

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE
DOTTORATO DI RICERCA IN PATOLOGIA ED
EMATOLOGIA CLINICA, SPERIMENTALE E COMPUTAZIONALE
XXIV CICLO**

Dott.ssa Ausilia Giuseppa Gorgone

**Correlazione tra dati biologici e prognosi in pazienti
affetti da B-CLL in stadio A secondo Binet**

Tesi di dottorato

COORDINATORE: Chiar.mo Prof. Alfredo Ferro

Tutor: Chiar.mo Prof. Francesco Di Raimondo

A.A. 2010/2011

Indice

Introduzione	pag 3
Patogenesi	pag 5
CLL apoptosi -microambiente.....	pag 8
Stadiazione e prognosi.....	pag 11
Terapia.....	pag 12
Marcatori biologici.....	pag 13
IgVH	
ZAP 70	
CD38	
FISH	
Obiettivi dello studio e rationale.....	pag 20
Pazienti.....	pag 22
Metodi.....	pag 23
Stratificazione del rischio.....	pag 24
Score0.....	pag 25
Score1.....	pag 26
Score 2.....	pag 25
Score 3.....	pag 29
Discussione.....	pag 31
Conclusioni.....	pag 35
Tabelle e Grafici.....	pag 38
Bibliografia.....	pag 52

INTRODUZIONE

La leucemia linfatica cronica di tipo B (LLC-B), rappresenta da sola il 30% circa di tutte le leucemie dell'adulto dell'emisfero occidentale, mentre rappresenta il 3% delle leucemie dell'adulto nelle razze orientali (Giappone) ed Africa.

L'incidenza è maggiore nel sesso maschile, con un'età media di diagnosi di 65 anni e l'incidenza aumenta da 1 caso/anno/100.000 abitanti nella fascia 40-50 anni a 20 casi nella fascia 70-80 anni.

Oltre il 40% delle CLL è diagnosticata ad un'età 75 anni mentre meno del 10% è diagnosticata prima dei 50 anni. (1)

L'eziologia non è nota. Non può essere escluso, anche se non sembrerebbe, associata con l'esposizione a sostanze chimiche nè a radiazioni ionizzanti e non sarebbe più comune in soggetti con immunodeficienza. (2)

Notevole risulta essere l'evidenza di una suscettibilità genetica che deriva dalla sua disparità etnica.

La CLL è infatti rara in Oriente ed è molto rara in Giappone, la sua incidenza non è modificata da elementi ambientali e non sarebbe influenzata dai flussi migratori, infatti i gruppi etnici che migrano in altri paesi mantengono l'incidenza della malattia a livello di quella del paese di provenienza.

E' stata documentata una tendenza familiare, che individua un rischio tre volte maggiore, rispetto alla popolazione generale, di sviluppare LLC o altre malattie linfoproliferative nei parenti di primo grado dei pazienti con Leucosi Linfatica Cronica. (3)

É presente inoltre il caratteristico fenomeno dell'anticipazione : esistono famiglie in cui la malattia appare in generazioni successive ad una età sempre più precoce (4).

Tra i parenti di primo grado di soggetti affetti da CLL, si possono inoltre riscontrare, espansioni di piccoli cloni B linfocitari con il fenotipo classico della CLL e negatività per CD38, con una frequenza maggiore rispetto alla popolazione generale (2).

Queste cellule, simili a quelle della CLL, potrebbero semplicemente rappresentare un epifenomeno della senescenza dei linfociti e/o rappresentare l'equivalente per la CLL dell' MGUS del mieloma multiplo (5).

Patogenesi

La leucemia linfatica cronica è caratterizzata dall'accumulo di cellule B clonali, costituite da linfociti di piccola taglia, positivi per i marcatori di linea B (CD 19-CD20) e tipicamente positivi per CD5+ e CD23+ e negativi per FMC7 e CD22, che esprimono Immunoglobuline a bassa intensità con restrizione clonale per le catene κ e λ .

È stata proposta l'origine da un linfocito B CD5+ della zona mantellare (6) o da un linfocito della zona marginale che esprime, in maniera aberrante, il CD5 normalmente assente in questa sede in seguito ad uno stato di attivazione.

Le cellule di LLC mostrano dunque il profilo fenotipico dei linfociti B memoria, attivati tramite l'interazione con l'antigene. Tali linfociti sono frequentemente autoreattivi e orientati alla produzione di autoanticorpi naturali polireattivi(4).

I linfociti della CLL esprimono infatti, un BCR che presenta analogie strutturali con gli anticorpi che reagiscono contro autoantigeni ed antigeni polisaccaridici come i linfociti della zona marginale (7) codificati dallo stesso repertorio di geni della zona V delle Ig che si osservano nella maggior parte dei casi di B-CLL.

In circa la metà dei casi di B-CLL i geni V delle Ig presentano mutazioni somatiche (8), questo significa che, almeno in questi casi, la cellula di origine è un linfocita B memoria che ha incontrato l'Ag nei centri germinativi in una reazione T dipendente.

I restanti casi non presentano mutazioni somatiche e dunque la cellula d'origine è un linfocita B naive che è stato stimolato al di fuori del centro germinativo da uno stimolo incapace di attivare il processo di ipermutazione somatica del gene Ig.

Probabilmente, il primo evento trasformante avverrebbe in una cellula progenitrice linfoide che poi si differenzia in una cellula B matura, con un Bcell receptor (BCR) funzionale.

Si è infatti affermato in questi ultimi anni il concetto di un relazione patogenetica tra stimolazione antigenica spesso sostenuta da auto antigeni e CLL(9).

Inoltre le cellule di CLL presentano un utilizzo preferenziale di alcuni geni delle regioni variabili delle immunoglobuline (IgVH).

V1-69, V3-07, V3-23 e V4-34 sono quelli usati più frequentemente.

Recentemente l'analisi della regione 3, determinante la complementarità della catena pesante delle immunoglobuline, ha dimostrato la presenza di sequenze fortemente simili, se non addirittura identiche, in pazienti differenti e non correlati (7). Questa scoperta, associata con un utilizzo preferenziale della catena leggera (L) e simile LCD3, tenendo conto che sia L che HCDR3 partecipano al sito di legame con l'antigene, associata alla presenza di mutazioni somatiche IgVH, forniscono importante evidenza che i BCR espressi dalle cellule B siano altamente selezionati, probabilmente da uno stimolo antigenico, sollevando la possibilità che un antigene possa essere coinvolto nella patogenesi della malattia.

La probabilità infatti che dei Linfociti B normali possano avere un BCR stereotipato è dell'ordine di 10^{-9} 10^{-12} mentre è stato osservato che fino al 25% dei casi di CLL può mostrare questo fenomeno(10).

Esiste inoltre dimostrazione, che il linfocita della CLL, può mantenere la capacità di rispondere all'Ag andando incontro a switch di classe Ig(11), sviluppando mutazioni del gene IGVH(12), modificando il profilo di espressione genica ed attivando il ciclo cellulare (13).

Queste caratteristiche sono più spiccate nei casi di CLL non mutate CD38+ e ZAP70+ (14-15).

Infatti nelle CLL non mutate il BCR signaling è attivo, mentre nelle forme mutate è inattivo in seguito ad uno stato di anergia funzionale legato ad una protratta stimolazione antigenica con conseguente desensibilizzazione del BCR stesso (16).

Apoptosi e microambiente

Nel recente passato, si è ritenuto che la progressione della CLL fosse influenzata in maniera decisiva da una apoptosi assente o difettiva.

I linfociti leucemici sono stati individuati, dunque, come cellule arrestate allo stato G0/G1 del ciclo cellulare, pertanto: scarsamente proliferanti, funzionalmente incompetenti, con prolungata sopravvivenza (anche di anni) in circolo. Tutto ciò si riteneva esclusivamente legato ad un'inibizione dell'apoptosi dovuta all'aumentata espressione della proteina del gene *bcl-2*.

Contrariamente a quanto ritenuto in passato, la CLL non può oggi essere considerata esclusivamente una patologia da accumulo di linfociti che non vanno incontro ad apoptosi.

Pur essendo le cellule circolanti di CLL nella fase G0/G1 del ciclo cellulare, lo studio della lunghezza dei telomeri e dell'attività telomerasica indica che un considerevole numero di divisioni cellulari avviene all'interno del clone leucemico (17).

Le cellule di CLL mantengono, difatti, la risposta ad alcuni segnali pro-apoptotici mediati da FAS e dal legame di anticorpi anti IgM che ingaggiano il BCR (18-19).

Con un ritmo di divisione cellulare e di rinnovo che è più elevato nella frazione cellulare CD38+(20).

Anche se la gran parte delle cellule di LLC sono quiescenti, prolinfociti e paraimmunoblasti proliferanti, possono essere identificati in tutti i pazienti come aggregati focali (centri di proliferazione-PC) nei linfonodi e nel midollo osseo.

Queste cellule costituiscono la riserva proliferante della malattia che rifornisce il compartimento di accumulo ed è plausibile credere che, l'equilibrio tra i due compartimenti controlli l'evoluzione della malattia. Le cellule proliferanti all'interno dei PC differiscono dalle cellule leucemiche quiescenti per l'espressione di parecchie molecole, tra cui la survivina regolante l'apoptosi, alcune chemochine (CCL-17 e CCL-22) e geni correlati alla proliferazione quali Ki67.

Infine, i linfociti T, soprattutto CD40L+ e quindi attivati, le cellule CD4+ e una varietà di cellule stromali sembrano avere un ruolo centrale nell'amplificare un microambiente capace sia di favorire la proliferazione all'interno dei PC dei tessuti con la produzione di citochine anti apoptotiche (IL4 IFN)(21).

Nella distribuzione e sopravvivenza delle cellule patologiche (16), giocherebbero un ruolo importante alcune chemochine e loro recettori espressi dal linfocito leucemico (CXCR3 CXCR5), cellule del sangue periferico capaci di differenziarsi in cellule nurselike, che favoriscono la sopravvivenza e la migrazione del linfocito all'interno degli spazi midollari attraverso lo stromal-derived-factor (22).

Le cellule dendritiche attraverso il CD44 e grazie all'induzione dell'espressione di una proteina Bcl2 correlata Mcl-1 (23)

L'angiogenesi sembrerebbe giocare un ruolo nelle fasi di accelerazione della malattia riscontrandosi nei gruppi più aggressivi elevati valori di VEGF (24-25)

Stadiazione e Prognosi

I fattori prognostici della leucemia linfatica cronica, riassumono la storia naturale della malattia (progressivo accumulo di linfociti neoplastici con aumento della massa tumorale, progressiva invasione midollare, deterioramento della mielopoiesi).

Essi dipendono dalla massa tumorale (numero delle sedi linfoidi interessate, grado di infiltrazione midollare, istologia osteomidollare diffusa, livelli serici di beta 2-microglobulina)(26); dalle caratteristiche biologiche della malattia (tempo di raddoppiamento dei linfociti (27), stato mutazionale geni VH delle immunoglobuline, CD38, ZAP-70); dal grado di compromissione dell'emopoiesi normale residua (livelli di emoglobina, piastrine, neutrofili, immunoglobuline) e infine dalle caratteristiche del paziente (età avanzata, sesso maschile, cattivo performance status, presenza di patologie associate).

Sulla base dei dati ematologici e di alcuni parametri clinici nel 1975, Rai e collaboratori hanno proposto una classificazione della leucemia linfatica cronica in 5 stadi ognuno dei quali corrisponde ad una prognosi differente, progressivamente peggiore all'aumentare dello stadio. Successivamente nel 1980, Binet e collaboratori hanno elaborato un sistema classificativo semplificato in 3 stadi clinici (tabella 1c)(28-29).

Terapia

Nella pratica clinica i pazienti di nuova diagnosi, con una malattia in stadio iniziale (Rai 0, Binet A) non richiedono terapia, bensì monitoraggio clinico e laboratoristico fino a progressione.

Gli studi del French Cooperative Group on CLL, il Cancer and Leukemia Group B, lo Spanish Group Pethema, il Medical Research Council e studi in metanalisi hanno dimostrato che l'uso di agenti alchilanti in pazienti con malattia in fase precoce non prolunga la sopravvivenza. Uno studio ha anzi dimostrato l'incremento dell'incidenza di patologie neoplastiche secondarie nei pazienti trattati rispetto ai non trattati.

Il trattamento in fase precoce è riservato ai pazienti con stadio iniziale ad alto rischio in trial clinici.

Il trattamento è invece raccomandato in pazienti in stadio avanzato (Binet C Rai III-IV) con malattia attiva e sintomatici (30).

Marcatori biologici

Non è esagerato dire che la scoperta del significato dello stato mutazionale dei geni delle regioni variabili abbia rivoluzionato lo studio della CLL.

Nei due articoli pubblicati contemporaneamente nel 1999, gli Autori (8-31) riscontrarono che i pazienti con geni IgVH mutati avevano una sopravvivenza media di 25 anni e invece quelli con geni IgVH non mutati sopravvivevano solo per 8 anni. Questo risultato è stato da allora confermato da parecchi altri gruppi.

In seguito, per convenzione fu stabilito che i pazienti con meno del 2% di mutazioni somatiche dovevano essere annoverati tra i casi non mutati e questo perché un piccolo numero di mutazioni potrebbero rappresentare polimorfismi.

Paragonando le sequenze geniche delle cellule di LLC con il DNA genomico, si è visto che queste piccole variazioni non sono polimorfismi ma vere mutazioni. Sebbene l'omologia >98% sia la convenzione generalmente accettata per il sottogruppo non mutato, alcuni gruppi hanno scelto 97% o anche 95% come miglior punto di cut-off (32). Lo stato mutazionale è risultato indipendente dai fattori prognostici tradizionali in particolar modo dallo stadio (33) e predittivo del time to progression e della sopravvivenza anche nei pazienti in stadio iniziale.

Una prognosi sfavorevole analoga a quella dei casi non mutati è stata riscontrata nei casi di CLL mutata ma esprime il gene VH3-21(34).

Lo stato mutazionale viene attualmente considerato il marcatore prognostico di riferimento per le CLL, ma poiché l'analisi è spesso di esecuzione complessa nei laboratori ematologici di routine, sono stati proposti come surrogati altri tests quali la determinazione dell'antigene CD38 e quella della proteina ZAP-70 (zeta associated protein con un peso molecolare di 70 kD).

ZAP-70 fu identificato come il gene meglio in grado di distinguere i due sottogruppi. ZAP-70 (proteina associata alla catena zeta CD3 del T cell receptor con un peso molecolare di 70 kD è una tirosinocinasi) normalmente espressa nei linfociti T ed NK ed espressa in maniera aberrante nelle cellule di CLL, è una molecola utilizzata per trasmettere il segnale dal T-cell receptor alle vie a valle, normalmente non è utilizzato nelle cellule B, in cui la molecola recettrice del segnale è Syk. Esso sembra essere coinvolto nella trasmissione del segnale regolando esso la sintesi delle proteine del citosol (syc BLNH), la mobilizzazione del calcio e la degradazione di I κ B con attivazione di Nf κ B, stimolando quindi la cellula alla proliferazione.

Studi di gene expression profiling, hanno dimostrato una differente espressione di ZAP-70 in pazienti affetti da CLL, associandosi la sua espressione allo stato non mutato (prognosi sfavorevole)(35).

Anticorpi contro ZAP-70, sono disponibili e parecchi metodi sono stati approntati, il Western-blot richiede la deplezione dei linfociti T, che ne limita l'uso. I tests in citometria a flusso sono risultati difficoltosi, poiché ZAP-70 è un antigene intracellulare cosicché le cellule devono essere permeabilizzate e i primi anticorpi utilizzati erano non coniugati (36-37).

La disponibilità odierna di anticorpi direttamente coniugati con nuovi fluorocromi più brillanti, ha permesso di isolare pazienti ZAP-70 positivi e VH mutati con peggiore sopravvivenza rispetto a pazienti ZAP-70 negativi e VH non mutati, attribuendo a tale marcatore una forte valenza prognostica (35).

Numerosi studi clinici, hanno messo in evidenza come l'espressione di questa proteina correli con un andamento clinico più aggressivo, più breve sopravvivenza e necessità di trattamento precoce(35-37).

In realtà, la concordanza tra l'espressione di Zap 70 e stato mutazionale non è completa, infatti i casi discordanti variano tra il 7 ed il 30% a seconda delle casistiche e delle metodiche impiegate (38).

La molecola ZAP-70, una chinasi che ha in comune funzioni di segnale sia con la chinasi spleen tyrosine (Syk) che con CD38, anch'essa molecola di segnale che influenza l'esito della stimolazione del recettore della cellula B (BCR), caratterizza l'eterogeneità biologica di LLC e mostra significato prognostico: la negatività per CD38 e ZAP-70 identifica pazienti con una migliore prognosi (8-36) .

L'espressione di CD38, molecola presente sulla membrana citoplasmatica dei linfociti B è correlata sostanzialmente ad uno stato di attivazione, può essere facilmente determinata utilizzando la citometria a flusso, e, se presente, identifica i pazienti con LLC a maggior rischio di progressione e con ridotta sopravvivenza, essendo espresso più frequentemente in pazienti che mostrano uno stato mutazionale germline ed alterazioni citogenetiche sfavorevoli (39).

In ogni caso CD38, presenta risultati discordanti rispetto allo stato mutazionale in circa il 30% dei casi. Inoltre, la sua espressione può variare nel corso della malattia in circa un quarto dei casi (40).

Il miglioramento delle tecniche di coltura e l'uso di mitogeni policlonali per la linea linfoide B ha consentito di dimostrare alterazioni del cariotipo non random in almeno il 50% dei casi.

Utilizzando la tecnica di ibridazione fluorescente in situ (FISH), anomalie cromosomiche sono state diagnosticate nell'82% dei casi (41). Le alterazioni più comuni sono risultate la trisomia del 12 (10-15% dei casi) e la delezione di 13q a livello della banda q14 in prossimità del gene oncosoppressore Rb (20%). La maggior parte dei casi di trisomia 12 e delle delezioni (13)(q14) non sono rilevabili all'esame citogenetico classico, ma con l'uso di sonde molecolari per la regione 13q14 sono state svelate nel 46% e nel 45-55% dei casi di LLC, rispettivamente.

Sempre usando la tecnica FISH, delezioni di 11q sono state trovate nel 17-20% dei pazienti e delezioni di 17p nel 7-10%.

Le anomalie del cariotipo diventano più frequenti con il trascorrere del tempo. I geni coinvolti in queste aberrazioni non sono del tutto chiariti.

Per la trisomia 12, non si hanno dati certi sul gene coinvolto, mentre i geni coinvolti sui cromosomi 11 e 17 sono ATM e p53 rispettivamente, entrambi impegnati nei meccanismi di riparazione del DNA.

La delezione 13q14, è associata ad una sopravvivenza superiore alla media, ma questo è vero solo se è una lesione unica. Questa lesione è stata descritta come eterozigote nel 75-80% dei casi ed omozigote nel 20-25%. I pazienti con delezione omozigote presentano una maggiore cinetica di crescita linfocitaria rispetto ai pazienti con delezioni eterozigoti.

Nel 2002 Calin e al (42) hanno identificato una piccola regione deleta di 29 Kb su 13q14 fra gli esoni 2 e 5 del gene LEU2 contenenti due geni codificanti per micro-RNA miR15A e miR161, sono assenti e downregolati nella maggior parte dei casi di LLC, ma il loro effetto è ancora oscuro.(43)

La trisomia 12 è associata ad una morfologia atipica, in particolare LLC/LPL (leucemia prolinfocitica). La sopravvivenza di tali pazienti è quella media dei pazienti con LLC e dipende dallo stato mutazionale.

La delezione 11q23 (7-25%) è spesso presente in pazienti giovani con linfadenopatie “bulky” (masse linfonodali >5-6 cm in diametro), e in molti studi è probante per una prognosi infausta.(44-45-46) Tale delezione è presente in pazienti sia con geni VH mutati che non mutati .

Tuttavia l'aggiunta di Rituximab alla tradizionale chemioterapia con Fludarabina e Ciclofosfamide nei pazienti giovani ha migliorato la percentuale di risposta completa e la PFS(47-48). Infine la delezione 17p13 rivela la presenza di un gene p53 deleto o mutato ed è associata ad una prognosi sfavorevole, con una sopravvivenza mediana inferiore a 36 mesi. Mutazioni del gene oncosoppressore *p53* sono stati trovati nel 10-47% dei pazienti con LLC alla diagnosi. Le mutazioni di *p53* si associano in genere alla trasformazione della LLC in forme a prolinfociti, ad una scarsa risposta alla chemioterapia, a resistenza alla terapia con analoghi purinici e ad una ridotta sopravvivenza dei pazienti.

Soprattutto nei pazienti che presentano stadio intermedio avanzato e geni IgVH non mutati (49).Ta li casi sono frequentemente resistenti alle terapie.

L'anticorpo monoclonale anti-CD52, può superare la farmacoresistenza in una parte significativa dei casi ed il trapianto allogenico non mieloablativo può avere un ruolo in questa forma di CLL.

Infine esistono altre rare anomalie cromosomiche che non hanno ancora significato prognostico definito.

Le delezioni di 6q21 sono le più comuni tra queste. In genere esse sono lesioni secondarie all'interno di un gruppo a prognosi sfavorevole, ma non mostrano un valore prognostico indipendente in analisi multivariata. Di significato incerto sono le doppie e triple trisomie che coinvolgono i cromosomi 12, 16, 18 e 19.

OBIETTIVI DELLO STUDIO E RAZIONALE

I dati di letteratura hanno dimostrato che un trattamento in fase precoce non offre vantaggi sulla sopravvivenza. Nella pratica clinica i pazienti di nuova diagnosi con una malattia in stadio iniziale (Rai 0-I, Binet A), non richiedono terapia, bensì monitoraggio clinico e laboratoristico fino a progressione.

Il trattamento in fase precoce è riservato ai pazienti con stadio iniziale ad alto rischio in trial clinici.

Gli studi di questi anni hanno dimostrato che i fattori biologici giocano un ruolo fondamentale come elementi predittivi del treatment-free survival e dell' overall survival nei pazienti affetti da CLL in stadio iniziale.

Nel nostro studio sono stati arruolati e valutati pazienti di età compresa tra i 18 e i 70 anni con diagnosi di Leucemia Linfatica Cronica Binet A.

Obiettivi primari dello studio erano :

- migliorare la definizione della prognosi in pazienti con Leucemia Linfatica Cronica in stadio Binet A.
- validare l'applicazione dello score system basato sulla presenza/assenza dei tre fattori di rischio biologici (Zap-70, IgVH, CD38) in grado di suddividere i pazienti in tre differenti gruppi di rischio (basso, intermedio, alto) con monitoraggio dell' andamento clinico della malattia in base al gruppo.
- Completare lo studio del profilo biologico delle cellule neoplastiche attraverso

analisi citogenetica mediante FISH per la ricerca delle principali anomalie citogenetiche legate alla malattia sia all'esordio che in fase di eventuale progressione clinica .

Pazienti

Il campione era costituito da 53 pazienti valutati tra il 2007 e il settembre 2011, con un follow-up mediano di 32 mesi (range 5-46) tabella 3. Nello studio erano inclusi 24 maschi e 29 femmine, in disaccordo con i dati di letteratura che riportano una maggiore incidenza nel sesso maschile rispetto al sesso femminile (7) con età media minima di 39 anni e massima di 70 al tempo della diagnosi con una mediana di 61.

Tutti i pazienti rispondevano ai criteri diagnostici per la LLC-B in quanto presentavano immunoglobuline di superficie a debole intensità e positività per gli antigeni CD5 e CD23.

Tutti i pazienti presentavano all'arruolamento uno stadio Binet A ed uno stadio RAI 0/1, non necessitavano dunque di trattamento chemioterapico secondo le linee guida NCI.

presentavano inoltre un ECOG-Performance Status compreso tra 0 e 2 valutato mediante l'anamnesi e l'esame obiettivo.

Alla diagnosi i pazienti erano sottoposti a Biopsia osteomidollare ed a studio strumentale tramite esame TAC per la valutazione delle linfadenopatie profonde e dell'organomegalia al baseline.

Tutti i pazienti erano sottoposti alla diagnosi e successivamente ogni sei mesi alla valutazione del tests di Coombs.

I pazienti erano inoltre sottoposti allo screening infettivologico per Epatite B e C Citomegalovirus e TORCH.

Metodiche

La diagnosi è stata effettuata mediante esame citofluorimetrico del sangue periferico (CD5+, CD23+, CD19+, CD79b, FMC-7, kappa-lambda, ZAP-70, CD38).

Per ogni paziente, il sangue periferico è stato raccolto per l'esame immunofenotipico in una provetta tipo vacutainer contenente EDTA.

L'analisi della sequenza dei geni che codificano per la regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgVH) è stata effettuata amplificando mediante PCR 300 ng di DNA genomico utilizzando un set di 6 primers VH famiglia-specifici che ibridizzano la regione leader ed utilizzando un primer reverse degenerato JH.

Test di ibridizzazione separati sono stati effettuati per loci sui cromosomi 11, 12, 13 e 17. Per i cromosomi 11 (q23,) 13 e 17 sono stati utilizzati probes commerciali (ATM-2, Rb-1, e p53 rispettivamente).

Un probe per il DNA CEP12 legato al colorante SpectrumGreen e' stato utilizzato per visualizzare la aneuploidia del cromosoma 12.

LSIp53, legato al colorante SpectrumOrange (Vysis), e' stato utilizzato per valutare la delezione del cromosoma 17 p13.1.

Sono state esaminate 200 cellule in interfase con spot di fluorescenza ben definiti.

Stratificazione del rischio

I pazienti sono stati suddivisi in classi di rischio (basso, intermedio, alto) in base alla presenza/assenza dei tre fattori di rischio biologici (Zap-70, IgVH, CD38), e monitorati laboratoristicamente e clinicamente per la valutazione degli indici di malattia a cadenza trimestrale.

Sono state individuate dunque quattro classi :

score 0 assenza dei tre fattori

score 1 positività per uno dei tre fattori esaminati.

score 2 positività per due dei tre fattori esaminati.

score 3 positività per i tre fattori esaminati.

individuando score 0-1 come basso rischio, lo score 2 come rischio intermedio, lo score 3 come alto rischio.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad analisi citogenetica mediante FISH per la ricerca delle principali anomalie legate alla patologia.

SCORE 0

Dei 53 pazienti valutabili 30 (56%), presentavano uno score biologico pari a 0 (tabella 4 a-b)

Il campione era costituito da 13 M e 17 F con un'età mediana di 60,5anni (range 37-69). Ventuno dei pazienti (70%) con score 0 presentavano allo studio citogenetico del 13q a prognosi favorevole.

Nove pazienti (30%) non presentavano alterazioni citogenetiche tra quelle studiate.

La mediana dei valori dell'esame emocromo riscontrata nei mesi di follow-up è stata per l'Hb 14g/dl (range 9,6-16,8 g/dl) per le PLT 204.000 mmc (range 107.000-432.000mmc), per WBC 27.330 mmc (range 10.5000-78.000 mmc)

Un paziente, ha presentato incremento della conta leucocitaria al mese 18 di follow up non rientrando però nei criteri di progressione NCI.

Il restante numero di pazienti, in accordo con i dati di letteratura (37-38) che individuano nei pazienti con score 0 soggetti a basso rischio, ha mantenuto costante la conta di WBC, di PLT ed Hb con stabilità dei valori di beta 2 microglobulina (mediana 1,7 mg/l range 0,4-3,5 mg/l) ed LDH (mediana 332 UI/l, range 114-639 UI/l).

Nessuno dei pazienti del suddetto gruppo ha sviluppato anemia emolitica con positivizzazione dei tests di Coombs.

SCORE 1

Dei 53 pazienti valutabili 13 (24,5%) presentavano uno score biologico pari a 1 (tabella 5 a-b-c)

Il campione era costituito da 9 M (69,9%) e 4 F (31%) con una età mediana di 58 anni (range 39-69).

Dei suddetti pazienti 11 (84,6%), presentavano positività dello Zap 70, 2 (15,5%) IgVH non mutato, nessuno presentava positività per CD38.

Nove (69%) dei pazienti presentavano allo studio citogenetico del 13q, 4 pazienti (31%) cariotipo normale rispetto alle alterazioni ricercate.

Dei 13 pazienti valutati, 1 (7,7%) con IgVH non mutato, citogenetica normale ha presentato progressione di malattia a 26 mesi di follow-up, con incremento della conta leucocitaria, comparsa di linfadenomegalie diffuse e di sintomi B, in accordo con i dati di letteratura che individuano nello stato mutazionale un fattore predittivo del time to progression anche nei pazienti in stadio iniziale (33).

Il suddetto paziente è stato avviato a ciclo chemioterapico standard secondo schema FCR per un totale di 6 cicli.

Il paziente è stato sottoposto alla ricaduta a rivalutazione citogenetica e biologica, per la valutazione di eventuale acquisizione di nuovi cloni, risultata negativa.

Nessuno dei pazienti del suddetto gruppo ha sviluppato anemia emolitica con

positivizzazione dei tests di Coombs.

La mediana dei valori dell'esame emocromo riscontrata nei mesi di follow-up è stata per l'Hb 13,5 g/dl (range 11,1-16,6 g/dl) per le PLT 232.000 mmc (range 134.000-411.000mmc), per WBC 25.140 mmc (8.100-82.000 mmc); con stabilità dei valori di beta 2 microglobulina (mediana 1,8 mg/l range 0,9-5,7 mg/l) ed LDH (mediana 290 UI/l, range 110- 538 UI/l).

SCORE 2

Dei 53 pazienti valutabili 5 (9.43%), presentavano uno score biologico pari a 2 (tabella 6a-b-c). Il campione era composto da 2 M (40%) e 3F (60%).

Due pazienti (40%) con citogenetica negativa presentavano IgVH non mutato e positività dello Zap 70.

Un paziente (20%) con citogenetica negativa ed uno (20%) con del 13q14 presentavano positività per CD38 e Zap 70.

Un paziente (20%), presentava stato non mutato con positività dello Zap70, negatività per CD38. Il suddetto presentava allo studio citogenetico del 11q22-q 23.

Quest'ultimo ha presentato progressione al 32 mese di follow up, con comparsa di linfadenomegalie diffuse superiori a 4 cm incremento dei valori di beta 2 microglobulina ed è stato pertanto avviato a trattamento standard secondo schema FCR ottenendo RC.

Il paziente ,ha eseguito alla progressione rivalutazione citogenetica e biologica per la valutazione di eventuale acquisizione di nuovi cloni risultata negativa .

Nessuno dei pazienti esaminati, ha sviluppato anemia emolitica con positivizzazione dei tests di Coombs. La mediana dei valori dell'esame emocromo riscontrata nei mesi di follow-up è stata per l'Hb 13,3 g/dl (range 11,6-15,2 g/dl) per le PLT 247.000 mmc (range 106.000-319.000mmc), per WBC 21.290 mmc (range 10.060- 39.150 mmc) con stabilità dei valori di beta 2 microglobulina (mediana 1,5 mg/l range 1,2-2,5 mg/l) ed LDH (mediana 236 UI/l, range 171- 546 UI/l).

SCORE 3

Dei 53 pazienti valutabili 5 (9.43%) presentavano uno score biologico pari a 3 (tabella 7a-b-c).

Il campione era costituito da 2 M (40%) e 3 F (60%) con una età mediana di 68 anni (range 59-70).

Tutti i pazienti presentavano positività per i tre fattori di rischio biologico esaminati.

1 paziente (20%) presentava del 13q14 allo studio citogenetico.

3 pazienti (60%) presentavano cariotipo normale rispetto alle alterazioni ricercate.

1 paziente (20%) presentava trisomia del 12.

Dei 5 pazienti tre hanno presentato progressione (60%)

Uno (20%) ha presentato progressione a 46 mesi di follow-up con aumento della conta leucocitaria e comparsa di linfadenopatie diffuse.

Uno (20%) ha presentato progressione al mese 3 di follow up.

Uno (20%) ha presentato progressione 6 mesi con comparsa di linfadenopatie diffuse, ed epatosplenomegalia.

Tutti i suddetti pazienti presentavano citogenetica normale.

Sono stati avviati a chemioterapia standard secondo le linee guida SIE . Nessuno dei pazienti esaminati ha sviluppato anemia emolitica con positivizzazione dei tests di Coombs.

La mediana dei valori dell'esame emocromo riscontrata nei mesi di follow-up è stata per l'Hb 14,9 g/dl (range 12,3-16 g/dl) per le PLT 205.000 mmc (range 95.000-271.000mmc), per WBC 20.380 mmc (8.600- 100.250 mmc) con stabilità dei valori di beta 2 microglobulina (mediana 2,1 mg/l range 1,59-3,2 mg/l) ed LDH (mediana 326 UI/l, range 211- 443 UI/l).

DISCUSSIONE

Nonostante la LLC presenti un fenotipo immunologico dunque unico e distintivo (CD5+, CD23+, immunoglobuline di superficie positive espresse a bassa intensità), tale patologia si presenta eterogenea a livello biologico, ed essa si traduce spesso in notevoli differenze cliniche.

Il decorso clinico è infatti estremamente variabile ed è caratterizzato dalla coesistenza di forme indolenti, nelle quali la malattia non compromette la durata della sopravvivenza e non necessita di alcun trattamento, ed altre invece molto aggressive con media di sopravvivenza di 3 anni (7), per le quali è necessario instaurare precocemente una terapia,

Alcuni pazienti sono infatti asintomatici o presentano sintomi lievi, altri sviluppano rapidamente linfocitosi, anemia ed epatosplenomegalia, in accordo con quanto riscontrato nel nostro studio, dove su 53 pazienti valutati 5 (9.43%) sono andati incontro a progressione (grafico 1).

I dati del CLL Research Consortium (35), attraverso uno studio condotto su più di 1000 pazienti per la predizione del time to treatment attraverso la valutazione di Zap 70, stato mutazionale e CD38 suggeriscono che i pazienti possono essere classificati in rischio basso, intermedio, alto, in base in base all'espressione di Zap 70 ed allo stato mutazionale, risultando i pazienti Zap 70 positivi, ad alto rischio indipendentemente dallo stato mutazionale.

I pazienti Zap 70 negativi possono essere classificati in basso rischio o rischio intermedio a seconda rispettivamente dello stato IgVH mutato o non mutato, non risentendo della positività o meno di CD38 nella predizione del time to treatment. L'espressione aumentata di ZAP- 70 dunque predice in modo più significativo la necessità di un trattamento rispetto alla presenza di uno stato mutazionale non mutato; per di più l'espressione di ZAP- 70 si mantiene costante nel tempo. °°°°°°°°°°

Dohner et al(41) hanno inoltre riportato un sistema classificativo predittivo dell'outcome basato sulla FISH in questa classificazione i pazienti con del 17p13 hanno un sopravvivenza mediana dalla diagnosi di 2 o 3 anni contro i 6-7 anni dei pazienti con del 11q22, 9 anni nei pazienti con trisomia del 12 o cariotipo normale, contro gli 11 anni per la del 13q14 come sola anomalia.

In uno studio di 189 pazienti in stadio Binet A (50) con valutazione di CD38, stato mutazionale e FISH i risultati suggeriscono che i pazienti possono essere suddivisi in rischio basso intermedio alto in base alla combinazione dei risultati dello studio FISH e dello stato mutazionale essendo ad alto rischio i pazienti con del 17p13 indipendentemente dallo stato mutato, a rischio intermedio del 11q22 e/o stato non mutato, basso rischio pazienti con stato mutato in assenza di del 17p13 o 11q22.

In accordo con i dati di letteratura, che individuano nello stato mutazionale un fattore predittivo del time to progression anche in pazienti in stadio iniziale (34) e nei pazienti Zap 70+ IgVH mutato prognosi peggiore con diminuzione della sopravvivenza (36-37), nel nostro studio nessuno dei 30 pazienti con score 0 (assenza di fattori di rischio biologici) ha presentato progressione nei mesi di follow-up,

mantenendo costanti i valori della crasi ematica e gli indici bioumorali di malattia. Un paziente con score 1(IgVH non mutato, citogenetica normale) ha presentato progressione di malattia al 26 mese di follow -up. Un paziente con score 2 (IgVH non mutato e Zap 70 +)che presentava del 11q22 ha mostrato progressione al mese 32 dalla diagnosi .

Tre pazienti su 5 con score 3 hanno presentato progressione rispettivamente a 3-6-46 mesi dalla diagnosi tutti presentavano citogenetica normale.

Come riportato dati di letteratura (38), anche nel nostro studio la concordanza tra l'espressione di Zap 70 e stato mutazionale non è risultata completa. Lo stesso è stato riscontrato per CD38 rispetto allo stato mutazionale (tabelle 5b-6b).

Come riportato nelle tabelle 8-9-10, è stato inoltre eseguito un confronto sui valori di Hb, WBC, LDH, beta 2 microglobulina, tra il gruppo dei pazienti con score 0 in cui non si è riscontrata progressione ed il gruppo di pazienti con score 1- 2 -3 dimostrandosi questi valori non statisticamente significativi.

Nonostante il numero dei pazienti non sia ampio, non essendoci nel nostro studio differenze statisticamente significative tra gli indici bioumorali di malattia dei pazienti ad alto rischio e di quelli a basso rischio, i dati risultano in disaccordo con i dati di letteratura che individuano: il doubling time, LDH, la beta 2 microglobulina come predittivi della progressione nei pazienti in stadio iniziale e come elementi utili nel monitoraggio della malattia (26-27).

In accordo con i dati di letteratura, lo studio FISH eseguito su tutti i pazienti arruolati correla con gli aspetti clinici della malattia e costituisce un importante fattore

prognostico. Difatti nessuno dei pazienti che presentava del 13q14 (anomalia strutturale a decorso favorevole) qualsiasi fosse la classe di rischio di appartenenza è andato incontro a progressione, essendo comunque la maggioranza di pazienti inclusi nello score 0. Un paziente con del 11q22-23 Zap 70+ e con stato non mutato è andato incontro a progressione, presentando adenopatia massiva e decorso aggressivo, in accordo con quanto riportato in letteratura. Nel restante numero di pazienti andati incontro a progressione non si sono riscontrate alterazioni citogenetiche tra quelle studiate.

CONCLUSIONI

I primi indici prognostici applicati su vasta scala derivano dagli schemi di stadiazione proposti 30 anni addietro che consentivano di suddividere i pazienti in categorie sulla base di elementi clinico ematologici, cioè la valutazione tramite esame obiettivo e dell'esame emocromocitometrico (classificazione di Rai e Binet). 28-29-51-52 .Il limite di queste stadiazioni esclusivamente cliniche risiedeva nel fatto che non fossero strettamente predittive del rischio di progressione .

Accanto allo stadio clinico sono stati proposti altri fattori prognostici che correlano con la ridotta sopravvivenza ed una rapida progressione : sesso, età, conta linfocitaria tipo di infiltrazione midollare citomorfologia tempo di raddoppiamento linfocitario (53-54)

La valutazione di marcatori sierici come l' LDH, la TK(timidina kinasi) la frazione solubile del CD23, sono stati correlati a rapida progressione ed a ridotta sopravvivenza con un aumentato rischio di evoluzione in sindrome di Richter(55-56-57-58-59)

Recentemente Wierda (59) ha proposto un indice prognostico validato su circa 1600 pazienti basato su 5 fattori predittivi tradizionali: sesso età conta linfocitaria, stadio secondo Rai, numero di regioni linfonodali coinvolte e sui livelli di beta due microglobulina sierica ormai entrata nella pratica routinaria che potrebbe essere considerato una alternativa per l'individuazione di pazienti ad alto rischio di progressione per i pazienti che non possono avere accesso alla valutazione del rischio biologico.

Queste stadiazioni comunque, necessitano di essere affiancate dalle numerose informazioni acquisite in campo biologico, immunologico e genetico che hanno permesso di identificare profili di malattia biologicamente e clinicamente differenti.

Le evidenze, indicano che un trattamento in fase precoce non offre vantaggi sulla sopravvivenza. Lo standard management dei pazienti in stadio iniziale rimanda infatti il trattamento fino alla progressione pur essendo quest'ultimo riservato ai soggetti ad alto rischio in trials clinici .

Gli studi di questi anni hanno dimostrato che i fattori biologici giocano un ruolo fondamentale per la stratificazione del rischio come elementi predittivi del treatment-free survival e dell' overall survival nei pazienti affetti da CLL in stadio iniziale, dato riscontrato nel nostro studio dove su 53 pazienti in stadio Binet A il 9,4% ha presentato progressione appartenendo questi pazienti a classi di rischio intermedio-alto.

La maggioranza di questi markers prognostici ,anche se ormai in uso quotidiano nella pratica clinica, non è ancora incluso nelle linee guida internazionali che si basano ancora su criteri esclusivamente clinici e individuano la valutazione biologica da usare in combinazione ai parametri clinici.

Questi markers, vanno certamente standardizzati e valutati in trial prospettici, essendo ancora in fase di studio se l'avvio del trattamento possa basarsi sul profilo prognostico e piuttosto non sui criteri di malattia in progressione (30), ma il loro impiego può certamente contribuire al miglioramento del clinical management dei pazienti affetti da CLL .

Stadiazione di Rai

Stadio 0 Solo linfocitosi periferica con infiltrato midollare >30%
Stadio I Linfocitosi + linfadenomegalie
Stadio II Linfocitosi + splenomegalia (+/- epatomegalia +/-adenopatia)
Stadio III Linfocitosi + anemia (emoglobina inferiore a 11 g/dl)
Stadio IV Linfocitosi + piastrinopenia (piastrine inferiori a $100 \times 10^9/L$) con o senza anemia o epato-splenomegalia

Tabella 1a

Stadiazione di Rai modificata

Basso Stadio 0 30 > 10 anni
Intermedio Stadi I + II 60 6-8 anni
Alto Stadi III e IV 10 2 anni

Tabella 1b

Stadiazione di Binet

Stadio A: Linfocitosi periferica e midollare con meno di tre aree linfoidi interessate*, non anemia o piastrinopenia

Stadio B: Idem con 3 o più aree linfoidi interessate*

Stadio C: Anemia (Hb < 10 g/dL) e/o piastrinopenia (<100 x 10⁹/L)

*aree linfoidi = cervicali, ascellari, inguinali, milza, fegato

Tabella 1c

Criteri di progressione NCI

- Perdita di peso (> 10% durante gli ultimi 6 mesi)
- Astenia
- Febbre (> 38°C)
- Sudorazione profusa notturna
- Organomegalia massiva (linfonodi con diametro >10 cm, splenomegalia massiva)
- Anemia e piastrinopenia progressive
- Rapido incremento del numero di linfociti (tempo di raddoppiamento < 6 mesi o aumento >50% in 2 mesi)
- Altri fattori prognostici sfavorevoli : eta' > 60 anni, sesso maschile e infiltrazione midollare di tipo diffuso.

Tabella 2

TOTALE PZ	53	%
TOTALE PZ VALUTABILI	53	
Età (anni)		
mediana	61	
Range	39-70	
ECOG Performance Status		
0	48	
1	5	
2	0	
STADIO BINET A	53	
STADIO RAI 0-I	53	
Positività al tests di Coombs	0	
CITOGENETICA		
del 13 q14	32	
del 11q22-q23	1	
Trisomia 12	1	
Del 17p13	0	
Nessuna anomalia citogenetica	19	
Score biologico 0	30	
Score biologico 1	13	
Score biologico 2	5	
score biologico 3	5	
Valori di emoglobina		
Mediana (g/dl)	13,7	
Range (g/dl)	9,6-16,8	
Valori di piastrine		
Mediana (mmc)	213.000	
Range (mmc)	95.000-423000	
Valori di WBC		
Mediana (mmc)	23.830	
Range (mmc)	8.110-102.250	
Concentrazione di LDH		
Mediana (UI/l)	302	
Range (UI/l)	110-639	
Concentrazione di β-2 microglobulina		
Mediana (mg/l)	1,8	
Range (mg/l)	0,4-7,15	
PROGRESSIONE	5	

Tabella 3

TOTALE PZ VALUTABILI	53	%
SCORE 0	30	
Età (anni)		
mediana	60,5	
Range	37-69	
ECOG Performance Status		
0	28	
1	2	
2	0	
STADIO BINET A	30	
STADIO RAI 0-I	30	
MESI DI FOLLOW-UP		
Mediana	32	
Range	5-46	
CITOGENETICA		
del 13 q14	21	
del 11q22-q23	0	
Trisomia 12	0	
Del 17p13	0	
Nessuna anomalia citogenetica	9	
Valori di emoglobina		
Mediana (g/dl)	14	
Range (g/dl)	9,6-16,8	
Valori di piastrine		
Mediana (mmc)	204.000	
Range (mmc)	107- 432.000	
Valori di WBC		
Mediana (mmc)	27.330	
Range (mmc)	10.500- 78.000	
Concentrazione di LDH		
Mediana (UI/l)	332	
Range (UI/l)	114-639	
Concentrazione di β-2 microglobulina		
Mediana (mg/l)	1,7	
Range (mg/l)	0,4-3,5	
PROGRESSIONE	0	

tabella 4 a

Numero pazienti	Mesi di follow-up
3	44
4	43
3	42
1	39
1	36
1	34
4	32
2	29
1	28
1	26
1	25
1	23
4	22
1	6
2	5

Score 0

Tabella 4 b

		%
TOTALE PZ VALUTABILI	53	
SCORE 1	13	
Età (anni)		
mediana	58	
Range	39-69	
ECOG Performance Status		
0	13	
1		
2		
STADIO BINET A	13	
STADIO RAI		
MESI DI FOLLOW-UP		
Mediana	32	
Range	5-46	
CITOGENETICA		
del 13 q14	9	
del 11q22-q23	0	
Trisomia 12	0	
Del 17p13	0	
Nessuna anomalia citogenetica	4	
Valori di emoglobina		
Mediana (g/dl)	13,5	
Range (g/dl)	11,1-16.6	
Valori di piastrine		
Mediana (mmc)	232.000	
Range (mmc)	134.000-411.000	
Valori di WBC		
Mediana (mmc)	25.140	
Range (mmc)	8100-82.000	
Concentrazione di LDH		
Mediana (UI/l)	290	
Range (UI/l)	110-538	
Concentrazione di β-2 microglobulina		
Mediana (mg/l)	1,8	
Range (mg/l)	0,9-5,7	
PROGRESSIONE	1 (26 MESI)	

Tabella 5a

Tot pz	FISH	IgVH nm	CD38+	Zap 70+
7	Del 13q 14		-	x
2	Del 13q 14	x		
4	Nessuna anomalia		-	x

Tabella 5b

Numero pazienti	Mesi di follow-up
1	43
1	42
1	39
2	36
1	32
1	28
1	26
1	24
1	21
1	19
1	18
1	5

Score 1

Tabella 5c

		%
TOTALE PZ VALUTABILI	53	
SCORE 2	5	
Età (anni)		
mediana	63	
Range	54-69	
ECOG Performance Status		
0	5	
1		
2		
STADIO BINET A	5	
STADIO RAI	5	
MESI DI FOLLOW-UP		
Mediana	32	
Range	5-46	
CITOGENETICA		
del 13 q14	1	
del 11q22-q23	1	
Trisomia 12	0	
Del 17p13	0	
Nessuna anomalia citogenetica	3	
Valori di emoglobina		
Mediana (g/dl)	13,3	
Range (g/dl)	11,6-15.2	
Valori di piastrine		
Mediana (mmc)	247.000	
Range (mmc)	106.000-319.000	
Valori di WBC		
Mediana (mmc)	21.290	
Range (mmc)	10.060-39.150	
Concentrazione di LDH		
Mediana (UI/l)	236	
Range (UI/l)	171-546	
Concentrazione di β-2 microglobulina		
Mediana (mg/l)	1,5	
Range (mg/l)	1,2-2,5	
PROGRESSIONE	1(32 MESI)	

Tabella 6a

Tot pz Score2	FISH	IgVH nm	CD38+	Zap 70+
1	del 11q22-q23	x		x
1	neg		x	x
2	neg	x		x
1	Del13q14		x	x

Tabella 6b

Numero pazienti	Mesi di follow-up
1	44
1	28
1	24
1	19
1	18

Score2

Tabella 6c

		%
TOTALE PZ VALUTABILI	53	
SCORE 3	5	
Età (anni)		
mediana	68	
Range	59-70	
ECOG Performance Status		
0	5	
1		
2		
STADIO BINET A	5	
STADIO RAI		
MESI DI FOLLOW-UP		
Mediana	32	
Range	5-46	
CITOGENETICA		
del 13 q14	1	
del 11q22-q23	0	
Trisomia 12	1	
Del 17p13	0	
Nessuna anomalia citogenetica	3	
Valori di emoglobina		
Mediana (g/dl)	14,9	
Range (g/dl)	12,3-16	
Valori di piastrine		
Mediana (mmc)	205.000	
Range (mmc)	95.000-271.000	
Valori di WBC		
Mediana (mmc)	20.380	
Range (mmc)	8600-100.250	
Concentrazione di LDH		
Mediana (UI/l)	326	
Range (UI/l)	211-443	
Concentrazione di β-2 microglobulina		
Mediana (mg/l)	2,1	
Range (mg/l)	1,59-3,2	
PROGRESSIONE	3	

Tabella 7a

Tot pz Score 3	FISH	IgVH nm	CD38+	Zap 70+
1	Del 13q 14	x	x	x
1	Nessuna anom	x	x	x
1	Nessuna anom	x	x	x
1	Nessuna anom	x	x	x
1	Trisomia 12	x	x	x

Tabella 7b

Numero pazienti	Mesi di follow-up
1	46
1	42
1	38
1	36
1	15

Tabella 7c

	Score0	Score1	p-value
Hb (g/dl)	14,1	13,4	0,97
WBC(mmc)	29.142	26570	0,95
PLT (mmc)	199.000	233.000	0,92
LDH (UI/l)	319	280	0,99
Beta2microglobulina(mg/dl)	1,86	2	0,92

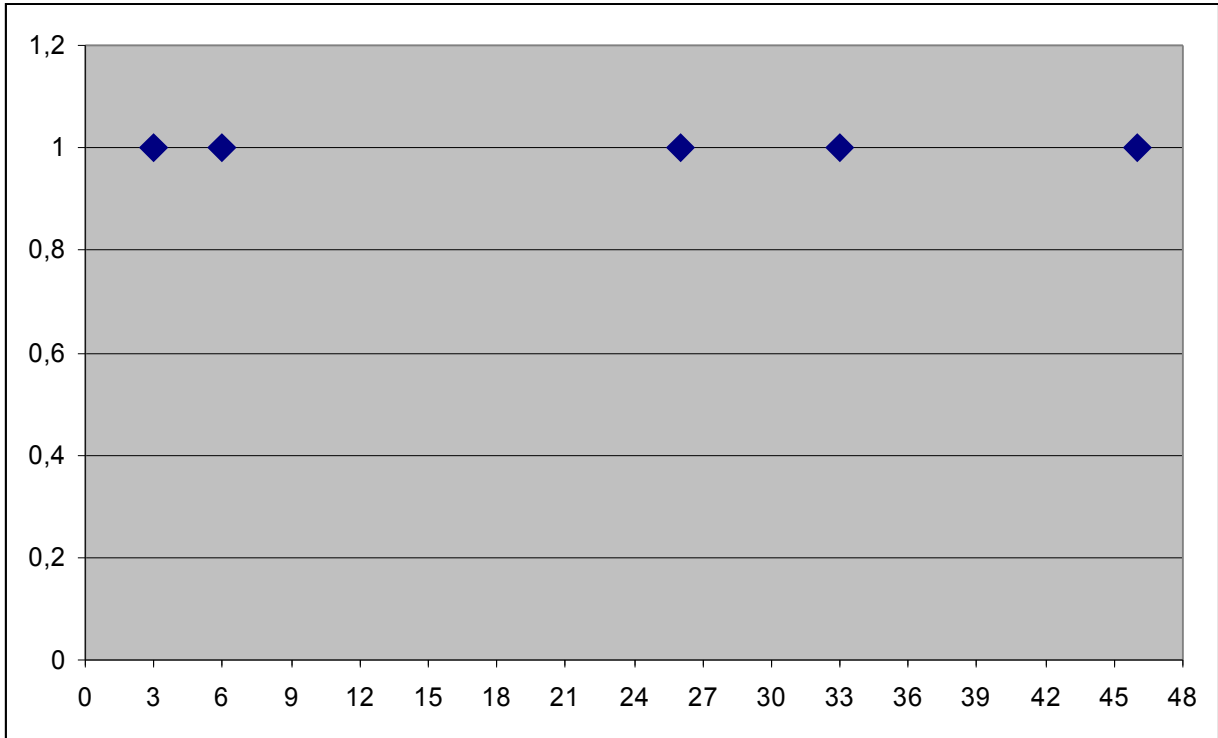
Tabella 8

	Score0	Score2	p-value
Hb (g/dl)	14,1	13,3	0,96
WBC(mmc)	29.142	21780	0,85
PLT (mmc)	199.000	220.040	0,94
LDH (UI/l)	319	252	0,88
Beta2microglobulina(mg/dl)	1,86	1,97	0,94

Tabella 9

	Score0	Score3	p-value
Hb (g/dl)	14,1	14,7	0,97
WBC(mmc)	29.142	30.500	0,97
PLT (mmc)	199.000	193.450	0,98
LDH (UI/l)	319	325	0,99
Beta2microglobulina(mg/dl)	1,86	2,14	0,86

Tabella 10



Mesi di follow-up

TIME TO PROGRESSION

Grade	ECOG
0	Fully active, able to carry on all pre-disease performance without restriction
1	Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out work of a light or sedentary nature, e.g., light house work, office work
2	Ambulatory and capable of all selfcare but unable to carry out any work activities. Up and about more than 50% of waking hours
3	Capable of only limited selfcare, confined to bed or chair more than 50% of waking hours
4	Completely disabled. Cannot carry on any selfcare. Totally confined to bed or chair
5	Dead

As published in Am. J. Clin. Oncol.: *Oken, M.M., Creech, R.H., Tormey, D.C., Horton, J., Davis, T.E., McFadden, E.T., Carbone, P.P.: Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative*

Bibliografia

- (1). Brenner H, Gondos A, Pulte D. Trends in long-term survival of patients with chronic lymphocytic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood* 2008;111:4916-214
- (2). Ghia P., Prato G., Scielzo C., et al., Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood*.2004; 103:2337-2342
- (3). Capalbo S, Treritoli P, Ciancio A, Battista C, Serio G, Liso V. Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur J haematol*.2000;65:114-7
- (4). Caligaris-Cappio F., Hamblin T.J., B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather, *J Clin Oncol*, 1999, 17, 399-408.
- (5). Rawstron AC, Gree MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JA, Evans PA et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*.2002;100:635-9
- (6). Dighiero G. CLL biology and prognosis. *Hematology Am Soc Hemat Educ Program*.2005;278-84
- (7). Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352:804-15
- (8). Damle R.N., Wasil T., Fais F., et al., IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*,1999, 94,1840-1847.
- (9). Ghiotto F, Fais F, Valletto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2004;113:1008-16
- (10). Stamatopulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007;109:259-70
- (11). Malisan F, Fluckiger AC, Ho S, Guret C, Banchereau J, Martinez-Valdez H. B-cell chronic lymphocytic leukemias can undergo isotype switching in vivo and can be induced to differentiate and switch in vitro. *Blood*. 1996; 87:717-24
- (12). Gurrieri C, McGuire P, Zan H, Yan X, Cerruti A, Albesiano E et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells can undergo somatic hypermutation and intraclonal immunoglobulin V(H)DJ(H) gene diversification. *J Exp Med* 2002; 196:629-39

- (13). Guarini A, Chiaretti S, Tavolaro S, Maggio R, Peragine N, Citarella F, Ricciardi MR, Santangelo S, Marinelli M, De Propriis MS, Messina M, Mauro FR, Del Giudice I, Foà R. [BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia \(CLL\) cells.](#) *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):782-92.
- (14). [Lanham S](#), [Hamblin T](#), [Oscier D](#), [Ibbotson R](#), [Stevenson F](#), [Packham G](#) Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):1087-93.
- (15). Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. [Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia.](#) *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4609-14.
- (16). [Stevenson FK](#), [Caligaris-Cappio F](#). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4389-95.
- (17). Damle R.N., Batliwalla F.M., Ghiotto F., et al., Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by IgV gene mutations, *Blood*, 2004, 103, 375-382.
- (18). [Chu P](#), [Deforce D](#), [Pedersen IM](#), [Kim Y](#), [Kitada S](#), [Reed JC](#), [Kipps TJ](#). Latent sensitivity to Fas-mediated apoptosis after CD40 ligation may explain activity of CD154 gene therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3854-9. Epub 2002 Mar 12.
- (19). Zupo S, Cutrona G, Mangiola M, Ferrarini M. [Role of surface IgM and IgD on survival of the cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia.](#) *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2277-8.
- (20). Calissano C, Damle RN, Hayes G, Murphy EJ, Hellerstein MK, Moreno C, Sison C, Kaufman MS, Kolitz JE, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. [In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia.](#) *Blood*. 2009 Nov 26;114(23):4832-42.
- (21). [Ghia P](#), [Caligaris-Cappio F](#). The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res*. 2000;79:157-73.
- (22). Burger JA, Burger M, Kipps TJ. [Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells.](#) *Blood*. 1999 Dec 1;94(11):3658-67.
- (23). Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N, Kipps TJ, Choi YS, Bennett F, Reed JC. [Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1.](#) *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1795-801

- (24).Molica S, Vacca A, Ribatti D, Cuneo A, Cavazzini F, Levato D, Vitelli G, Tucci L, Roccaro AM, Dammacco F. [Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia](#). *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3344-51
- (25).Maffei R, Martinelli S, Santachiara R, Rossi D, Guarnotta C, Sozzi E, Zucchetto A, Rigolin GM, Fiorcari S, Castelli I, Fontana M, Coluccio V, Leonardi G, Zucchini P, Tripodo C, Cuneo A, Gattei V, Del Poeta G, Forconi F, Gaidano G, Torelli G, Marasca R. [Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia](#). *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):584-92.
- (26).Keating M.J., Kantarjan H., Freireich E.J., O'Brien S., The serum beta 2 - microglobulin level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL), *Blood*,1995, 606a.
- (27).Montserrat E., Sanchez-Bisno J., Vinolas N., Rozman C., Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia : analysis of its prognostic significance, *Br J Haematol*, 1986, 62, 567-575.
- (28).Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N., Pasternack B.S., Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia, *Blood*,1975,46, 219-234.
- (29).Binet J.L., Auquier A. Dighiero G. et al., A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis, *Cancer* , 1981, 48,198-206.
- (30).Hallek M, 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.
- (31).Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., et al., Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 1999, 94,1848-1854
- (32).Hamblin T.J., Orchard J.A., Davies Z.A., et al., How many somatic mutations should we allow in chronic lymphocytic leukemia with unmutated IgVH genes ? *Blood*, 2004,104, 219a..
- (33).Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, Oppezzo P, Magnac C, Michel A, Yamamoto M, Pritsch O, Merle-Béral H, Maloum K, Ajchenbaum-Cymbalista F, Dighiero G. [Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia](#). *J Clin Oncol*. 2003 Nov 1;21(21):3928-32
- (34). Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sällström J, Sundström C, Roos G, Rosenquist R. [Somatic mutations in Ig V\(H\)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia](#). *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):2262-4.

- (35). [Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberger DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ.](#) ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2004 Aug 26;351(9):893-901.
- (36). Crespo M., Bosch F., Villamor N., et al., ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin -variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 2003, 348, 1764-1775.
- (37). Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, Maravelaki S, Owusu-Ankomah K, Swansbury J, A'Hern R, Brito-Babapulle V, Catovsky D. [Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia.](#) *Cancer.* 2005 Nov 15;104(10):2124-32
- (38). Van Bockstaele F, Verhasselt B, Philippé J. [Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review.](#) *Blood Rev.* 2009 Jan;23(1):25-47. Epub 2008 Jul 2. Review
- (39). Del Poeta G., Maurillo L., Venditti A., et al., Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, 2001, 98, 2633-2639
- (40) Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. *Blood.* 2002 Feb 1;99(3):1023-9. [CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease.](#)
- (41). Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al., Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med.* 2000, 343, 1910-1916
- (42). 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. Epub 2002 Nov 14
- (43). Calin G.A., Liu C.G., Shimizu M., et al., MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101, 11755-11760
- (44). Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. [11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis.](#) *Blood.* 1997 Apr 1;89(7):2516-22.
- (45). Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF, Pettitt AR, Hamblin T, Milligan DW, Child JA, Hamilton MS, Dearden CE, Smith AG, Bosanquet AG, Davis Z, Brito-Babapulle V, Else M, Wade R, Hillmen P; UK National Cancer Research Institute (NCRI) [Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia \(the LRF CLL4 Trial\): a randomised controlled trial.](#) Haematological Oncology Clinical Studies Group; NCRI Chronic Lymphocytic Leukaemia Working Group. *Lancet.* 2007 Jul 21;370(9583):230-9

- (46). Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, Siehl S, Jäger U, Bergmann M, Stilgenbauer S, Schweighofer C, Wendtner CM, Döhner H, Brittinger G, Emmerich B, Hallek M; German CLL Study Group. [Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia.](#) Blood. 2006 Feb 1;107(3):885-91. Epub 2005 Oct
- (47). Tsimberidou AM, Tam C, Abruzzo LV, O'Brien S, Wierda WG, Lerner S, Kantarjian HM, Keating MJ. [Chemoimmunotherapy may overcome the adverse prognostic significance of 11q deletion in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia.](#) Cancer. 2009 Jan 15;115(2):373-80
- (48). Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grünhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani PL, Caligaris-Cappio F, Seymour JF, Berrebi A, Jäger U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner CM, Eichhorst BF, Staib P, Bühler A, Winkler D, Zenz T, Böttcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Döhner H, Stilgenbauer S; International Group of Investigators; German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group. [Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial.](#) Lancet. 2010 Oct 2;376(9747):1164-74
- (49). [Shanafelt TD, Wierda WG, Abruzzo LV, Van Dyke DL, O'Brien S, Ferrajoli A, Tam CS, Lynn A, Kay NE, Keating MJ.](#) De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience.
- (50). Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer SV(H) [mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia.](#) Blood. 2002 Aug 15;100(4):1410-6.
- (51). Bergmann MA, Eichhorst BF, Busch R et al. Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL): Results of the CLL1-protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). ASH Annual Meeting Abstracts 2007; 110: 625.
- (52). Montserrat E., Vinolas N., Reverter J.C., Rozman C. Natural History of chronic lymphocytic leukaemia: on the progression and prognosis of early clinical stages. Nouv. Rev. Fr. Hematol., 1988, 30, 359-361.
- (53). Kay, N.E., Hamblin, T.J., Jelinek, D.F., Dewald, G.W., Byrd, J.C., Farag, S., Lucas, M., Lin, T., Chronic lymphocytic Leukemia. Hematol., 2002, 193-213.
- (54). [Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M.](#) Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. [Blood.](#) 1987 Mar;69(3):929-36.
- (55). Vallespi T, Montserrat E, Sanz MA :chronic lymphocytic leucemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtype. A multivariate survival analysis in 146 patients. B J Haematol.1991;77:478-85

- (56). [Di Raimondo F](#), [Giustolisi R](#), [Lerner S](#), [Cacciola E](#), [O'Brien S](#), [Kantarjian H](#), [Keating MJ](#). Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine. [Ann Oncol](#). 2001 May;12(5):621-5.
- (57). [Magnac C](#), [Porcher R](#), [Davi F](#), [Nataf J](#), [Payelle-Brogard B](#), [Tang RP](#), [Oppezso P](#), [Lévy V](#), [Dighiero G](#), [Ajchenbaum-Cymbalista F](#) Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. [Leukemia](#). 2003 Jan;17(1):133-7.
- (58) . [Matthews C](#), [Catherwood MA](#), [Morris TC](#), [Kettle PJ](#), [Drake MB](#), [Gilmore WS](#), [Alexander HD](#) Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. [Eur J Haematol](#). 2006 Oct;77(4):309-17.
- (59). [Reinisch W](#), [Willheim M](#), [Hilgarth M](#), [Gasché C](#), [Mader R](#), [Szepfalusi S](#), [Steger G](#), [Berger R](#), [Lechner K](#), [Boltz-Nitulescu G](#), et al. Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. [J Clin Oncol](#). 1994 Oct;12(10):2146-52.
- (60). Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, Cortes J, Thomas D, Garcia-Manero G, Koller C, Beran M, Giles F, Ravandi F, Lerner S, Kantarjian H, Keating M. [Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia](#). [Blood](#). 2007 Jun 1;109(11):4679-85.