziente come età avanzata e sesso maschile, sia con i dati laboratoristici (ad esempio elevati livelli serici di LDH e beta-2 microglobulina, creatinina). Invece, non è mai stata dimostrata alcuna correlazione tra rischio di sviluppare seconde neoplasie solide ed uno specifico tipo di trattamento. Al contrario, il rischio di seconde neoplasie ematologiche quali sindromi mielodisplastiche e leucemie acute secondarie è aumentato se il paziente affetto da LLC è stato sottoposto a regimi chemioterapici contenenti agenti alchilanti o analoghi delle purine (1).

1.5 Diagnosi

I vigenti criteri diagnostici proposti dalle linee guida NCI-WG e IWCLL richiedono la presenza continuata per almeno tre mesi di linfocitosi assoluta B clonale con valori maggiori di 5.000/ μ l nel sangue periferico e un’infiltrazione linfocitaria maggiore del 30% di tutte le cellule nucleate nel midollo osseo (Tabella 4).

Tab. 4: Valutazione diagnostica della LLC

Test per stabilire la diagnosi
Emocromo •> 5x10 ⁹ /L linfociti circolanti
Conta differenziale al microscopico ottico •Prevalenza di piccoli linfociti; linfociti clivati, grandi linfociti e/o prolinfociti <55% •Ombre di Gumprecht
Immunofenotipo dei linfociti •Espansione clonale di elementi CD5+, CD19+, CD23+ con restrizione per le catene leggere del Ig (score immunofenotipico ≥ 3)
Valutazione alla diagnosi e/o prima del trattamento
Anamnesi ed esame obiettivo, performance status
Conta completa e differenziale delle cellule ematiche
Aspirato midollare e biopsia •nel caso l'obiettivo della terapia sia la remissione completa •per la diagnosi differenziale di eventuali citopenie
Esami di laboratorio sierici, inclusa LDH e β2-microglobulina, immunoglobuline sieriche, test diretto antiglobuline
Radiografia del torace ed ecografia dell'addome
Indagine FISH/molecolare •da effettuarsi qualora sia importante ottenere una informazione prognostica •ricerca di 17-p/TP53 mutazioni, 11q-, traslocazioni 14q32/IgH, trisomia 12, del(6q), del(13q), cariotipo su linfociti del sangue periferico •17p- merita approccio terapeutico diverso, che può includere, in casi selezionati, il trapianto allogenico di midollo, possibilmente nell'ambito di un trial clinico.
Stato mutazionale IgVH e CD38 •utile perché fornisce una informazione prognostica •ZAP-70 non ancora standardizzato

Le linee guida suggeriscono un'accurata raccolta dei dati anamnestici del paziente ed una precisa stima del Performance Status poiché anche su quest'ultimo si basa la scelta della tipologia del trattamento, valutando un possibile inserimento in trial clinici, in caso di progressione di malattia. Infatti, i pazienti possono essere suddivisi in tre categorie di rischio in base al PS ("go-go", "slow-go" e "no-go") per la scelta della migliore strategia terapeutica (3).

Il Performance Status può essere definito con il sistema Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (Tabella 5) e/o con la scala Karnofsky (Tabella 6).

Grado	ECOG
0	Completamente attivo e in grado di eseguire tutte le attività precedenti alla malattia senza limitazioni
1	Limitato nelle attività fisicamente ardue ma in grado di eseguire lavori leggeri o sedentari
2	Capace di provvedere completamente a sé stesso, ma incapace di eseguire attività lavorative di qualsiasi grado. In piedi per più del 50% delle ore di veglia.
3	Capace di provvedere a sé stesso solo limitatamente. Confinato a letto o in poltrona per più del 50% delle ore di veglia.
4	Completamente inabile. Non in grado di provvedere a sé stesso. Completamente confinato a letto o in poltrona.
5	Decesso

Tab. 5 Score ECOG

Grado	Definizione
100	Normale, nessun disturbo, nessun segno di malattia
90	Capace di eseguire le attività normali, sintomi o segni minimi di malattia
80	Capace di eseguire le attività normali con difficoltà, alcuni sintomi o segni di malattia
70	Autosufficiente; incapace di eseguire le attività normali o di espletare attività lavorative attive
60	Necessità di assistenza occasionale, ma capace di provvedere alla maggior parte delle proprie necessità
50	Necessità di assistenza notevole e di frequenti cure mediche
40	Inabile; necessita di cure e di assistenza particolari
30	Gravemente inabile, è indicato il ricovero ospedaliero; la morte non è imminente
20	Molto debilitato, ricovero ospedaliero indispensabile, necessita di terapia attiva e di supporto
10	Moribondo, rapida progressione di processi patologici fatali (p. es., metastasi endocraniche, emottisi massiva)

Tab. 6 Scala Karnofsky

Oggi i trial clinici richiedono nei pazienti anziani anche la valutazione delle comorbidità (“fitness”) e delle capacità funzionali del paziente calcolate con CIRS (“cumulative illness rating scale”) o score di “Charlson” (3).

L’esame obiettivo ha lo scopo di ricercare eventuali linfadenomegalie nelle comuni sedi di reperi superficiale (cervicale, sopraclaveare, ascellare, inguinale e femorale), splenomegalia, epatomegalia per un’adeguata stadiazione clinica della malattia con i sistemi di Rai e Binet (28, 29). Tipicamente le linfadenopatie provocate dalla LLC appaiono alla palpazione di consistenza aumentata, non dolenti, fisse e mobili rispetto ai tessuti sottostanti.

La conta emocromocitometrica rileva di norma un’inversione della formula. L’anemia secondaria all’infiltrazione midollare da parte della malattia è tipicamente di tipo iporigenerativo e quindi con una bassa conta reticolocitaria. Invece, il riscontro di anemia associata a reticolocitosi in un paziente affetto da LLC deve far sospettare un quadro di tipo emolitico e quindi una complicanza autoimmune. Per escludere la presenza di un quadro disimmune già alla diagnosi è importante eseguire il test di Coombs sia diretto sia indiretto così come la valutazione degli indici ematochimici di emolisi (bilirubina indiretta, ferritina, aptoglobina, LDH) (1, 6, 23).

Lo studio morfologico dello striscio di sangue periferico mostra i linfociti come elementi cellulari di piccole dimensioni ed aspetto maturo. La peculiarità della LLC

all'osservazione al microscopio ottico del sangue periferico è la presenza delle cosiddette "ombre di Gumprecht" e cioè di cellule che si sono degenerate per trauma meccanico durante l'allestimento del vetrino; secondo alcuni autori un elevato numero di tali elementi si associa ad una malattia clinicamente più aggressiva. Inoltre, la ricerca di elementi linfocitari atipici, come ad esempio prolinfociti e cellule linfoplasmocitoidi, consente di distinguere le due varianti di LLC proposte dalla classificazione FAB: la forma "classica" quando tali cellule rappresentano meno del 10% della formula leucocitaria e la forma "atipica" in caso contrario. A loro volta le LLC "atipiche" si possono distinguere in due varianti: la forma "prolinfocitica" per un numero di prolinfociti maggiore del 10% ma minore del 55% e la forma a "cellule di tipo misto" se presenti elementi a differenziazione linfoplasmocitica (1) (Figura 1.5.1a).

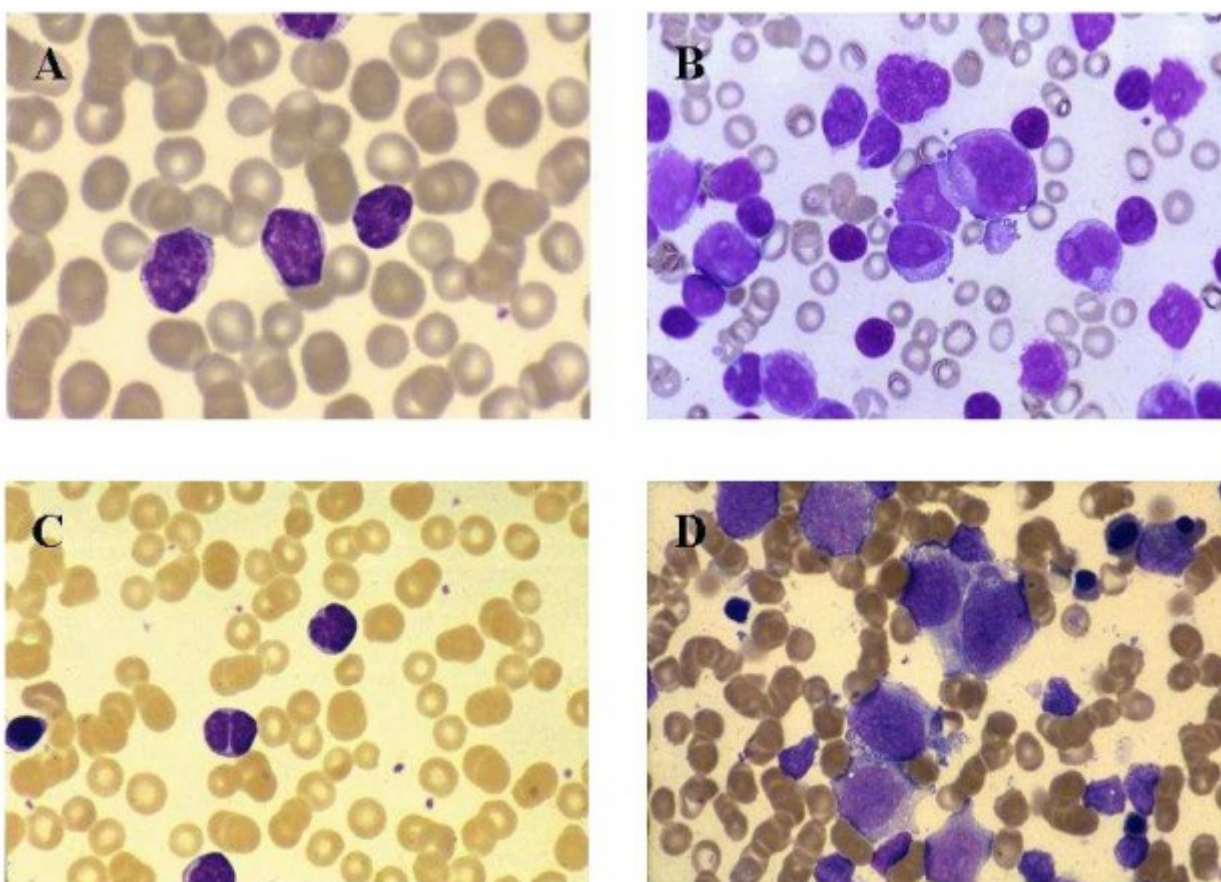


Fig. 1.5.1a: LLC classica in (A) con quadro monomorfo di piccoli linfociti; LLC di tipo LLC/PL in (B) (si noti la presenza di un pro linfocito); LLC a cellularità mista in (C); sindrome di Richter (D). (da Castoldi G, Liso V, Malattie del sangue e degli organi ematopoietici, V edizione; McGRAW-HILL)

Lo studio citologico o istologico del midollo osseo non è riportato come una procedura necessaria alla diagnosi pur essendo un'infiltrazione linfocitaria di almeno 30% di tutte le cellule nucleate un criterio diagnostico minimo. La valutazione del tessuto midollare diventa cruciale in caso di citopenia e quindi per stabilire se la causa sia unicamente da attribuire alla progressione della LLC o, in caso contrario, l'eziologia sia indipendente dalla leucemia (3). Nel 30% dei casi l'infiltrato leucemico a livello midollare assume una configurazione "diffusa" che si associa a quadri di LLC in stadi clinici avanzati e rappresenta di per sé un fattore prognostico negativo (1).

Lo studio immunofenotipico del sangue periferico con metodiche di citofluorimetria è fondamentale per porre diagnosi di LLC poiché consente di definire la natura clonale clonale della linfocitosi e se i marcatori di superficie sono quelli tipicamente associati alla malattia.

La clonalità viene stabilita in base al pattern di espressione delle catene leggere kappa o lambda poiché le cellule leucemiche esprimono in modo restrittivo uno dei due tipi. Le cellule della LLC si caratterizzano per l'espressione contemporanea dell'antigene T cellulare CD5 ed i marcatori B cellulari CD19, CD20 e CD23; per CD20 e CD79b a bassa intensità rispetto alle cellule B normali così come per le catene leggere delle immunoglobuline.

In caso di conferma della natura monoclonale della linfocitosi, si applica lo score immunofenotipico di Matutes et al che valuta l'espressione di cinque diversi marcatori di superficie (viene conferito un punto ad ogni marcatore per CD5+, CD23+, CD22/CD79a debole, immunoglobuline di superficie debole e FMC7-; 0 in caso contrario). Secondo questo score si definisce una LLC quando la somma finale è maggiore o uguale a 3 permettendo quindi di differenziare tale malattia da altri disordini linfoproliferativi cronici a cellule B (30).

Lo studio citofluorimetrico consente inoltre, dopo il trattamento, lo studio della malattia minima residua (3).

Gli esami ematochimici sono importanti alla diagnosi ed al momento della progressione della malattia poiché permettono di valutare la funzionalità epato-renale del paziente e quindi la capacità di tollerare o meno una chemioimmunoterapia intensiva. Inoltre, il dosaggio sierico di LDH e beta-2 microglobulina concorre alla stratificazione del rischio poiché se elevato si associa ad una malattia più aggressiva.

Nel 5% di tutti i casi di LLC i pazienti presentano un picco monoclonale all'elettroforesi delle proteine solitamente costituito da IgM, più di rado da IgG o IgA. Invece, più frequente (circa 50-70% dei casi) è il riscontro di un'ipogammaglobulinemia soprattutto nelle fasi più avanzate di malattia e nei soggetti pluritrattati che si associa ad un rischio maggiore di sviluppare una complicanza infettiva; è in questi casi indicato dosare le singole immunoglobuline (IgG, IgM, IgA).

L'aumentato rischio infettivo giustifica anche la ricerca di eventuali infezioni e soprattutto lo studio sierologico per HBV, HCV, HIV e CMV per valutare la necessità di innestare, ove possibile, una terapia antivirale di profilassi al momento del trattamento.

Metodiche strumentali come l'ecografia addominale e la radiografia del torace sono utilizzate per escludere la presenza di patologie intercorrenti e consentono inoltre una migliore descrizione della diffusione della malattia con lo studio di linfonodi profondi e degli organi ipocondriaci. Lo studio con TC total body è suggerito dalla vigenti linee guida solo alla progressione di malattia ed in particolare quando l'obiettivo terapeutico è l'ottenimento di una risposta completa (solitamente pazienti partecipanti a trial clinici). In caso di sospetta progressione di malattia in una sindrome di Richter può essere indicato lo studio radiometabolico con PET anche per guidare in un secondo momento la sede in cui eseguire la rivalutazione istologica della malattia (3).

Alla diagnosi è inoltre importante lo studio dei principali marcatori biologici della malattia per definirne il rischio prognostico con metodiche citofluorimetriche (CD38 e ZAP-70), molecolari (IgVH e TP53) e citogenetiche/FISH, che presenteremo estesamente i seguito. Tali indici andranno poi ripetuti alla progressione anche per guidare la scelta del

trattamento più adeguato, ad eccezione di IgVH che rimane costante nel tempo. Lo studio FISH/citogenetico è inoltre utile nella diagnosi differenziale con altri disordini linfoproliferativi B nei casi dubbi (ad esempio, il riscontro di t(11;14) che si associa al Linfoma mantellare) (3).

1.5.1 Diagnosi Differenziale

Una linfocitosi all'esame emocromocitometrico può essere attribuita ad un quadro reattivo e quindi secondario ad esempio un'infezione virale intercorrente, come in caso di sindrome mononucleosica. In questi casi, si riscontra soprattutto in soggetti di giovane età, e la linfocitosi è transitoria e policlonale. Al contrario, l'esordio della LLC avviene in età adulta-avanzata, con una linfocitosi persistente nel tempo (criterio minimo temporale di almeno 3 mesi) e con carattere monoclonale (6). Lo studio immunofenotipico dei linfociti del sangue periferico con il calcolo del Score Matutes, consente di differenziare la LLC da altri disordini linfoproliferativi (30) (Tabella 7).

Tab. 7: Caratterizzazione immunofenotipica dei disordini linfoproliferativi cronici a cellule B

	CLL	PLL	HCL	SLVL	MCL	FL
sIg	-/+	+++	++	++	++	++
CD5	+	-	-	-	+	-
CD23	+	-	-/+	-	-	-/+
FMC7	-	+	+	+	+	+
CD22	-/+	+	+	+	+	+
CD10	-	-	-	-	-/+	+
CD79b	-	+	-/+	+	+	+

Abbreviazioni. PLL: leucemia prolinfocitica; HCL: leucemia a cellule capellute; SLVL: linfoma splenico con linfociti villosi; MCL: linfoma mantellare; FL: linfoma follicolare; -: l'antigene non è espresso; +/-: debole espressione; +: espressione; ++: forte espressione; +++: espressione molto forte.

La diagnosi differenziale con altri disordini linfoproliferativi a cellule B si completa con la ricerca di aberrazioni citogenetiche specifiche alla FISH come la t(11;14)(q13;q34) con conseguente riarrangiamento di BCL1 patognomica del linfoma mantellare o la t(14;18) con riarrangiamento di BCL2 come nel linfoma follicolare (6).

Le vigenti linee guida indicano inoltre la distinzione tra quadri di LLC da quelli di Linfocitosi B monoclonale (MBL) e quelli di Linfoma a piccoli linfociti (SLL) (3).

La diagnosi di MBL richiede una linfocitosi clonale con immunofenotipo uguale a quello della LLC, persistente nel tempo ma con conta assoluta inferiore a 5.000/ μ l in assenza di linfadenopatie, organomegalia, citopenie o sintomi correlabili alla malattia. Tale disordine può precedere molte volte un quadro conclamato di LLC e può trasformarsi in essa a un tasso dell'1-2% annuo.

Il riscontro di una linfocitosi B clonale inferiore a 5.000/ μ l e contemporaneamente di adenopatie, organomegalie, citopenie o sintomi sistemici di tipo B indica la diagnosi di SLL; in tale caso è indicata la biopsia per la conferma istologica della diagnosi.

1.6 Fattori Prognostici

Lo studio della biologia della LLC ha mutato nel tempo la concezione della malattia. Inizialmente, come detto sopra, la LLC veniva considerata come una patologia omogenea caratterizzata esclusivamente dall'accumulo di cellule B incapaci di andare incontro ai normali processi di morte cellulare. Oggi, invece, la linfocitosi tipica della malattia si ritiene determinata anche da un'augmentata capacità di proliferazione delle stesse cellule (12, 21). Questa eterogeneità biologica si traduce nei linfociti clonali con un'ampia variabilità in morfologia, immunofenotipo, citogenetica, caratteristiche molecolari e si riflette in un decorso clinico e una risposta al trattamento altrettanto diversi (31). Infatti, la sopravvivenza dei pazienti affetti da LLC varia da meno di 1-2 anni a più di 15 anni (32). Inoltre, mentre circa un terzo dei pazienti non richiederà mai un trattamento specifico anche dopo un follow up maggiore di 20 anni, altri possono necessitare di una terapia a breve distanza dalla diagnosi. Inoltre, circa 1-3% delle LLC può evolvere in un linfoma non Hodgkin B ad alto grado (Sindrome di Richter) o può trasformarsi in una leucemia prolinfocitica (31) (Figura 1.6a).

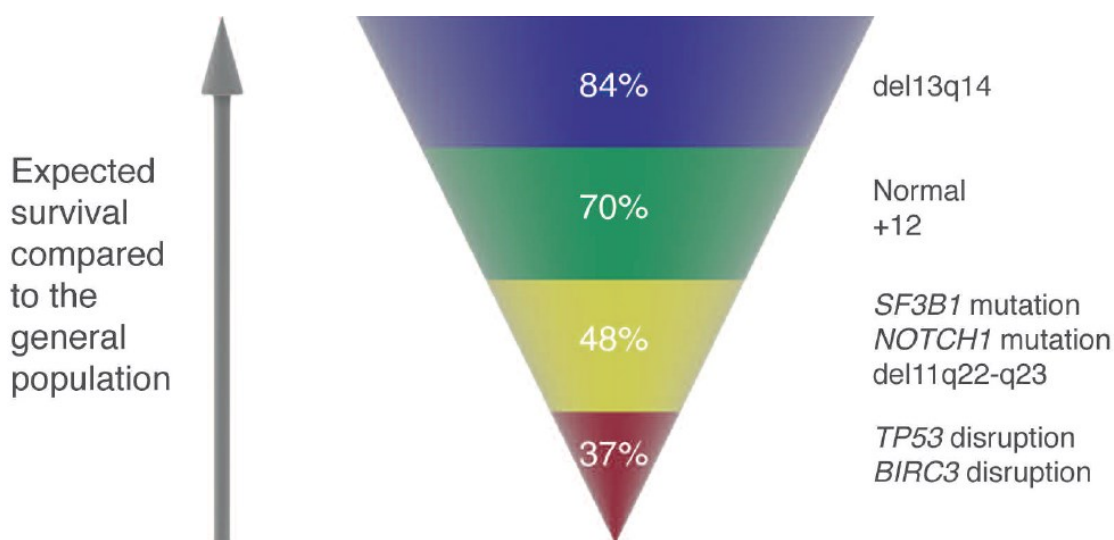


Figura 1.6a *Aspettativa di sopravvivenza nei pazienti con LLC stratificata in base ai modelli di rischio citogenetici e molecolari e comparata alla popolazione generale. Aspettativa di vita calcolata a 10 anni. (da Foà R et al. Haematologica 2013)*

Diversi marcatori clinici e biologici sono stati identificati per riuscire a stabilire in modo adeguato la prognosi e in particolare sopravvivenza libera da terapia (TFS, treatment free survival) e sopravvivenza globale (OS, overall survival). Solitamente alla diagnosi, ancora oggi, si utilizzano i classici sistemici di stadiazione Rai e Binet, basati unicamente su dati clinici, poiché permettono di identificare i pazienti con malattia in stadio avanzato e quindi con TFS e OS più brevi. Tuttavia, questi sistemi non consentono di stratificare in modo adeguato il rischio dei pazienti con malattia in stadio precoce, non identificano la chemiorefrattarietà e non guidano le scelte terapeutiche. Per supplire a tali mancanze, sono stati studiati diversi potenziali marcatori prognostici biologici rilevabili con tecniche di analisi citofluorimetriche e citogenetiche, FISH e biologia molecolare (4) (Tabella 8).

Tab. 8: Parametri clinici e biologici con significato prognostico nella LLC

Caratteristiche	LLC a basso rischio	LLC ad alto rischio
Stadio clinico Binet	A	B, C
Stadio clinico Rai	0	I, II, III, IV
Conta Globuli Bianchi	$< 5 \times 10^9/L$	$> 5 \times 10^9/L$
Prolinfociti nel sangue periferico	$< 10\%$	$> 10\%$
Infiltrazione midollare	Pattern non diffuso	Pattern diffuso
Doubling time	> 12 mesi	< 12 mesi
Citogenetica	Normale; del(13q) isolata	Del(11q); del(17p); +12, cariotipo complesso
CD38	$< 30\%$	$> 30\%$
IgVH geni	Mutati	Non mutati
ZAP-70 (% cellule positive)	$< 20\%$	$> 20\%$
Marcatori sierici (TK, sCD23, $\beta 2M$),	normali	Incrementati
TP53	Normale	Mutato
hTERT	Bassi o Indeterminabili	Alti livelli

Tali marcatori prognostici riflettono le proprietà biologiche di ogni singolo caso di LLC descrivendo direttamente le specifiche proprietà delle cellule della LLC o indirettamente valutando l'influenza del microambiente dell'ospite sulle stesse cellule della malattia (33). Il potere predittivo del rischio di ciascun marcatore prognostico è dipendente dal momento specifico della malattia in cui viene valutato. Per tale ragione, alcuni marcatori vengono studiati solo alla diagnosi mentre altri anche in momenti diversi della malattia come ad esempio alla progressione (33). L'importanza della stratificazione prognostica dei pazienti è cruciale, soprattutto nell'era del trattamento moderno della LLC. Presenteremo di seguito una carrellata dei principali fattori prognostici utilizzati nella LLC. Dedicheremo invece alla discussione dei fattori prognostici in quanto elementi in grado di guidare la scelta ragionata della terapia un intero capitolo illustrativo di lavori di ricerca clinica eseguiti presso il nostro Istituto.

1.6.1 Stadiazione Clinica

L'elevata variabilità nella probabilità di progressione e nell'incidenza di complicanze dipendenti dalla malattia tra i soggetti affetti da LLC dimostra la necessità di individuare dei parametri clinico-laboratoristici capaci di stratificarne il rischio.

I primi metodi di stadiazione con valore prognostico validato, tanto da essere utilizzati di routine ancora oggi, si basano su dati clinici e sono rappresentati dal sistema di Rai (28) e da quello di Binet (29).

Il sistema di Rai è stato pubblicato nel 1975 ed identifica cinque diversi stadi clinici in base alla presenza di linfocitosi, linfadenopatia, organomegalia e citopenie (anemia con valori di emoglobina < 11 g/dl, piastrinopenia con conta $< 100.000/\mu l$).

In particolare, lo stadio 0 comprende pazienti caratterizzati unicamente da linfocitosi nel sangue periferico e/o nel midollo osseo (sopravvivenza media > 150 mesi), stadio I se comparsa anche di linfadenomegalie palpabili (sopravvivenza media 101 mesi), stadio II

se epatomegalia o splenomegalia (sopravvivenza media 71 mesi), stadio III se riscontro di anemia (sopravvivenza media 19 mesi) e quindi stadio IV se piastrinopenia (19 mesi). Nel 1987 questo sistema è stato riorganizzato riducendo i cinque gruppi a tre categorie: basso rischio (stadio 0) con 150 mesi di sopravvivenza media, rischio intermedio (stadio I e II) con sopravvivenza media di 90 mesi ed alto rischio (stadio III e IV) con sopravvivenza media di 19 mesi (34).

Il sistema Rai è stato ulteriormente modificato con la pubblicazione delle raccomandazioni NCI-IWCLL in cui si definisce con linfocitosi una conta di almeno 5.000/ μ l e/o una percentuale maggiore del 30% di linfociti B clonali nel sangue periferico e/o nel midollo osseo (nel sistema di Rai originario si consideravano come valori soglia 15.000/ μ l linfociti in valore assoluto nel sangue periferico e 40% di tutte le cellule nucleate nel midollo osseo) (3).

Ad oggi lo studio di linfadenopatie e/o organomegalie viene eseguito unicamente all'esame obiettivo poiché rimane ancora dubbia la capacità di metodiche strumentali, soprattutto per la TAC, di modificare la prognosi dei gruppi di rischio definiti dal sistema Rai (3).

Nel 1987 Binet et al (29) pubblicarono un altro sistema di stadiazione clinica, simile dal punto di vista concettuale a quello di Rai, ma capace di stratificare i pazienti in sole tre categorie di rischio. Lo stadio C, il più avanzato, comprende i pazienti con anemia (emoglobina inferiore a 11 g/dl nei maschi e inferiore a 10 g/dl nelle femmine) e/o piastrinopenia (conta piastrinica inferiore a 100.000/ μ l) come segno di insufficienza midollare (sopravvivenza media minore a 2 anni). Diversamente la distinzione tra lo stadio A e B si basa unicamente per il numero delle aree linfoidi ingrandite (5 regioni: linfonodi cervicali, ascellari, inguinofemorali, o milza o fegato). Il gruppo A caratterizzato da una sopravvivenza media maggiore di 7 anni è definito dall'interessamento di meno di tre aree linfoidi, mentre lo stadio B richiede il coinvolgimento di almeno tre aree e si associa ad una sopravvivenza minore di 5 anni (Tabella 9).

Gruppo di rischio	Caratteristiche	Sopravvivenza mediana nel Rai report originale (n = 125)	Sopravvivenza mediana in accordo con lo stadio Rai al Mayo Clinic CLL Database* (n = 2397)
Basso	0 Rai A Binet Solo linfocitosi < 3 LN aree coinvolte, non citopenia	150 mesi	130 mesi
Intermedio	I Rai B Binet + Linfadenopatia ≥ 3 LN aree coinvolte, non citopenia	101	106
	II Rai B Binet + Organomegalia ≥ 3 LN aree coinvolte, non citopenia		
Alto	III + Anemia	19	58
IV Rai	+ trombocitopenia**		
C Binet	Anemia+/- trombocitopenia + Trombocitopenia	19	69

*Tutti i pazienti con LLC sono stati visti al Mayo Clinic Division of Hematology dal 1995 (Shanafelt T, ASH educational book, 2009).
**Hb < 11 g/dL a causa dell'infiltrazione midollare, conta piastrinica <100 x 10⁹/L a causa dell'infiltrazione midollare

Tab. 9 Stadiazione clinica LLC con sistemi di Rai e Binet e stratificazione in gruppi di rischio

Entrambi questi sistemi di stadiazione clinica permettono quindi non solo di definire la prognosi dei pazienti ma anche di identificare quando è opportuno iniziare un trattamento nei singoli casi poiché secondo le attuali raccomandazioni NCI-IWCLL la presenza di anemia e/o piastrinopenia (stadi Rai III-IV e C Binet) rappresenta un'indicazione al trattamento (3).

1.6.2 Analisi citofluorimetrica

L'analisi citofluorimetrica a flusso è una metodica diagnostica fondamentale per lo studio del fenotipo delle cellule del sangue periferico che utilizza specifici anticorpi monoclonali marcati con fluorocromi capaci di riconoscere antigeni sia di membrana cellulare che citoplasmatici. Il citofluorimetro con l'utilizzo di biglie coniugate con quantità note di fluorescina permette inoltre di pesare l'intensità dell'espressione di un particolare antigene e la sua densità.

Solitamente l'analisi citofluorimetrica viene eseguita su sangue periferico ma può essere applicata anche in campioni ottenuti dopo separazione per gradiente di densità.

Una popolazione particolare di cellule può essere studiata applicando contemporaneamente più anticorpi monoclonali con differenti citofluorocromi diretti contro diversi antigeni di superficie; questo è soprattutto utile nello studio della malattia minima residua (35).

Confermata la diagnosi di LLC tramite l'applicazione del pannello dello score Matutes, l'analisi verrà implementata con anticorpi monoclonali diretti contro CD38, ZAP-70 e CD49d che rappresentano dei marcatori cellulari con significato prognostico noto.

1.6.2.1 CD38

L'espressione di CD38 sulle cellule B fisiologicamente varia in base alla fase di maturazione della cellula, del suo stato di attivazione e del contesto in cui la cellula viene stimolata (36, 37).

Nel clone LLC la percentuale di cellule esprimenti il CD38 è un indice del grado di attivazione cellulare del clone stesso. Questo significa quindi che se CD38 è espresso in un numero di cellule leucemiche al disopra di un determinato "cut-off", il clone LLC sarà costituito prevalentemente da cellule sensibili all'attivazione o già attivate e quindi più aggressive. Inoltre, dai risultati ottenuti studiando le cellule LLC con l'incorporazione di deuterio marcato, si è evidenziato come in esse l'espressione di CD38 muti in base alla fase del ciclo cellulare. In particolare, il CD38 verrebbe transitoriamente espresso dalle cellule in fase proliferativa e poi verrebbe perduto e quindi potrebbe essere correlato con l'evento dell'evoluzione clonale nella storia della malattia. Inoltre, questo dato concorda con l'elevata associazione tra l'espressione di CD38 con altri marcatori di attivazione e proliferazione come ZAP70, Ki-67 e lo stato mutazionale IgVH pur mantenendo un significato prognostico indipendente da essi.

È al momento ancora dibattuto il valore di "cut-off" per stabilire la positività o negatività di un campione; è oggi in un intervallo compreso tra 7% e 30% in base al gruppo di lavoro (il "cut-off" più frequentemente utilizzato è quello del 30%). Questo riflette la mancata omogeneità nei diversi laboratori ad indagare l'espressione di CD38, così come di ZAP-70 e CD49d, e anche l'elevata variabilità di espressione del marcatore nelle diverse fasi della malattia (33).

Sul piano prognostico i casi di LLC definiti CD38 positivi presentano una prognosi peggiore con riduzione della sopravvivenza. Lo studio dell'espressione di CD38 permette

così di individuare nel gruppo di pazienti clinicamente a basso rischio (Rai 0-II) quelli con rischio maggiore (37) (Figura 1.6.2.1a).

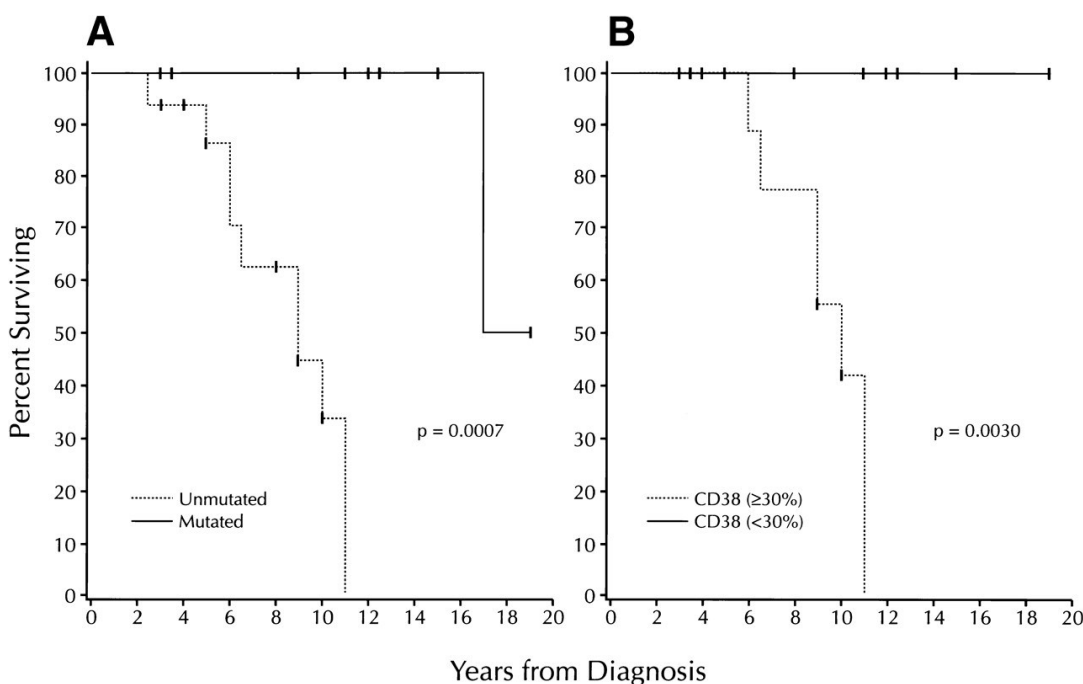


Figura 1.6.2.1a Stratificazione della sopravvivenza di pazienti con LLC con rischio Rai intermedio in base a espressione stato mutazionale IgVH (figura A) e CD38 (figura B) (da Damle RN et al Blood 1999)

Inoltre, i casi CD38 positivi presentano spesso caratteristiche sfavorevoli sia cliniche (forme a morfologia atipica, infiltrazione midollare di tipo diffuso, elevata linfocitosi) (38) sia citogenetiche/FISH (più frequentemente 11q e 17p) sia molecolari (IgVH non mutato) (33).

1.6.2.2 ZAP-70

ZAP-70 è un enzima intracellulare che in condizioni fisiologiche si ritrova unicamente nei linfociti T in cui gioca un ruolo fondamentale nell'attivazione cellulare antigeni-dipendente. In realtà, esso viene anche espresso nelle cellule LLC, soprattutto nei casi caratterizzati da IgVH non mutato e da positività per CD38 (39). Nonostante la concordanza con gli altri marcatori prognostici considerati, l'espressione di ZAP-70 nel clone leucemico mantiene un significato prognostico indipendente per sopravvivenza e tempo al trattamento (TTT) (34, 40) (Figura 1.6.2.2a).

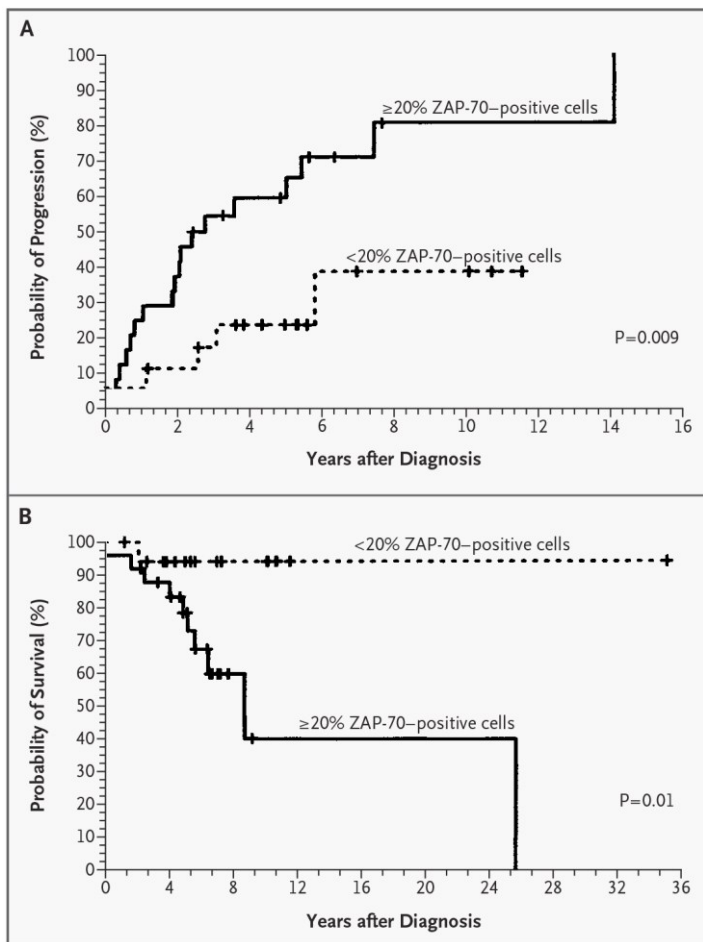


Figura 1.6.2.2.a Curve di Kaplan-Meier di stima del rischio di progressione della LLC (figura A) e della sopravvivenza (Figura B) in LLC in stadio Binet A in base ai livelli di espressione di ZAP-70) (da Crespo M et al NEJM 2003)

ZAP-70 agisce potenziando la via del segnale mediata dal BCR poiché sembra ritardare l'internalizzazione di alcune componenti di membrana del recettore (sIgM e CD79b) prolungandone quindi l'attivazione. Inoltre, ZAP70 gioca un ruolo fondamentale nel microambiente tumorale poiché può promuovere la proliferazione e la sopravvivenza cellulare regolando le interazioni tra chemochine e BCR. Nella nicchia tumorale ZAP-70 inibisce l'apoptosi poiché favorisce l'espressione di molecole di adesione come CD49d. L'espressione di ZAP-70 viene definita positiva se è maggiore del valore di "cut-off" del 20%. Anche l'analisi di questo marcatore è in realtà suscettibile a variabilità nei diversi laboratori, soprattutto perché si localizza nell'ambiente intracellulare (33).

1.6.2.3 CD49d

Nella nicchia tumorale lo stimolo alla sopravvivenza delle cellule leucemiche viene mediato dal legame tra le integrine (ad esempio VLA-4, CD49d) espresse sulla superficie delle cellule LLC ed i loro ligandi (come VCAM1 e fibronectina) presenti sugli elementi stromali midollari (41).

In particolare, CD49d è una subunità α -integrina ($\alpha 4$) che associandosi al CD29 (subunità $\beta 1$) permette la costituzione di un'integrina completa ($\alpha 4\beta 1$) capace di legare VCAM-1 e fibronectina. $\alpha 4\beta 1$ come le altre integrine regola le mobilità dei leucociti e può favorire

L'attivazione e quindi la sopravvivenza cellulare in seguito alla stimolazione indotta dagli elementi stromali del microambiente (33).

CD49d esercita la sua azione anti-apoptotica sulle cellule LLC attraverso "upregulation" di Bcl-2. Uno studio eseguito in vitro ha inoltre dimostrato come la stimolazione di CD49d induca nelle cellule leucemiche una riduzione dell'apoptosi non solo spontanea ma anche farmaco-indotta (soprattutto fludarabina-indotta) (42).

L'espressione di CD49d nelle cellule LLC viene valutata con lo studio citofluorimetrico a tre colori ed è stato stabilito un cutoff $\geq 30\%$ per definirne la positività (33).

CD49d nella LLC rappresenta un marcatore prognostico indipendente che combinato con CD38, ZAP-70 e lo stato mutazione IGHV migliora la capacità di previsione di TTFT e la OS. In particolare, la positività di questo marcatore correla con la riduzione dei tempi di sopravvivenza sopra citati (TTFT e OS) (42, 43) (Figura 1.6.2.3a).

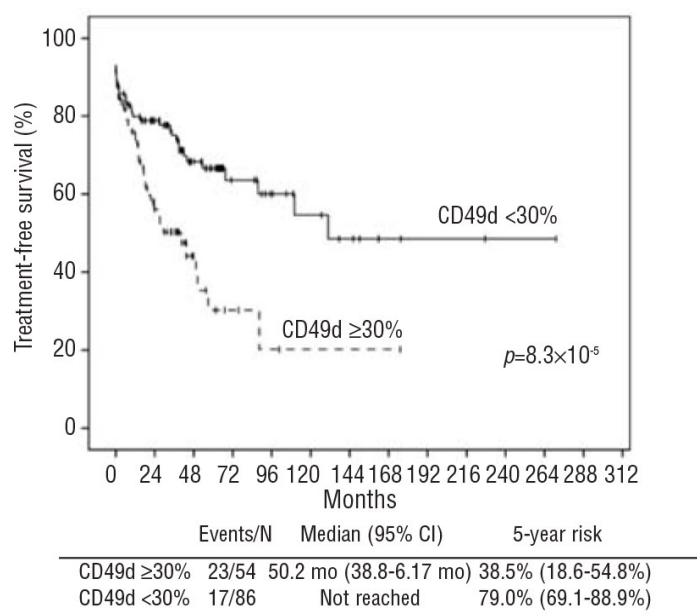


Figura 1.6.2.3a Curva di sopravvivenza libera da terapia in base all'espressione di CD49d (da Rossi D et al Haematologica 2008)

L'espressione di CD49d correla con quella di CD38 poiché, come dimostrato da recenti studi, le due molecole sono legate non solo funzionalmente ma anche strutturalmente (33).

Uno studio multicentrico recente ha dimostrato una concordanza tra l'espressione di CD49d e CXCR4 (recettore per chemochine) e quindi di due molecole coinvolte nella regolazione della migrazione leucocitaria. Infatti, le cellule LLC con elevati livelli di CXCR4 aderiscono meglio agli elementi stromali del microambiente e quindi sarebbero meglio protette dall'azione di farmaci citotossici nella nicchia tumorale, costituendo quindi una sorgente di malattia minima residua (42).

Questo marcatore prognostico è oggi fonte di molto interesse negli studiosi della LLC poiché oltre ad avere un forte potere predittivo, è rilevante per la biologia della malattia ed inoltre è un potenziale bersaglio terapeutico. Infatti, sono già in commercio con approvazione FDA anticorpi monoclonali anti-CD49d per il trattamento di altre patologie (41).

1.6.3 Fattori Prognostici Citogenetici

Lo studio delle anomalie cromosomiche nella LLC viene eseguito di routine alla diagnosi poiché permette di stratificare il rischio prognostico in base al loro numero e tipo (3).

Rispetto alle altre patologie ematologiche, come leucemie e linfomi, nella LLC non esiste un'aberrazione cromosomica specifica della malattia comune a tutti i pazienti e quindi potenzialmente coinvolta nella patogenesi. A conferma di ciò, le anomalie citogenetiche più frequenti nella LLC sono le delezioni e non le traslocazioni come nella maggior parte delle altre emolinfopatie (31) (Tabella 10).

Tab. 10: Anomalie cromosomiche nella LLC: frequenza delle aberrazioni cromosomiche rilevate con citogenetica convenzionale e con FISH e correlazioni clinico-ematologiche principali. (da <http://www.ematologiainprogress.net>; Cuneo A, Rigolin GM)

ANOMALIE	Gene coinvolto	Citomorfolgia	Immunofenotipo/ Stato dei geni Ig	Caratteristiche cliniche e biologiche
17p-	TP53	CLL/PL	CD38+++/- ZAP-70+++/- Ig non mutati +++/-	Prognosi severa, in particolare negli stadi intermedio-avanzati e se associata a IGHV non mutato (sopravvivenza mediana <5 anni). Resistente agli analoghi delle purine. Risposte alla chemioimmunoterapia di breve durata Responsiva ad alemtuzumab.
11q-	ATM	CLL tipica	CD38+++/- ZAP-70+/- Ig non mutati +++/-	Sviluppo di adenopatie marcate. Prognosi sfavorevole, migliorata con l'introduzione della terapia con fludarabina, ciclofosfamide e rituximab
+12	12q13-15	CLL atipica	CD38+/- ZAP-70+++/- Ig non mutati ++/-	Prognosi intermedia (sopravvivenza mediana 10-15 anni).
6q-	6q21	CLL atipica	CD38+++/- ZAP70+/- Ig non mutati ++/-	Elevata conta di globuli bianchi. Prognosi intermedia (sopravvivenza mediana 10-15 anni)
14q32	IgH + partners vari	CLL tipica	CD38+/- ZAP70+/- Ig non mutati ++/-	Prognosi intermedia, richiede un trattamento precoce.
13q-	13q14 miR-15a miR-16 DLEU2	CLL tipica	CD38- ZAP-70+/- Ig non mutati +/---	Prognosi buona se presente come anomalia isolata (sopravvivenza mediana > 15 anni)
Traslocazioni e cariotipo complesso	sconosciuto	NA	CD38+++/- Ig non mutati +++/-	Prognosi sfavorevole

+++/-: 60-80% positivo; ++/-: 30-59% positivo; +/-: < 30% positivo
NA: non applicabile

1.6.3.1 Analisi Citogenetica

Nel 1990 Juliusson et al riconobbero per la prima volta che alcune anomalie cromosomiche, rilevate con le convenzionali tecniche di analisi di bandeggio del cariotipo, sono significative nella LLC per prevalenza ed impatto prognostico (44).

Le tradizionali tecniche di G-bandeggio consentono di ottenere un disegno generale dell'intero genoma, ma con scarso potere risolutivo nella LLC e nelle altre neoplasie caratterizzate da basso indice mitotico. Diverse innovazioni metodologiche sono state testate per migliorarne il potere diagnostico nella LLC come ad esempio prolungando i tempi delle colture cellulari ed utilizzando nuovi agenti stimolanti (ad esempio TPA, PHA, LPS e PWM). Le anomalie cromosomiche sono così identificabili in circa il 40% dei casi; le più comuni sono la trisomia 12 e la delezione 13q14 (31).

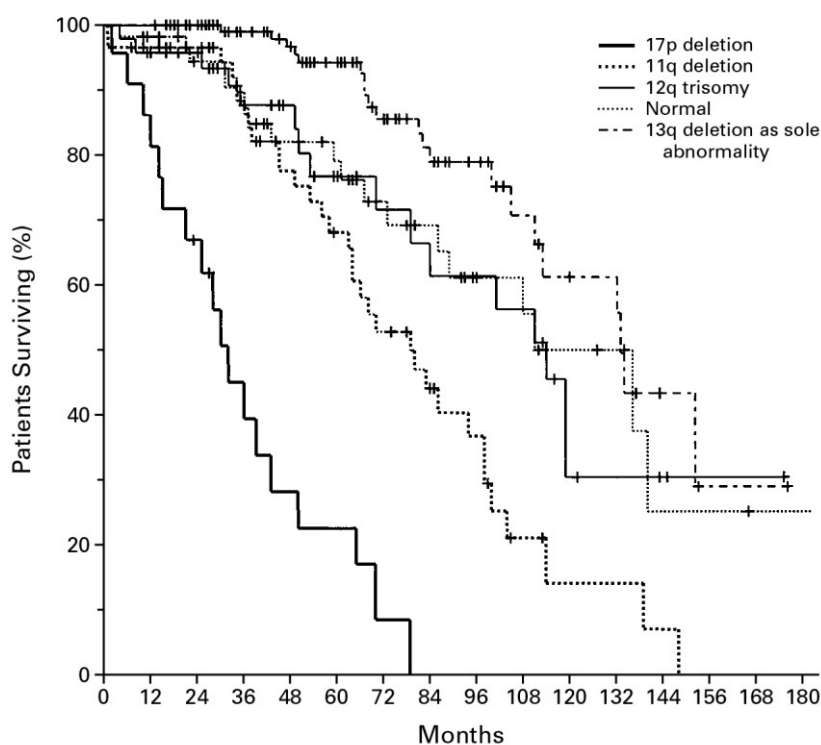
Recentemente, ulteriori innovazioni metodologiche nelle colture cellulari sono state tentate per ottenere un numero maggiore di metafasi analizzabili.

Il primo aumento di metafasi (93% rispetto al 78% registrato con i mitogeni classici) è stato raggiunto con l'utilizzo di linfociti B esprimenti CD40-ligando (CD40-L) permettendo così di identificare anomalie citogenetiche nel 89% dei casi. Questo dato è completamente sovrapponibile a quello solitamente riportato con la FISH e di gran lunga maggiore rispetto al 22% con le metodiche classiche. Inoltre, nel 41% dei casi è stato identificato un cariotipo complesso (3 o più anomalie cromosomiche). Tale tecnica però non può essere utilizzata di routine poichè molto impegnativa dal punto di vista laboratoristico (45).

La metodica attualmente utilizzata nei laboratori prevede lo sfruttamento dell'immunostimolazione indotta da CpG-oligonucleotide DSP30 e IL-2 sulla progressione del ciclo cellulare delle cellule della LLC in vitro. L'analisi del cariotipo con questo mitogeno consente di ottenere il risultato nel 95% dei test eseguiti (cut-off minimo di metafasi pari a 15) con riscontro di anomalie cromosomiche con ugual frequenza rispetto alla FISH (80% dei casi circa). Così come descritto sopra per la metodica precedente, l'analisi del cariotipo permette una migliore visualizzazione della complessità ed eterogeneità delle anomalie cromosomiche nella LLC rispetto alla FISH consentendo quindi di identificare casi con cariotipo complesso o anomalie in sedi non specifiche per le sonde usate nell'analisi delle interfasi o traslocazioni cromosomiche (46, 47). Attualmente, sono in corso diversi studi per valutare il significato prognostico e la frequenza delle aberrazioni cromosomiche evidenziate con la citogenetica in casi con FISH normale (48).

1.6.3.2 FISH

Nel 2000 Dohner et al confermarono, per la prima volta con la metodica di FISH, la frequente localizzazione di anomalie citogenetiche a livello dei cromosomi 6, 11, 12, 13, 14 e 17 nella LLC come già precedentemente evidenziato all'analisi del cariotipo convenzionale. Più precisamente tali alterazioni ricorrenti sono 5: delezione 13q, trisomia 12, delezione 11q, 17p e 6q (49) (Figura 1.6.3.2a).



NO. AT RISK	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180
17p deletion	23	18	13	8	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11q deletion	56	53	47	43	33	27	20	15	10	4	2	2	1	0	0	0
12q trisomy	47	44	41	29	24	17	14	13	12	11	4	3	2	1	1	0
Normal	57	51	45	37	30	27	20	17	12	11	6	5	2	2	1	1
13q deletion as sole abnormality	117	117	106	91	80	63	45	36	24	16	12	11	3	1	1	0

Figura 1.6.3.1a Probabilità di sopravvivenza in pazienti con LLC dalla diagnosi nelle cinque categorie di rischio citogenetico (da Dohner H et al NEJM 2000)

Tale metodica è dotata di una maggiore risoluzione rispetto allo studio citogenetico convenzionale ed è ideale nella LLC poiché rileva le alterazioni in interfase e quindi indipendentemente dalla capacità di divisione cellulare. Le informazioni desunte con la FISH derivano dall'utilizzo di sonde fluorescenti di DNA specifiche per ristrette le regioni cromosomiche. Più precisamente, nella LLC viene utilizzato di routine un pannello di sonde comprendenti le 5 anomalie cromosomiche sopra riportate (31).

Diversi studi di coorti di pazienti con follow-up a lungo termine con la FISH hanno dimostrato che l'evoluzione clonale è un evento comune nella LLC. Più precisamente, l'evoluzione clonale si verifica nel 20-40% dei casi e corrisponde alla progressione della malattia (31, 50, 51, 52, 53).

Lo studio di Dohner non ha solo permesso di evidenziare le anomalie citogenetiche più frequentemente riscontrate nella LLC ma anche di definirne il significato prognostico. Infatti, correlando i dati derivati dalla FISH con quelli del decorso clinico, è stato costruito un modello di rischio gerarchico che riconosce la del17p- (prevalenza 7%) come l'anomalia con prognosi peggiore (mediana di sopravvivenza di 32 mesi), seguita da del11q22-q23 (prevalenza 18%, mediana di sopravvivenza di 79 mesi), trisomia 12 (prevalenza 16%, mediana di sopravvivenza 114 mesi), cariotipo normale (prevalenza 18%, mediana di sopravvivenza 111 mesi) e quindi del13q14 (prevalenza 55%, mediana di sopravvivenza 133 mesi) (49).

Considerando tali dati si evidenzia come la del13q e la +12 rappresentino le anomalie citogenetiche ricorrenti più frequenti e presenti inoltre in tutte le fasi cliniche. Questo fa ipotizzare che entrambe le anomalie considerate rappresentino il primo “hit step” nell’alterazione genetica della malattia e che quindi l’accumulo delle altre anomalie (secondo “hit step”), tipico delle fasi più avanzate della malattia, derivi nel corso dell’evoluzione del clone da una progressiva selezione o dalla nuova acquisizione (32). Secondo le vigenti linee guida IWCLL nella LLC la FISH è indicata prima di iniziare un trattamento, sia in trial clinici sia nella comune pratica clinica (3).

1.6.3.2.1 Delezione 13q (13q-)

La perdita di 13q14.3, come detto sopra, rappresenta l’anomalia citogenetica più frequente nella LLC (49). Essa si differenzia dalle altre aberrazioni cromosomiche poiché si può presentare in eterozigosi (monoallelica nel 76% dei casi) o in omozigosi (biallelica nel 24%). Alcuni autori ipotizzano che la delezione in forma eterozigote rappresenti un evento precoce con la perdita del secondo allele che avviene successivamente in una fase più avanzata di malattia. Quest’ipotesi si basa nuovamente sul concetto di evoluzione clonale della LLC (51, 54). Un’ulteriore conferma viene fornita dallo studio delle MBL in cui la del13q- si rileva con un’uguale prevalenza rispetto a quella tipica della LLC, mentre si registrano solo in una minima percentuale (0-3%) le lesioni secondarie ad impatto prognostico negativo come 11q- e 17p- (32).

La del13q- assume significato prognostico favorevole quando è l’unica aberrazione cromosomica presente nel clone; spesso si rileva in LLC con IGVH mutato (54).

Diversi autori ipotizzano che sia la percentuale di interfasi con tale anomalia alla FISH sia la dimensione della regione deleta possano influenzare l’outcome della malattia; mentre la delezione in forma mono o biallelica non influenza l’intervallo di tempo alla prima terapia (TTFT, time to first treatment) o OS.

In particolare, i pazienti con un’elevata percentuale di cellule con del13q- (> 80%) presentano un ridotto TTFT ed una minore OS rispetto a quelli con < 80% di del13q- (31).

La dimensione della delezione è molto varia (>300 kbp a > 70 mpb) e determina la perdita di una regione definita come “minimal deleted region” (MDR), distale rispetto al locus dell’oncosoppressore Retinoblastoma-1 (RB-1), contenente il gene DLEU2 ed i microRNA (miR) 15a/16-1. Quindi, in base all’estensione della delezione si possono definire 2 gruppi: tipo 1 (corto) con punto di rottura localizzato nei locus miR15/miR16 senza coinvolgimento di RB1; tipo 2 (ampio) che include il locus RB1 e quindi con una maggiore complessità genomica ed un decorso clinico più aggressivo (31, 33).

Numerosi studi, eseguiti anche con l’uso di modelli murini, hanno dimostrato come la perdita della soppressione neoplastica secondaria alla del 13q- è provocata dalla rottura di un complesso meccanismo di regolazione basato su eventi epigenetici e non per la scomparsa di uno specifico oncosoppressore. In questo meccanismo di regolazione cellulare epigenetica un ruolo cruciale viene giocato da miR15a/miR16 poiché sono deleti e/o down-regolati nel 68% di casi di LLC. Gli autori ipotizzano che questi due micro-RNA possiedano un’azione inibitoria verso BCL-2 ed altri geni di regolazione della proliferazione cellulare e dell’apoptosi (55).

1.6.3.2.2 Trisomia 12 (+12)

Il significato prognostico di tale lesione si è modificato nel tempo. Infatti, mentre inizialmente veniva definita come un'anomalia cromosomica di LLC a rischio intermedio, recentemente da studi prospettici è stata confermata l'associazione con malattia caratterizzata da OS favorevole anche se con sopravvivenza libera dalla progressione (PFS da "progression free survival") ridotta (56). Inoltre, ad ulteriore prova del significato prognostico favorevole della +12, essa raramente si associa a mutazioni TP53. Invece, la contemporanea presenza di mutazioni NOTCH-1 delinea un sottogruppo di pazienti con +12 caratterizzati da riduzione di TTFT e OS (32).

Dal punto di vista clinico, la LLC con +12 si caratterizza per morfologia ed immunofenotipo atipico (31).

Lo studio citogenetico e molecolare dei casi di LLC con +12 non ha permesso l'identificazione di un gene critico ma si evidenzia l'acquisizione di una piccola regione comune localizzata a livello 12q13, piccole duplicazioni di 12q, ed amplificazioni di MDM2 ("murine double-minute 2 gene") mappato a livello 12q15. Invece, la mutazione CLLU1, di solito iperespressa nella LLC e mappata a livello 12q22, sembra indipendentemente dalla +12 (31).

1.6.3.2.3 Delezione 11q (11q-)

In circa 1/5 dei pazienti affetti da LLC richiedenti innesto di terapia specifica si rileva la del11q- (31).

Dal punto di vista clinico i pazienti con del11q- presentano tipicamente numerose linfadenomegalie (spesso con "bulky" addominale), sintomi sistemici di tipo B, giovane età (età mediana di 59 anni), una malattia con progressione molto rapida e ridotta OS (57). Ad ulteriore conferma del significato prognostico sfavorevole si rileva la frequente associazione con forme di LLC con IGVH non mutato (54). La regione cromosomica tipicamente deleta è rappresentata dalla banda 11q22.3-q23.1 che contiene all'interno il gene ATM. La proteina ATM, come descritto in dettaglio in seguito, è una protein-chinasi attivata in caso di danno a doppio filamento del DNA partecipando quindi alla regolazione dell'attività di "checkpoint" del ciclo cellulare cruciali per il controllo di apoptosi e di riparazione dell'anomalia (31). Secondo alcuni autori nella regione normalmente deleta sarebbero compresi altri geni con un significato non ancora chiarito (ad esempio il gene RDX) (33).

La contemporanea mutazione ATM all'analisi molecolare si verifica nel 30% dei casi nel gruppo di pazienti con LLC richiedente terapia specifica (32).

1.6.3.2.4 Delezione 17p (17p-)

La delezione 17p, come verrà descritto di seguito, si presenta raramente nelle LLC all'esordio (3-8%) mentre è frequente nei pazienti con malattia avanzata e refrattaria ai trattamenti (30%). Inoltre, in molti casi si registra contemporaneamente la perdita di una copia e la mutazione della rimanente copia (31).

Il significato prognostico di tale anomalia è sfavorevole ed infatti si associa a LLC con un decorso clinico molto aggressivo, PFS ridotta, mancata risposta alla terapia, recidiva precoce, e OS ridotta (49).

Dal punto di vista patogenetico si rileva in caso di del17p- la costante perdita della TP53, un oncosoppressore responsabile della risposta al danno del DNA. Sulla base di questo

dato e del meccanismo d'azione TP53 dipendente per alcuni farmaci (fludarabina ed agenti alchilati) si può facilmente comprendere l'associazione tra del17p- e chemiorefrattarietà verso i convenzionali trattamenti chemioterapici (31, 32).

1.6.3.2.5 Delezione 6 (6q-)

La del6q- è un'aberrazione cromosomica rara che colpisce circa 6% dei pazienti affetti da LLC e determina un rischio prognostico intermedio.

Dal punto di vista clinico si associa a linfocitosi con morfologia atipica (presenza soprattutto di grandi linfociti e cellule linfoplasmacitiche comprendenti anche cellule simil-immunoblasti), splenomegalia, immunofenotipo classico ma con elevata espressione di CD38, necessità di terapia precoce; non correla con lo status mutazione di IGVH (58).

1.6.3.2.6 Altre Anomalie

Sono state descritte numerose altre aberrazioni cromosomiche ricorrenti nella LLC ma, essendo molto rare, il loro significato prognostico non è noto (31). Ad esempio coinvolgimento 6p, 4q21 e monosomia 21 spesso caratterizzano LLC con immunofenotipo e morfologia atipica e malattia in progressione; frequentemente si associano ad altre anomalie e si riscontrano quindi di frequente nelle LLC con cariotipo complesso (59).

1.6.3.2.7 Traslocazioni

Le traslocazioni nelle altre forme di linfomi a cellule B e di leucemia sono frequenti, specifiche e ricorrenti poiché determinano la deregolazione di geni cruciali nel processo di oncogenesi. Invece, nella LLC le traslocazioni bilanciate sono rare (<5%) e nessuna di esse è specifica della malattia (31).

Nella LLC i geni maggiormente coinvolti da tali anomalie sono i geni delle immunoglobuline (14q32) che presentano come "partner" ricorrenti i geni normalmente coinvolti nelle traslocazioni degli altri disordini linfoproliferativi (ad esempio BCL2, BCL3, BCL11A e cMYC) (31).

Dal punto di vista prognostico le traslocazioni peggiorano la sopravvivenza e la risposta alla terapia nei pazienti affetti da LLC, soprattutto quando sono sbilanciate. Tali aberrazioni si riscontrano principalmente nei casi con cariotipo complesso (45).

1.6.3.2.8 Cariotipo Complesso

Nel 20% dei casi di LLC si rileva un profilo citogenetico definito come cariotipo complesso (presenza di almeno 3 anomalie cromosomiche contemporaneamente) (46).

L'acquisizione di nuove anomalie cromosomiche nel clone della LLC durante il decorso della malattia è nuovamente un esempio di evoluzione clonale che concorre all'aumento della complessità genomica. Infatti, l'acquisizione di ulteriori anomalie cromosomiche da parte di un gruppo di cellule nel clone neoplastico determina la costituzione di sottoclone con diversi profili citogenetici e molecolari regolanti l'attività genica. Questi sottoclone, se acquisiscono un vantaggio di sopravvivenza, aumentano l'aggressività della malattia con conseguente riduzione della OS e minor risposta ai convenzionali trattamenti chemioterapici (54).

Per tale ragione nei casi con FISH normale è necessario studiare anche le metafasi con i nuovi agenti stimolanti (31).

1.6.3.3 Metodiche Genetiche Molecolari Basate su “MICROARRAY”

Il profilo genetico della LLC è recentemente migliorato con l'introduzione di due nuove metodiche: CGH (“Comparative Genome Hybridization”) e SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”). Tali metodiche possiedono una migliore risoluzione rispetto alle metodiche citogenetiche convenzionali, non richiedono colture cellulari ed evitano la necessità di lettura dei segnali di fluorescenza. Il mancato riscontro di traslocazioni bilanciate e la riduzione della performance in caso di bassi livelli di malattia ne rappresentano i limiti. Diversi studi hanno comunque dimostrato un'alta concordanza tra le metodiche utilizzanti “microarray” e la FISH.

Lo studio del cariotipo con “microarray” può essere eseguito con diverse piattaforme. Gli “array” possono essere “genome-wide” (sonde distribuite lungo l'intero genoma) o “targeted” (sonde per specifiche regioni del genoma).

Nelle malattie ematologiche, richiedenti uno studio “genome-wide” ad alta risoluzione per individuare le alterazioni numeriche in singola ibridazione, si esegue con Array-CGH utilizzando cromosomi artificiali batterici (BAC) come sonde.

Le caratteristiche specifiche della piattaforma utilizzata limitano la capacità di risoluzione in base al numero ed alla distribuzione genomica degli “array”.

Nella LLC le metodiche utilizzanti “microarray” hanno permesso di evidenziare nuove probabili anomalie ricorrenti, anche criptiche con le convenzionali metodiche, con un ruolo prognostico ancora da definire completamente. Tali metodiche inoltre consentono di definire quadri complessi dal punto di vista genomico, caratterizzati da progressione di malattia e ridotta chemiosensibilità della LLC (Tabella 11).

Anomalie	CC-TPA (%) ^a	CC-DSP30/IL-2 or CD40L (%) ^b	FISH (%) ^c	aCGH (%) ^d
13q Totale	5-25	14.3-57	30-62	40-59
13q Biallelica	<1	7	14-24	-
Trisomia del 12	20-25	12.8-14	12-30	7-25
del(11q)	12-18	9.7-15.9	7-19	9-13
del(17p)	7-12	3.7-7.5	4-9	4-11
Traslocazioni	5-20	4-34	1-13 ^e	-
del(6q)	5-8	4-6.8	3.4-6	5.5
Clonalità	20-40	21.5-83	77-82	65.6-90

Tab. 11 Le principali anomalie citogenetiche nella LLC rilevate con citogenetica convenzionale, FISH, a CGH. ^a: dati cumulativi da 1.09 casi; ^b: da 1.322 casi; ^c: da 1.485 casi; ^d: da 2.141 casi; ^e: solo traslocazioni IGH].

L'analisi con SNP “array”, applicata allo studio delle già note aberrazioni cromosomiche della LLC, permette di localizzare in modo preciso le regioni di “breakpoint” ed i meccanismi di ricombinazione. Tale metodica consente inoltre di ricercare la perdita della “copy number-neutral loss of heterozygosity” (cnLOH) o “acquired uniparental disomy” (aUPD) (31).

1.6.3.4 Fattori Prognostici Molecolari

Lo studio molecolare della LLC ha permesso di identificare due fattori ad elevato impatto prognostico: lo status mutazionale della regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline (IGHV) e quello della proteina ad attività oncosoppressiva p53 (TP53) (60). Recentemente, l'analisi dell'intero genoma e degli esoni delle cellule leucemiche con le tecnologie di "next generation sequencing" ha identificato nuove alterazioni genomiche a significato prognostico. Tra queste si riconoscono le mutazioni di NOTCH1 (neurogenic locus notch homolog protein 1), SF3B1 (splicing factor 3B subunit) and BIRC3 (baculoviral IAP repeat-containing protein 3) (32) (Figura 1.6.3.4a).

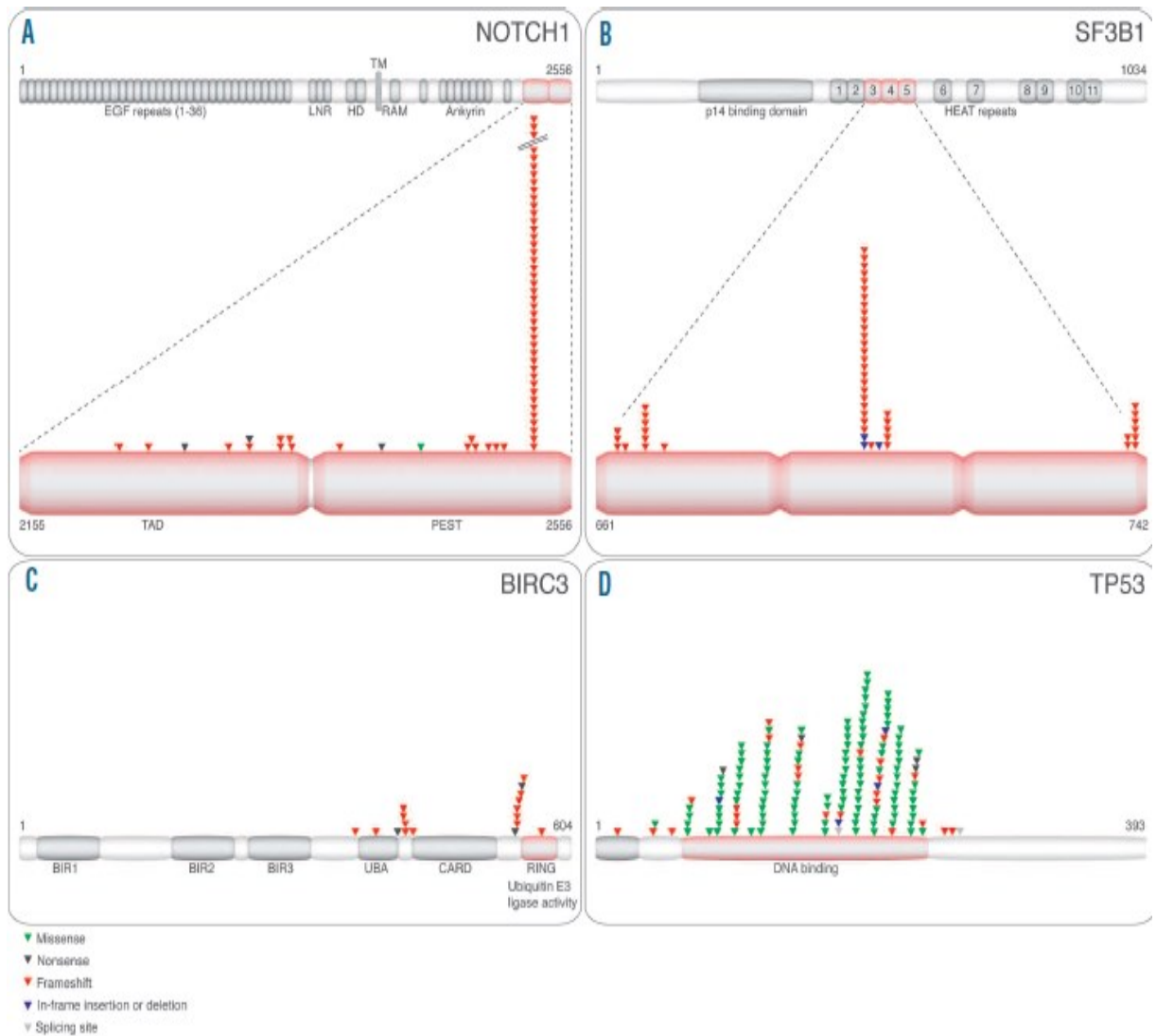


Fig. 1.6.3.4a: Rappresentazione schematica di NOTCH1 (A), SF3B1 (B), BIRC3 (C), TP53 (D). I codici di colore indicano il tipo e la posizione delle mutazioni. (da Foà R, 2013)

1.6.3.4.1 Analisi Mutazionale IgVH

Nel 1994, da una revisione della letteratura, Schroeder e Dighiero dimostrarono per la prima volta la natura eterogenea della malattia e la conseguente variabilità di decorso clinico (61). Infatti, sulla base dello status mutazionale IgVH, si possono riconoscere due sottocategorie di LLC: una con clone mutato (> 2% di differenze nella sequenza

nucleotidica rispetto a quella “germline”) ed una con clone non mutato (>98% di omologia con la sequenza “germline”).

Nel 1999 lo studio di Hamblin et al, valutando la relazione tra IgVH e sopravvivenza, evidenziò come l’analisi dello status mutazionale permetta di stratificare i casi di LLC in 2 gruppi anche sul piano prognostico: uno a buona prognosi (IgVH mutato) ed uno a cattiva prognosi (IgVH non mutato) (15). Infatti, come dimostrato da numerosi studi della letteratura, i casi di LLC con IgVH non mutato sono spesso caratterizzati da necessità di trattamento specifico, scarsa risposta alla chemioterapia con recidiva precoce di malattia, elevata probabilità di evoluzione in sindrome di Richter ed anomalie citogenetiche sfavorevoli alla FISH (11q-, 17p-) (31, 34).

Gli studi di Damle et al e di Hamblin et al sottolinearono il potenziale ruolo della caratterizzazione molecolare anche nella definizione della cellula d’origine della malattia (14, 15). Infatti, sulla base dello studio dello status mutazionale IgVH, considerando che la mutazione somatica avviene normalmente nel centro germinativo, è possibile riconoscere come la cellula d’origine delle LLC con IgVH non mutato (UM) corrisponda ad un linfocita B “naive” pre-centro germinativo, mentre in quelle con IgVH mutato (M) è una cellula B della memoria post-centro germinativo. Tale distinzione conferma nuovamente come i casi derivati da un precursore linfocitario meno differenziato rappresentino un sottotipo di LLC con un maggiore potenziale evolutivo e quindi con peggiore prognosi (62).

Lo status mutazionale IgVH e le anomalie cromosomiche alla FISH incidono significativamente sulla sopravvivenza dei pazienti affetti da LLC ma, mentre l’acquisizione di nuove mutazioni citogenetiche avviene di frequente nel corso della malattia, lo status mutazionale IgVH rimane costante nel tempo. Per tale ragione, lo studio della sequenza di IgVH è indicato unicamente alla diagnosi (33).

Successivi studi della letteratura, confrontando le regioni variabili delle catene pesanti delle immunoglobuline associate al BCR dei linfociti leucemici, indipendentemente dallo status mutazione di IgVH, hanno dimostrato come queste presentino specifiche caratteristiche cliniche e come siano distribuite in modo diverso geograficamente (63). Ad esempio IGHV3-21 è spesso presente in casi a cattiva prognosi ed è raro nell’Europa meridionale. Inoltre, si è notata una certa concordanza tra casi UM con l’espressione di IGHV1-69 e IGHV4-39 così come tra casi M e IGHV4-34 (31).

Considerando la complessità legata alla metodica di studio dello status mutazionale di IgVH e la sua indisponibilità in diversi centri, numerosi studi hanno tentato di individuare nuovi marcatori surrogati nella definizione della prognosi. Inizialmente, è stata dimostrata una concordanza di espressione tra lo status mutazionale IgVH e di CD38 sulla superficie dei linfociti leucemici. In realtà, da studi successivi, si è evidenziato un ruolo indipendente dei due fattori prognostici nella stratificazione delle LLC a causa di un’incompleta concordanza di espressione e, contemporaneamente, della variabilità d’espressione di CD38 nel corso della malattia (36, 38).

Diversamente, invece, la concordanza tra lo status mutazionale IgVH e l’espressione del marcatore di superficie ZAP-70, studiata attraverso metodiche citofluorimetriche, è completa. Infatti, la maggior parte dei casi M sono ZAP-70 positivi, mentre quelli UM sono ZAP-70 negativi. Inoltre, l’espressione di ZAP-70 si mantiene costante nel corso della malattia così come per la sequenza IgVH (38, 39, 64) (Figura 1.6.3.4.1a).

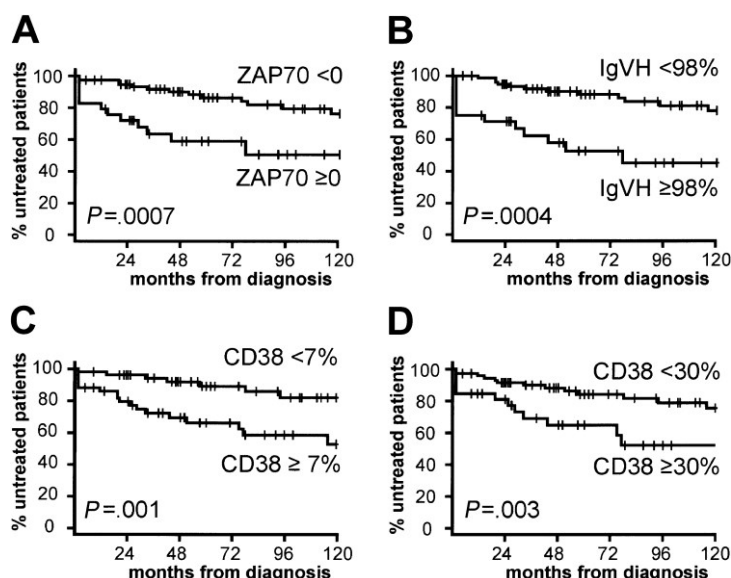


Figura 1.6.3.4.1a *Impatto prognostico sul decorso della LLC. Probabilità di progressione di malattia calcolata in base a TTFT misurata in mesi dalla diagnosi per ZAP-70 (Figura A), IgVH (Figura B), CD38 con cutoff di 7% (Figura C) e di 30% (Figura D) (da Wiestner A et al Blood 2003)*

1.6.3.4.2 Mutazione TP53

TP53 è un oncosoppressore localizzato a livello delle braccia corte del cromosoma 17 (17p13.1) che codifica per una proteina con un ruolo cruciale nel controllo del “pathway” di regolazione della risposta cellulare al danno del DNA. Infatti, l’attivazione di TP53 secondaria al danneggiamento del DNA determina arresto del ciclo cellulare, riparazione del DNA, apoptosi o invecchiamento della cellula attraverso attività trascrizionali dipendenti ed indipendenti. Alcuni agenti chemioterapici inducenti danno al DNA, inclusi gli analoghi delle purine e gli agenti alchilanti spesso utilizzati nel trattamento di prima linea della LLC, sfruttano l’attività pro-apoptotica ed anti-proliferativa della TP53 per la loro azione terapeutica.

Alterazioni dell’espressione di TP53 si riscontrano di frequente nei tumori solidi ma anche nel 10-15% dei casi di LLC alla diagnosi (32).

In particolare, nella LLC l’inattivazione di TP53 può essere secondaria a delezioni e/o mutazioni. Nella maggior parte dei casi (70% circa) la delezione 17p13 si associa anche a mutazioni di TP53 nel secondo allele, mentre è monoallelica nel 20% delle LLC; nel 10% è presente solo la mutazione TP53 in assenza della del17p13 (32).

Lo studio molecolare delle mutazioni della TP53 nella LLC evidenzia come la maggior parte corrisponda a sostituzioni “missense” (75% dei casi) soprattutto a livello degli esoni 5-8, codificanti il dominio di legame al DNA; nel restante 25% si tratta di eventi “troncanti”, sostituzioni “non-senso” e mutazioni nei siti di “splice”.

La frequenza di tali mutazioni è differente in diversi momenti nella storia naturale della malattia. Infatti, si è rilevato che se tale anomalia è rara alla diagnosi (5-10% dei casi), essa tende ad aumentare alla prima progressione di malattia (10% di tutti i casi) ed ulteriormente al 40% nella LLC recidivata/refrattaria alla fludarabina. Inoltre, se si valuta l’inattivazione di TP53 in senso globale, combinando contemporaneamente i dati riguardanti le mutazioni con quelli delle delezioni di TP53, si conferma una minor frequenza alla diagnosi (10% dei casi) rispetto alla prima progressione di malattia (15%

circa) e quindi ai casi recidivati/refrattari alla fludarabina (45%). Sulla scorta di tali dati si può quindi desumere che l'inattivazione di TP53 rappresenta la più frequente lesione presente nei casi di LLC ad alto rischio (32).

Partendo da ciò, diversi autori hanno studiato l'impatto prognostico di tale anomalia dimostrando come l'inattivazione di TP53 comporta non solo una riduzione della sopravvivenza ma anche chemiorefrattarietà ai trattamenti "classici" (agenti alchilanti ed analoghi delle purine) (65, 66).

Dai dati del trial clinico CLL4 prospettico e randomizzato (F [Fludarabina] versus FC [Fludarabina-Ciclofosfamide]) comprendente pazienti alla prima progressione di malattia con necessità di intraprendere trattamento specifico, Zenz et al hanno riconosciuto il valore prognostico indipendente delle mutazioni di TP53 su PFS e su OS. Inoltre, questo impatto prognostico si conferma anche nel sottogruppo di LLC con mutazioni di TP53 in assenza di del17p13 (66) (Figura 1.6.3.4.2a).

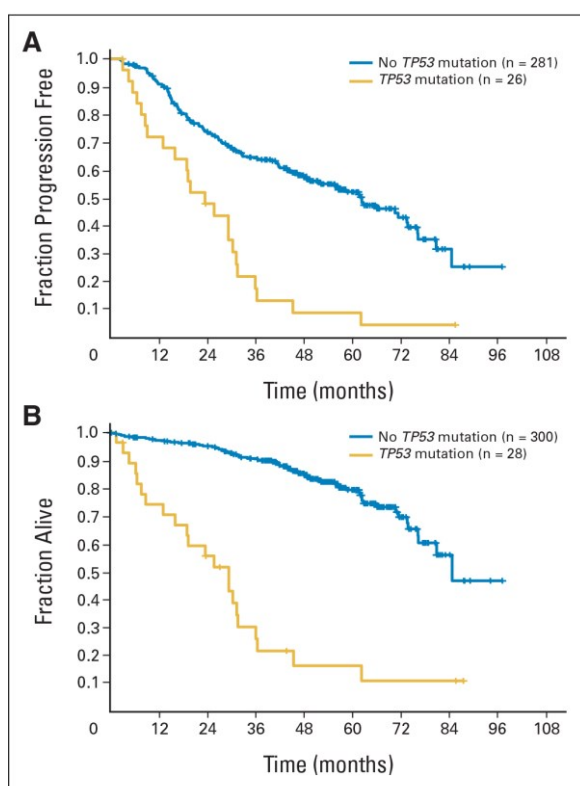


Figura 1.6.3.4.2a Mutazioni di TP53 peggiorano sopravvivenza LLC. Figura A: PFS di 62.2 mesi se TP53 non-mutata e 52.8 mesi con TP53 mutata. Figura B: OS di 29.2 mesi se TP53 mutata e 84.6 mesi con TP53 non-mutata (da Zenz T et al JCO 2010)

Il confronto di tasso e tipo di risposta ai trattamenti nei pazienti del trial in base alla presenza o assenza di inattivazione di TP53 ha confermato che i pazienti chemiorefrattari nel 40-50% dei casi sono portatori di perdita o mutazioni di TP53 (66).

Ulteriori studi hanno evidenziato come in generale l'inattivazione di TP53 si associ ad una scarsa risposta al trattamento con analoghi delle purine (fludarabina, pentostatina, cladribina), agenti alchilanti (clorambucile, bendamustina, ciclofosfamide) in combinazione o meno con Rituximab. Al contrario, altri studi hanno dimostrato che i pazienti portatori di anomalie della TP53 rispondono meglio ad altre terapie come ad esempio metilprednisolone ad alte dosi, alemtuzumab, flavopiridolo o trapianto allogenico,

che sfruttano meccanismi terapeutici TP53 indipendenti. Pertanto, lo studio dell'attività di TP53 può essere importante non solo per la definizione della prognosi ma anche per la scelta del trattamento di prima linea preferendo nei pazienti con inattivazione strategie terapeutiche differenti, prive di agenti alchilanti ed analoghi delle purine (22, 32, 67), come vedremo illustrato più estesamente nel nostro lavoro "Modern treatment in chronic lymphocytic leukemia: impact on survival and efficacy in high risk group".

Le vigenti linee guida suggeriscono quindi lo studio di TP53 alla diagnosi, ripetendolo poi ad ogni ricaduta della malattia prima di iniziare una nuova linea di terapia, dato il rischio di evoluzione clonale della malattia che sottende alle recidive (3).

L'alterazione dell'attività di TP53 nella LLC può essere determinata anche da meccanismi non dipendenti da mutazioni e/o delezioni di TP53 come ad esempio attraverso disregolazione del pathway di TP53 a opera dai geni ATM e MDM2 (32).

1.6.3.4.3 ATM

ATM è un oncosoppressore appartenente alla famiglia delle fosfatidilinositolo-3 chinasi coinvolto nella prevenzione di un danno del DNA regolando la progressione del ciclo cellulare nei punti G1/S e G2/M. L'attivazione di questa proteina nucleare può essere innescata da una rottura del doppio filamento del DNA, ad esempio dopo esposizione ad agenti danneggianti il DNA, come chemioterapici e radioterapia (32).

La sequenza genica codificante per ATM si localizza sul cromosoma 11 (11q22-q23) (49).

Così come per TP53, ATM può essere inattivato da una mutazione somatica e/o da una delezione ma, diversamente dalla prima, raramente le due lesioni si combinano. Infatti, solo il 10-20% dei casi di LLC con mutazione ATM presentano anche la del11q-, così come unicamente nel 20-30% delle del11q- coesistono delle mutazioni somatiche.

Comunque, le alterazioni di ATM, sia da mutazione sia da delezione, rappresentano le lesioni genetiche più frequenti alla diagnosi (20% circa) ed al momento della richiesta di trattamento (35%) con significato prognostico negativo (32).

1.6.3.4.4 NOTCH1

La mutazione attivante in modo costitutivo di NOTCH1 è stata per la prima volta rilevata nei pazienti affetti da Leucemia Linfoblastica a cellule T con t(7;9)(q34;q34.3). Tale anomalia genomica nel 2009 è stata identificata anche nella LLC ove è implicata nei meccanismi di resistenza all'apoptosi. NOTCH1 codifica per una proteina di transmembrana che agisce come un fattore di trascrizione attivato dal ligando e regola l'attività di numerosi geni "target", come ad esempio MYC, TP53 e la via di segnale di NF-kB. Le mutazioni di tale gene nella LLC si localizzano selettivamente a livello del dominio C-terminale PEST, normalmente responsabile della degradazione proteosomica di NOTCH1. In tal modo, NOTCH1 va incontro ad un'alterata degradazione, alla stabilizzazione in forma attivata ed alla deregolazione delle vie del segnale da esso controllate come ad esempio quelle responsabili del controllo del metabolismo cellulare e della progressione del ciclo cellulare (Figura 1.6.3.4.4a).

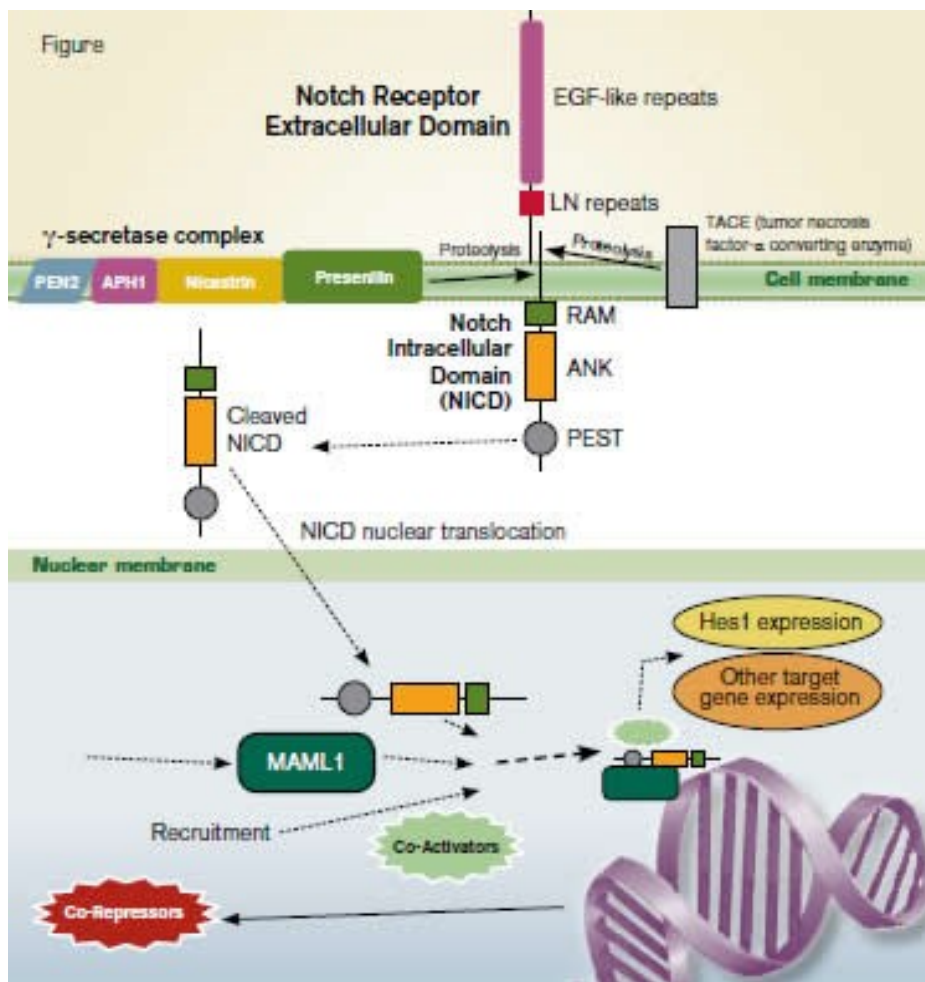


Fig. 1.6.3.4.4a: NOTCH1 Pathway

(da www.hematology.org/Publications/Hematologist/2011/6994.aspx; dr.Steensma; 2011)

Nella LLC, le mutazioni di NOTCH1 sono prevalentemente “frameshift” o “non-sense” e si localizzano nell’introne 34 (in circa 80-90% dei casi si rileva la delezione c.7544_7545delCT) (32).

Dal punto di vista prognostico, la presenza della mutazione di NOTCH1 identifica un sottogruppo di pazienti con inferiore OS, ma non PFS. Infatti, la mutazione di NOTCH1 è spesso combinata con altri marcatori molecolari (IGVH non mutato, TP53 mutata, XPO1 mutato) e citogenetici (trisomia cromosoma 12) con rischio intermedio-elevato. La mutazione di NOTCH1 è solo di rado isolata.

Questo sottogruppo di pazienti è clinicamente caratterizzato da una malattia in stadio Binet B, un’elevata percentuale di cellule con fenotipo LLC con positività per CD38 e ZAP-70 (68).

La presenza di tale mutazione è rara alla diagnosi (in circa 5-10% dei casi) ma la prevalenza aumenta al 13-20% al momento della progressione (32).

1.6.3.4.5 SF3B1

Similmente, la frequenza delle mutazioni di SF3B1 è del 3-10% nelle LLC alla diagnosi ma aumenta a più del 20% nei pazienti recidivati, in particolare in caso di refrattarietà a fludarabina (32).

SF3B1 è un elemento chiave dello spliceosoma. Tale struttura è fisiologicamente presente nel nucleo delle cellule eucariotiche ed è costituita dall'associazione di piccoli segmenti di RNA nucleare con varie subunità proteiche. Esso regola lo "splicing" dei precursori di RNA messaggero e quindi la formazione di mRNA maturo attraverso la rimozione di introni nei geni codificanti proteine. Dal momento che SF3B1 controlla diverse vie di regolazione genica come ad esempio apoptosi, ciclo cellulare e geni Hox, si ipotizza abbia un ruolo chiave nei processi di oncogenesi. L'acquisizione o la perdita dell'attività di diversi oncogeni può essere causata da mutazioni di SF3B1 a causa dell'alterato "splicing" della sequenza genica (69). Nella LLC queste mutazioni sono costituite esclusivamente da sostituzioni aminoacidiche "missense" a livello del dominio HEAT con localizzazione in cinque punti ricorrenti (codone 662, 666, 700, 704 e 742). Nel 40-50% di tutte le mutazioni, più precisamente, si rileva la sostituzione K700E. Visto il carattere tendenzialmente ricorrente in specifiche regioni del gene, si ipotizza che le mutazioni determinino in SF3B1 un'alterata funzione piuttosto che la perdita funzionale (32).

Clinicamente nella LLC tali mutazioni si associano spesso, ma senza raggiungere la significatività statistica, con la delezione 11q22-q23 e le mutazioni del gene ATM.

Dal punto di vista prognostico, la mutazione SF3B1 determina la riduzione non solo di OS, ma anche l'accorciamento di PFS (68).

1.6.3.4.6 BIRC3

BIRC3 è un inibitore di MAP3K14, una serina-treonina chinasi coinvolta nell'attivazione non canonica di NF- κ B. Quindi, in caso di mutazione, si rileva un'attivazione costitutiva della via non canonica del segnale NF- κ B conferendo quindi alle cellule leucemiche un meccanismo di resistenza. Inoltre, BIRC3 partecipa al mantenimento di un'espressione "wild-type" di TP53 prevenendo le alterazioni trascrizionali e post-traslazionali NF- κ B-mediate di MDM2. Quindi, la mancata espressione di BIRC3 favorisce i processi di carcinogenesi attraverso la "downregulation" MDM2-mediata di TP53 (32).

La mancata espressione di BIRC3, nella LLC, può derivare da mutazioni o delezioni, ma anche dalla combinazione di entrambe. Tali anomalie, nella maggior parte dei casi, troncano il dominio C-terminale RING attraverso "frameshift" o "sostituzioni non-sense" (32).

Il significato prognostico di tale mutazione non è ancora stato completamente chiarito. Recentemente, uno studio retrospettivo eseguito in pazienti affetta da LLC alla diagnosi dimostra come tali pazienti presentino una OS mediana di 3 anni, come avviene in caso di mutazione di TP53. Mancano invece dati riguardanti l'impatto prognostico delle mutazioni di BIRC3 sulla risposta al trattamento.

Attualmente rimane ancora incerto il significato prognostico di altre mutazioni molecolari ricorrenti che si riscontrano con una frequenza al di sotto del 10% come ad esempio XPO1, FBXW7, MYD88 (68).

1.6.3.5 MicroRNA (miRNAs)

Lo studio del ruolo dei miRNAs nei processi di regolazione genica ha coinvolto la comunità scientifica solo nel XXI secolo con la cosiddetta "miRNA Revolution" capeggiata da Lee e Ambros nel 2001. Infatti, fino ad allora i miRNAs non venivano studiati poiché, essendo delle sequenze di RNA non codificanti, non rispettavano il dogma

su cui si basa la biologia molecolare per il quale le informazioni biologiche passano in modo univoco dal DNA al RNA e quindi alla proteina (70).

I miRNAs sono delle piccole sequenze di RNA non codificanti che si localizzano negli introni di mRNAs o in mRNAs non codificanti o in posizione 3' di regioni UTR ("untranslated region") di mRNAs codificanti (70).

Il ruolo biologico dei miRNAs è determinante nella regolazione dell'espressione di numerosi geni poiché queste micro-sequenze di RNA possono determinare la degradazione e/o la deregolazione di mRNA cruciali per la sintesi proteica sia durante i processi di traduzione sia in quelli di trascrizione. Inoltre, per sottolineare la complessità dell'attività dei miRNAs è stata rilevata la loro capacità anche di funzionare come attivatori traslazionali di alcuni geni e di interferire nell'attività di diverse proteine di regolazione (70).

L'elaborata rete di controllo dei miRNAs coinvolge circa il 60% di tutti i geni umani (ogni miRNA può teoricamente legare diverse centinaia di geni) ed ognuno di essi contiene siti di legame specifici per diversi miRNAs che possono cooperare tra di loro.

Poiché l'attività dei miRNAs condiziona diversi momenti fisiologici della vita cellulare (differenziazione, proliferazione, apoptosi, metabolismo..) e dell'emopoiesi mieloide e linfoide, è stato ipotizzato che un'alterazione della loro espressione possa giocare un ruolo patogenetico nella carcinogenesi di tumori solidi ed ematologici. Quest'ipotesi è stata inoltre rafforzata dal riscontro della localizzazione della maggior parte dei miRNAs in regioni del genoma associate al cancro (70).

L'espressione aberrante dei miRNAs nelle neoplasie ematologiche può essere determinata da diversi eventi, tra cui aberrazioni cromosomiche, la deregolazione epigenetica, l'alterata espressione di fattori di trascrizione coinvolti nel controllo di regioni promoter di miRNAs, di fattori condizionanti la loro biosintesi o funzione (70).

Il primo gruppo a porre in luce il ruolo dei miRNAs nello sviluppo delle emopatie maligne, e in particolare nella LLC, fu quello di Carlo Croce nel 2002 che, con il lavoro di Calin et, esplicitò la relazione tra delezione 13q14 e "down-regulation" di miR-15a/16-1 codificati in questa regione (nello specifico nella MDR come riportato nel paragrafo sulla del13q) (55).

Studi successivi, utilizzando prevalentemente modelli murini, hanno rilevato come l'espressione di miR-15a/16-1 sia inversamente proporzionale a quella di BCL-2 e come, quindi, questi miRNA esercitano una inibizione su BCL-2 a livello post-trascrizionale. Di conseguenza, mentre in condizioni fisiologiche la mancata espressione di BCL-2 regolata dai due miRNAs determina l'apoptosi nelle linee cellulari leucemiche, nella LLC si assiste ad un'augmentata espressione di BCL-2 secondaria alla delezione di miR-15a/16-1.

Nuovi studi hanno inoltre evidenziato come la "down-regulation" di miR-15a/16-1 nel 30-35% dei casi di LLC possa anche essere secondaria ad eventi di disregolazione epigenetica conseguente ad un'augmentata espressione di HDAC1-3 e, quindi, potenzialmente curata con agenti ipometilanti (70, 71).

Anche altri miRNAs hanno un ruolo riconosciuto nella patogenesi della LLC: la "down-regulation" di miR-29 e miR181b determina un'augmentata espressione dell'oncogene TCL1 (T-cell leukemia/lymphoma 1) in forme di LLC particolarmente aggressive (per lo più con IGVH non-mutato e ZAP-70+). Fisiologicamente, TCL-1 regola la via del segnale intracellulare di PI3K-Akt (PKB) e, attraverso l'attivazione dell'oncogene AKT, controlla

numerose vie di segnale di regolazione della proliferazione, sopravvivenza ed apoptosi di linfociti T e B (71, 72).

Il ruolo carcinogenetico di questo oncogene è stato per la prima volta identificato come bersaglio nelle traslocazioni e delezioni 14q32, comuni nella leucemia prolinfocitica a cellule T. La costruzione di modelli murini dotati di un' aumentata espressione di TCL-1 hanno dimostrato il ruolo patogenetico di questo oncogene nella LLC con la comparsa in questi animali di linfocitosi, splenomegalia ed epatomegalia (71) (Figura 1.6.3.5a).

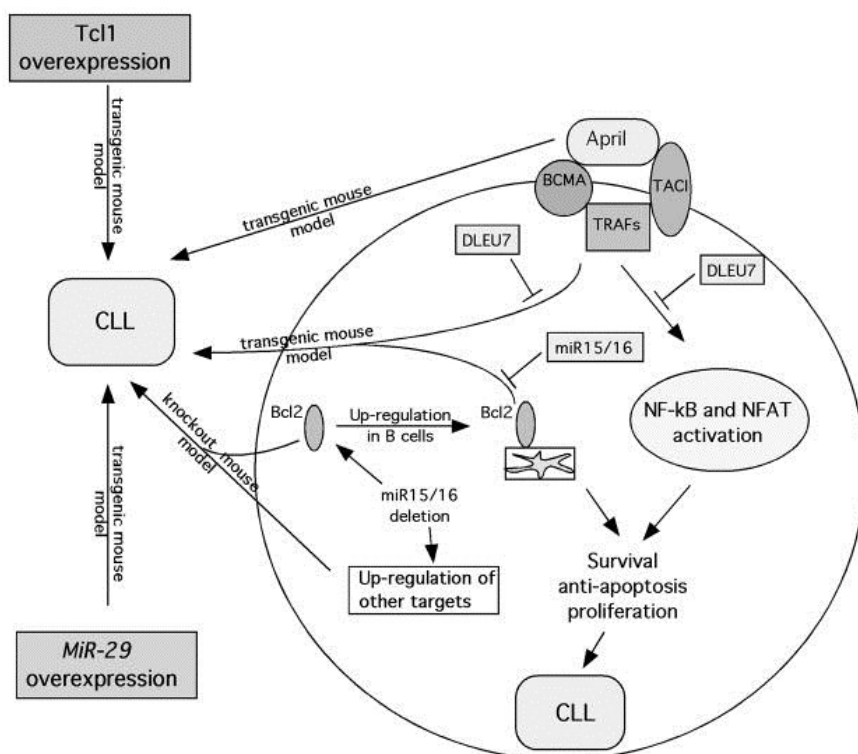


Figura 1.6.3.5a Rappresentazione schematica delle vie di segnale molecolari in LLC in vivo ed in modelli animali (da Pekarsky Y et al *Seminars in Cancer Biology* 2010)

Nuovi studi hanno riconosciuto il ruolo prognostico dei miRNAs anche nella LLC, poiché espressi in maniera differenziale nelle forme aggressive ed indolenti di malattia, in accordo con i classici sottogruppi citogenetici. Ad esempio un' aumentata espressione di miR-21 si associa a LLC aggressive caratterizzate dalla del17p- mentre miR-181 correla in modo inversamente proporzionale con la prognosi, tanto da essere stato proposto come marcatore d'indicazione al trattamento. Inoltre, è stato proposto il ruolo di miR-34a come indicatore di chemiorefrattarietà alla fludarabina in caso di ridotta espressione, anche in maniera indipendente dallo stato mutazionale di TP53 (70). Una ridotta risposta alla terapia e quindi un minor OS sono state identificate dal gruppo della Ferrajoli nelle LLC con un' aumentata espressione plasmatica e cellulare di miR-155; questo stesso miRNA è stato proposto come possibile indicatore dei casi di MBL che evolveranno in una LLC conclamata (73).

1.6.3.6 Lunghezza dei Telomeri

I telomeri sono delle strutture protettive specializzate localizzati nelle regioni terminali dei cromosomi e sono composti da sequenze esanucleotidiche (TTAGGG) ripetute in tandem a

cui si associa il complesso di proteine di protezione. Durante i normali processi di replicazione cellulare, i telomeri vanno incontro alla perdita di circa 50-100 paia di basi per mitosi. Quando l'accorciamento telomerico in un singolo cromosoma raggiunge dimensioni maggiori di un livello definito "critico", la cellula non prolifera, andando incontro ad un processo di senescenza e poi di morte cellulare. Nel caso in cui la cellula continui a proliferare, come avviene nella carcinogenesi di diverse neoplasie solide ed ematologiche, si determina un'elevata instabilità cromosomica favorente le aberrazioni cromosomiche numeriche e strutturali tipiche delle neoplasie. Fisiologicamente un gruppo di enzimi con caratteristiche di ribonucleoproteine, rappresentato dalle telomerasi, impediscono l'accorciamento dei telomeri con la sintesi di sequenze telomeriche ripetute alle estremità cromosomiche. Il mantenimento dei telomeri viene anche protetto dall'attività del complesso proteico di protezione che regola inoltre le telomerasi stesse.

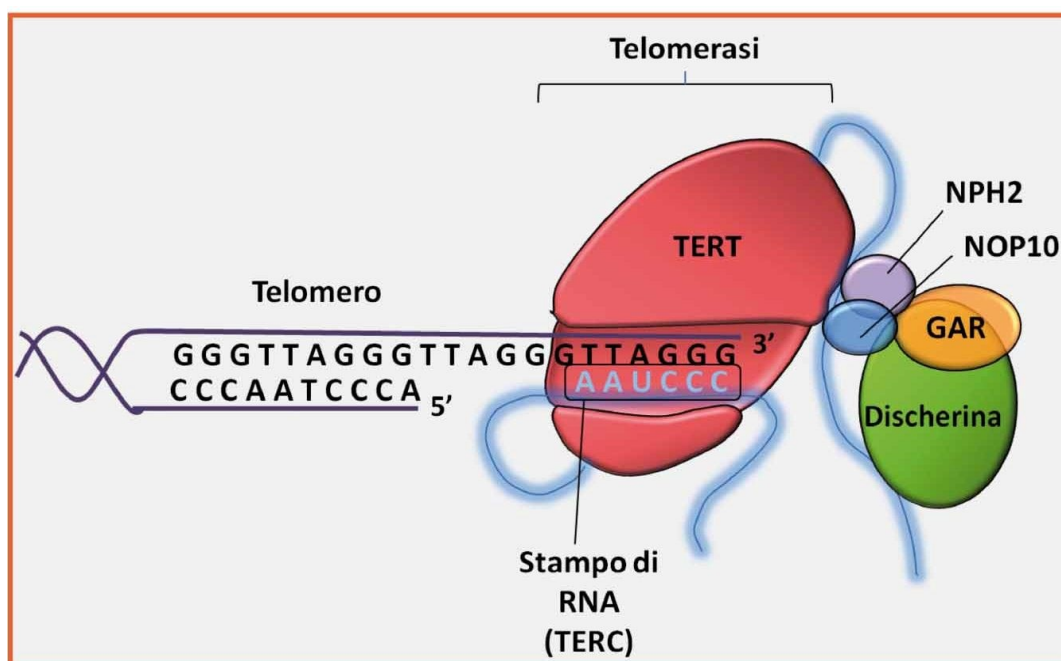


Fig. 1.6.3.6a: Struttura del complesso telomerasico

L'accorciamento dei telomeri avviene fisiologicamente con l'invecchiamento, soprattutto nei leucociti (74).

Numerosi studi hanno rilevato un significativo accorciamento dei telomeri nei soggetti affetti da LLC rispetto ai soggetti sani. Più in particolare, Hoxha et al hanno ipotizzato, studiando un gruppo di pazienti in stadio precoce, che l'accorciamento dei telomeri avvenga precocemente. Tale alterazione è stata poi correlata con gli altri fattori prognostici noti identificando una concordanza tra forme di LLC con telomeri corti e quelle con IGHV-UM (75).

Il ruolo giocato dai telomeri nel mantenimento della stabilità genomica è stato dimostrato da diversi autori anche nello studio della LLC tanto che Mansoura et al hanno rilevato una correlazione statisticamente significativa tra lunghezza dei telomeri e gruppo prognostico definitivo citogeneticamente (telomeri progressivamente più corti passando da 13q-, +12, 11q- e quindi 17p-).

Lo studio di Hoxha, inoltre, studiando le proteine che costituiscono il complesso di protezione, ha evidenziato un maggior grado di ipometilazione di queste nelle LLC

all'esordio suggerendo quindi come la lunghezza dei telomeri possa essere condizionata anche da eventi epigenetici (75).

2. Sviluppi delle conoscenze in tema di evoluzione e architettura clonale nella LLC

2.1 Introduzione

Il principio basilare della teoria evuzionistica darwiniana è la selezione naturale delle varianti genetiche maggiormente adattative, dove l'adattamento è definito come l'abilità di sopravvivere e riprodursi. Il concetto di selezione subclonale delle varianti più adattative venne per la prima volta applicato al cancro da Nowell nel 1976 (76) e successivamente supportato dalle acquisizioni della moderna genomica (77). La conoscenza della diversità clonale e della selezione clonale operanti in un dato specifico cancro sono critiche per la comprensione della progressione di malattia, della risposta al trattamento e dello sviluppo di resistenza. L'architettura clonale di ogni cancro è in stato di evoluzione costante e tale processo può articolarsi su periodi di tempo anche molto lunghi. Clinicamente, mutazioni importanti possono essere presenti all'esordio e diventare evidenti solo nel tempo per effetto della pressione selettiva.

Nonostante la convinzione generale, fino a pochi anni fa, che la CLL fosse un disordine linfoproliferativo essenzialmente stabile dal punto di vista genetico, sempre più solide sono le evidenze favore di una evoluzione clonale nel 15-42% dei casi, sia utilizzando una analisi convenzionale del cariotipo (78) che l'analisi in FISH (79-82). L'incidenza di questo fenomeno è variabile e dipende non solo dalla lunghezza del follow-up, ma ovviamente anche dal numero di sonde utilizzate per l'analisi FISH di interfase.

In studi precedenti (83), l'evoluzione clonale è stata definita come la comparsa tardiva di alterazioni a carico dei cromosomi 17p, 11q, 6q e 12 ed era associata a markers di malattia attiva, come la positività di Zap70 e lo stato non mutato di IGVH (81,82). Oltre alle classiche alterazioni associate alla CLL, grande attenzione ha suscitato la presenza di traslocazioni coinvolgenti il gene per le catene pesanti delle immunoglobuline (IGH) posto sulla regione 14q32. Questa alterazione, presente nel 6-19% dei pazienti alla diagnosi, è associata a maggiore richiesta di terapie specifiche e ad un outcome più sfavorevole (84,85).

L'incidenza della traslocazione 14q32 al momento della evoluzione clonale è sconosciuta. Per quantificare l'incidenza dell'evoluzione clonale e comprendere il suo significato clinico, compresa la comparsa tardiva di traslocazioni a carico della regione 14q32 (IGH) in una casistica real life, abbiamo condotto uno studio pubblicato su *Leukemia&Lymphoma* nel 2011, comprendente 105 casi di CLL analizzati sequenzialmente presso il nostro Istituto nell'arco di 10 anni con un pannello di sonde comprendenti anche una sonda IGH break-apart.

2.2 CONTRIBUTO SPERIMENTALE:

Clonal evolution including 14q32/IGH translocation in chronic lymphocytic leukemia: analysis of clinicobiologic correlation in 105 patients (Allegato 1)

2.2.1 Razionale dello studio

Alla diagnosi, fino all'80% dei casi di LLC mostrano aberrazioni cromosomiche clonali, alcune delle quali di sicuro significato prognostico, come visto nei precedenti paragrafi. Nonostante la tradizionale e storica visione della LLC come una patologia sostanzialmente stabile dal punto di vista genetico, una evoluzione clonale è stata dimostrata nel 15-42% dei pazienti, utilizzando una analisi tradizionale del cariotipo (78) o una metodica FISH (79). L'incidenza di questo fenomeno è variabile e dipende dalla lunghezza del follow-up (81) e dal numero di sonde utilizzate per l'analisi FISH (80). In studi precedenti, l'evoluzione clonale è stata definita come la comparsa tardiva di alterazioni dei cromosomi 17p, 11q, 6q e 12 (82) ed è associata a markers di attivazione, come la positività per ZAP70 e lo stato non mutato di IGVH (81).

A fianco delle alterazioni classicamente associate alla LLC, come 13q- (40%), +12 e 11q- (10-15% dei casi), 17p- (2-5% dei casi) (49), sono state descritte altre alterazioni ricorrenti, in particolare le traslocazioni che coinvolgono il gene per le catene pesanti delle immunoglobuline IGH. Queste alterazioni sono state identificate nel 6-19% dei pazienti alla diagnosi (47) e sono associate a outcome inferiore e a maggiore richiesta di trattamento (85).

L'incidenza di queste alterazioni al momento dell'evoluzione clonale non è nota. Per definire meglio l'incidenza e il significato dell'evoluzione clonale, compresa la comparsa tardiva di traslocazioni 14q32, abbiamo analizzato sequenzialmente 105 pazienti affetti da LLC afferiti al nostro Istituto in un arco temporale di 10 anni, con un pannello di sonde FISH includenti una sonda break-apart per IGH.

2.2.2 Pazienti e metodi

105 casi di CLL, definita morfologicamente e comprovata da score Matutes \geq 3 per linfocitosi clonali $>$ 5000/ul, sono stati arruolati sequenzialmente presso il nostro Istituto tra il 1995 e il 2004. Tutti questi pazienti sono stati sottoposti ad analisi FISH alla diagnosi come parte di un work-up clinico routinario e successivamente a uno studio FISH sequenziale, prima di ogni nuova linea terapeutica e a distanza di 4-6 anni per i pazienti non sottoposti ad alcuna terapia.

L'analisi FISH è stata condotta su sangue periferico usando sonde commerciali per la identificazione di delezioni a carico di 13q14/D13S25, 11q23/ATM e 17p13/TP53, così come per l'identificazione di trisomia del 12e traslocazioni 14q32/IGH. Di 10 pazienti, per scopi clinico-diagnostici indipendenti dallo studio, sono stati eseguiti anche un aspirato midollare o una biopsia linfonodale e il materiale è stato successivamente processato per eseguire studio FISH dei campioni prelevati.

Le caratteristiche dei pazienti arruolati al baseline sono illustrate nella tabella 13.

Characteristics	All patients (no. of cases)	Without CE (n = 90)	With CE (n = 15)	Without 14q32 translocation at CE (n = 98)	With 14q32 translocation at CE (n = 7)
Median age, years (range)	63 (31-86)	63 (31-86)	63 (51-78)	63 (31-86)	60 (51-71)
M/F ratio	66/39	57/33	9/6	62/36	4/3
Lymphocytes					
< 30 × 10 ⁹ /L	89	78	11	84	5
> 30 × 10 ⁹ /L	16	12	4	14	2
Rai stage					
0-1	84	74	10	80	4
2-4	21	16	5	18	3
CD38 +					
Negative	72	64	8	69	3
Positive	30	23	7	26	4
ZAP70					
Negative	46	40	6	42	4
Positive	25	17	8	22	3
FISH aberrations					
Standard risk	92	81	11	87	5
High risk	13	9	4	11	2
Treated before CE					
Yes	58	43	15*	51	7**
No	47	47	0	47	0
Relapsed/refractory					
Yes	27	16	11***	21	6****
No	31	27	4	30	1

*p < 0.0001; **p = 0.014; ***p = 0.016; ****p = 0.027.

CLL, chronic lymphocytic leukemia; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; CE, clonal evolution.

Tabella 13: caratteristiche al baseline e dati clinici di 105 pazienti con CLL sottoposti a valutazione FISH sequenziale.

I pazienti con 11q- o 17p- sono stati considerati, in accordo con le correnti linee guida, ad alto rischio citogenetico, mentre i pazienti con 13q-, trisomia 12 e traslocazioni 14q32/IGH sono stati considerati a rischio citogenetico standard.

A fianco dello studio FISH, abbiamo valutato tramite citofluorimetria l'espressione di ZAP70 e CD38. I pazienti inoltre hanno eseguito studio radiologico del torace ed ecografia completa dell'addome, a completamento della stadiazione clinica.

L'indicazione al trattamento è stata posta in accordo con i criteri NCI (86). La totalità dei pazienti giovani è stata trattata in prima linea con schemi contenenti fludarabina. La maggioranza dei pazienti con età superiore a 70 anni è stata invece trattata con regimi a base di clorambucile.

Per quanto concerne l'analisi statistica, il time to first treatment (TTT) è stato calcolato dalla data della diagnosi alla data d'inizio della terapia. La malattia è stata definita refrattaria se stabile o in progressione durante il trattamento o se in progressione entro i primi sei mesi dopo trattamento a base di fludarabina in monoterapia o in regimi combinati. Infine, il time to refractoriness (TTCR) è stato calcolato dalla data della terapia di prima linea alla data di refrattarietà a regime fludarabine-based o all'ultimo giorno di follow-up. L'overall survival (OS) era misurato dalla diagnosi alla morte o all'ultimo follow-up.

Per una descrizione più estesa di materiali e metodi, si rimanda alla copia allegata del lavoro originale.

2.2.3 Risultati

Il follow-up mediano è stato 73 mesi (range 12-180 mesi).

Vi è stata evidenza di evoluzione clonale (CE) in 15/105 pazienti dopo 24-170 mesi, mediana 64 mesi. Aberrazioni clonali ricorrenti al momento dell'evoluzione sono state: traslocazioni 14q32/IGH in sette pazienti, 17p- in quattro pazienti, 11q- in due pazienti, 13q- biallelica in quattro pazienti, 13q- in emizigosi in un paziente e delezione 14q32 in un

paziente. La 17p- era associata a riarrangiamento 14q32 in 3/7 pazienti, uno dei quali aveva sviluppato inoltre una delezione biallelica di 13q (vedi tabella 14).

In due casi con riarrangiamento di 14q32/IGH alla CE, era disponibile un campione midollare o linfonodale di confronto. In questi pazienti la traslocazione nel midollo osseo o nel linfonodo precedeva la comparsa della stessa su sangue periferico, persistendo in un'analisi successiva in entrambi i casi.

Tutti i pazienti con traslocazione 14q32 sono stati studiati tramite FISH per identificare i possibili partner di traslocazione: 3/7 casi mostravano un segnale di fusione IGH-BCL2, congruo con t(14;18)(q32;q21). Nei restanti 4/7 casi non è stato possibile identificare il partner di traslocazione.

Patient	Aberration at diagnosis (% of cells)	Aberrations at CE	No. of previous lines of treatment	Interval between diagnosis and clonal evolution (months)
1	13q- biallelic (42%)	13q- biallelic (55%); IgH R (18%)*; 17p- (27%)	2	60
2	No aberration	17p- (26%); IgH R (21%) (<i>IGH-BCL2</i>)	1	58
3	11q- (20%)	11q- (26%); IgH R (20%)	1	73
4	13q- (21%)	13q- (53%); IgH R (19%)	3	91
5	+12 (28%)	+12 (42%); IgH R (16%) (<i>IGH-BCL2</i>)	4	64
6	13q- (32%); 11q- (15%)	13q- biallelic (34%); 11q- (27%); IgH R (21%) (<i>IGH-BCL2</i>); 17p- (18%)	4	74
7	+12 (30%)	+12 (55%); IgH R (25%)*	3	51
8	No aberration	11q- (42%)	4	41
9	No aberration	17p- (54%)	4	97
10	No aberration	11q- (61%)	3	48
11	13q- (66%); 11q- (65%)	11q- (61%); 13q- biallelic (60%)	5	84
12	+12 (56%)	+12 (51%); 13q- (71%)	3	87
13	No aberration	13q- biallelic (71%)	3	53
14	13q- (78%)	13q- biallelic (67%)	5	170
15	No aberration	14q32 deletion (45%)	2	24

*Detected in BM/LN sample before its appearance in PB.

FISH, fluorescence *in situ* hybridization; CE, clonal evolution; IgH R, rearrangement of IgH with split signal by FISH (14q32/IGH translocation).

Tabella 14: risultati FISH in 15 pazienti con CE.

Nella nostra coorte, 47/105 pazienti non hanno richiesto terapia specifica nel tempo di ossevezione, mentre 58/105 pazienti hanno ricevuto da 1 a 6 linee di trattamento.

Come anticipato, una CE è stata identificata in 15 pazienti, tutti pretrattati, in 7 dei quali vi era una traslocazione 14q32/IGH, comparsa dopo 1-4 linee di trattamento (mediana 3). Al contrario, nessuno dei pazienti liberi da terapia ha sviluppato una CE ($p < 0.0001$). ZAP70+ e alto rischio citogenetico sono risultati predittivi di CE con una significatività statistica border-line ($p = 0.055$ e 0.07 rispettivamente).

La correlazione tra sviluppo di CE e outcome clinico, come emerge dai nostri dati, è la seguente: l'OS dalla diagnosi è più breve nei pazienti con CE, ma con una differenza non statisticamente significativa; si è osservato inoltre un più breve TTT ($p = 0.003$) e TTCR ($p = 0.0046$) nei pazienti con CE (fig 2.2.2 a e b). Tra le caratteristiche alla diagnosi predittive di TTCR nei 58 pazienti trattati emergono citogenetica alto rischio ($p = 0.0032$) e stadio avanzato ($p = 0.0004$). La sopravvivenza dopo CE era 32 mesi in 15 pazienti, sovrapponibile a quella dei pazienti con sviluppo tardivo di t(14q32). I dati sono riassunti nella tabella 15.

Outcome measure	Months	p-Value
TTT		
All patients (<i>n</i> = 105)	54 (SE 11.1)	
With CE (<i>n</i> = 15)	35 (SE 3.6)	0.0033
Without CE (<i>n</i> = 90)	71 (SE 14.0)	
With 14q32 translocation (<i>n</i> = 7)	36 (0.40)*	0.067
Without 14q32 translocation (<i>n</i> = 98)	63 (13.90)	
TTCR		
All patients (<i>n</i> = 58)	72 (SE 8.7)	
With CE (<i>n</i> = 15)	34 (SE 5.2)	0.0046
Without CE (<i>n</i> = 43)	86 (SE 12.1)	
With 14q32 translocation (<i>n</i> = 7)	27 (SE 0.2)	0.0002
Without 14q32 translocation (<i>n</i> = 51)	75 (SE 6.8)	
Survival from diagnosis		
All patients (<i>n</i> = 105)	173 (SE 35.1)	
With CE (<i>n</i> = 15)	124 (SE 2.03)	NS
Without CE (<i>n</i> = 43)	173 (SE 18.80)	
With 14q32 translocation (<i>n</i> = 7)	125 (SE 2.0)	NS
Without 14q32 translocation (<i>n</i> = 51)	173 (SE 33.0)	

*

CE, clonal evolution; TTT, Time to first treatment; TTCR, time to chemorefractoriness; SE, standard error; NS, not significant.

Tabella 15: correlazione tra le misure di outcome e lo sviluppo di CE.

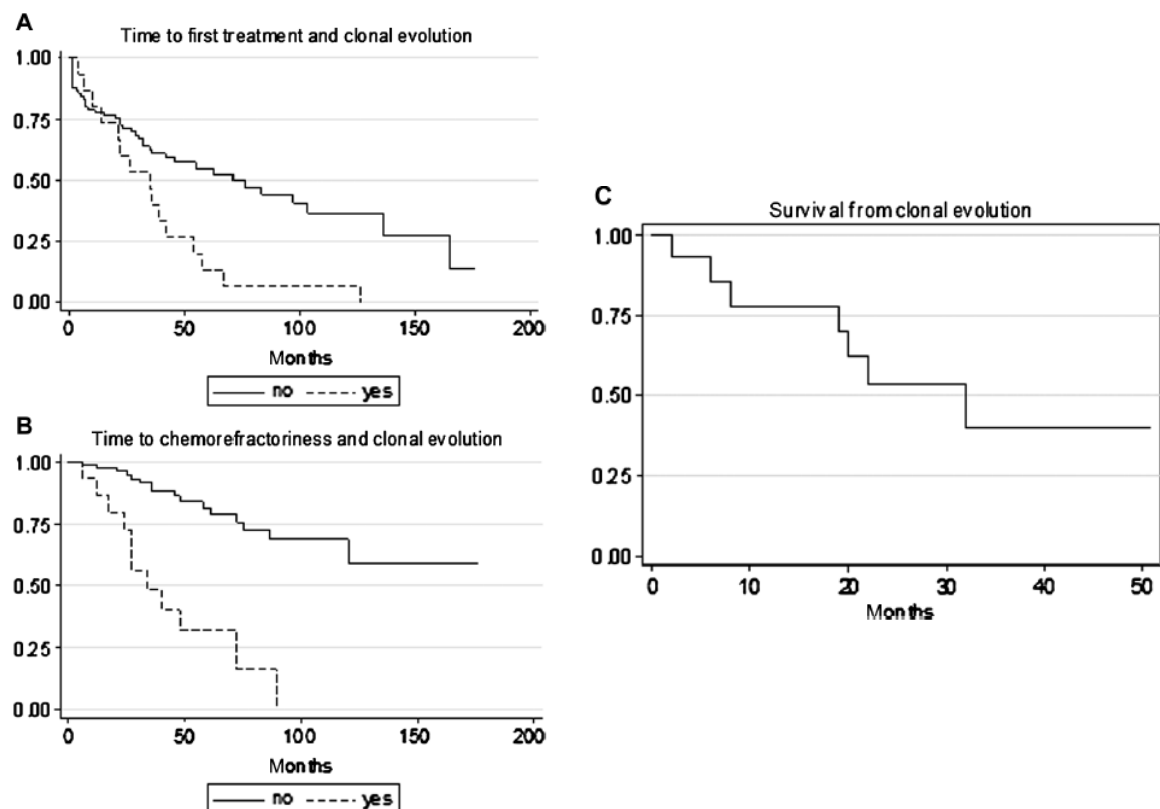


Fig. 2.2.2 (A) Time to first treatment in pazienti con (“yes,” *n* = 15) e senza CE (“no,” *n* = 90); (B) time to chemorefractoriness in pazienti con (“yes,” *n* = 15) e senza CE (“no,” *n* = 43); (C) sopravvivenza dopo CE in 15 pazienti.

2.2.4 Discussione

La CLL può andare incontro a CE, con comparsa tardiva di delezione 11q, 17p e 6q nel 16-17% dei casi (79). Anche se vi sono dati crescenti sul ruolo delle traslocazioni a carico di 14q32/IGH (84,85), che sembra identificare un sottogruppo di pazienti con necessità di trattamento maggiore, non si hanno dati in merito alla sua comparsa tardiva.

Dei 105 casi studiati, 15 dei nostri pazienti hanno sviluppato una CE, e in particolare 7/15 mostravano una traslocazione 14q32/IGH come evento tardivo nella storia naturale della loro malattia. La comparsa tardiva di traslocazioni 14q32 è stata riportata in un subset di pazienti con LNH marginale splenico caratterizzato da un decorso clinico relativamente aggressivo (87). Analogamente, sono documentati alcuni casi di CLL con partner alternativi di traslocazione, che lasciano supporre una natura secondaria della traslocazione stessa (84).

I pazienti con t14q32 sono stati studiati con un vasto pannello di sonde per identificare i partners di traslocazione: in 3/7 casi è stato possibile rilevare un segnale di fusione per IGH/Bcl-2, congruamente a precedenti osservazioni che vedono la t(14;18)(q32;q21) come la più frequente nella LLC (84).

Nella nostra casistica, nei pazienti nei quali era stata condotta l'indagine, la traslocazione a livello linfonodale e midollare precedeva la sua comparsa su sangue periferico. Questa osservazione appare congrua con i risultati di recenti studi hanno indicato come le cellule di CLL a livello linfonodale e midollare abbiano veri e propri centri di proliferazione tumorale (88-90); in maniera interessante Flanagan e coll. hanno recentemente dimostrato, tramite FISH condotta su materiale linfonodale paraffinato, proprio una elevata incidenza di traslocazioni 14q32/IGH (17-19%) in campioni di SLL/CLL (91).

I nostri pazienti sono stati osservati in maniera longitudinale nel tempo, per un periodo superiore a 10 anni, per cui non è stato possibile eseguire una analisi comparativa che prendesse in considerazione l'impatto clinico-biologico dei vari regimi terapeutici utilizzati. Tuttavia, considerando i pazienti con traslocazione 14q32/IGH, il numero mediano di trattamenti precedenti era 3 (range 1-4) e tutti avevano ricevuto almeno una linea terapeutica contenente alchilanti. Nell'analisi FISH d'interfase, il clone maggioritario 14q32 era associato a subcloni recanti 17p- e 13q- biallelica. Questi dati, valutati complessivamente, suggeriscono come l'insabilità genetica derivante da trattamenti precedenti possa giocare un ruolo nell'emergenza di cloni minori e nella determinazione di un'architettura subclonale complessa e dinamica.

Nella nostra casistica, una CE si è verificata solo in pazienti pretrattati. Tra i parametri ematologici al baseline, solo la positività per ZAP70 e la categoria genetica ad alto rischio si sono dimostrati predittivi per CE con una significatività borderline.

Analizzando la possibile associazione della CE con gli indicatori comuni di outcome clinico, abbiamo dimostrato come la TTT e TTCR siano più brevi nei pazienti con CE rispetto ai pazienti senza CE, in maniera statisticamente significativa. Questa associazione si mantiene anche considerando separatamente i pazienti con traslocazione 14q32/IGH, rispetto alla TTCR. Questo dato può essere giustificato dalla considerazione che la CE riflette una situazione di instabilità genetica, normalmente associata con l'evoluzione della malattia per emergenza di un clone resistente.

In conclusione, i nostri dati dimostrano come la traslocazione 14q32/IGH rappresenti una delle più frequenti alterazioni acquisite durante la storia naturale della LLC, e che questa possa essere identificata più precocemente su BM e linfonodi. La CE avviene in pazienti

pretrettati con inferiore TTT e TTCR e la sopravvivenza dopo CE, con o senza traslocazioni di 14q32, è relativamente breve.

2.3 Architettura subclonale

In maniera coerente con i risultati preliminari del nostro lavoro, sempre più studi hanno dimostrato come singole neoplasie siano geneticamente eterogenee e contengano diverse popolazioni subclonali (92, 93). Infatti, si ritiene che le neoplasie evolvano attraverso la competizione e le interazioni tra cloni geneticamente diversi (94). Nonostante l'esistenza di subcloni sia nota, si conosce ancora relativamente poco sulla frequenza, sull'identità, sull'evoluzione delle alterazioni subclonali e sul loro impatto sul decorso clinico.

Il contributo delle mutazioni subclonali alla varietà del decorso clinico della LLC è stato mostrato per la prima volta in maniera estesa e longitudinale in una recente pubblicazione ad opera di Landau e coll (175). La presenza di mutazioni subclonali è stata indagata con metodica di whole-exome sequencing (WES), una metodica rapida, affidabile, relativamente low-cost e "comprehensive" per rilevare mutazioni somatiche codificanti. Studi precedenti, eseguiti con metodica FISH o con microarrays (95, 96), avevano dimostrato come i subcloni rechino mutazioni driver ed evolvano nel tempo. Tuttavia, queste metodiche rivelano solo un numero limitato di mutazioni, in maniera direttamente dipendente dalla sensibilità della metodica stessa, mentre il WES consente di identificare più mutazioni contemporaneamente, con un livello di sensibilità e specificità tali da identificare correttamente un subclone. Lo studio ha quindi analizzato 160 coppie di campioni neoplastici/normali (quesi ultimi ricavati da cellule della mucosa orale) rappresentativi di altrettanti pazienti affetti da LLC a decorso clinico variabile; per 18 di questi pazienti, inoltre, è stato possibile eseguire una valutazione su due timepoints differenti.

I risultati ottenuti sono i seguenti: l'età e la configurazione IGVH mutata si associano a un maggior numero di mutazioni somatiche clonali; la terapia, invece, si associa ad un aumentato numero di mutazioni subclonali; infine, la presenza di drivers subclonali impatta negativamente sulla prognosi. Più specificatamente, partendo da queste osservazioni, Landau propone l'esistenza di più fasi temporali successive nella progressione della LLC. Nel primo periodo, eventi passeggeri si accumulano nelle cellule che eventualmente diventeranno il clone fondatore della leucemia, in maniera direttamente proporzionale all'età del paziente (fig 2.3a). In un secondo momento, le mutazioni fondanti la LLC compaiono in una singola cellula portandola alla trasformazione leucemica (fig 2.3b): si tratta di mutazioni clonali, ma diversamente dalle mutazioni passeggeri, queste sono ricorrenti nei pazienti. Landau ha identificato queste mutazioni driver (del13q, MYD88, trisomia del 12) che sembrano relativamente specifiche della CLL e ristrette ad altre neoplasie B linfocitarie. Nel terzo periodo, alla progressione di progressione di malattia, mutazioni subclonali si espandono nel tempo in funzione della loro intrinseca funzionalità (proliferazione, apoptosi) e di pressioni evolutive estrinseche (terapia e competizione interclonale), (fig 2.3c e d). Questi drivers subclonali includono oncogeni ubiquitari come ATM, TP53, mutazioni di RAS. Quesi dati suggeriscono che le mutazioni che riguardano selettivamente le cellule B contribuiscono alla patogenesi e precedono la selezione di drivers più generici, che invece sottendono alla progressione di malattia. Questi elementi possono essere utilizzati come fattori predittivi nei pazienti affetti da LLC. Una questione di rilievo affrontata da Landau nel suo ottimo lavoro è l'impatto del trattamento sull'evoluzione clonale. In 18 pazienti, per i quali è stato possibile un monitoraggio longitudinale, sono stati osservati due pattern comportamentali: uno di

equilibrio clonale in cui le taglie relative di ogni subclone era mantenute, e uno di evoluzione in cui alcuni subcloni diventavano dominanti. L'interpretazione di Landau è che, in assenza della forte pressione selettiva conseguente alla terapia, è necessario più tempo perché un nuovo subclone recante un vantaggio adattativo soppianti la popolazione clonale dominante. Al contrario, nei soggetti trattati, la terapia citotossica tipicamente rimuove il clone dominante, agendo come un evento di estinzione di massa, e modifica lo scenario evolutivo in favore di un subclone maggiormente aggressivo. Per questo motivo subcloni altamente fit beneficiano della terapia e mostrano una rapida espansione, condizionando le fasi successive di malattia (97).

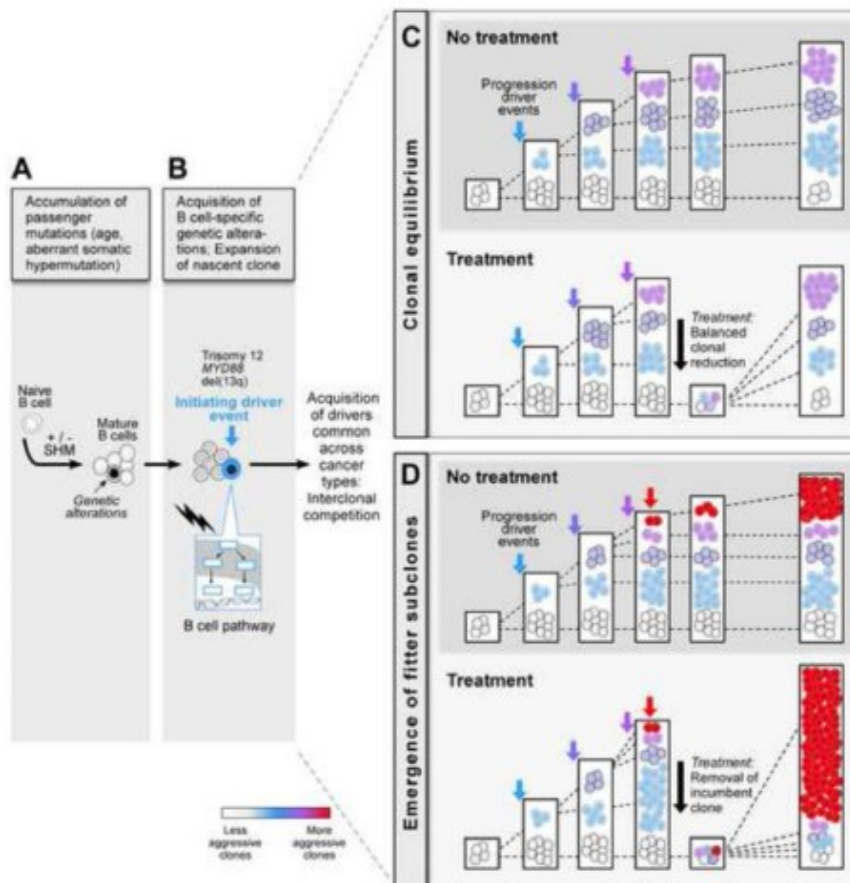


Fig. 2.3 Un modello di trasformazione per la CLL. I dati suggeriscono periodi distinti nella storia della CLL: vi è un aumentato numero di mutazioni clonali nei pazienti più anziani e con stato IGVH mutato, che verosimilmente corrisponde a eventi di mutagenesi antecedenti la trasformazione (a). Sono state identificate mutazioni precoci e tardive, specifiche delle cellule B (B) o cangerogeni ubiquitari (C e D), rispettivamente. Infine, l'evoluzione clonale e il trattamento mostrano una relazione complessa. La maggior parte dei pazienti non trattati e una minoranza dei pazienti trattati mantengono un equilibrio clonale stabile per anni (C). Tuttavia, in presenza di un subclone contenente un driver forte, il trattamento distrugge l'equilibrio interclonale e accelera l'evoluzione clonale della LLC (da Landau et al, Cell 2013).

2.4 CONTRIBUTO SPERIMENTALE:

Genetic subclonal complexity and miR25a-5p down-regulation identify a subset of patients with inferior outcome in low risk CLL patients (Allegato 2).

2.4.1 Razionale dello studio

Come illustrato fino ad ora, vi sono sempre maggiori evidenze che l'eterogeneità dell'architettura subclonale della LLC correla con un outcome globalmente più sfavorevole (98).

Inoltre, nella CLL, l'espressione differenziale di CD38 è associata ad un distinto profilo di espressione genica (99). Infine, un'unica signature di espressione di microRNAs è stata associata a markers di attivazione e a fattori prognostici sfavorevoli (100).

Al fine di comprendere meglio le caratteristiche biologiche e molecolari predittive di possibile progressione di malattia, in particolare in quei pazienti tradizionalmente identificati come a buona prognosi, abbiamo disegnato uno studio in 2 fasi aventi i seguenti propositi:

- fase 1:
 - a) verificare se, nella frazione leucemica CD38+ di pazienti naive con CLL CD38- (definita come positività per CD38 inferiore al 7%) e rischio citogenetico favorevole, possano trovarsi lesioni genetiche aggiuntive;
 - b) identificare i fattori biologici associati ad eventuali lesioni genetiche aggiuntive nel clone minoritario CD38+, che siano predittivi di progressione di malattia;
- fase 2: validare i risultati ottenuti in una coorte di controllo di pazienti.

2.4.2 Materiali e metodi

Nello studio sono state arruolate consecutivamente due coorti di pazienti. La coorte 1 includeva 28 pazienti non trattati afferiti al nostro Centro dal 2005 al 2006. La coorte 2 consisteva di 71 pazienti consecutivi diagnosticati presso il nostro Istituto tra il 2007 e il 2011. Criteri di inclusione erano: diagnosi di LLC secondo i criteri NCI; negatività per CD38 (definita come espressione di CD38+ inferiore al 7%); rischio citogenetico favorevole, definito come delezione isolata di 13q o cariotipo normale. Le caratteristiche cliniche e biologiche di entrambe le coorti sono riportate in tabella 16.

	Cohort 1	Cohort 2
N of patients	28	71
M/F	16/12	49/22
Age mean yrs (range)	65 (50-91)	64 (38-86)
Stage (Binet) a/b/c	28/0/0	63/8/0
FISH neg/13q deletion	14/14	40/31
ZAP70 (>30%) neg/pos	22/5	61/10
IGHV mut/unmut	20/2	60/11
TP53 mut/unmut	0/18	0/69

Tabella 16: Principali caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti in Coorte 1 e 2.

Per una descrizione dettagliata delle metodiche di analisi immunofenotipica, separazione cellulare, analisi FISH e RNA-microarray si rimanda all'articolo originale allegato alla tesi.

2.4.3 Risultati

I risultati dell'indagine FISH sulle popolazioni leucemiche CD38+ e CD38- nella Coorte 1 sono riportati in tabella 17.

In 16/28 pazienti si sono riscontrate alterazioni genetiche nel clone CD38+ non rilevabili nel clone maggioritario CD38-. Per verificare se le lesioni genetiche aggiuntive fossero su cloni differenti o sulla stessa sottopopolazione cellulare, sono stati condotti esperimenti di co-ibridizzazione con sonde appropriate negli 11 casi mostranti più di una singola aberrazione nelle cellule CD38+. Le lesioni sono risultate nel medesimo clone in 3 casi, nei restanti invece coinvolgevano più cloni CD38+ distinti.

Abbiamo successivamente valutato l'espressione globale di microRNAs in 19 pazienti, considerando le cellule leucemiche CD38+ e CD38- separatamente. Abbiamo dimostrato come, alla diagnosi, la maggior parte dei pazienti con lesioni genetiche nelle cellule CD38+ (W) abbiano un profilo distintivo miRNA quando confrontati con quelli senza anomalie aggiuntive (WO) sia nelle sottopopolazioni CD38+ che CD38-. In particolare, 23 miRNA sono stati trovati differentemente espressi nella popolazione CD38+ ($p < 0.05$) e 9 miRNA sono stati trovati differentemente espressi nella popolazione CD38- ($p < 0.05$).

Di questi, 4 miRNA sono stati trovati downregolati nei pazienti W vs WO sia nel clone CD38+ che nel clone CD38-: let-e7-5p, miR-125 a-5p, miR-181b-5 e miR-338-3p. In particolare, miR-125 a-5p mostra il maggior grado di significatività in entrambe le sottopopolazioni e pertanto è stato scelto per le successive correlazioni cliniche. La down-regulation di miR-125 a-5p è stata in seguito confermata in RT-qPCR.

case	FISH results on CD38- cells (%)	FISH results on CD38+ cells (% of positive cells)						
		del(13q)	del(11q)	Trisomy 12	14q32 rearr	del(17p)	Number of additional lesions in CD38+ cells	Cohybridization
56	13q del (20%)	25	20	Neg	32	24	3	Different cells
58	13q del (30%)	28	30	Neg	28	18	3	Different cells
41	Neg	23	24	Neg	Neg	40	3	Different cells
50	13q del (60%)	37	21	15	Neg	33	3	ND
46	13q del (18%)	42	22	Neg	Neg	38	2	ND
49	13q del (60%)	37	23	Neg	21	20	3	Different cells
61	Neg	33	26	Neg	22	23	3	Different cells
43	Neg	34	Neg	Neg	27	Neg	2	Same cells
56	Neg	19	Neg	Neg	49	Neg	2	Different cells
63	Neg	20 (69*)	Neg	Neg	Neg	21	2	ND
45	13q del (69%)	58	33	17	Neg	Neg	2	Different cells
54	Neg	62*	Neg	Neg	18	Neg	2	Same cells
60	Neg	18	Neg	Neg	Neg	Neg	1	NA
48	13q del (38%)	45	20	Neg	Neg	Neg	1	Different cells
57	13q del (30%)	37	Neg	19	Neg	Neg	1	ND
64	Neg	34	Neg	33	Neg	Neg	1	Same cells

Tabella 17: Risultati dell'indagine FISH in pazienti con CLL e lesioni genetiche nelle cellule CD38+ (*delezione biallelica di 13q).

La presenza di anomalie aggiuntive nel clone CD38+ correla con un decorso clinico più aggressivo, caratterizzato da un più breve TTFT ($p=0.0162$), (fig. 2.4.3 a). Non vi erano invece differenze significative tra i due gruppi per quanto concerne le principali caratteristiche clinico-biologiche, come mostrato in tabella 16.

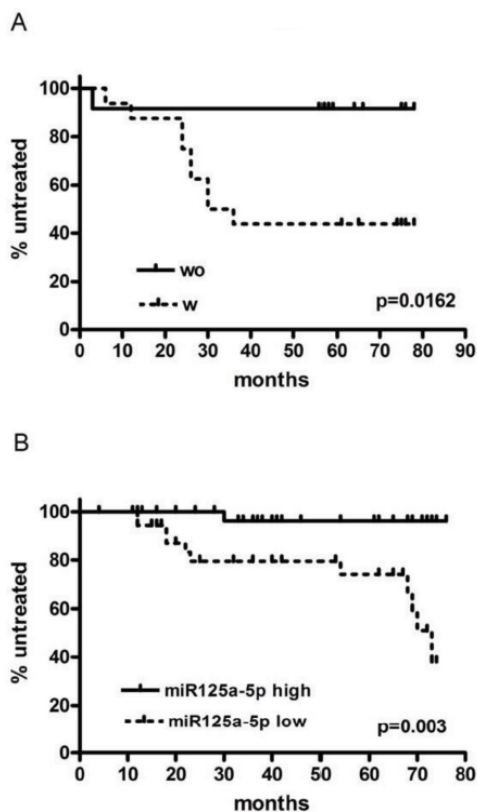


Fig. 2.4.3 a: Time to First Treatment nella Coorte 1 (A) e nella Coorte 2 (B) rispettivamente, secondo la presenza (W) o meno (WO) di lesioni FISH nel subclone CD38+ e in funzione del livello di espressione di miR-125 a -5p, rispettivamente.

Avendo dimostrato che la down-regolazione di miR-125 a-5p è fortemente associata ad anomalie subclonali aggiuntive ed a un minore TTFT, abbiamo validato la variabile su una coorte successiva di 71 pazienti consecutivamente arruolati presso il nostro Istituto e mai trattati. I pazienti sono stati quindi suddivisi in due gruppi, in base al 50° percentile della distribuzione di miR-125 a-5p. Il follow-up mediano è stato 43 mesi e i due gruppi non presentavano differenze significative dal punto di vista delle caratteristiche clinico-biologiche di malattia (tabella 18).

	Cohort 1			Cohort 2		
	Patients with FISH lesions	Patients without FISH lesions	P	miR-125a low	miR-125a high	P
N of patients	16	12	-	35	36	-
M/F	9/7	7/5	ns	26/9	23/13	ns
Age mean yrs (range)	64 (50-91)	66 (52-80)	ns	64 (50-91)	66 (52-80)	ns
Binet stage a/b/c	16/0/0	12/0/0	ns	30/4/1	33/3/0	ns
ZAP70 (>30%) pos/neg	4/12	1/10	ns	6/29	4/32	ns
FISH neg/13qdeletion	8/8	6/6	ns	16/19	16/20	ns
IGHV mut/unmut	11/2	9/0	ns	30/5	30/6	ns
Treated /untreated	9/7	1/11	0.0159	11/24	1/35	0.001

Tabella 18: Caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti in Coorte 1 e Coorte 2 in relazione alla presenza o assenza di anomalie FISH addizionali nelle cellule CD38+ e ai livelli di espressione di miR-125 a -5p, rispettivamente.

Tuttavia, i pazienti con minore espressione di miR-125 a-5p erano caratterizzati da un decorso clinico più aggressivo e da un più breve TTFT, sia in analisi univariata che multivariata (Fig.2.4.3°, grafico B).

2.4.4 Discussione

Vi è evidenza che un'architettura subclonale complessa nella LLC correla con un decorso clinico più aggressivo e che, nella maggior parte dei casi, le mutazioni siano eventi non casuali che si espandono nel tempo grazie ad una pressione selettiva evolutiva di tipo darwiniano (101).

Il CD38 è un marker prognostico sfavorevole in quanto indicatore di attivazione cellulare e proliferazione, che possono essere preludio all'evoluzione clonale e, in ultimo, ad un outcome più sfavorevole (102). Vi sono dati a supporto di un ruolo cruciale del microambiente per quanto riguarda la crescita delle cellule leucemiche, con l'acquisizione sequenziale e l'accumulo progressivo di alterazioni genetiche. Vi sono evidenze, poi, che i centri proliferativi siano ricchi di cellule CD38+ e che le lesioni genetiche potrebbero dunque accumularsi in questi siti con una elevata frequenza (103).

In una coorte di pazienti con LLC mai trattati a basso rischio siamo stati in grado di identificare il significato clinico della presenza di eterogeneità clonale nella frazione minoritaria di cellule leucemiche CD38+.

I nostri dati, infatti, mostrano come in una frazione significativa di pazienti CD38- a rischio citogenetico tradizionale favorevole, la frazione CD38+ possa presentare anomalie aggiuntive, molte delle quali ad alto rischio (11q-, 17p-). In molti casi, inoltre, queste lesioni sono state identificate in cellule diverse, indicando che possono essere presenti multipli cloni citogeneticamente non correlati nella frazione CD38+. La piccola taglia del clone CD38+ preclude la sua identificazione con metodica FISH tradizionale, condotta sulla totalità delle cellule leucemiche, in maggioranza CD38-. La presenza tuttavia di questo subclone si associa ad un più breve TTFT.

Per identificare un biomarker associato con questo fenomeno, abbiamo condotto un'analisi di espressione di microRNA perché studi precedenti avevano dimostrato una correlazione tra down-regolazione di microRNA con la presenza di markers di attivazione (100). Comparando i pazienti della Coorte 1 con o senza anomalie aggiuntive nel subclone CD38+, abbiamo notato come i pazienti W mostrassero un profilo di down-regolazione caratteristico. Tra i microRNA down-regolati, in particolare, miR-125 a-5p appare

soppresso sia nel clone minoritario che nel clone dominante CD38-. È stato quindi scelto come marker associato a complessità clonale e possibilmente a un decorso clinico più aggressivo come suggerito dal più breve TTFT osservato nei pazienti.

La rilevanza di miR-125 a -5p come biomarker di complessità genetica e di outcome inferiore è stata sottoposta a validazione in una seconda coorte prospettica di pazienti con caratteristiche biologiche e cliniche analoghe alla precedente. In questa coorte di validazione siamo riusciti a confermare il ruolo predittivo della down-regolazione di miR-125 a-5q in termini di ridotto TTFT. Questo risultato è di valore, poichè consente di discriminare i pazienti a maggior rischio in una popolazione considerata tradizionalmente a prognosi favorevole.

Come corollario, tramite metodiche di NGS, vi è evidenza di una maggiore incidenza di mutazioni nei geni LLC-relati nei pazienti con down-regolazione di miR-125 a -5p: la maggior parte delle mutazioni evidenziate erano a carico di geni noti per il conferimento di una prognosi sfavorevole (TP53, SF3B1, ATM). Questa osservazione rafforza il legame tra complessità genetica, down-regolazione di miR-125 a-5p e outcome inferiore.

MiR-125 a-5q è un riconosciuto oncosoppressore non tumore specifico che correla, in molte neoplasie solide, con un decorso più aggressivo (104,105). Questo miRNA esercita la sua azione antiproliferativa tramite la down-regolazione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare via il signaling di PI3K-AKT e RAS-RAF. Nell'ambito delle neoplasie ematologiche, è stata recentemente dimostrata una sua down-regolazione nel SMZL, un linfoma indolente che presenta un certo grado di analogia con la LLC (106). Al contrario, esso risulta iperespresso nel DLBCL (107): in questa ottica sarebbe particolarmente interessante andarne a studiare l'espressione nel contesto della sindrome di Richter.

In conclusione:

- (i) tramite analisi FISH abbiamo identificato lesioni genetiche nel clone minoritario CD38+ di pazienti affetti da LLC CD38- a basso rischio citogenetico;
- (ii) abbiamo dimostrato l'associazione tra queste lesioni criptiche e la progressione di malattia;
- (iii) abbiamo dimostrato come la complessità genica e il peggiore outcome fossero associati a down-regolazione di miR125 a-5q;
- (iv) abbiamo validato questo marker in un a coorte indipendente di pazienti CD38- a basso rischio FISH.

Tale risultato consente una migliore stratificazione prognostica di questo subset di pazienti.

3. Terapia

3.1 Indicazione al trattamento, valutazione della risposta e approccio multidisciplinare al paziente

Il trattamento della LLC è drasticamente mutato negli ultimi anni grazie ad una migliore conoscenza dei meccanismi di base della malattia e alla identificazione di nuovi regimi terapeutici efficaci. Questi risultati sono stati ottenuti coniugando i dati derivati dalla ricerca biologica e da numerosi trial clinici ben disegnati.

Le vigenti linee guida NCI indicano la necessità di innestare un trattamento specifico solo in LLC in stadio Binet C/Rai III-IV o con malattia attiva o in caso di progressione, mentre nei restanti casi è mantenuta l'indicazione ad una politica di "watch and wait" (3).

La malattia viene definita attiva, e quindi meritevole di terapia, in caso di presenza di uno dei seguenti criteri:

- a. Progressiva insufficienza midollare con comparsa o peggioramento di anemia e/o piastrinopenia
- b. Splenomegalia massiva (polo splenico debordante dall'arcata costale almeno 6 cm) o progressiva o sintomatica
- c. Linfadenomegalia massiva (diametro maggiore di 10 cm), o progressiva o sintomatica
- d. Linfocitosi progressiva con aumento maggiore del 50% della conta linfocitaria in tempo inferiore a due mesi, o tempo di raddoppiamento linfocitario in meno di 6 mesi partendo da valori di almeno 30.000/ μ l linfociti
- e. Anemia e/o piastrinopenia di natura autoimmune non responsive a terapia con corticosteroidi o con altre terapie standard
- f. Presenza di uno dei seguenti sintomi di progressione: calo ponderale maggiore del 10% in 6 mesi, astenia (ECOG2 o peggioramento ECOG), febbre con temperatura corporea maggiore di 38°C in assenza di altre evidenze di infezione in corso, sudorazioni notturne per un periodo maggiore di un mese senza evidenza di infezione in corso.

In corso di trattamento e/o al termine del programma terapeutico pianificato è necessario valutare il tipo di risposta ottenuta per stabilire se sospendere qualsiasi terapia per il raggiungimento dell'obiettivo terapeutico o se passare a nuova linea in caso di mancata risposta o di malattia in progressione (3).

Le attuali linee guida IWCLL riportano le indicazioni per definire il tipo di risposta raggiunto, distinguendolo in quattro diverse categorie: risposta completa, risposta parziale, malattia stabile o malattia in progressione (Tabella 19)

Parametri	CR	PR	PD
Gruppo A			
Linfoadenopatia	Nessuno > 1.5 cm	Riduzione \geq 50%	Aumento \geq 50%
Fegato e/o milza	Normale	Riduzione \geq 50%	Aumento \geq 50%
Sintomi costituzionali	Nessuno	Qualsiasi	Qualsiasi
Neutrofil	> 1500/ μ l	< 1500/ μ l o aumento > 50% rispetto al basale	Qualsiasi
Linfociti B clonali circolanti	Nessuno	Diminuzione \geq 50% rispetto al basale	Aumento \geq 50% rispetto al basale
Gruppo B			
Piastrine	> 100000/ μ l	< 100000/ μ l o aumento \geq 50% rispetto al basale	Diminuzione \geq 50% dal basale secondaria alla LLC
Emoglobina	> 11 g/dl	> 11 g/dl o aumento \geq 50% rispetto al basale	Diminuzione > 2 g/dl dal basale secondaria alla LLC
Midollo	Normocellulare, linfociti < 30%, no noduli linfoidi; un MO ipocellulare definisce una RCi	Linfociti \geq 30%, o noduli linfoidi, o MO non eseguito	Aumento della linfocitosi del 30% dal normale

Tab. 19 Criteri di risposta clinica secondo linee guida IWCLL 2008

La definizione della risposta è fondamentale poiché la profondità della remissione raggiunta correla sul piano prognostico con PFS e OS (3).

Nella comune pratica clinica la valutazione della risposta richiede: raccolta anamnestica (indagando la presenza di sintomi sistemici e nuovo Performance Status), esame obiettivo con eventuale ecografia addome se eseguita prima del trattamento (studio di linfonodi, fegato, milza, altri organi in caso di localizzazione extralinfatica iniziale o se sospettata nuova comparsa), biopsia midollare o ossea in caso di recente comparsa di citopenie per escludere forme iatrogene secondarie, biopsia specifica PET guidata in caso di sospetta evoluzione in Sindrome di Richter (3).

Diversamente, la definizione della risposta in un trial clinico richiede anche studio strumentale con TC total body, biopsia ossea da eseguire dopo almeno due mesi dalla sospensione della terapia (risposta completa richiede un midollo normocellulato con infiltrazione linfocitaria inferiore al 30%) e studio della malattia minima residua.

Ad oggi il significato dell'ottenimento di una negativizzazione della malattia minima residua (MRD) al termine del trattamento rimane ancora dubbio tanto che le vigenti linee guida non estendono la raccomandazione alla comune pratica clinica (3).

Diversi studi clinici hanno dimostrato la capacità dei regimi immunochemioterapici oggi utilizzati di determinare il raggiungimento di una risposta completa profonda con eradicazione della MRD. In particolare, in tutti questi trial clinici è stato dimostrato che i pazienti con una MRD-negativa sopravvivono più a lungo rispetto a quelli con MRD-

positiva suggerendo quindi che l'eradicazione della MRD possa migliorare PFS, TFS e probabilmente OS. Basandosi su queste premesse, diversi trial clinici stanno valutando se nei pazienti in risposta completa ma con MRD-positiva al termine del trattamento di induzione sia vantaggioso instaurare una terapia di consolidamento fino all'eradicazione della MRD rispetto a posticipare le terapie fino alla progressione di malattia. Infatti, non è ancora noto se il beneficio determinato dall'eradicazione della MRD con anticorpi monoclonali in monoterapia (ad esempio rituximab o alemtuzumab) possa controbilanciare il rischio legato al mantenimento di uno stato di immunodepressione per un periodo di tempo protratto, che espone il paziente a possibili complicanze infettive (da ricordare la frequente riattivazione di CMV in corso di Alemtuzumab). Pertanto, è necessario attendere i dati dei trial clinici randomizzati in corso prima di estendere lo studio della MRD anche nella pratica clinica comune. Inoltre, si è in attesa anche della standardizzazione e validazione delle metodiche di laboratorio utilizzate per stabilire la MRD (67, 22).

Le attuali linee guida IWCLL indicano la necessità di una nuova linea di terapia in caso di malattia in progressione e quindi quando presente almeno uno seguenti punti:

- a. Linfadenomegalia all'esame obiettivo con: i) comparsa di nuove lesioni o di nuove linfadenomegalie (diametro di almeno 15 mm), splenomegalia, epatomegalia o infiltrati in altri organi, ii) aumento di almeno 50% del diametro delle precedenti linfadenomegalie, iii) aumento di almeno 50% della somma del prodotto dei diametri delle singole linfadenomegalie
- b. Epatosplenomegalia con aumento di almeno 50% delle dimensioni o comparsa "de novo"
- c. Raddoppio della conta linfocitaria partendo da un valore minimo di linfociti B di 5.000/ μ l
- d. Trasformazione in una forma istologica più aggressiva (Sindrome di Richter)
- e. Citopenia (anemia per emoglobina minore di 10 g/dl o calo di almeno 2 g/dl rispetto ai valori basali, neutropenia, piastrinopenia con piastrine inferiori a 100.000/ μ l o ridotte di almeno 50% rispetto ai valori abituali) secondaria alla malattia; questo criterio non è valutabile in corso di terapia o in un periodo di tempo inferiore a 3 mesi dalla sospensione della terapia e richiede la dimostrazione e quantificazione dell'eventuale infiltrazione midollare leucemica con biopsia midollare e/o biopsia ossea.

Più in generale si parla di fallimento terapeutico e quindi di mancata risposta non solo in caso di progressione ma anche in caso di malattia stabile (3).

Inoltre per la scelta della nuova linea di terapia è importante distinguere i pazienti recidivati (progressione di malattia dopo almeno sei mesi dalla precedente risposta) e quelli refrattari (se mancata risposta o progressione in meno di sei mesi dalla remissione) (3, 67).

La scelta del trattamento si basa anche sulla valutazione del "fitness status" del paziente e quindi sul suo stato di salute in generale a prescindere dall'età anagrafica. Tale valutazione multidisciplinare è fondamentale poiché indicativa della QoL, dell'aspettativa di vita e della capacità di tollerare le terapie antineoplastiche. Nello specifico comorbilità, stato funzionale, stato nutrizionale e sindromi geriatriche concorrono a determinare l'età biologica di un soggetto (136).

Lo studio delle comorbilità è fondamentale nella LLC considerando che la malattia colpisce prevalentemente soggetti anziani (età mediana alla diagnosi intorno ai 70 anni) e

quindi gravati da numerose patologie concomitanti (copatologie). Infatti, l'incidenza di comorbilità nei pazienti oncologici incrementa con l'avanzare dell'età: il numero mediano di comorbilità è di 2.9 per età inferiore a 65 anni e sale fino a 4.2 nei soggetti con più di 75 anni (137).

Inoltre, è importante sottolineare il significato prognostico negativo delle comorbilità poiché impattano sul rischio di decesso contribuendo alla mortalità non correlata alla LLC, aumentano la probabilità di complicanze secondarie al trattamento ed inoltre predispongono a una progressione precoce della leucemia (ad esempio, per interruzione del trattamento) (14).

L'unico sistema di stima delle comorbilità validato nell'ambito della LLC è rappresentato dal "Cumulative Illness Rating Scale" (CIRS). Questo è un indice che classifica le comorbilità in base all'apparato o all'organo coinvolto (vengono considerati 14 apparati), valutando poi il peso della severità clinica e funzionale di ciascuna patologia (punteggio da 1 a 4) in base a tabelle di riferimento. Dalla sua applicazione è possibile ottenere due indici: l'indice di comorbilità ottenuto dalla media dei punteggi delle prime 13 categorie (escludendo la categoria patologie psichiatriche/comportamentali) e l'indice di severità, che rappresenta il numero delle categorie nelle quali si ottiene un punteggio uguale o superiore a 3 (escludendo sempre la categoria patologie psichiatriche/comportamentali) (138).

I trial clinici utilizzano il sistema CIRS poiché, basandosi su punteggi desumibili direttamente dall'anamnesi e dalla cartella clinica, è facilmente applicabile su ampia scala (3) (Tabella 20).

	Severità				
Patologie cardiache	0	1	2	3	4
Ipertensione	0	1	2	3	4
Patologie cardiovascolari (Sangue, vasi, midollo, milza, sistema linfatico)	0	1	2	3	4
Patologie respiratorie	0	1	2	3	4
O.O.N.G.L (occhio, orecchio, naso, gola, laringe)	0	1	2	3	4
Apparato GI superiore	0	1	2	3	4
Apparato GI inferiore	0	1	2	3	4
Patologie epatiche	0	1	2	3	4
Patologie renali	0	1	2	3	4
Altre patologie genito-urinarie	0	1	2	3	4
Sistema muscolo-scheletro-cute	0	1	2	3	4
Patologie del sistema nervoso	0	1	2	3	4
Patologie endocrino-metaboliche	0	1	2	3	4
Patologie psichiatriche comportamentali	0	1	2	3	4

0: Assente; 1: lieve; 2: moderato; 3: grave; 4: molto grave

Tabella 20: Cumulative Illness Rating Scale (da Parmelee PA, 1995)

Lo stato funzionale stima la capacità di un soggetto di avere cura di sé e di svolgere una vita indipendente sia nelle attività quotidiane o “Activities of Daily Living” (ADL), sia nelle attività strumentali o “Instrumental Activities of Daily Living” (IADL).

La valutazione dello stato nutrizionale permette di rilevare condizioni di malnutrizione calorica e/o proteica, calo ponderale, perdita di massa muscolare.

La pianificazione della terapia nel paziente oncologico anziano richiede infine la ricerca delle principali sindromi geriatriche (delirio, demenza, depressione, incontinenza, cadute, vertigini, fratture spontanee, calo ponderale pur con adeguata nutrizione, maltrattamento e abbandono).

L'applicazione dei modelli sopra esposti consente quindi di stimare il “fitness status” di un soggetto e quindi di definirlo come “fit” o “go-go”, “unfit” o “slow-go” e “frail” o “no-go”; su questa categorizzazione si basa l'obiettivo terapeutico e la scelta della terapia stessa (3, 67).

Nella pratica clinica e nei trial clinici la distinzione tra pazienti “fit” e “unfit” si basa sull'utilizzo congiunto di età (minore o maggiore di 65 anni), CIRS (< o > 6) e clearance della creatinina (> 70 ml/min o < 70 ml/min). Invece, il paziente oncologico è definito “no-go” se è dipendente in una o più ADL, 3 o più comorbilità gravi (CIRS > 6), presenza di una o più sindromi geriatriche o età superiore a 85 anni (67).

I pazienti affetti da LLC definiti “go-go” sono in grado di tollerare regimi intensivi di chemioimmunoterapia per un numero limitato o assenza di comorbilità; in questi casi lo scopo del trattamento è la remissione completa, anche molecolare, e quindi un miglioramento di PSF e OS.

Invece, nei pazienti “slow-go” per la presenza di multiple comorbilità o per ridotto Performance Status e quindi ad elevato rischio a complicanze iatrogene, la terapia ha soprattutto una funzione di contenimento della malattia controllandone i sintomi e possibilmente migliorandone la PFS.

Infine, il gruppo “no-go” è candidato a terapia palliativa e quindi esclusivamente volta al controllo dei sintomi per la presenza di gravi comorbilità e di aspettativa di vita ridotta.

La scelta della migliore opzione di terapia si basa quindi sulla valutazione di tre potenziali punti:

- a. Condizioni fisiche (“fitness” e comorbilità) del paziente, indipendentemente dall'età anagrafica
- b. Rischio prognostico della leucemia in base ai fattori prognostici genetici e molecolari (soprattutto identificazione casi del17p o con mutazioni p53)
- c. Stadio Rai o Binet della malattia (67).

3.2 Terapia di Prima Linea

I pazienti asintomatici o con malattia in Stadio Binet A o B /Stadio Rai 0-II, e quindi la maggioranza di LLC alla diagnosi, sono candidati unicamente ad un approccio osservazionale di “watch and wait” (67).

Questa indicazione terapeutica si basa su dati pubblicati nel 1991 secondo cui l'utilizzo di agenti alchilanti non determina alcun beneficio reale nel gruppo di pazienti con malattia indolente e limitata (138). In realtà, oggi sono in corso diversi trial clinici che stanno valutando l'efficacia di nuovi regimi terapeutici in pazienti con malattia ancora limitata ma con rischio prognostico elevato (139).

La scelta della terapia nei pazienti meritevoli di trattamento per malattia in Stadio Binet C/Stadio Rai III-IV o per malattia attiva indipendentemente dallo Stadio clinico richiede prima di tutto la valutazione del “fitness status” (67).

Negli ultimi anni alcuni importanti studi clinici hanno cambiato radicalmente l’approccio alla terapia della LLC:

1) La combinazione di fludarabina e ciclofosfamide con l’aggiunta di rituximab migliora la sopravvivenza nel paziente giovane e/o in buone condizioni generali rispetto al migliore standard terapeutico (56), al pari di quanto registrato nei linfomi indolenti e aggressivi (176). La combinazione alternativa che associa bendamustina e rituximab appare meglio tollerata e per lo meno altrettanto efficace nei pazienti anziani in buone condizioni di salute (177). Entrambe le terapie possono ottenere remissioni profonde con negatività della malattia minima residua in una parte significativa dei casi (177)

2) Il controllo della sintomatologia, ottenibile con terapie meno aggressive, può essere vantaggioso nella popolazione anziana (178). Tuttavia, recenti studi retrospettivi hanno dimostrato un prolungamento della sopravvivenza rispetto a controlli storici nei pazienti anziani trattati con fludarabina in associazione a rituximab (179). Inoltre, nei pazienti con comorbidità, l’aggiunta al clorambucile del nuovo anticorpo monoclonale anti CD20 obinutuzumab ha consentito di ottenere risposte complete con negativizzazione della malattia minima residua in una parte significativa dei casi, di migliorare la sopravvivenza rispetto al clorambucile da solo, e di prolungare la sopravvivenza libera da progressione rispetto all’associazione del clorambucile con l’anticorpo anti CD20 di prima generazione rituximab (117). Infine, l’aggiunta dell’anticorpo monoclonale anti CD20 ofatumumab al clorambucile ha consentito di ottenere un aumento significativo della percentuale di risposte alla terapia con negativizzazione della malattia minima residua in una parte dei casi ed un prolungamento della sopravvivenza libera da progressione (180).

3) Nei pazienti con LLC ricaduta refrattaria le nuove terapie orali che bloccano il signaling mediato dal BCR hanno prodotto risultati di grandissimo interesse in termini di risposta, sopravvivenza libera da progressione e tollerabilità e hanno cambiato il paradigma di trattamento in questa fase della malattia, essendo efficaci anche in presenza di malattia pluri-recidivata e/o refrattaria ed in presenza della delezione 17p (110, 123, 125). Ibrutinib (che inibisce la Bruton tirosin chinasi) e idelalisib (che inibisce la subunità delta della fosfatidil inositolo 3-chinasi) in associazione al rituximab rappresentano oggi un trattamento di scelta per la LLC recidivata e refrattaria in un quadro in rapidissima evoluzione che ha già in fase avanzata di sperimentazione nuove molecole, tra cui l’inibitore orale di BCL2 ABT-199 (129). Ibrutinib e idelalisib sono stati approvati da EMA anche per la terapia di prima linea della LLC con 17p-

Oggi lo standard terapeutico nei pazienti giovani e nella minoranza di anziani che presentano condizioni generali ottimali è la combinazione fludarabina (F), ciclofosfamide (C) e rituximab (R), secondo lo schema FCR, in quanto questo trattamento ha per la prima volta documentato un allungamento della sopravvivenza rispetto al migliore standard, rappresentato dalla combinazione FC, che a sua volta si era dimostrata superiore a F e a C in precedenti studi, riassunti in Tabella 21.

	Calovsky Lancet, 2007		Finn JCO, 2007		Eichhorst Blood, 2006		Hilmen JCO, 2007		Knauf Blood, 2009		Rai NEJM, 2000		Hallek Lancet, 2010		Booth COO, 2008 JCO, 2009		Ridask JCO, 2010		Foon JCO 2009		Kestin JCO 2005		Fische JCO 2012		Foa AJH 2014		Goede NEJM, 2014		Hilmen JCO, 2014		Eichhorst ASH, 2014		Hilmen ASH, 2013		Mauro LeuRe 5 2014		O'Brien Lancet Onc 2014					
	CHI	F	FC	F	FC	F	FC	A	CHI	B	CHI	F	FC	FC	R	M	M	DIC	FC	FC	FC	FC	BR	BR	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC	FC			
EFFICACIA																																										
Regime N. patient	387	194	196	137	141	182	180	149	148	152	157	179	409	408	69	67	69	211	212	212	48	224	117	288	284	226	221	221	226	226	226	226	226	226	226	226	226	226	226	226		
% CR	7	15	38	4.6	23	7	24	24	2	31	2	20	4	22	44	64	47	46	46	79	70	23	31.5	40.7	1	12	11	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
% OR	72	80	94	59	74	83	94	83	55	68	31	63	80	90	90	93	88	82	82	100	95	88	97.8	97.8	82	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84		
Med PFS (medi)	20	23	43	19	31	20	48	23	14	21	8.3	20	45	45			28	27	27	22.3	47	33.9	43.2	53.7	13.1	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4		
TOSSICITA' Grado 3/4																																										
%Neutropeni a	28	41	56	63	69	55	55	41	25	23	10	27	19	21	34	4	13	20	21	13	52	19.7	67.8	67.7	14	26	38	3														
%Anemia	12	11	5	20	30	11	8.1	11	18	2.5	0	NR	7	5	NR	2	11	9	9	2	NR	19.7	12	14.2	NR	NR	0															
%Piastrone na	13	11	17	16	28	12	15	12	12	11	7.9	13	14	11	7	NR	2	12	11	3	4.3	22.2	16.5	22.4	NR	NR	3															
%Infezioni	35	27	35	13	17	8.7	7.8	4.1	1.9	0	0	16	9	21	25	1	5	28	27	6.2	2.6	7.7	25.4	39.8	14	15	13	10														
%Mortalita da terapia	0.3	3	2	4	2	0.8	0.5	0.6	2	0	0	0.6	0	3	2	NR	1.5	NR	NR	NR	NR	3.4	2.1	3.9	2	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	

Benda: bendamustina; Flr: fludarabina; A: alemtuzumab; FC: fludarabina + ciclofosfamide; O: obintuzumab; Ofa: ofatumumab; R: rituximab; FA: fludarabina e alemtuzumab

Tabella 21: principali studi clinici per LLC in prima linea a confronto.

L'obiettivo del trattamento nel giovane deve essere, quando possibile, l'ottenimento della remissione completa secondo i criteri clinici NCI (3), obiettivo raggiungibile in un 44-70% dei casi (56). I pazienti trattati con FCR nel trial CLL8 presentavano una sopravvivenza libera da progressione pari al 38% e una sopravvivenza pari al 69,4% dopo una mediana di osservazione pari a 5,9 anni (116). La terapia FCR richiede uno stretto monitoraggio ematologico e, di norma, profilassi antinfettiva e antivirale. In caso di neutropenia o tossicità ematologica al momento della ripresa terapeutica è obbligatoria la riduzione della dose del 20%, anche ripetuta in caso di ulteriore successiva citopenia. Si consideri che nei due principali studi che hanno descritto l'efficacia di FCR (56):

- l'età mediana dei pazienti era di 58-61 anni, con 11-13% di pazienti >70 anni;
- il 74% dei pazienti ha completato la terapia con i previsti 6 cicli nei succitati studi;
- non è stata documentato vantaggio di sopravvivenza nei pazienti > 70 anni (56);
- si sono osservate neutropenie tardive nell'anno seguente la sospensione del trattamento nel 10-20% dei pazienti, con infezioni nel 10% dei pazienti (181).

La combinazione bendamustina e rituximab si è dimostrata efficace e relativamente maneggevole (158). Questa combinazione ha ottenuto un 31,5% di RC con una PFS di 43,2 mesi e oggi può rappresentare una valida alternativa a FCR, specialmente nel paziente meno giovane o anziano in buone condizioni (177).

È stata anche saggiata in un numero limitato di pazienti l'efficacia e la tollerabilità di uno schema che, riducendo le dosi di FC e aumentando la dose di rituximab (FCR-lite), ha dimostrato buona efficacia e tollerabilità (182).

Molto efficace e, analogamente a FCR, impegnativo nella gestione degli effetti collaterali è risultata la combinazione che include mitoxantrone nello schema R-FCM (183).

Nei pazienti anziani e in presenza di comorbidità, il clorambucile associato agli anticorpi monoclonali anti CD20 rappresenta un'importante opzione terapeutica. La sua associazione con rituximab ha prodotto risposte complete nell'8-19% dei casi, con una sopravvivenza libera da progressione di 15-34 mesi, con tossicità limitata. Il clorambucile con il nuovo anticorpo anti CD20 obinutuzumab ha consentito di ottenere risposte complete nel 22% dei casi con negativizzazione della malattia minima residua in oltre il 20% dei casi, dimostrandosi significativamente più efficace della combinazione clorambucile e rituximab in termini di profondità della risposta con negativizzazione della malattia minima residua e di sopravvivenza libera da progressione. Obinutuzumab ha avuto la registrazione FDA ed EMA per l'impiego in prima linea assieme al clorambucile nel paziente con comorbidità.

Risposte complete con negativizzazione della malattia minima residua si ottengono anche con la combinazione clorambucile e ofatumumab (180), che migliora la sopravvivenza libera da progressione rispetto al solo clorambucile

In tutte le circostanze in cui l'obiettivo della terapia è quello di un contenimento dell'espansione della malattia, il clorambucile può mantenere un ruolo importante per la sua limitata tossicità e per la sua maneggevolezza. Nei trial clinici bendamustina e fludarabina si sono dimostrate più efficaci di clorambucile, ma questo vantaggio non si è tramutato in una sopravvivenza più lunga (178); l'aggiunta di rituximab a fludarabina migliora la qualità e la durata delle risposte (184).

Nei pazienti con 17p- l'approccio terapeutico non è stabilito in maniera univoca ma importanti dati sull'efficacia degli inibitori del signaling intracellulare stanno cambiando radicalmente l'approccio terapeutico in questo sottotipo citogenetico-molecolare. Infatti il

classico FCR migliora la sopravvivenza libera da progressione rispetto a FC, ma solo il 18% dei pazienti risultava libero da progressione a 3 anni in uno studio (56). Il trattamento con alemtuzumab, associato o meno a desametazone o a metilprednisone ad alte dosi, ha dimostrato efficacia in questi pazienti, che tuttavia vanno incontro a progressione in tempi relativamente rapidi (119). La gestione degli eventi avversi, in particolare delle problematiche infettive, limita l'uso di questa terapia a centri esperti. Buone sono risultate l'efficacia e la tolleranza della combinazione fludarabina e alemtuzumab in prima linea nei pazienti ad alto rischio (185). Il trapianto di midollo è un'opzione da considerare in questi pazienti secondo raccomandazioni condivise dalla comunità scientifica (120).

I risultati di trial clinici con l'inibitore di BTK ibrutinib e di idelalisib in combinazione con rituximab chiaramente indicano come questi farmaci che interferiscono con il BCR signalling possano rappresentare oggi l'opzione terapeutica di scelta per questo sottogruppo citogenetico di pazienti (170).

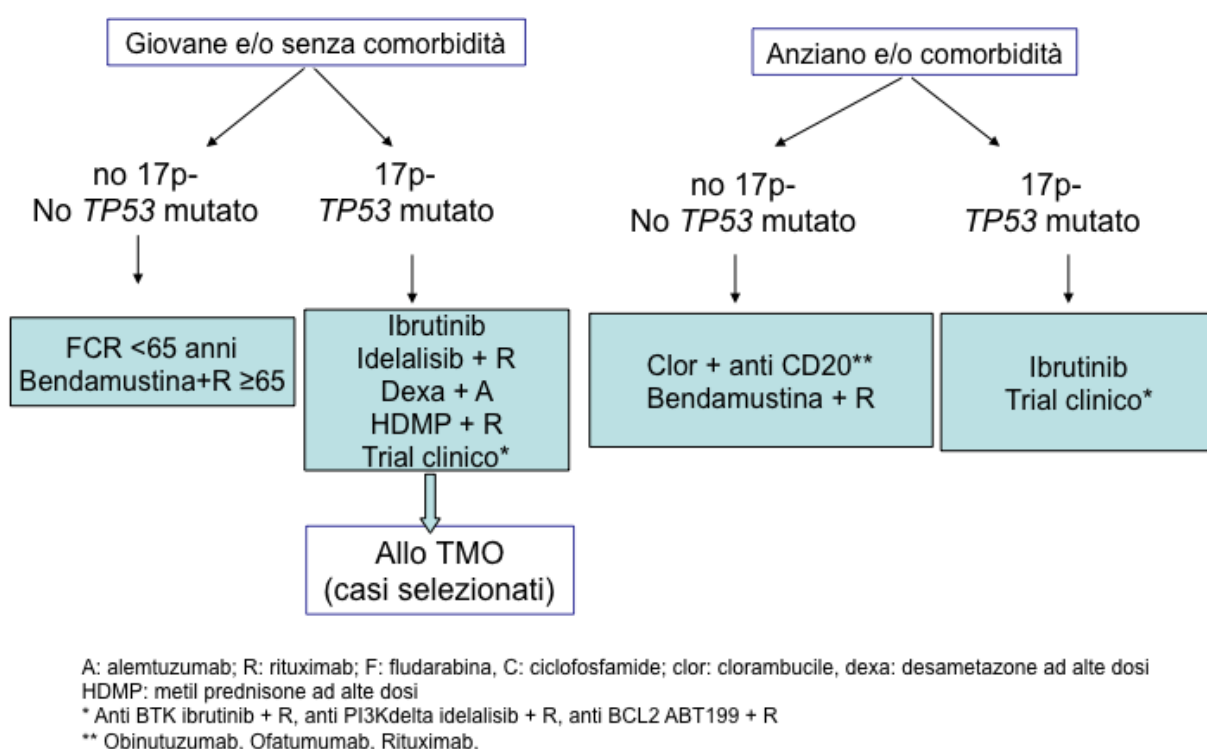


Fig.3.2a: Principali opzioni terapeutiche di prima linea
(da <http://www.ematologiainprogress.net>, Cuneo A, Rigolin GM)

3.3 Terapia Recidivati e Refrattari

Di grandissimo interesse è la dimostrazione di una elevata percentuale di risposte con un 75% di sopravvivenza libera da progressione a 26 mesi ottenuta nella LLC recidivata o refrattaria con l'inibitore della BTK ibrutinib (123), che agisce interferendo con il BCR signaling, mobilizzando i linfociti dalle sedi linfonodali coinvolte. Le poche progressioni osservate riguardavano in prevalenza pazienti con 17p- o 11q-.

La pubblicazione di dati che documentano un'elevata percentuale di risposte utilizzando l'inibitore della PI3K delta idelalisib in associazione a rituximab e/o bendamustina (170) apre la prospettiva di un largo impiego di inibitori del signaling intracellulare nella terapia della LLC refrattaria/recidivata.

Questi agenti orali molto efficaci rappresentano oggi il trattamento di scelta nei pazienti refrattari e plurirecidivati e costituiscono un'importante opzione per il trattamento di seconda linea per molti pazienti, in un contesto terapeutico in rapido cambiamento che potrebbe vedere presto l'introduzione di nuove molecole, quali ad esempio l'inibitore di BCL2 ABT-199 (129).

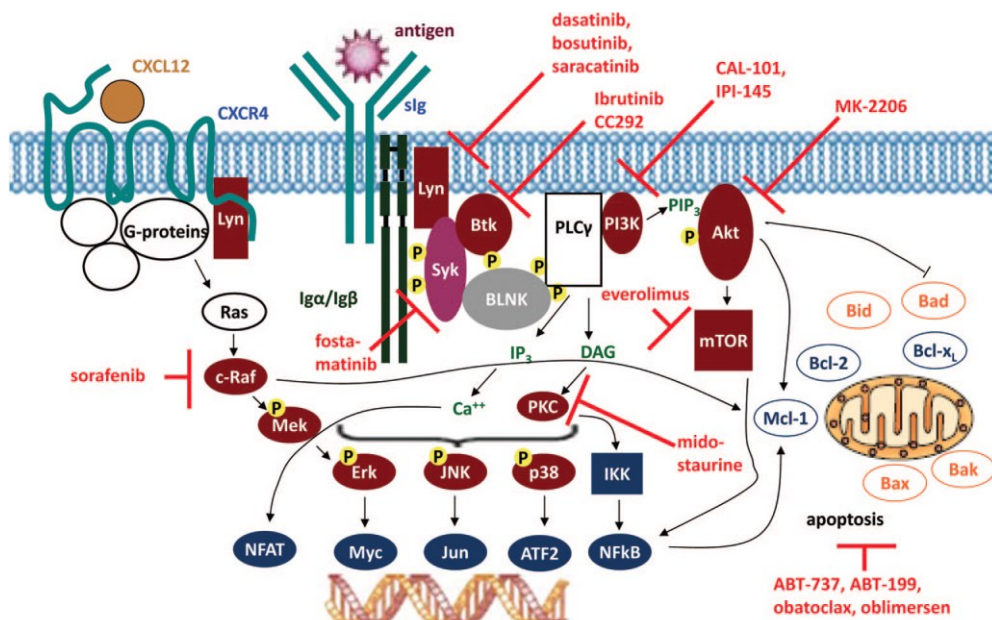


Figura 3.3a Target therapy contro vie del segnale attivate da BCR (da Hallek M ASH 2013)

Qualora ci si orienti verso l'impiego dei tradizionali schemi chemioimmunoterapici per la terapia di seconda linea occorre considerare che si può ritenere ragionevole ripetere il trattamento usato in prima linea qualora la durata della remissione sia di almeno 24 mesi (139). Uno studio randomizzato ha dimostrato la maggiore efficacia di FCR rispetto a FC in pazienti che erano stati trattati in prima linea alchilanti (82% dei casi) e fludarabina (18% dei casi) (151), rendendo questa combinazione di buona efficacia nei pazienti trattati in monoterapia in prima linea.

Bendamustina e rituximab si sono dimostrati efficaci e relativamente ben tollerati, anche in pazienti pretrattati con regimi contenenti fludarabina (162).

La combinazione fludarabina e alemtuzumab è risultata efficace e ben tollerata (161) e, in uno studio randomizzato è risultata più efficace rispetto a fludarabina da sola (186) in una coorte di pazienti pretrattati, che avevano ricevuto nel 21% dei casi fludarabina in prima linea.

Ofatumumab ha dimostrato efficacia e buona tolleranza ed è approvato per l'uso clinico in Europa nei pazienti refrattari a fludarabina e alemtuzumab. Analoga efficacia è stata dimostrata nei pazienti refrattari a fludarabina con malattia bulky (166).

Le alte dosi di metilprednisolone in associazione a rituximab hanno mostrato efficacia in pazienti pretrattati con delezione 17p (187).

La lenalidomide, in associazione a rituximab, ha dimostrato efficacia e buona tolleranza (172).

Il flavopiridolo ha dimostrato efficacia (188), ma il suo impiego richiede ulteriore studio per ottimizzare dose e modalità di somministrazione.

Il trapianto di midollo osseo allogenico ha dimostrato di poter indurre risposte cliniche prolungate (120), con progressiva negativizzazione del residuo leucemico in una parte dei casi grazie all'effetto immunomediato (189). La sopravvivenza a 5 anni è di circa il 50% e la non-relapse mortality del 20% circa. La tossicità si manifesta con graft versus host disease (GVHD) acuta di grado ≥ 2 nel 50% circa dei casi e con GVHD cronica estesa nel 50% circa dei casi, sia nei pazienti trapiantati da fratelli HLA identici che da donatori non familiari HLA-identici, con durata mediana della GVHD di 25 mesi (189). Possibili candidati a un approccio trapiantologico sono i pazienti giovani e in buone condizioni che non abbiano risposto o che siano progrediti dopo terapia con inibitori del BCR signaling. L'opzione trapiantologica può essere discussa, in alternativa alla prosecuzione della terapia nei pazienti resistenti o recidivati o con delezione 17p/mutazioni di TP53 che hanno risposto a ibrutinib o idelalisib (190).

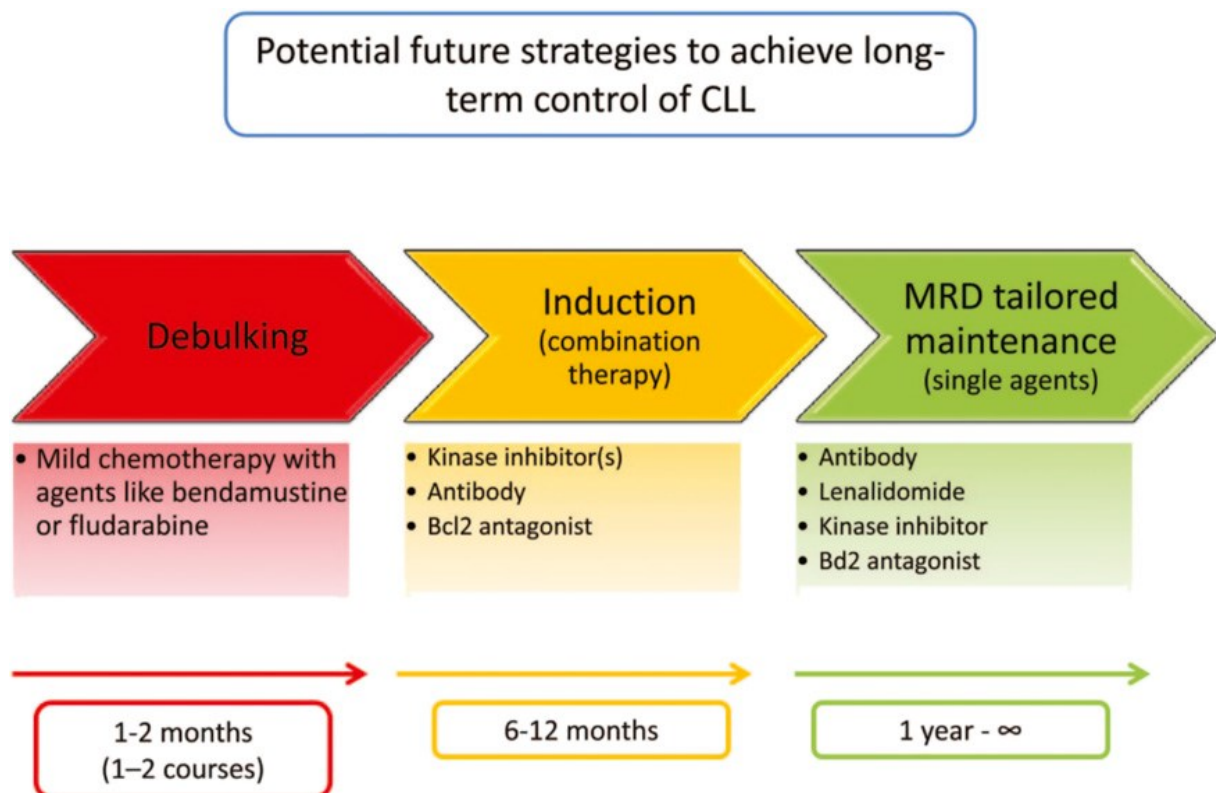


Fig. 3.3b: Strategie future di trattamento con i nuovi farmaci (da Hallek M, 2013)

3.4 REVISIONE DELLA LETTERATURA:

Modern treatment in chronic lymphocytic leukemia: impact on survival and efficacy in high risk group (Allegato 3).

3.4.1 Razionale della review

Il trattamento della CLL è cambiato drammaticamente negli ultimi anni sotto diversi punti di vista grazie alla convergenza della ricerca di base e a studi clinici ben condotti che hanno portato ad una più chiara comprensione della patofisiologia di questa malattia, alla identificazione sempre più raffinata di fattori prognostici e al disegno di regimi terapeutici efficaci. In questo scenario abbiamo riassunto in un review article pubblicato su "Cancer Medicine" le principali acquisizioni terapeutiche dell'ultima decade

I moderni regimi di trattamento producono elevati overall response rate (ORR), compresi anche casi di risposta completa con negativizzazione della malattia minima residua (MRD), e allungamento della progression free survival (PFS). La combinazione di rituximab con fludarabina e ciclofosfamida (FCR) ha dimostrato di essere superiore a FC su tutti gli endpoint, compreso l'OS, con le notevoli eccezioni dei pazienti con 17p- e del subset a FISH normale (108). Inoltre, vi sono evidenze di alcune lesioni citogenetiche molecolari che definiscono diversi subset di pazienti ad alto rischio con più breve PFS e OS con i regimi terapeutici correnti (109). Infine, nuovi agenti con caratteristiche biologiche uniche, come la capacità di down-regolare il segnale di BCR e Bcl-2, stanno entrando rapidamente nella pratica clinica, iniziando a tratteggiare un nuovo scenario di terapia meccanismo-guidata nella CLL e inducendo rapide e durature risposte anche in pazienti con CLL recidivato-refrattario (110,111).

Con alcune eccezioni, tuttavia, la maggior parte degli studi arruola pazienti giovani e in buone condizioni generali. Al contrario, per rispondere al quesito se i trattamenti moderni migliorano la sopravvivenza in tutte le fasce d'età e in una casistica real life, vengono generalmente condotti studi retrospettivi.

Nel nostro lavoro, abbiamo valutato i moderni approcci terapeutici con particolare attenzione a:

- 1) impatto su OS in diversi gruppi di età;
- 2) attività in specifici subset citogenetico-molecolari.

3.4.2 Impatto dei trattamenti sulla sopravvivenza

La sopravvivenza della popolazione generale è aumentata in molti paesi occidentali nelle ultime decadi e diversi fattori possono influenzare i dati realtivi a questa variabile quando si considerano casistiche storiche, compresi una diagnosi più precoce e precisa, che consenta di distinguere ed escludere molti linfomi leucemizzati, nonché il miglioramento della terapia di supporto. Nonostante queste precisazioni, i dati nel complesso indicano come vi sia stato un miglioramento complessivo nei pazienti di ogni età affetti da CLL negli ultimi decenni.

Brenner e collaboratori (112) hanno valutato i tassi di sopravvivenza nei pazienti affetti da CLL, calcolando il rapporto tra la sopravvivenza assoluta dei pazienti con CLL rispetto alla sopravvivenza della popolazione generale, con analoghe caratteristiche clinico-anagrafiche. Un miglioramento nella sopravvivenza dei pazienti con età inferiore agli 80 anni si è registrato negli anni 1980-1984 e 2000-2004. In quest'ultimo quadriennio i pazienti con età inferiore a 70 anni hanno raggiunto una sopravvivenza relativa a 10 anni vicina al 65%, mentre pazienti nella fascia di età 70-79 anni hanno raggiunto un valore di sopravvivenza realtiva del 55%. Nella casistica spagnola (113), il miglioramento della sopravvivenza relativa a 5 e 10 anni nel periodo 1995-2004, rispetto allo storico 1980-1994,

è risultato più spiccato per i pazienti giovani con stadio intermedio e avanzato, mentre non vi era nessuna evidenza di un miglioramento della sopravvivenza per pazeinti anziani o in stadio limitato.

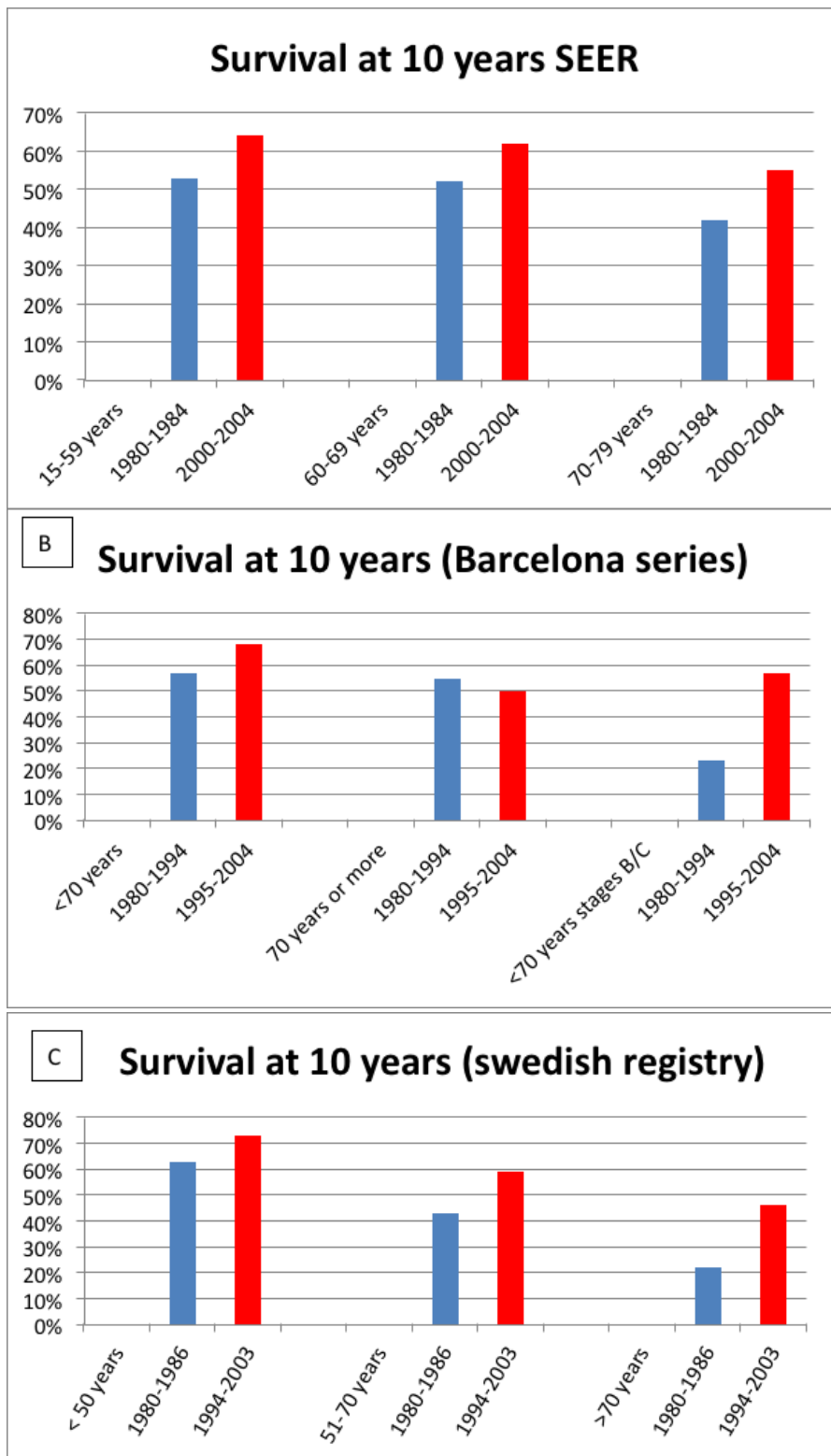


Fig. 3.4.2: aumento della sopravvivenza a 10 anni in diversi gruppi di età. La sopravvivenza è espressa come rapporto tra la sopravvivenza assoluta dei pazienti con LLC e la sopravvivenza attesa per la popolazione generali con uguali caratteristiche. Dati da Brenner (A), Abrisqueta (B) e dal registro svedese (C).

La chemioimmunoterapia upfront ha dimostrato un prolungamento della sopravvivenza a 6 anni (77%) rispetto ai trials precedenti che utilizzavano regimi fludarabine-based (54-59%), (114). Più recentemente, OS e PFS sono stati valutati retrospettivamente in 4 trials in front-line successivi del CALGB (115). Con un follow-up mediano nei diversi studi di 92 mesi, l'OS è dimostrato migliore con fludarabina vs clorambucil (31% di riduzione del rischio di morte) tra i pazienti con età inferiore a 70 anni, ma non nella popolazione anziana. Un'ulteriore riduzione del rischio di morte del 35% si è registrata con l'aggiunta di rituximab a fludarabina, indipendentemente dall'età dei pazienti.

Per quanto riguarda i dati derivati da trials clinici randomizzati, ad una analisi di follow-up estesa a 5.9 anni dello studio CLL8 (116), il 69.4% dei pazienti nel gruppo FCR erano vivi contro il 62.3% del gruppo FC. I criteri di inclusione di questo protocollo, hanno precluso l'arruolamento a molti pazienti anziani e, quando si restringe l'analisi di sopravvivenza al 30% dei pazienti con età superiore a 65 anni, si osserva un miglioramento di CR e PFS, ma non significativo vantaggio in termini di sopravvivenza in questo specifico subset anagrafico. Un'analisi ad interim del protocollo CLL11, disegnato per pazienti unfit e che confronta clorambucil vs clorambucil-rituximab vs clorambucil-obinutuzumab, mostra una migliore PFS nel braccio con obinutuzumab rispetto a rituximab (117).

Questi dati nel complesso suggeriscono che un vero miglioramento nella sopravvivenza è possibile nella maggior parte dei gruppi anagrafici, specialmente per i pazienti eleggibili alla chemioimmunoterapia.

3.4.3 Efficacia del trattamento in specifici subset citogenetico-molecolari di LLC

Vi sono numerose evidenze, derivanti sia da esperienze monocentriche, che da trials multicentrici, che specifiche lesioni citogenetico-molecolari, riguardanti tutte le fasce di età, come 17p-, 11q-, mutazioni a carico di TP53, NOTCH1 e SF3B1 siano associate a chemiorefrattarietà e, di conseguenza, ad una prognosi più sfavorevole (118). Il miglioramento dell'outcome nella LLC deriva in parte dall'introduzione di nuovi regimi che hanno dimostrato la loro efficacia in tutte le categorie di pazienti, inclusi quelli appartenenti alle classi citogenetiche definite ad alto rischio. Questi regimi sono stati testati preferenzialmente in pazienti giovani e fit. I dati di efficacia della chemioimmunoterapia front line nei diversi gruppi citogenetici sono presentati nella tabella 22.

Reference	Regimen	Response rate expressed as %ORR/%CR					Survival expressed as PFS/OS (months)				
		13q-	+12	11q-	17p-	All groups	13q-	+12	11q-	17p-	All groups
		All groups	All groups	All groups	All groups	All groups	All groups	All groups	All groups	All groups	All groups
Hillmen et al. [80]	Chlorambucil	55.4/NR	80/NR	29/NR	20/NR	11.7/NR	13/NR	12.9/NR	8.5/NR	2.2/NR	
Hillmen et al. [80]	Alemtuzumab	83.2/NR	83/NR	87/NR	64/NR	14.6/NR	24.4/NR	18.3/NR	8.5/NR	10.7/NR	
Hallek et al. [13]	Fludarabine cyclophosphamide	80/22	84/19	87/15	34/0	45%/83%*	52%/89%*	48%/86%*	32%/83%*	0%/37%*	
Hallek et al. [13]	Fludarabine cyclophosphamide rituximab	90/44	100/71	93/51	68/5	65%/87%*	76%/95%*	83%/96%*	64%/94%*	18%/38%*	
Bosch et al. [81]	Rituximab fludarabine cyclophosphamide mitoxantrone	82/11	NR/82	NR/87	NR/25	NR	NR	NR	NR	NR	
Parikh et al. [82]	Cyclophosphamide fludarabine alemtuzumab rituximab	92/70	100/64	90/80	78/57	38/NR	42**/NR	42**/NR	27/NR	15/NR	
Fisher et al. [69]	Rituximab bendamustine	88/23	93.3/13.3	94.7/21	37.5/0	33.8/NR	34.4/NR	Not reached/NR	29.7/NR	7.9/NR	
Pettitt et al. [39]	Alemtuzumab methylprednisolone	NA	NR	NR	88/65	NA	NR	NR	NR	18.3/39	

CLL, chronic lymphocytic leukemia; ORR, overall response rate; CR, complete remission; PFS, progression-free survival; OS, overall survival; NR, not reported; NA, not applicable.
*At 3 years; **median not reached.

Tabella 22: Efficacia dei principali regimi terapeutici in fornt line in pazienti con diverse cateriore di rischio citogenetico.

Nel corso degli ultimi anni, tuttavia, l'introduzione di nuovo regimi terapeutici e lo sviluppo di molecole in grado di interferire con meccanismi biologici specifici, ha mutato il paradigma della terapia della LLC, specialmente nel paziente ad alto rischio o con malattia chemiorefrattaria. L'efficacia e la sicurezza dei nuovi regimi nel paziente recidivato-refrattario, inclusi i pazienti con genetica sfavorevole, sono riportati in tabella 23.

		Regimen (reference)									
Various regimens [83]		FCR [84, 85]	Ofatumumab [86]	Lenalidomide + R [62]	Ibrutinib [9]	Idelalisib + R/B/RB [51]	ABT-199 [57]	B + R [72]	R-BAC [41]	Flavopiridol [42]	
Number of patients	99	276/284	138	59	85	51	56	78	13	40	
Number previous regimens (median)	NA (refractory)	1/2	4 (refractory)	2	4	1-10 (range)	4	2	3	4	
Response											
CR	0%	24/30%	0-1%	12%	2%	78-87%	21%	9%	38%	46% (ORR)	
PR	23%	45/44%	47-58%	54%	69%(iii)	(ORR)	63%	50%	46%		
Follow-up (i)	NA	25/43	NA	33	26	>40 weeks	NA	24	17	NA	
PFS	2-3	30/21	5.7-5.9	17.4 (ii)	75%(iv)	74-87%(iv)		15.2	16	10.4	
Survival	9	NR/47	13.7-15.4	71%	83%	NA		33.9	NR	19.8	
Grade 3/4 AE											
infections	54%	18/16%	8-12%	24%	17%	0-29% (v)	7% (vi)	0-3.4%	8%(vi)	NA	
neutropenia	NA	89/81%	6-14%	73%	15%	32-67%	41%	4.8-5.4%	84%	NA	

PFS, progression-free survival; CLL, chronic lymphocytic leukemia; NA, not available; NR, not reached; ORR, overall response rate; R, rituximab; B, bendamustine; (i) months, median value; (ii) time to treatment failure; (iii) an additional 18% patients had PR with lymphocytosis; (iv) % at 26 months for ibrutinib and % at 1 year for idelalisib; (v) pneumonia; (vi) febrile neutropenia.

Tabella 23: Efficacia e sicurezza di alcuni regimi classici e di nuove opzioni terapeutiche nella LLC recidivata-refrattaria.

3.4.3.1 17 p-/mutazioni TP53

Questo subset di pazienti è il più refrattario alla fludarabina e agli agenti alchilanti, e mostra, con poche eccezioni, una prognosi infausta con una sopravvivenza media attesa di pochi anni anche con regimi terapeutici intensivi. Poiché l'anticorpo monoclonale antiCD52, alemtuzumab, in combinazione ad alte dosi di steroidi, sopprimono le cellule leucemiche con un meccanismo TP53 indipendente, l'efficacia di questi farmaci è stata testata, portando a un tasso di CR pari al 65% con MRD- nel 36% dei casi e una PFS di 18.3 mesi in pazienti non precedentemente trattati. Anche se questi risultati rappresentano un progresso significativo rispetto ai dati storici, virtualmente ogni paziente è destinato a recidivare (119).

Il trapianto allogenico rappresenta un'opzione per questi pazienti. In una casistica di 90 pazienti ad alto rischio, per il 49% refrattari a fludarabina e sottoposti a trapianto allogenico, l'OS a 6 anni e l'EFS erano rispettivamente il 58% e il 38%. L'efficacia di questa procedura era indipendente dalla presenza di 17p- (120).

La combinazione di rituximab, bendamustina e citosina arabinoside in 9 pazienti pesantemente pretrattati con 17p-, ha portato ad una CR in 3 casi e una PR in 4 casi con un ORR del 78% e una mediana di PFS di 16 mesi nel gruppo completo, inclusi 4 pazienti con 11 q- (121).

Anche il flavopiridolo single agent ha ottenuto un ORR del 48% in 40 pazienti pretrattati con 17p-, con una PFS mediana di 10.4 mesi: questi dati non erano significativamente differenti nei vari gruppi citogenetici arruolati (122).

3.4.3.1.1 BCR-targeted therapy: Ibrutinib

Come illustrato nei paragrafi precedenti, la Bruton Tyrosin Kinasi BTK è una kinasi citoplasmatica essenziale per il funzionamento di BCR, inducendo la proliferazione cellulare e l'attivazione del pathway di NF-kb. Ibrutinib è un agente orale che si lega in maniera covalente alla Cys-481 di BTK, inibendolo.

La pubblicazione da parte del gruppo di Byrd di uno studio multicentrico di fase Ib-2 (123) per valutare sicurezza ed efficacia di ibrutinib in 85 pazienti recidivati-refrattari che avevano ricevuto in media 4 linee di trattamento precedenti, è stata salutata come la prima terapia meccanismo-guidata nella CLL. Il farmaco ha indotto una rapida diminuzione volumetrica dei linfonodi con una linfocitosi assoluta, che riflette uno shift compartimentale delle cellule leucemiche, dal compartimento linfonodale a quello circolante. Nel tempo, la linfocitosi si riduce gradualmente nella maggioranza dei pazienti. La tossicità si è rivelata modesta con diarrea grado 1-2, fatigue ed infezioni delle alte vie respiratorie.

Le risposte ottenute erano indipendenti dallo stadio, dal numero di precedenti terapie e dalla presenza o meno di 17p-. A 26 mesi, si sono osservate una stupefacente PFS del 75% e un OS del 83%. Tuttavia, una progressione di malattia si è osservata in 11 pazienti, 10 dei quali presentavano 17p- e 11q-. Sui pazienti recidivati, è stata condotta un'indagine di whole exome sequencing con evidenza in 3 pazienti di singola variazione nucleotidica: in due casi questa comportava una sostituzione da cisteina a serina in posizione 481 di BTK(C481S); nel terzo paziente, la mutazione potenzialmente comportava una gain of function di PLCg2, un substrato di BTK. Nonostante la loro rarità, queste mutazioni suggeriscono meccanismi di resistenza a ibrutinib (124). In un altro studio, la resistenza a

ibrutinib si associava a fenomeni di evoluzione clonale con la comparsa di mutazioni driver di SF3B1 o 8p- nel contesto di preesistenti 17p- e 11q-.

Il favorevole indice terapeutico, unitamente alla tollerabilità ed efficacia, candida ibrutinib a un utilizzo in prima linea in associazione ad altri agenti per limitarne la linfocitosi ed aumentarne ulteriormente l'efficacia.

3.4.3.1.2 Idelalisib (CAL 101)

CAL101 inibisce PI3K- Δ , inducendo apoptosi nelle cellule della LLC mentre risparmia i linfociti T e le cellule NK. In vitro, CAL101 è in grado di sensibilizzare le cellule di LLC all'azione di farmaci citotossici e steroidi, nonché di interagire con il BCR signaling, riflettendo verosimilmente un duplice meccanismo d'azione (124).

Un chiaro vantaggio per l'associazione idelalisib-rituximab rispetto a rituximab in monoterapia è stato documentato indipendentemente dalla presenza di 17p- in pazienti pesantemente pretrattati e non in grado di ricevere ulteriore chemioterapia, per la presenza di comorbidità o per citopenie severe (125).

Come per ibrutinib, la risposta è associata a linfocitosi e l'effetto è limitato dall'uso concomitante di altri farmaci. Il profilo di sicurezza ottimo rende possibile somministrare idelalisib per via orale, anche in associazione a chemioimmunoterapia e costituisce la base di studi di associazione in corso con rituximab o bendamustina +/- rituximab, fludarabina o clorambucile.

Idelalisib ha mostrato una robusta attività indipendentemente dalla presenza di 17p- sia in pazienti naive che pretrattati (126-127).

3.4.3.1.3 Antagonisti di BCL2

BCL2 è iperespresso nella LLC e gioca un ruolo anti-apoptotico (128). Il composto ABT-199, che ha come target specifico BCL2, è stato associato ad una potente sindrome da lisi tumorale in assenza di una significativa tossicità ematologica in 3 pazienti.

56 pazienti precedentemente pretrattati sono stati arruolati in uno studio di fase I con ABT-199 con ottenimento di 21% di CR e con l'insorgenza di rari eventi avversi di grado 3 e 4. Anche in questo caso, le risposte erano indipendenti dalla presenza di 17p- e dalla refrattarietà alla fludarabina (129). In un analogo studio, si è riportato un ORR pari al 87.5% in pazienti RR con 17p- o mutazione di TP53 (130).

3.4.3.1.4 Lenalidomide

La terapia con lenalidomide è oggetto di trials in corso. Il meccanismo d'azione risiede nella interferenza nel cross-talk tra cellule leucemiche e microambiente e nella modulazione dell'immunità. Shanafelt e colleghi hanno dimostrato che un regime d'induzione con pentostatina, ciclofosfamide e rituximab, seguito da consolidamento con lenalidomide, porta ad un miglioramento della qualità della risposta del 24% (131).

L'associazione di lenalidomide con rituximab si è dimostrata efficace nei pazienti con LLC recidivata-refrattaria, incluso il subset con 17p-, con un ORR del 58% (132).

3.4.3.2 11q-

La delezione di 11q è presente nel 10-15% dei casi e coinvolge ATM, uno dei principali geni coinvolti nella riparazione del danno al DNA.

11q- era associato ad un outcome inferiore, ma la combinazione di fludarabina con agenti alchilanti ha migliorato la prognosi in questo subset di pazienti. Inoltre, il 40% di CR in pazienti naive si è ottenuto dall'associazione bendamustina-rituximab e vi sono evidenze che la chemioimmunoterapia secondo schema FCR abbia abolito il significato prognostico infausto di questa alterazione, come confermato anche dalla studio CLL8.

Nel setting recidivato-refrattario, un ORR del 92% e del 57% è stato ottenuto rispettivamente con la combinazione rituximab-bendamustina (144) e flavopiridolo in monoterapia (122).

L'inibitore di BTK ibrutinib ha mostrato una grande efficacia in questo subset citogenetico, anche se va notato che, probabilmente per la loro complessità subclonale, i pazienti con 11q- e 17p- possono progredire più frequentemente. Analogamente, il trattamento con idelalisib e ABT-199 ha mostrato efficacia indipendentemente dalla delezione di 11q (126,130).

3.4.3.3 Mutazioni di SF3B1 e NOTCH1

Lesioni a carico di SF3B1, NOTCH1 e BIRC3 sono chiaramente associate a malattia recidivata-refrattaria (109).

Il significato delle mutazioni di NOTCH1 e SF3B1 è stato studiato in 494 pazienti arruolati nel trial UK LRFCLL4 e randomizzati a clorambucil, fludarabina o fludarabina-ciclofosfamide (133). Mentre non si sono rese evidenti differenze in termini di ORR, NOTCH1 e SF3B1 erano associati a più breve OS e SF3B1 era associato anche a inferiore PFS nel braccio FC.

Analogamente, SF3B1 ha mostrato valore prognostico negativo per la PFS in pazienti trattati con FC e FCR nel trial CLL8. Inoltre, NOTCH1 sembrerebbe identificare un subset di pazienti che non beneficiano dell'associazione di rituximab a FC (134). Analogamente, l'associazione di obinutuzumab a clorambucil ha prolungato significativamente la PFS nei pazienti del protocollo CLL11, ma non nei pazienti con NOTCH1 mutato (135).

Al contrario, idelalisib, da solo o in combinazione con rituximab o chemioimmunoterapia, ha mostrato uguale efficacia in una coorte di 232 pazienti, indipendentemente dallo stato mutazionale di NOTCH1 (126).

3.4.4 Conclusioni

La moderna terapia della CLL è un esempio notevole di come gli studi biologici e l'expertise clinico possano convergere, dimostrando un asse razionale per lo sviluppo di trattamenti efficaci e portando a un miglioramento significativo del numero e della qualità delle risposte, della qualità di vita e della sopravvivenza nella maggior parte dei pazienti, inclusi gli anziani.

Nei pazienti definiti ad alto rischio dal punto di vista genetico, la chemioimmunoterapia ha migliorato la qualità e la durata della risposta nei pazienti con 17p- e 11q- consentendo di procedere al trapianto allogenico di midollo osseo, che annulla il significato prognostico sfavorevole di queste alterazioni citogenetiche, come delle mutazioni di NOTCH1 e SF3B1. Inoltre, composti altamente efficaci sulla via del BTK signaling hanno portato a risultati eccellenti e duraturi in pazienti sia naive che con malattia refrattaria o recidivata.

Il costo delle neoplasie ematologiche è una materia di grande interesse e lo sviluppo di nuove molecole altamente efficaci si configura come una vera sfida per i sistemi sanitari nazionali.

Comunque, l'analisi farmaco-economica condotta dal NICE in UK riconosce che FCR è una risorsa cost-effective.

La prevedibile efficacia di farmaci potenti, targeted e di chemioterapici, insieme allo sviluppo di fattori produttivi di risposta sempre più sensibili, offre un'opportunità unica di intensificare programmi coordinati di ricerca volti a produrre evidenza del bilancio positivo costo-efficacia per questi nuovi farmaci.

BIBLIOGRAFIA

1. Castoldi G, Liso V. "Malattie del sangue e degli organi ematopoietici" VI edizione McGrawHill 2013: pagine 1-19; 355-371; 389-518.
2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019-32.
3. Hallek M¹, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5446-56.
4. Shanafelt TD. Predicting clinical outcome in CLL: how and why. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:421-9.
5. Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Oct 5;97(19):1407-27.
6. Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 1997 Jul;4(4):268-76. Review
7. Goldin LR, Slager SL. Familial CLL: genes and environment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:339-45. Review.
8. National Cancer Institute (Web site). Surveillance Epidemiology and End Results Program. SEER Stat Fact Sheets: Chronic Lymphocytic Leukemia. Available at: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>. Accessed: June 14, 2013.
9. AIURTUM. I tumori in Italia-Rapporto 2010. La prevalenza dei tumori in Italia persone che sopravvivono con un tumore, lungosopravvivenenti e guariti. Capitolo: Leucemia linfatica cronica. 2010; 140-1.
10. Call TG, Norman AD, Hanson CA, Achenbach SJ, Kay NE, Zent CS, Ding W, Cerhan JR, Rabe KG, Vachon CM, Hallberg EJ, Shanafelt TD, Slager SL. Incidence of chronic lymphocytic leukemia and high-count monoclonal B-cell lymphocytosis using the 2008 guidelines. *Cancer*. 2014 Apr 7.
11. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):251-62. Review

12. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Feb 24;352(8):804-15. Review.
13. Rosén A, Murray F, Evaldsson C, Rosenquist R. Antigens in chronic lymphocytic leukemia--implications for cell origin and leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2010 Dec;20(6)
14. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *N. Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1840-7.
15. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1848-54.
16. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194: 1639–1647.
17. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194:1625–1638.
18. Lanasa MC. Novel insights into the biology of CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:70-6.
19. Seiler T, Woelfle M, Yancopoulos S, et al. Characterization of structurally defined epitopes recognized by monoclonal antibodies produced by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2009;114:3615–3624.
20. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111:1524–1533.
21. Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 Sep;20(3):399-413. Review
22. Hillmen P. Using the biology of chronic lymphocytic leukemia to choose treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:104
23. Hoffman R, Benz E J Jr, Shattil S J, Furie B, Cohen H, Silbstein L E, McGlave P. *Haematology Basi Principles and Practice*. IV E dizione Elsevier Churchill Livingstone 2005:1437-1451.

24. Ferrajoli A. Treatment of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:82-9.
25. Shanafelt TD, Kay NE. Comprehensive management of the CLL patient: a holistic approach. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:324-31. Review.
26. Morrison VA. Management of infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:332-8. Review
27. Parikh SA, Kay NE, Shanafelt TD. How we treat Richter syndrome. *Blood*. 2014 Mar 13;123(11):1647-57.
28. Richard R. Furman Chronic Lymphocytic Leukemia: Prognostic Markers and Stratification of Chronic Lymphocytic Leukemia *Hematology* 2010 2010:77-81.
29. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbès S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981 Jul 1;48(1):198-206
30. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL." *Leukemia* 1994 Oct; 8 (10): 1640-5.
31. Rodríguez-Vicente AE, Díaz MG, Hernández-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genet*. 2013 Mar;206(3):49-62.
32. Foà R, Del Giudice I, Guarini A, Rossi D, Gaidano G. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013 May;98(5):675-85
33. Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*.
34. Furman RR. Prognostic markers and stratification of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:77-81.
35. DiGiuseppe JA, Borowitz MJ. Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin Oncol*. 1998 Feb;25(1):6-10. Review
36. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):181-6.
37. Damle R N, Wasil T, Fais F, Valetto A, Allen S L, Buchbinder A, Bduman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman S M, Schulman P, Vinciguerra V P, Rai K R, Ferrarini

- M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15; 94(6):1840-7.
38. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*. 2005 Mar;90(3):391-9. Review.
 39. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003 May 1;348(18):1764-75.
 40. Furman RR. Prognostic markers and stratification of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:77-81.
 41. Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, Tschumper RC, Witzig TE, Nowakowski GS, Zent CS, Call TG, Laplant B, Dewald GW, Jelinek DF, Kay NE. CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol*. 2008 Mar;140(5):537-46.
 42. Majid A, Lin TT, Best G, Fishlock K, Hewamana S, Pratt G, Yallop D, Buggins AG, Wagner S, Kennedy BJ, Miall F, Hills R, Devereux S, Oscier DG, Dyer MJ, Fegan C, Pepper C. CD49d is an independent prognostic marker that is associated with CXCR4 expression in CLL. *Leuk Res*. 2011 Jun;35(6):750-6.
 43. Rossi D, Zucchetto A, Rossi FM, Capello D, Cerri M, Deambrogi C, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Bodoni CL, Bulian P, Del Poeta G, Ladetto M, Gattei V, Gaidano G. CD49d expression is an independent risk factor of progressive disease in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2008 Oct;93(10):1575-9.
 44. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med*. 1990 Sep 13;323(11):720-4.
 45. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner CM. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006 Jan 15;107(2):742-51.
 46. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3152-60.
 47. Haferlach T, Dicker F, Schnittger S, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVH status and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007; 21(12):2442-2451.

48. Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, Saccenti E, Bardi A, Cavazzini F, Ciccone M, Nichele I, Pizzolo G, Zaja F, Fanin R, Galieni P, Dalsass A, Mestichelli F, Testa N, Negrini M, Cuneo A. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*. 2012 Mar 8;119(10):2310-3.
49. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000 Dec 28;343(26):1910-6.
50. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al. Late appearance of the 11q22.3-23.1 deletion involving the ATM locus in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Clinico-biological significance. *Haematologica* 2002;87:44e51.
51. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 2007;92:1242e1245.
52. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002;16:993e1007.
53. Berkova A, Zemanova Z, Trnecny M, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia studied by interphase fluorescence in-situ hybridization. *Neoplasma* 2009;56:455e458.
54. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, James CD, Jelinek DF, Tschumper RC, Hanson CA, Pruthi RK, Witzig TE, Call TG, Kay NE. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003 Apr;121(2):287-95
55. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.
56. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010;376:1164e1174.
57. Ding W¹, Ferrajoli A Evidence-based mini-review: the role of alkylating agents in the initial treatment of chronic lymphocytic leukemia patients with the 11q deletion. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:90-2.

58. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, Bardi A, Roberti MG, Tammiso E, Agostini P, Ciccone M, Della Porta M, Tieghi A, Cavazzini L, Negrini M, Castoldi G. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*. 2004 Mar;18(3):476-83
59. Cuneo A, Roberti MG, Bigoni R, Minotto C, Bardi A, Milani R, Tieghi A, Campioni D, Cavazzini F, De Angeli C, Negrini M, Castoldi G. Four novel non-random chromosome rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: 6p24-25 and 12p12-13 translocations, 4q21 anomalies and monosomy 21. *Br J Haematol*. 2000 Mar;108(3):559-64.
60. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, Alpermann T, Roller A, Kohlmann A, Haferlach T, Kern W, Schnittger S. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):108-17.
61. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1848-54.
62. Naylor M, Capra J D. Mutational status of Ig VH provides clinically valuable information in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 September; 94(6):1837-1839.
63. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005;105:1678e1685.
64. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrikson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4944-51.
65. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb 1;15(3):995-1004.
66. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, Bühler A, Edelmann J, Bergmann M, Hopfinger G, Hensel M, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 10;28(29):4473-9.

67. Hallek M. State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:440-9.
68. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, Alpermann T, Roller A, Kohlmann A, Haferlach T, Kern W, Schnittger S. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):108-17.
69. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, Ramsay AJ, Beà S, Pinyol M, Martínez-Trillos A, López-Guerra M, Colomer D, Navarro A, Baumann T, Aymerich M, Rozman M, Delgado J, Giné E, Hernández JM, González-Díaz M, Puente DA, Velasco G, Freije JM, Tubío JM, Royo R, Gelpí JL, Orozco M, Pisano DG, Zamora J, Vázquez M, Valencia A, Himmelbauer H, Bayés M, Heath S, Gut M, Gut I, Estivill X, López-Guillermo A, Puente XS, Campo E, López-Otín C. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011 Dec 11;44(1):47-52.
70. Lawrie CH. MicroRNAs and lymphomagenesis: a functional review. *Br J Haematol*. 2013 Mar;160(5):571-81. doi: 10.1111/bjh.12157. Epub 2012 Dec 4. Review
71. Pekarsky Y, Zanesi N, Croce CM. Molecular basis of CLL. *Semin Cancer Biol*. 2010 Dec;20(6):370-6.
72. Codony C, Crespo M, Abrisqueta P, Montserrat E, Bosch F. Gene expression profiling in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009 Jun;22(2):211-22.
73. Ferrajoli A, Shanafelt TD, Ivan C, Shimizu M, Rabe KG, Nouraei N, Ikuo M, Ghosh AK, Lerner S, Rassenti LZ, Xiao L, Hu J, Reuben JM, Calin S, You MJ, Manning JT, Wierda WG, Estrov Z, O'Brien S, Kipps TJ, Keating MJ, Kay NE, Calin GA. Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013 Sep 12;122(11):1891-9.
74. Neal S. Young. *Aplastic Anemia: Telomere Biology and Telomere Diseases: Implications for Practice and Research*. *Hematology* 2010 2010:30-35; doi:10.1182/asheducation-2010.1.30
75. Hoxha M, Fabris S, Agnelli L, Bollati V, Cutrona G, Matis S, Recchia AG, Gentile M, Cortelezzi A, Morabito F, Bertazzi PA, Ferrarini M, Neri A. Relevance of telomere/telomerase system impairment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014 Jul;53(7):612
76. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976; 194:23–28. The foundational paper establishing the evolutionary theory of cancer. [PubMed: 959840]

77. Campbell PJ, Pleasance ED, Stephens PJ, et al. Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(35):13081-13086.
78. Juliusson G, Robèrt KH, Ost A, et al. Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma. *Blood* 1985;65:134-141.
79. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al. Late appearance of the 11q22.3-23.1 deletion involving the ATM locus in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Clinico-biological significance. *Haematologica* 2002;87:44-51.
80. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;116:142-150.
81. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006;24: 4634-4634.
82. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 2007;92:1242-1245.
83. Hjalmar V, Hast R, Kimby E. Sequential fluorescence in situ hybridization analyses for trisomy 12 in chronic leukemic B-cell disorders. *Haematologica* 2001;86:174-180.
84. Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol* 2008;142:529-523.
85. Haferlach C, Dicker F, Weiss T, et al. Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:851-859.
86. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87:4990-4997.
87. Cuneo A, Bardi A, Wlodarska I, et al. A novel recurrent translocation t(11;14)(p11;q32) in splenic marginal zone B cell lymphoma. *Leukemia* 2001;15:1262-1267.
88. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005;115:755-764.

89. van Gent R, Kater AP, Otto SA, et al. In vivo dynamics of stable chronic lymphocytic leukemia inversely correlate with somatic hypermutation levels and suggest no major leukemic turnover in bone marrow. *Cancer Res* 2008;68:10137–10144.
90. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117:563–574.
91. Flanagan MB, Sathanoori M, Surti U, et al. Cytogenetic abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma lymphoid tissue biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2008;130:620–627
92. Carter SL, Cibulskis K, Helman E, McKenna A, Shen H, Zack T, Laird PW, Onofrio RC, Winckler W, Weir BA, et al. Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat Biotechnol.* 2012; 30:413–421
93. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by wholegenome sequencing. *Nature.* 2012; 481:506–510.
94. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, Akhavanfard S, Cahill DP, Aldape KD, Betensky RA, et al. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2011; 20:810–817.
95. Shanafelt TD, Hanson C, Dewald GW, Witzig TE, LaPlant B, Abrahamzon J, Jelinek DF, Kay NE. Karyotype evolution on fluorescent in situ hybridization analysis is associated with short survival in patients with chronic lymphocytic leukemia and is related to CD49d expression. *J Clin Oncol.* 2008; 26:e5–6.
96. Grubor V, Krasnitz A, Troge J, Meth J, Lakshmi B, Kendall J, Yamrom B, Alex G, Pai D, Navin N, et al. Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by NIH-PA Author Manuscript NIH-PA Author Manuscript NIH-PA Author Manuscript representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). *Blood.* 2009; 113:1294–1303.
97. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012; 481:306–313.
98. Knight SJ, Yau C, Clifford R, Timbs AT, Sadighi Akha E, Dréau HM, Burns A, Ciria C, Oscier DG, Pettitt AR, Dutton S, Holmes CC, Taylor J, Cazier JB, Schuh A. Quantification of subclonal distributions of recurrent genomic aberrations in paired pre-treatment and relapse samples from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2012; 26: 1564-1575.
99. Pepper C, Ward R, Lin TT, Brennan P, Starczynski J, Musson M, Rowntree C, Bentley P, Mills K, Pratt G, Fegan C. Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones

- derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia*. 2007; 21: 687-696.
100. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 353: 1793-1801.
 101. Braggio E, Kay NE, VanWier S, Tschumper RC, Smoley S, Eckel-Passow JE, Sassoon T, Barrett M, Van Dyke DL, Byrd JC, Jelinek DF, Shanafelt TD, Fonseca R. Longitudinal genome-wide analysis of patients with chronic lymphocytic leukemia reveals complex evolution of clonal architecture at disease progression and at the time of relapse. *Leukemia*. 2012; 26: 1698-1701.
 102. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*. 2011; 118: 3470-3478.
 103. Ciccone M, Agostinelli C, Rigolin GM, Piccaluga PP, Cavazzini F, Righi S, Sista MT, Sofritti O, Rizzotto L, Sabattini E, Fioritoni G, Falorio S, Stelitano C, Olivieri A, Attolico I, Brugiattelli M, et al. Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: correlation with cytogenetic and clinic biological features inconsecutive patients analyzed on tissue microarrays. *Leukemia*. 2012; 26: 499- 508.
 104. Guo X, Wu Y, Hartley RS. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biol*. 2009; 6: 575-583.
 105. Wang G, Mao W, Zheng S, Ye J. Epidermal growth factor receptor-regulated miR-125a-5p: a metastatic inhibitor of lung cancer. *FEBS J*. 2009; 276: 5571-5578.
 106. Peveling-Oberhag J, Crisman G, Schmidt A, Döring C, Lucioni M, Arcaini L, Rattotti S, Hartmann S, Piiper A, Hofmann WP, Paulli M, Küppers R, Zeuzem S, Hansmann ML. Dysregulation of global microRNA expression in splenic marginal zone lymphoma and influence of chronic hepatitis C virus infection. *Leukemia*. 2012; 26: 1654-1662.
 107. Kim SW, Ramasamy K, Bouamar H, Lin AP, Jiang D, Aguiar RC. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- κ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 7865-7870.
 108. Hallek M, Fischer G, Fingerle-Rowson A, Fink R, Busch J, Mayer J, et al. 2010. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 376:1164–1174.
 109. Foa R, Del Giudice A, Guarini D, Rossi G, Gaidano G. 2013. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 98:675–685.

110. Foa, R., and A. Guarini. 2013. A mechanism-driven treatment for chronic lymphocytic leukemia? *N. Engl. J. Med.* 369:85–87.
111. Souers, A. J., J. D. Levenson, E. R. Boghaert, S. L. Ackler, N. D. Catron, J. Chen, et al. 2013. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 19:202–208.
112. Brenner, H., A. Gondos, and D. Pulte. 2008. Trends in long-term survival of patients with chronic lymphocytic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood* 111:4916–4921.
113. Abrisqueta, P., A. Pereira, C. Rozman, M. Aymerich, E. Gine, C. Moreno, et al. 2009. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980–2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood* 114:2044–2050.
114. Tam, C. S., S. O’Brien, W. Wierda, H. Kantarjian, S. Wen, K. A. Do, et al. 2008. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 112:975–980.
115. Woyach, J. A., A. S. Ruppert, K. Rai, T. S. Lin, S. Geyer, J. Kolitz, et al. 2012. Impact of age on outcomes after initial therapy with chemotherapy and different chemoimmunotherapy regimens in patients with chronic lymphocytic leukemia: results of sequential cancer and leukemia group B studies. *J. Clin. Oncol.* 31:440–447.
116. Fischer, K., J. Bahlo, A. M. Fink, R. Busch, S. Boëtcher, J. Mayer, et al. 2012. Chemoimmunotherapy based treatment for CLL: extended follow up of the CLL8 protocol, a randomized phase-III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG) comparing fludarabine and cyclophosphamide (FC) to FC plus rituximab (FCR) for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL): results on survival, progression-free survival, delayed neutropenias and secondary malignancies confirm superiority of the FCR regimen. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 120: abstract 435.
117. Goede, V., K. Fischer, R. Busch, A. Engelke, B. Eichhorst, C. M. Wendtner, et al. 2014. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N. Engl. J. Med.* [Epub ahead of print].
118. Rossi, D., S. Rasi, V. Spina, A. Bruscaggin, S. Monti, C. Ciardullo, et al. 2013. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121:1403–1412.
119. Pettitt, A. R., R. Jackson, S. Carruthers, J. Dodd, S. Dodd, M. Oates, et al. 2012. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancerresearch institute CLL206 trial. *J. Clin. Oncol.* 30:1647–1655.

120. Dreger, P., A. Schnaiter, T. Zenz, S. Boëtcher, M. Rossi, P. Paschka, et al. 2013. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood* 121:3284–3288.
121. Visco, C., S. Finotto, F. Pomponi, R. Sartori, F. Laveder, L. Trentin, et al. 2013. The combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for heavily pretreated relapsed/refractory cytogenetically high-risk patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 88:289–293.
122. Woyach, J. A., G. Lozanski, A. S. Ruppert, A. Lozanski, K. A. Blum, J. A. Jones, et al. 2012. Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features. *Leukemia* 26:1442–1444.
123. Byrd, J. C., R. R. Furman, S. E. Coutre, I. W. Flinn, J. A. Burger, K. A. Blum, et al. 2013. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 369:32–42.
124. Chang B. Y, R. R. Furman, M. Zapatka, J. C. Barrientos, D. Li, S. Steggerda, et al. 2013. Use of tumor genomic profiling to reveal mechanisms of resistance to the BTK inhibitor ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *J. Clin. Oncol.* 31 (Suppl. abs no. 7014).
125. Burger, I., D. Landau, J. Hoellenriegel, C. Sougnez, M. Schlesner, N. Ishaque, et al. 2013. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) developing resistance to BTK inhibition. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), 122: abs no. 866.
126. Coutre, S. E., J. P. Leonard, J. C. Barrientos, S. De Vos, I. Flinn, R. R. Furman, et al. 2013. Clinical activity of idelalisib (GS-1101), a selective inhibitor of pi3kd, in phase 1 and 2 trials in chronic lymphocytic leukemia (CLL): effect of Del(17p)/TP53 mutation, Del(11q), IGHV mutation, and NOTCH1 mutation. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), 122: abs no. 1632
127. De Vos S., R. R. Furman, J. C. Barrientos, N. D. Wagner-Johnston, I. Flinn, J. P. Sharman, et al. 2013. Idelalisib, a selective inhibitor Of PI3Kd, in combination with bendamustine, fludarabine or chlorambucil in patients with relapsed or refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), 122 abs no. 2878.
128. Hanada, M., D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer, J. C. Reed. 1993. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82:1820–1828.
129. Seymour, J. F., M. S. Davids, J. M. Pagel, B. S. Kahl, W. Wierda, S. Puvvada, et al. 2013. Bcl-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) monotherapy shows anti-tumor activity including complete remissions in high-risk relapsed/refractory (R/R) chronic

lymphocytic leukemia (CLL) and small lymphocytic lymphoma (SLL). *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), 122: abs no. 872.

130. Anderson, M. A., C. S. Tam, J. F. Seymour, A. Bell, D. A. Westerman, S. Juneja, et al. 2013. Selective Bcl-2 inhibition with ABT-199 is highly active against chronic lymphocytic leukemia (CLL) irrespective of TP53 mutation or dysfunction. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), 122: abs no. 1304.
131. Shanafelt, T. D., A. G. Ramsay, C. S. Zent, J. F. Leis, H. W. Tun, T. G. Call, et al. 2013. Long-term repair of T-cell synapse activity in a phase II trial of chemoimmunotherapy followed by lenalidomide consolidation in previously untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 121:4137–4141
132. James, D. F., J. R. Brown, L. Werner, W. G. Wierda, J. C. Barrientos, J. Castro, et al. 2011. Lenalidomide and rituximab for the initial treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) a multicenter study of the CLL research consortium. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), 118: abstract 291.
133. Oscier, D., R. Wade, Z. Davis, A. Morilla, G. Best, S. Richards, et al. 2010. Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. *Haematologica* 95:1705–1712.
134. Stilgenbauer, S., R. Busch, A. Schnaiter, P. Paschka, M. Rossi, K. Döhner, et al. 2012. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 120:433.
135. Tausch, E., P. Beck, R. F. Schlenk, S. Kless, C. Galler, P. Hillmen, et al. NOTCH1 mutation and treatment outcome in CLL patients treated with chlorambucil (Chl) or ofatumumab-Chl (O-Chl): results from the phase III study complement 1 (OMB110911). *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), 2013; 122: abs no. 527.
136. Molica S, Mauro FR, Callea V, Gentile M, Giannarelli D, Lopez M, Lauria F, Rotoli B, Montanaro M, Cortelezzi A, Liso V, Mandelli F, Foa R; GIMEMA CLL Study Group. A gender-based score system predicts the clinical outcome of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2005 Apr;46(4):553-60.
137. Chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Hamatology*. 2007; 139:809-19.
138. Cramer P, Goede V, Jenke P, et al. Impact of different chemotherapy regimen in comorbid patients with advanced chronic lymphocytic leukemia: metanalysis of two phase-III-trials of the German CLL study Group. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2006; 108:2840.
139. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. International Group of Investigators; German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. Addition of rituximab to

- fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010 Oct 2; 376(9747):1164-74.
140. Cuneo A, Cavazzini F, Ciccone M, Daghia G, Sofritti O, Saccenti E, Negrini M, Rigolin GM. Modern treatment in chronic lymphocytic leukemia: impact on survival and efficacy in high-risk subgroups. *Cancer Med.* 2014 Mar 19
 141. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;2013:138-50.
 142. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1750-1757.
 143. Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, et al. Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, randomized, multicenter trial. *Blood.* 2000;96:2723-2729.
 144. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol.* 2012;30(26):3209-321
 145. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4378-4384.
 146. Stilgenbauer S, Kröber, Busch R, et al. 17p Deletion predicts for inferior overall survival after fludarabine-based first line therapy in chronic lymphocytic leukemia: first analysis of genetics in the CLL4 trial of the GCLLSG [abstract]. *Blood.* 2005;106:715.
 147. Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR, et al. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J Clin Oncol.* 2007;25:793-798.
 148. Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;370:230-239.
 149. Stilgenbauer S, Eichhorst BF, Busch R, et al. Biologic and clinical markers for outcome after fludarabine (F) or F plus cyclophosphamide (FC)—comprehensive analysis of the CLL4 Trial of the GCLLSG [abstract]. *Blood.* 2008;112:2089.
 150. Tay K, Dunleavy K, Wilson WH. Novel agents for B-cell non-Hodgkin lymphoma: science and the promise. *Blood Rev.* 2010 Mar;24(2):69-82.

151. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1756-1765.
152. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, Chagorova T, de la Serna J, Dilhuydy MS, Illmer T, Opat S, Owen CJ, Samoylova O, Kreuzer KA, Stilgenbauer S, Döhner H, Langerak AW, Ritgen M, Kneba M, Asikanius E, Humphrey K, Wenger M, Hallek M. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014 Mar 20;370(12):1101-10.
153. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J, Sirard C, Mayer J. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2007 Dec 10;25(35):5616-23.
154. Arnason JE, Brown JR. Alemtuzumab use in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. [corrected]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:119-20.
155. Lepretre S, Aurrant T, Mahe B, et al. Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood*. 2012;119(22):5104-5110.
156. Pettitt AR, Jackson R, Carruthers S, et al. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *J Clin Oncol*. 2012; 30(14):1647-1655.
157. Stilgenbauer S, Cymbalista F, Leblond V, et al. Alemtuzumab plus oral dexamethasone, followed by alemtuzumab maintenance or allogeneic transplantation in ultra high-risk CLL: updated results from a phase II study of the Gellsg and fcgll/MW [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2012;120(21):716.
158. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2012;30(26):3209-3216.
159. Reynolds C, Di Bella N, Lyons RM, et al. A phase III trial of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab vs pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Invest New Drugs*. 2012;30(3):1232-1240.
160. Zenz T, Busch R, Fink A, et al. The treatment of relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. Brown JR. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:110-8. Genetics of patients with F-refractory CLL or early relapse after

- FC or FCR: Results from the CLL8 trial of the GCLLSG [Abstract]. *Blood*. 2010; 116:2427.
161. Elter T, Borchmann P, Schulz H, et al. Fludarabine in combination with alemtuzumab is effective and feasible in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II trial. *J Clin Oncol*. 2005;23(28):7024-7031.
 162. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2011;29(26):3559-3566.
 163. Dreger P, Corradini P, Kimby E, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia*. 2007;21:12-17.
 164. Gribben JG, Riches JC. Immunotherapeutic strategies including transplantation: eradication of disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:151-7.
 165. Michallet M, Dreger P, Sutton L, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: results of European intergroup randomized trial comparing autografting versus observation. *Blood*. 2011; 117(5):1516-1521.
 166. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, Robak T, Furman RR, Hillmen P, Trneny M, Dyer MJ, Padmanabhan S, Piotrowska M, Kozak T, Chan G, Davis R, Losic N, Wilms J, Russell CA, Osterborg A; Hx-CD20-406 Study Investigators. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1749-55.
 167. Aalipour A¹, Advani RH. Bruton tyrosine kinase inhibitors: a promising novel targeted treatment for B cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2013 Nov;163(4):436-43.
 168. Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:88-96.
 169. Jabbour E, Ottmann OG, Deininger M, Hochhaus A. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2014 Jan;99(1):7-18.
 170. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, Barrientos JC, Zelenetz AD, Kipps TJ, Flinn I, Ghia P, Eradat H, Ervin T, Lamanna N, Coiffier B, Pettitt AR, Ma S, Stilgenbauer S, Cramer P, Aiello M, Johnson DM, Miller LL, Li D, Jahn TM, Dansey RD, Hallek M, O'Brien SM. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Mar 13;370(11):997-1007.

171. Byrd JC, Fruman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, Grant B, Sharman JP, Coleman M, Wierda WG, Jones JA, Sukbuntherng J, Chang BY, Clow F, Hedrick E, Buggy JJ, James DF, O'Brien S (2013). Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 369, 32-42.
172. Badoux XC, Keating MJ, Wen S, et al. Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31(5):584-591.
173. Zenz T, Mertens D, Kupperts R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):37-50.
174. Landau D et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013 February 14; 152(4): 714–726.
175. Seifert M, Stilgenbauer S, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2012 Nov 19;209(12):2183-9
176. Schulz H, Bohlius J, Skoetz N, Trelle S, Kober T, Reiser M, Dreyling M, Herold M, Schwarzer G, Hallek M, Engert A. Chemotherapy plus Rituximab versus chemotherapy alone for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 4. Art. No.: CD003805. DOI: 10.1002/14651858.CD003805.pub2.
177. Eichhorst B, Fink AM, Busch R, Kovacs G, Maurer C, Lange E, et al Frontline Chemoimmunotherapy with Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Shows Superior Efficacy in Comparison to Bendamustine (B) and Rituximab (BR) in Previously Untreated and Physically Fit Patients (pts) with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Final Analysis of an International, Randomized Study of the German CLL Study Group (GCLLSG) (CLL10 Study). *ASH abstract book 2014, abs # 19*
178. Eichhorst BF et al, First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3382-91. doi: 10.1182/blood-2009-02-206185. Epub 2009 Jul 15.
179. Woyach JA et al Impact of age on outcomes after initial therapy with chemotherapy and different chemoimmunotherapy regimens in patients with chronic lymphocytic leukemia: results of sequential cancer and leukemia group B studies. *J Clin Oncol*. 2013 Feb 1;31(4):440-7. doi: 10.1200/JCO.2011.41.5646. Epub 2012 Dec 10.
180. Hillmen P et al Ofatumumab plus chlorambucil versus chlorambucil alone in patients with untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL): results of the phase III study complement 1 (OMB110911) (2013) *BLOOD*. 122(21).

181. Strati P, Wierda W, Burger J, Ferrajoli A, Tam C, Lerner S, Keating MJ, O'Brien S. Myelosuppression after frontline fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia: analysis of persistent and new-onset cytopenia. *Cancer*. 2013 Nov 1;119(21):3805-11
182. Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, Marks S, Raptis A, Pietragallo L et al. Chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009; 27:498-503.
183. Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, González-Barca E, Ferra C et al. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009; 27:4578-84.
184. Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, Morrison VA, Kolitz JE et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood*. 2005; 105:49-53.
185. Mauro FR, Molica S, Laurenti L, Cortelezzi A, Carella AM, Zaja F, Chiarenza A, Angrilli F, Nobile F, Marasca R, Musolino C, Brugiattelli M, Piciocchi A, Vignetti M, Fazi P, Gentile G, De Propriis MS, Della Starza I, Marinelli M, Chiaretti S, Del Giudice I, Nanni M, Albano F, Cuneo A, Guarini A, Foà R; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Working Party for Chronic Lymphoproliferative Disorders. Fludarabine plus alemtuzumab (FA) front-line treatment in young patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and an adverse biologic profile. *Leuk Res*. 2014 Feb;38(2):198-203.
186. Elter T, Gercheva-Kyuchukova L, Pylypenko H, Robak T, Jaksic B, Rekhman G, Kyrz-Krzemień S, Vatutin M, Wu J, Sirard C, Hallek M, Engert A. Fludarabine plus alemtuzumab versus fludarabine alone in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia: a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2011;12:1204-13.
187. Castro JE, James DF, Sandoval-Sus JD, Jain S, Bole J, Rassenti L, Kipps TJ. Rituximab in combination with high-dose methylprednisolone for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2009 Oct;23(10):1779-89.
188. Lin TS, Ruppert AS, Johnson AJ, Fischer B, Heerema NA, Andritsos LA, Blum KA, Flynn JM, Jones JA, Hu W, Moran ME, Mitchell SM, Smith LL, Wagner AJ, Raymond CA, Schaaf LJ, Phelps MA, Villalona-Calero MA, Grever MR, Byrd JC. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):6012-8

189. Sorror ML, Storer BE, Sandmaier BM, Maris M, Shizuru J, Maziarz R, Agura E, Chauncey TR, Pulsipher MA, McSweeney PA, Wade JC, Bruno B, Langston A, Radich J, Niederwieser D, Blume KG, Storb R, Maloney DG. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol*. 2008; 26:4912-20.
190. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, Corradini P, van Gelder M, Gribben J, Kimby E, Michallet M, Moreno C, Stilgenbauer S, Montserrat E; European Research Initiative on CLL (ERIC) and the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood* 2014; 124:3841-9