

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE

Coordinatore: Prof. Stefano A. Pileri

**CARATTERIZZAZIONE CITOGENETICO-
MOLECOLARE IN PAZIENTI CON MIELOMA
MULTIPLO. IMPLICAZIONI PROGNOSTICHE DELLE
DELEZIONI DEL CROMOSOMA 13 E DEL
CROMOSOMA 17**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
XIX CICLO

Presentata da
Dott.ssa Chiara Nicci

Relatore
Dott.ssa Nicoletta Testoni

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15 MALATTIE DEL SANGUE

Anno Accademico 2005-2006

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Biologia del mieloma multiplo.....	1
1.2. Clinica.....	3
1.3. Laboratorio e diagnosi.....	4
1.4. Prognosi.....	6
1.5. Terapia.....	9
2. CARATTERIZZAZIONE CITOGENETICA-MOLECOLARE NEL MIELOMA MULTIPLO.....	13
2.1. Alterazioni citogenetiche.....	16
2.1.1. t(11;14)(q13;q32).....	21
2.1.2. t(4;14)(p16.3;q32).....	22
2.1.3. t(14;16)(q32;q23).....	23
2.1.4. monosomia 13/delezione 13q (-13/13q-).....	24
2.1.5. delezione 17p13.....	26
2.1.6. Anomalie del cromosoma 1.....	27
3. OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	28
4. MATERIALI E METODI.....	29
4.1. Protocollo terapeutico.....	29
4.2. Separazione positiva della popolazione plasmacellulare (Metodo MACS).....	31
4.2.1. Preparazione delle cellule mononucleate da midollo.....	31
4.2.2. Marcatura magnetica.....	32
4.2.3. Separazione delle cellule CD138+.....	32
4.3. Analisi citogenetica molecolare.....	34
4.3.1. Sonde utilizzate.....	34
4.3.2. Metodica FISH.....	39
4.4. Analisi citogenetica convenzionale.....	40
4.5. Tecnica del bandeggio cromosomico.....	41
4.5.1. Bandeggio GTG.....	42
4.6. Analisi statistica.....	43
5. RISULTATI.....	44
7. DISCUSSIONE.....	65
8. BIBLIOGRAFIA.....	73

1. INTRODUZIONE

Il mieloma multiplo (MM) è una malattia neoplastica caratterizzata dalla proliferazione ed accumulo di linfociti B e di plasmacellule sintetizzanti immunoglobuline monoclonali (componente M).

Il MM rappresenta approssimativamente l'1% delle patologie maligne e circa il 10% delle neoplasie ematologiche. La frequenza di questa patologia aumenta con l'età e raggiunge un picco nella 6-7^a decade di vita. L'età media della popolazione colpita è di circa 65 anni. I maschi sono interessati con frequenza leggermente superiore rispetto alle femmine e la razza negra con frequenza doppia rispetto alla bianca.

L'eziologia del mieloma multiplo è sconosciuta. Numerose osservazioni epidemiologiche hanno identificato, quale principale fattore di rischio, l'esposizione occupazionale a pesticidi, derivati del petrolio e radiazioni ionizzanti. E' stato, infine, ipotizzato che la stimolazione cronica del sistema monocito-macrofagico, quale si realizza in corso di processi infettivi o flogistici cronici o di natura autoimmune, possa rivestire un ruolo di primaria importanza nell'eziologia della malattia (1).

1.1. BIOLOGIA DEL MIELOMA MULTIPLO

Inizialmente si pensava che il MM fosse una neoplasia delle sole plasmacellule, attualmente, invece, è considerata una neoplasia dell'intero sistema linfoide B. Si ipotizza che l'evento neoplastico possa realizzarsi ad uno stadio della linfocitopoiesi B antecedente la maturazione a plasmacellula.

Numerose osservazioni hanno portato alla conclusione che i precursori delle plasmacellule mielomatose midollari sono cellule della linfocitopoiesi B, identificabili quali B-linfociti memoria o plasmablasti, che hanno già superato la fase di maturazione antigene-dipendente (risposta immune secondaria) che si realizza a livello dei centri germinativi dei follicoli linfatici secondari degli organi linfoidei periferici, identificati, quindi, come sede di cruciale importanza nella patogenesi del MM. In seguito si ha la migrazione dei plasmablasti verso il midollo osseo, ove differenziano a plasmacellule mature e trovano il microambiente adatto per la crescita, sia per l'ancoraggio offerto dalle cellule midollari, che per la produzione di numerose citochine, prima fra tutte l'interleuchina 6 (IL-6). L'IL-6 stimola, infatti, la proliferazione delle plasmacellule mielomatose ed ha un ruolo protettivo contro l'apoptosi, sia spontanea che indotta da desametasone.

Anche altre citochine giocano un ruolo importante nella proliferazione delle plasmacellule neoplastiche e nella patogenesi del mieloma multiplo. Fra queste IL-10, TGF- β 1, IL-15, IL-11, Leukemia Inhibitory Factor (LIF) e soprattutto l'Insulin like Growth Factor (IGF). Un ruolo molto importante è svolto da citochine che hanno anche un'attività angiogenica (HGF, FGF e VEGF). L'angiogenesi è fondamentale per la progressione tumorale e pertanto è correlata con la prognosi. Infatti, i neovasi stimolano la proliferazione delle cellule tumorali ed incrementano l'attività invasiva e la capacità metastatica delle cellule tumorali.

Oltre alla proliferazione plasmacellulare, il MM è caratterizzato dalla presenza di aree osteolitiche. Studi condotti su topi transgenici hanno mostrato che l'esaltata attività osteoclastica è provocata da un'alterazione dell'equilibrio fra la produzione di RANK-L e osteoprotegerina (OPG). Il RANK

(Receptor Activator of Nuclear factor KB) è un recettore espresso sui precursori degli osteoclasti e sugli osteoclasti maturi. Il suo ligando (RANK-L) è prodotto dalle cellule del microambiente midollare e da cellule linfoidi. Il legame RANK-RANK-L promuove il differenziamento degli osteoclasti, la loro maturazione, proliferazione e attivazione. L'attività del RANK è inibita dall' OPG, che funge da recettore "esca" per RANK, prevenendone l'attivazione da parte di RANK-L. Molte citochine, fattori di crescita e ormoni, fra cui il paratormone, agiscono fisiologicamente a livello di RANK-L e OPG per regolare l'attività ed il differenziamento degli osteoclasti. Nel MM il bilancio tra RANK-L e OPG è alterato da numerose citochine, fra cui IL-1 β , IL-6, IL-11, TNF- α , TGF- β , HGF e MIP1 α , che aumentano la produzione di RANK-L e riducono quella di OPG, inducendo l'osteoclastogenesi (1-3).

1.2. CLINICA

Le manifestazioni cliniche d'esordio del MM sono varie e possono riconoscere, quale proprio substrato patogenetico, l'espansione della massa neoplastica e/o la produzione ad opera delle cellule neoplastiche di citochine (o di altri fattori) e/o particolari caratteristiche chimico-fisiche della componente M.

Questo spiega la totale assenza di sintomi nella fase di accrescimento del tumore che precede la diagnosi. Mentre, successivamente all'espansione del clone plasmacellulare diventano, invece, evidenti i caratteristici quadri clinici, tra cui i più importanti per frequenza e severità sono: l'interessamento dell'apparato scheletrico, l'interessamento renale, la morbidità infettiva, lo scompenso mieloide, la sindrome da ipercalcemia, le

complicanze neurologiche, la sindrome da iperviscosità e l'amiloidosi (1).

1.3. LABORATORIO E DIAGNOSI

Nel midollo osseo normale le plasmacellule non superano il 3% della popolazione nucleata totale. In corso di MM l'infiltrazione plasmacellulare midollare è quantitativamente superiore al 10% della popolazione nucleata totale e può giungere alla totale sostituzione del normale parenchima midollare.

All'esame morfologico le plasmacellule neoplastiche appaiono indistinguibili da quelle normali o, più spesso, presentano numerose atipie citologiche, sino all'acquisizione di caratteri francamente anaplastici.

E' dimostrabile la presenza di una componente M nel siero e nelle urine in oltre il 95% dei pazienti con MM. La sua individuazione viene svolta tramite elettroforesi delle sieroproteine su acetato di cellulosa o su gel di agarosio, mentre la sua quantificazione tramite nefelometria o immunodiffusione radiale. Infine, tramite immunofissazione o immunoelettroforesi, si riesce a tipizzare la classe di catena pesante ed il tipo di catena leggera da cui essa risulta composta.

Le alterazioni elettroforetiche variano a seconda che il MM sia di tipo:

- **secernente**: (70-80% dei casi) la componente M è costituita da immunoglobuline complete, più frequentemente di tipo IgG e IgA, identiche per isotipo ed idiotipo e analoghe per caratteristiche fisico chimiche alle corrispondenti immunoglobuline fisiologiche. La protidemia è costantemente elevata e l'elettroforesi sierica mostra una banda

immunoglobulinica monoclonale che migra in una zona molto ristretta fornendo al tracciato il classico aspetto a due guglie di duomo o a “corna”;

- **Bence Jones:** (più rara) quando il clone mielomatoso secreta soltanto catene leggere dello stesso tipo (k o λ), quindi immunoglobuline incomplete. La protidemia totale è normale e la percentuale di gammaglobuline può essere aumentata per la presenza di una componente M costituita da sole catene leggere;
- **non secernente:** (piccola percentuale di casi) il clone mielomatoso non secreta, oppure secreta ma non escretta immunoglobuline. La protidemia totale è normale e la percentuale di gammaglobuline può essere o normale o ridotta.

L'emogramma può evidenziare, quale segno più comune di scompenso midollare secondario all'espansione della popolazione neoplastica, anemia normocromica-normocitica, con globuli rossi impilati (conseguenza dell'aumento nel plasma delle Ig). Meno frequente è, invece, la presenza di leucopenia e/o piastrinopenia, mentre decisamente poco frequente è il reperto, alla formula leucocitaria, di un'elevata percentuale di linfociti plasmacitoidi e/o di plasmacellule. Queste ultime, se presenti in numero superiore a $2000/\text{mm}^3$, identificano la variante leucemica del MM (leucemia plasmacellulare LPC).

Strettamente dipendente dall'ipergammaglobulinemia è l'aumentata velocità di eritrosedimentazione (VES).

Quindi i principali criteri su cui si basa la diagnosi di MM sono:

1. la presenza all'esame citologico ed istologico del midollo osseo di una percentuale di plasmacellule superiore al 10% della popolazione mononucleata totale o la dimostrazione istologica d'infiltrazione plasmacellulare di altri tessuti (tessuti molli, ossa, ecc.) prelevati biotticamente;

2. la presenza di una componente M sierica e/o urinaria che viene tipizzata e quantificata;
3. la presenza delle caratteristiche lesioni osteolitiche scheletriche.
Per completare il quadro diagnostico utili sono l'emogramma e l'indagine di valutazione della funzionalità renale.

Un altro parametro laboristico di grande importanza è la β_2 -microglobulina sierica. E' normalmente rilevabile nel siero in piccole quantità ed aumenta in corso di numerose malattie neoplastiche solide, specialmente del sistema linfoide.

Per quanto riguarda l'ipercalcemia (Ca sierico superiore a 11.5-12 mg/dl) si riscontra più frequentemente in pazienti con massa neoplastica espansa ed esteso interessamento scheletrico. Quest'ultimo viene evidenziato tramite TAC o risonanza magnetica nucleare (RMN).

Molto importante è anche la determinazione dell'attività proliferativa delle plasmacellule midollari (PCLI) che viene valutata incubando il midollo osseo con bromodeossiuridina (BrdU) in vitro e successivamente l'evidenziazione all'immunofluorescenza con anticorpo monoclonale anti-BrdU. La BrdU è un analogo della timidina che viene incorporato nelle cellule in fase S. Qualora non sia possibile eseguire questa metodica, in alternativa, si possono misurare i livelli sierici di proteina C reattiva (PCR) la cui sintesi, prevalentemente epatica, è dipendente dall'IL-6 (1).

1.4. PROGNOSI

La sopravvivenza dei pazienti con MM varia da pochi mesi a più di 10 anni ed è mediamente pari a 3-4 anni. Essa risulta influenzata da diversi parametri clinico-laboristici, alcuni dei

quali sono correlati alla taglia neoplastica, mentre altri sono espressione dell'intrinseca malignità del clone tumorale (Tab.1).

<i>Correlati alla massa neoplastica</i>	<i>Correlati a caratteri biologici</i>
• β 2-microglobulina	• Attività proliferativa plasmacellulare
• Stadio clinico	• Livelli di IL-6
• Funzionalità renale	• Proteina C reattiva
• Grado e tipo di infiltrazione midollare	• Albumina
• Numero delle piastrine	• Alterazioni citogenetiche
	• Fenotipo plasmacellulare

Tabella 1: Fattori prognostici del mieloma multiplo.

Utilizzato universalmente è il sistema classificativo in stadi clinici introdotto da Durie e Salmon nel 1975 (4) che permette di identificare tre stadi clinici (I,II,III), corrispondenti ad una massa tumorale più espansa, e due varietà (A e B), a seconda che la funzionalità renale sia, rispettivamente, normale o alterata (Tab.2). Anche se questa è considerata una classificazione molto semplice, vengono attualmente preferiti ulteriori parametri, di maggiore affidabilità, quali la β 2-microglobulina sierica e la proteina C reattiva (PCR), l'attività proliferativa plasmacellulare midollare (PCLI) e le alterazioni citogenetiche.

Il valore sierico della β 2-microglobulina costituisce una misura della massa tumorale e della funzione renale (5). Anche il livello di PCR costituisce un importante valore predittivo di questo marker surrogato dei valori di IL-6. Alti livelli di PCR con alti livelli di β 2-microglobulina sierica sono associati ad una sopravvivenza breve in pazienti con MM trattati con chemioterapia convenzionale (6).

La PCLI, invece, aumenta in associazione alla progressione tumorale (7). La sopravvivenza mediana di pazienti con una bassa PCLI e con bassi livelli di β 2-microglobulina sierica,

trattati con chemioterapia (CHT) convenzionale è di 71 mesi rispetto ai 17 mesi dei pazienti con entrambi i parametri elevati (8).

Recentemente è emerso che la presenza di alterazioni genetiche costituisca il più importante fattore prognostico del MM (9).

Stadio (A/B)	Parametri	Massa tumorale
I	(tutti i seguenti parametri debbono essere soddisfatti) 1. Emoglobina >10 g/dl 2. Calcemia normale 3. Normale struttura ossea o unica lesione 4. Bassa concentrazione di componente M a) IgG < 50g/l b) IgA < 30 g/l c) Bence Jones < 4 g/24 ore	< 0,5 x 10 ¹² cell/m ² (piccola)
II	Quando non siano soddisfatti i criteri per gli stadi I e III	0,5 - 1,2 x 10 ¹² cell/m ² (media)
III	(uno solo dei seguenti parametri è sufficiente) 1. Emoglobina < 8,5 g/dl 2. Calcemia ≥ 12 mg/dl 3. Gravi lesioni ossee 4. Elevata concentrazione di componente M a) IgG > 70 g/l b) IgA > 50 g/l c) Bence Jonce > 12 g/24 ore	> 1,2 x 10 ¹² cell/m ² (grande)
A= creatinina <2mg/dl ; B= creatinina > 2 mg/dl		

Tabella 2: Classificazione in stadi clinici secondo Durie e Salmon.

1.5. TERAPIA

La strategia terapeutica nel MM è stata per molti anni finalizzata esclusivamente al contenimento della massa neoplastica. Per raggiungere questo fine ci si avvale della chemioterapia convenzionale, con l'eventuale associazione dell'irradiazione locale di lesioni scheletriche dolenti o a rischio di frattura. In questo modo si raggiunge una remissione completa (RC) in meno del 5% dei casi ed una remissione parziale (RP) nel 40-70% dei casi. Nell'arco dell'ultimo decennio l'applicazione su larga scala delle terapie mieloablative con singolo o doppio trapianto autologo o con trapianto allogenico di progenitori emopoietici ha, invece, condotto ad utilizzare preferenzialmente queste procedure (1). Diversi studi, infatti, hanno dimostrato che la risposta alla terapia, la sopravvivenza totale (over survival-OS) e la sopravvivenza libera da eventi (event free survival-EFS) aumentano significativamente in pazienti trattati con terapia ad alte dosi (HDT) seguita da trapianto autologo rispetto ai pazienti trattati con chemioterapia convenzionale (10).

Il mieloma multiplo, però, nonostante la chemioterapia convenzionale e la terapia ad alte dosi, rimane una neoplasia incurabile. Per superare la resistenza alla terapia e per migliorare la prognosi dei pazienti, sono state e si stanno sviluppando nuove strategie terapeutiche (11).

Tra i nuovi farmaci primo fra tutti è la talidomide.

La talidomide è un derivato sintetico dell'acido glutamico. Inizialmente è stato utilizzato per le sue proprietà sedative, tuttavia, la dimostrazione di effetti teratogeni, ne ha causato il ritiro dal mercato nei primi anni '60. Successivamente il farmaco è stato utilizzato in varie rare affezioni a differente eziologia, quali le manifestazioni cutanee della lebbra, le ulcere esofagee, la

wasting-syndrome AIDS correlata, le lesioni cutanee del lupus eritematoso, la sarcoidosi polmonare e cutanea e la graft versus host disease (GVHD) cronica.

In seguito, basandosi sui suoi effetti antiangiogenici ed immunomodulatori, la talidomide è stata utilizzata anche in diversi tumori solidi e neoplasie ematologiche, e la più stretta attività antitumorale è stata osservata nel MM (12).

Il suo meccanismo d'azione non è stato ancora completamente chiarito. Sembra che la talidomide agisca sia direttamente sulle plasmacellule neoplastiche che indirettamente sulle cellule del microambiente midollare. Infatti, la talidomide induce l'apoptosi e l'arresto della crescita in fase G1 nelle cellule mielomatose attraverso diversi meccanismi (13). Inibisce, inoltre, l'adesione delle cellule neoplastiche alle cellule stromali midollari e la secrezione di citochine e fattori di crescita come IL-6, IGF, VEGF, IL-1 β , FGF, importantissimi per la proliferazione delle cellule tumorali, per la formazione delle lesioni scheletriche e per lo sviluppo dell'angiogenesi. Infine la talidomide modula la risposta immunitaria cellulo-mediata perché induce la risposta Th-1 e stimola la produzione di IL-2 e γ -interferone, con conseguente aumento del numero e stimolazione della funzione contro le cellule mielomatose dei linfociti natural killer (NK) (14) (Fig. 1).

L'efficacia, riportata in diversi studi, della talidomide da sola e successivamente in associazione con il desametasone in MM refrattari o in progressione (15,16), ha portato ad investigare l'utilizzo di questi agenti come terapia di prima linea per indurre la remissione in pazienti con MM di nuova diagnosi.

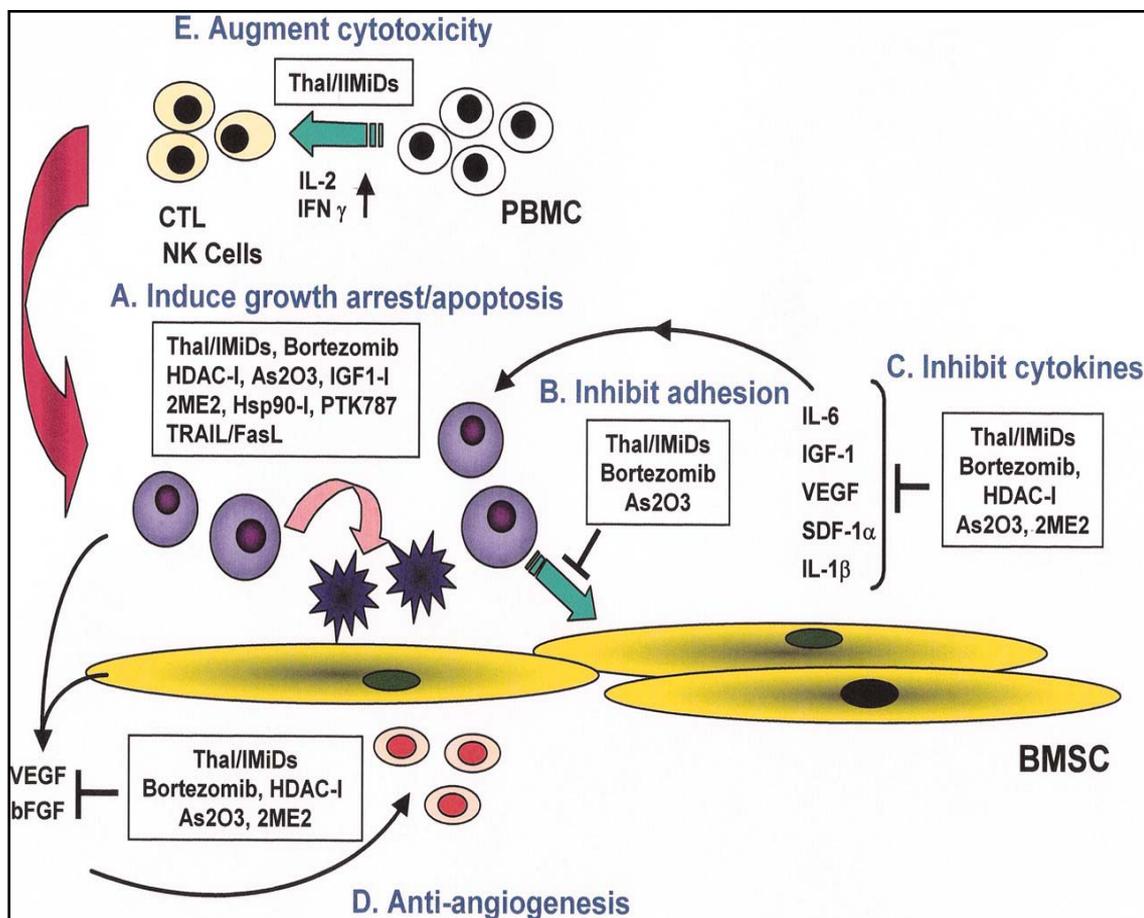


Figura 1: Meccanismo d'azione della Talidomide.

Autori dell'Istituto di Ematologia di Bologna hanno recentemente pubblicato uno studio che ha mostrato la superiorità di talidomide + desametasone (Thal-Dex) rispetto alla terapia ad alte dosi secondo schema VAD (vincristina-doxorubicina-desametasone) come terapia primaria in preparazione al trapianto autologo di cellule staminali da sangue periferico. Da questo studio è emerso che i pazienti trattati con Thal-Dex mostrano una risposta pari al 76%, percentuale significativamente più alta di quella osservata nei pazienti trattati

con VAD (52%). Inoltre questo lavoro ha mostrato una riduzione della taglia tumorale (misurabile come riduzione di componente M sierica) significativamente superiore nei pazienti trattati con Thal-Dex rispetto a quella dei pazienti trattati con VAD (12). Un'alta riduzione della componente M sierica è predittiva dell'ottenimento della remissione completa post-trapianto (17).

2. CARATTERIZZAZIONE CITOGENETICA-MOLECOLARE NEL MIELOMA MULTIPLO

Il mieloma multiplo è caratterizzato, almeno nelle prime fasi della malattia, da una scarsa proliferazione delle plasmacellule neoplastiche e, spesso, anche da una loro bassa infiltrazione midollare. L'analisi citogenetica risulta per questo essere limitata e difficoltosa, in quanto le metafasi ottenute ed analizzate rappresentano in molti casi la mielopoiesi normale, per cui spesso è indispensabile l'analisi citogenetica di un elevato numero di metafasi per l'identificazione di un clone anomalo (18-20).

La frequenza delle alterazioni cromosomiche, analizzate con metodica di citogenetica convenzionale (CC), varia dal 30-50% nei pazienti alla diagnosi, ad un 40-60% nei pazienti in progressione, fino a più dell'85% nelle leucemie plasmacellulari. Tale aumento deriva probabilmente da un'incrementata attività proliferativa delle plasmacellule e dall'eventuale insorgenza di alterazioni citogenetiche secondarie, che possono mascherare l'evento primario della malattia.

La percentuale dei cloni alterati nei pazienti alla diagnosi può aumentare se si eseguono colture cellulari midollari "a lungo termine" (72-120h).

Negli ultimi anni, lo sviluppo della citogenetica molecolare, che va dalla FISH (fluorescent *in situ* hybridization) alla SKY/M-FISH (metaphase spectral karyotype imaging/multicolor-FISH) e alla CGH (comparative genomic hybridization), ha notevolmente aumentato la possibilità di individuare anomalie citogenetiche. L'individuazione di specifiche alterazioni genetiche ha permesso una migliore comprensione della patogenesi di questa malattia (21).

La FISH è una metodica che si basa sull'utilizzo di sequenze di DNA a singolo filamento coniugate con fluorocromi (sonde) in grado di ibridizzare specifiche sequenze complementari di DNA genomico. Il DNA target è DNA cromosomico di cellule in metafase o in interfase fissate su un vetrino. Le sonde che si utilizzano possono essere centromeriche (specifiche per le sequenze ripetute presenti nei centromeri dei singoli cromosomi), chromosome paints (un insieme di sonde specifiche per l'intera lunghezza di un determinato cromosoma) oppure specifiche per un singolo locus (22).

Questa metodica permette di rilevare alterazioni numeriche e/o strutturali ed anomalie criptiche alla citogenetica convenzionale, nell'80-90% dei pazienti, indipendentemente dallo stadio della malattia: una percentuale notevolmente superiore, in quanto permette di analizzare anche cellule in interfase (23-25).

La M-FISH e la SKY permettono la colorazione diversificata dei singoli cromosomi. Per identificare i 24 cromosomi è necessario l'utilizzo di almeno 5 fluorocromi, che combinati tra loro danno origine a 24 colori diversi. Per cui ogni cromosoma è marcato con una combinazione di fluorocromi. Queste metodiche permettono l'identificazione di riarrangiamenti complessi e/o non identificabili con metodiche standard (traslocazioni che coinvolgono più di due cromosomi, markers, ring, hsr, double minute), ma non permettono di identificare riarrangiamenti intracromosomici come delezioni e inversioni. Inoltre, come per la metodica classica, presentano il limite di dover analizzare cellule in metafase (26-27).

La CGH, infine, permette di individuare perdita o acquisizione di materiale cromosomico senza la necessità di dover ottenere metafasi in quanto viene analizzato il DNA estratto dalle cellule tumorali. Questo DNA viene marcato con un fluorocromo, solitamente il fluoroisotiocianato (FITC-verde), mentre un DNA

di controllo viene marcato con rodamina (rosso), ed uguali quantità di questi DNA vengono fatte ibridizzare ad una metafase normale. L'analisi si basa poi sul calcolo in software del rapporto tra fluorescenza rossa e fluorescenza verde lungo la lunghezza di ogni cromosoma. Comunque tale metodologia non permette di rilevare le alterazioni di tipo bilanciato (traslocazioni o inversioni) in cui non si ha variazione in termini quantitativi di materiale cromosomico (28).

Sicuramente la metodica più utilizzata, e quella che ha permesso di caratterizzare meglio questa patologia da un punto di vista citogenetico, è la FISH. Tuttavia, come detto precedentemente, nei mielomi alla diagnosi la percentuale di plasmacellule neoplastiche presenti nel midollo non è alta. Di conseguenza, per riuscire ad analizzare il clone mielomatoso, è importante, prima di applicare la FISH, effettuare una selezione della popolazione plasmacellulare. A questo scopo possono essere applicate diverse metodiche e sicuramente una delle più pratiche ed utilizzate è la selezione positiva tramite sistema immunomagnetico di separazione su colonna. Per questa metodica viene utilizzato l'anticorpo anti-CD138, che riconosce appunto l'antigene CD138 presente sulle plasmacellule normali e neoplastiche. Questo anticorpo messo ad incubare con la porzione mononucleata delle cellule midollari, legherà soltanto le plasmacellule. L'anticorpo è coniugato a delle microbiglie magnetiche, di conseguenza, facendo passare le cellule attraverso una colonna contenente una matrice di sfere ferromagnetiche, inserita in un magnete, si riuscirà ad effettuare una selezione delle cellule leganti l'anticorpo, poiché saranno le uniche a rimanere ancorate alla colonna (Fig.2).

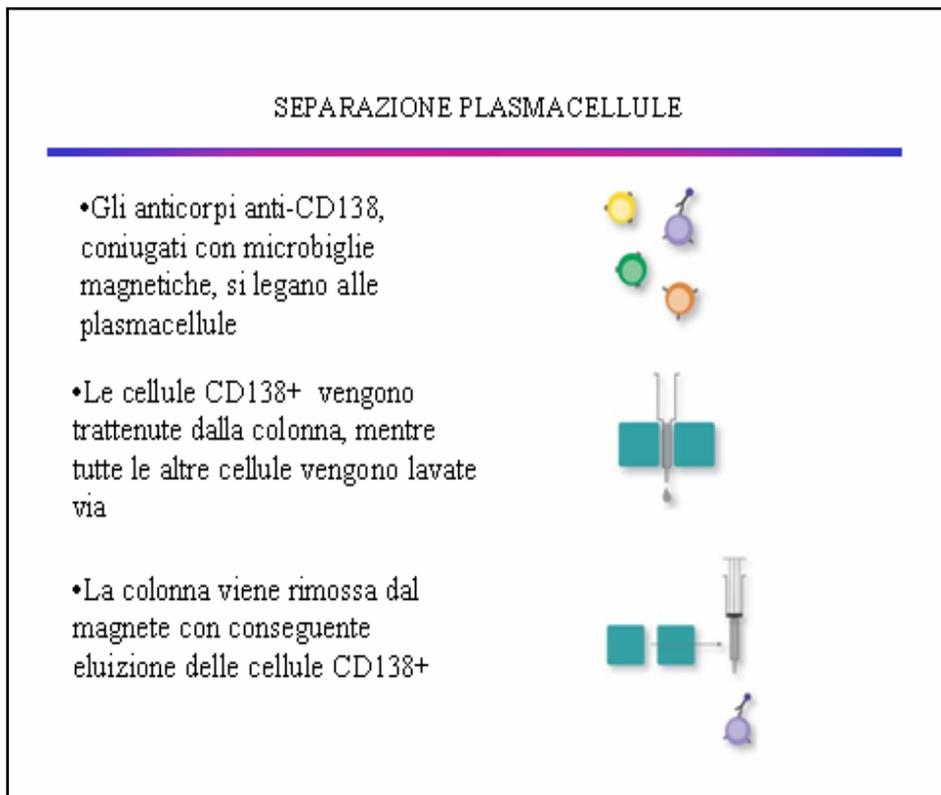


Figura 2: Selezione positiva delle plasmacellule (CD138+) tramite sistema immunomagnetico di separazione su colonna (Miltenyi Biotec).

Un'altra metodica molto utilizzata è la FICTION. Questa è un'analisi in FISH di cellule precedentemente marcate con anticorpi monoclonali. Nel caso del MM gli anticorpi riconoscono le immunoglobuline citoplasmatiche.

2.1. ALTERAZIONI CITOGENETICHE

Il mieloma multiplo è caratterizzato spesso da un cariotipo complesso con numerose alterazioni strutturali e numeriche. Ciò rende ancora più problematica l'indagine citogenetica e perciò, in molti casi, le alterazioni possono essere non ben caratterizzate. In particolare il MM è caratterizzato da frequente presenza di aneuploidia. Inizialmente si pensava che le trisomie fossero più

frequenti delle monosomie, in realtà, è vero il contrario. Le più frequenti riguardano monosomie dei cromosomi 13,14,16,22 e trisomie dei cromosomi 3,5,7,9,11,15,19 e 21 (9).

In base al tipo di aneuploidia presente i pazienti possono essere suddivisi nelle seguenti categorie:

- ipodiploidi/ipotetraploidi (<46 cromosomi/ 75-90 cromosomi);
- pseudodiploidi (46 cromosomi, ma con alterazioni strutturali);
- iperdiploidi (>46/47 cromosomi).

I primi due gruppi di pazienti sono associati prevalentemente (<85% dei casi) a traslocazioni che coinvolgono la banda 14q32 (locus del gene delle catene pesanti delle immunoglobuline-IgH) e a monosomia/delezione del cromosoma 13. In particolare è evidente l'associazione per le tre traslocazioni 14q32 più ricorrenti: $t(4;14)(p16;q32)$, $t(11;14)(q13;q32)$ e $t(14;16)(q32;q23)$. Mentre nell'iperdiploidia, sono meno comuni queste traslocazioni (< 30% dei casi) ma prevalgono duplicazioni di segmenti cromosomici (9,29-32).

Per quanto riguarda il valore prognostico di questi sottogruppi, diversi studi hanno dimostrato l'associazione, nel mieloma multiplo, dell'ipodiploidia ad una sopravvivenza più breve (33-39). Non è ancora ben chiaro perché l'ipodiploidia sia associata ad una prognosi sfavorevole. Si ipotizza che la causa di ciò sia l'associazione dell'ipodiploidia con le traslocazioni 14q32, oppure la perdita di materiale genetico, tra cui geni oncosoppressori, con conseguente instabilità genomica che porta ad un aumento dei difetti genetici (35,39-40). D'altra parte il danno genetico in pazienti con iperdiploidia potrebbe essere parzialmente controbilanciato da un aumentato numero di copie di geni oncosoppressori (41). In realtà la maggior parte degli studi finora effettuati per valutare le implicazioni cliniche della ploidia si è basata sull'utilizzo di metodiche di citogenetica convenzionale, quindi su plasmacellule altamente proliferanti. Si

stanno utilizzando, ora, metodiche di citofluorimetria e FISH interfascica (per i cromosomi 5, 9 e 15) per studiare, in maniera più approfondita, il valore prognostico dell'iperdiploidia.

Tra le alterazioni strutturali, le più frequenti e maggiormente caratterizzate sono quelle che coinvolgono il locus del gene delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgH).

Le traslocazioni che coinvolgono i geni delle catene pesanti (IgH) e delle catene leggere (IgL- λ e IgL- κ) delle immunoglobuline sembrano costituire degli eventi primari nella patogenesi del MM (42-43). Studi di FISH indicano che traslocazioni che coinvolgono il locus IgH sono presenti nel 55-70% dei casi di MM e nell'80% dei casi di leucemia plasmacellulare (40,44-45). Quelle che coinvolgono il locus IgL- λ sono presenti in circa il 20% dei casi di MM (46), mentre quelle che coinvolgono il locus IgL- κ sono molto rare (9).

La banda 14q32 è coinvolta in traslocazioni con più di 20 partners cromosomici differenti. Le traslocazioni più frequenti sono quelle con i loci (Fig.3):

- 11q13, che coinvolge il gene della *ciclina D1* (*CCND1*), presente nel 15-20% dei casi (44,47);
- 4p16, che coinvolge i geni *MMSET* e *FGFR3*, presente nel 15-20% dei casi (48-52);
- 16q23, che coinvolge il gene *c-maf*, presente in circa il 2-10% dei casi (29,53-54);
- 6p21, che coinvolge il gene della *ciclina D3* (*CCND3*), presente in circa il 4% dei casi (26,55).

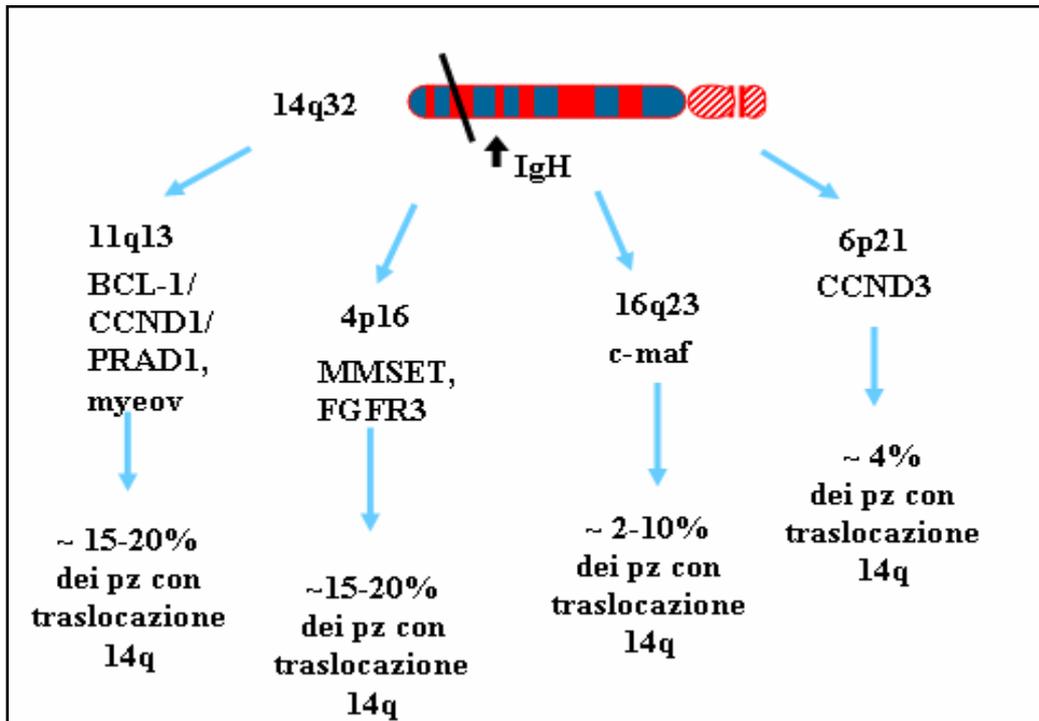


Figura 3: Traslocazioni più frequenti che coinvolgono il locus delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgH) (banda cromosomica 14q32).

Altre traslocazioni ricorrenti, ma sicuramente meno frequenti e, di conseguenza, ancora non ben caratterizzate, sono quelle della banda 14q32 con i loci:

- 8q23, che coinvolge il gene *c-myc*, presente in circa il 3% dei casi (26);
- 20q11, che coinvolge il gene *maf-B* (56);
- 6p25, che coinvolge il gene *MUM1/IRF4* (57-58).

Queste traslocazioni causano la *cis* up-regolazione trascrizionale di oncogeni da parte degli enhancers del gene delle catene pesanti delle immunoglobuline. Dato che gli enhancers sono in grado di aumentare l'espressione genica di geni distanti anche centinaia di kilobasi e dato che dopo la traslocazione possono essere segregati in entrambi i cromosomi derivativi, anche due o più oncogeni possono essere up-regolati come risultato di una sola traslocazione, come succede, ad esempio, per

i geni *MMSET* e *FGFR3* nella traslocazione t(4;14)(p16;q32). (9,53,59)

Le traslocazioni 14q32 possono essere suddivise in tre gruppi principali:

1. quelle che causano l'overespressione delle cicline D: 11q13 (*ciclina D1*), 6p21 (*ciclina D3*), 4p16 e 16q23 (indirettamente causano l'overespressione della *ciclina D2*);
2. quelle che causano la up-regolazione di *FGFR3* ed *MMSET*;
3. quelle che coinvolgono i geni MAF: 16q23 (*c-maf*) e 20q11 (*maf-B*).

Questi tre gruppi principali costituiscono il 45% dei casi di MM e risultano essere lesioni genetiche primarie (“traslocazioni IgH primarie”). Sembra, infatti, che la maggior parte di queste traslocazioni derivi da un errore nei processi di modificazione del DNA specifici delle cellule B: la maggior parte delle volte durante lo switch isotipico delle catene pesanti delle immunoglobuline, meno spesso durante il processo di ipermutazione somatica e raramente durante la ricombinazione VDJ. Tutte le altre traslocazioni 14q32 costituiscono circa il 20% dei casi di MM e sono chiamate “traslocazioni IgH secondarie” (40,45).

Poiché le “traslocazioni IgH primarie” sono strettamente associate alla non-iperdiploidia (35,40), si ipotizzano due meccanismi di patogenesi del MM:

1. una precoce traslocazione 14q32 che, associata a ipodiploidia o pseudodiploidia, causa la trasformazione neoplastica delle plasmacellule;
2. la presenza di un cariotipo iperdiploide che, riflettendo una intrinseca instabilità genetica, potrebbe essere l'evento stesso di immortalizzazione primaria (46).

2.1.1. *t(11;14)(q13;q32)*

E' la traslocazione più frequente infatti è stata identificata, tramite FISH, in circa il 15-20% dei pazienti con MM. La presenza della *t(11;14)* è stata correlata con una morfologia linfoplasmacitoide, cioè ad una morfologia matura delle plasmacellule, espressione dell'anticorpo CD20, e con i sottotipi di MM oligo-/non secernente. I breakpoints di traslocazione sul cromosoma 11 sono dispersi fra 330 kb che costituiscono il locus del gene della Ciclina D1 (CCND1). Il risultato della traslocazione è l'espressione aumentata della ciclina. La *t(11;14)* ha una prognosi favorevole nei pazienti trattati con alte dosi di terapia (29,60-61). Solitamente è una traslocazione bilanciata; raramente vengono osservate varianti come la *t(11;17;14)(q13;q11;q32)* o la *t(9;11;12;14)(q21;q13;q24;q32)*.

Alcuni studi hanno riportato l'associazione di questa traslocazione ad un isotipo Bence-Jones, ad un basso PCLI, ad una minore concentrazione sierica della componente M e ad un cariotipo pseudodiploide. Inoltre sembra non associata alla delezione del cromosoma 13 (50,62-64).

Per quanto riguarda le implicazioni cliniche, sono riportati pareri discordanti. I primi studi mostravano l'associazione della traslocazione ad una prognosi sfavorevole (65-66). In realtà gli studi erano stati condotti su un piccolo numero di pazienti, inoltre erano studi citogenetici retrospettivi condotti su pazienti trattati con diverse strategie terapeutiche e analizzati solo in citogenetica convenzionale. Quindi, probabilmente, la prognosi severa poteva essere correlata ad un alto indice proliferativo delle plasmacellule di questi pazienti, tale da permettere di individuare l'alterazione con la metodica convenzionale (50).

In seguito sono stati condotti degli studi su coorti più numerose di pazienti trattati omogeneamente (50,66). Questi studi fanno supporre che la *t(11;14)* individui un sottogruppo di

mielomi che è relativamente “geneticamente stabile”, con conseguente decorso più indolente della malattia ed una maggiore suscettibilità del clone plasmacellulare alla chemioterapia, in particolare a quella ad alte dosi.

Presso l’Istituto di Ematologia di Bologna, è stato condotto uno studio in cui sono state analizzate la frequenza e le implicazioni cliniche e prognostiche, dell’espressione della *ciclina D1* in un’ampia serie di pazienti con MM trattati omogeneamente con terapia ad alte dosi, seguita da trapianto autologo di cellule staminali. Dallo studio è emerso che i pazienti con aumentata espressione della *ciclina D1* presentano una sopravvivenza più lunga rispetto ai pazienti che non la overesprimono. Questa differenza risulta essere statisticamente significativa sia per quanto riguarda il tempo di progressione della malattia (time to disease progression-TTP) che per quanto riguarda la sopravvivenza libera da eventi (event free survival-EFS), confermando quanto osservato negli ultimi studi sulla t(11;14). (64)

2.1.2. t(4;14)(p16.3;q32)

La t(4;14)(p16.3;q32) è citogeneticamente criptica, rilevabile però in FISH, e vede coinvolti due oncogeni, MMSET (Multiple Myeloma SET domain, fattore di trascrizione) che permane sul der(4) e FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3, recettore tirosin chinasi) che trasloca sul der(14). Da notare che in circa il 20% dei casi con t(4;14), FGFR3 sul der(14) è perso o non espresso. La consistente permanenza di MMSET suggerisce che questo potrebbe essere l’oncogene deregolato più importante, anche se il suo ruolo rimane ancora sconosciuto (9). Questa traslocazione è stata trovata per la prima volta in tumori che presentavano un isotipo IgA ed è associata a pazienti con

caratteristiche cliniche aggressive. Indipendentemente dalla modalità di trattamento, la t(4;14) è associata ad un decorso clinico non favorevole. In uno studio con pazienti trattati con alte dosi di chemioterapia è risultato che la sopravvivenza media libera da eventi (EFS) era 20.7 mesi per i pazienti con la t(4;14) e di 28.5 mesi per i pazienti senza la t(4;14) (P<0.0001). La sopravvivenza totale (OS) ad 80 mesi era inoltre significativamente differente (22.8% verso 66%, P=0.002). In questo e in successivi studi si è notata una stretta relazione fra t(4;14) e delezione del cromosoma 13, con alti livelli sierici di β 2-microglobulina, con un alto PCLI, con alti livelli di componente M sierica e una morfologia immatura delle PC, quindi con caratteristiche associate ad una prognosi sfavorevole (29,67). Recenti studi hanno dimostrato che la t(4;14) è associata ad una OS ed ad una EFS significativamente più brevi, sia nei pazienti trattati con chemioterapia convenzionale che in quelli trattati con terapia ad alte dosi (48).

FGFR3 è una glicoproteina di 125 kd, prevalentemente presente nel sistema nervoso centrale, nei polmoni, nei reni e nelle cartilagini. Oggi si stanno attuando degli esperimenti per poter inibire la tirosin chinasi. Un tale inibitore, CHIR258, è attivo nei confronti di FGFR3. Questo è stato dimostrato in esperimenti su topi che presentavano l'espressione della malattia ed è stata dimostrata l'attività anche su primi modelli di pazienti (29,60-61).

2.1.3. t(14;16)(q32;q23)

La traslocazione (14;16)(q32;q23) è citogeneticamente silente ma può essere rilevata tramite FISH. Tale traslocazione è rara, infatti presenta una incidenza del 2-10% in pazienti con MM, ed

ha come risultato una espressione aumentata del fattore di trascrizione c-maf che regola l'espressione di geni come CCND2. La deregolazione di questo oncogene, quindi, può portare ad un controllo alterato del ciclo cellulare, dell'apoptosi o dell'interazione cellula-cellula. La sua presenza sembra essere associata ad una OS e ad una EFS significativamente più brevi (9,59,68).

2.1.4. monosomia 13/ delezione 13q (-13/13q-)

In studi di FISH queste alterazioni sono presenti in circa il 40-50% dei casi e quindi rappresentano le più frequenti alterazioni citogenetiche nei pazienti affetti da MM. Utilizzando solo la citogenetica convenzionale l'incidenza della delezione del cromosoma 13, è intorno al 10-20%. Tramite l'analisi cromosomica con bandeggio e l'analisi in FISH si è visto che l'alterazione sul cromosoma 13 è una monosomia del 13 nella maggior parte dei casi (80-90% dei casi). Benchè sia noto che la parziale delezione sia concentrata nella banda cromosomica 13q14, ancora non è stato definito il singolo segmento genomico che viene deletato. La regione critica di rottura (13q14-q21) è costituita da 350kb, zona dove è localizzato il gene RB1 (gene oncosoppressore del retinoblastoma), che gioca un ruolo importante in numerose neoplasie, ma non sembra avere un ruolo nella patogenesi del MM (29).

Anche per quanto riguarda *BCRA-2*, gene oncosoppressore localizzato nella banda 13q12, non si hanno dati certi sul suo coinvolgimento (21). E' per questo che la delezione del cromosoma 13 viene considerata, da molti, semplicemente un marker surrogato di altre alterazioni, a prognosi sfavorevole, a cui risulta essere associata, come l'ipodiploidia o la t(4;14) (33,39,62,69-70). In realtà, nel mieloma multiplo, la delezione

del 13 sembra essere associata ad importanti implicazioni cliniche e molte sue caratteristiche fanno supporre un suo specifico ruolo biologico (62,71). Queste caratteristiche includono la sua alta frequenza, la sua selezione clonale, le sue implicazioni cliniche, la sua associazione con altre lesioni genetiche primarie e la rarità di trisomie del cromosoma 13 (26,62,69,70,72-75). Comunque il suo ruolo nella patogenesi del MM non è ancora stato chiarito. Secondo alcuni la delezione del 13 è coinvolta nella progressione da MGUS (gammopatia monoclonale di significato non determinato) a MM (76), mentre secondo altri è un evento di iniziazione e non di progressione della malattia (62,77).

Per quanto riguarda le implicazioni cliniche di questa alterazione, diversi studi hanno riportato che la delezione del 13 è associata ad una OS e ad una EFS significativamente più brevi, sia in pazienti trattati con chemioterapia convenzionale che in pazienti trattati con terapia ad alte dosi (62,69,74-75,78-80). Invece alcuni studi mostrano che se associata ad altri fattori a prognosi sfavorevole, come alti livelli sierici di β_2 -microglobulina o la presenza di un cariotipo alterato, l'alterazione porta ad una prognosi ancora più sfavorevole. Mentre la presenza di alterazioni a prognosi favorevole, come la t(11;14), in pazienti trattati con terapia ad alte dosi, annulla l'effetto negativo sulla prognosi della delezione stessa. Infine diversi studi riportano l'associazione della delezione del cromosoma 13 alla t(4;14)(p16;q32) (40,50).

Recenti studi hanno evidenziato la significativa associazione di una precoce ricaduta della malattia nei pazienti con alterazioni citogenetiche del cromosoma 13 ma non in quelli con delezioni del cromosoma 13 osservate solo in FISH. Quindi l'analisi citogenetica convenzionale sembrerebbe identificare una

popolazione clonale iperproliferante con un'alta frequenza di fallimento terapeutico.

A Bologna è stata effettuata una caratterizzazione di questa alterazione in pazienti con MM alla diagnosi, arruolati nel protocollo precedente Bologna '96, trattati con terapia ad alte dosi seguita da trapianto autologo. Dallo studio è emerso che la delezione del 13 è associata alla t(4;14) e ad OS, EFS e TTP significativamente più brevi.

2.1.5. delezione 17p13

Nella banda 17p13 è presente il locus del gene oncosoppressore p53, che viene perso in caso di delezione. p53 è un fattore trascrizionale che induce la trascrizione dei geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nei meccanismi di riparazione del DNA e di morte cellulare programmata. L'alterazione di p53 può essere il risultato di una mutazione puntiforme, una perdita allelica, un riarrangiamento o una delezione. Comunque nel MM una delezione del gene oncosoppressore è abbastanza rara. L'incidenza della del(17p) varia in un range compreso fra il 5% e il 10% dei pazienti alla diagnosi. Si è riscontrato, invece, che la perdita funzionale del gene ha un'incidenza del 40% nei pazienti in stadio avanzato. Tutto ciò sta ad indicare che tale delezione possa essere un marker della progressione della malattia. Per quanto riguarda l'associazione con terapia convenzionale ed ad alte dosi, gli studi finora effettuati riportano che la delezione 17p13 è associata ad una prognosi sfavorevole sia in pazienti trattati con CHT convenzionale che in pazienti con terapie ad alte dosi (29,61).

Recenti studi hanno evidenziato che un'elevata percentuale di pazienti (89%) con MM coinvolgente il sistema nervoso centrale presentava del(17p), mentre altre alterazioni, quali delezione 13q,

traslocazioni coinvolgenti il locus 14q32, erano presenti con un'incidenza molto inferiore. Diversamente nei pazienti affetti da MM, ma senza malattia a livello del sistema nervoso centrale, la del(17p) mostrava un'incidenza del 10-15% all'analisi di FISH interfascica (81).

La FISH rappresenta comunque lo studio più appropriato per questo tipo di alterazione, rispetto alla citogenetica convenzionale.

2.1.6. Anomalie del cromosoma 1

Anomalie del cromosoma 1 sono state osservate in più del 48% dei casi (54). Fino ad ora nessun gene specifico è stato associato alle alterazioni di questo cromosoma, del quale sono stati individuati, sorprendentemente, numerosi punti di rottura sia sul braccio p che sul braccio q. In particolare, Inoue e al. hanno recentemente riportato che amplificazioni del braccio lungo del cromosoma 1 possono essere associate a fenotipi più aggressivi (82). Inoltre è stato visto che anomalie strutturali del cromosoma 1 sono associate, nel mieloma, ad un elevato PCLI e ad una sopravvivenza significativamente più breve (33).

Recenti studi hanno descritto il coinvolgimento della banda 1q21 in fenomeni di amplificazione ed overespressione del locus del gene CKS1B (regolatore del ciclo cellulare). Tali implicazioni sembrano essere associate ad una prognosi sfavorevole (29).

Infine, meno frequenti sono le alterazioni che coinvolgono il cromosoma 6 (soprattutto 6q), la banda 19p13 ed infine la t(1;16)(q10;p10).

3. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Per valutare l'incidenza e il valore prognostico delle alterazioni citogenetiche in esame si è voluto studiare un campione di pazienti più omogeneo possibile. Quindi sono stati inseriti solo pazienti alla diagnosi della malattia e sottoposti allo stesso trattamento terapeutico (protocollo BO 2002).

4. MATERIALI E METODI

L'analisi citogenetica e citogenetico/molecolare è stata eseguita nei pazienti con mieloma multiplo alla diagnosi.

I prelievi venivano inviati dai centri clinici italiani che seguivano i pazienti, arruolati nel protocollo terapeutico e centralizzati nei laboratori di citogenetica e biologia molecolare dell'Istituto di Ematologia dell'Università di Bologna.

4.1. PROTOCOLLO TERAPEUTICO

Sono stati analizzati pazienti arruolati nel protocollo “Bologna 2002”, uno studio italiano multicentrico di fase II coordinato dall'Istituto “Seràgnoli” che aveva come oggetto la terapia di prima linea del MM sintomatico con talidomide-desametasone e doppio trapianto autologo di PBSC. I criteri di inclusione comprendevano: MM sintomatico di nuova diagnosi non precedentemente trattato, età ≤ 65 anni, componente monoclinale quantizzabile nel siero e/o nelle urine, stadio I (secondo la classificazione di Durie e Salmon) in progressione (per aumento della componente monoclinale sierica ≥ 1 g/dl rispetto al valore iniziale, confermato a due successivi controlli laboratoristici distanziati di 3 settimane l'uno dall'altro e/o aumento della escrezione giornaliera di catene leggere libere urinarie in pazienti con MM di tipo Bence-jones pari al 100% del valore iniziale, confermato a due successivi controlli laboratoristici distanziati di 3 settimane l'uno dall'altro e/o comparsa di nuove lesioni osteolitiche), oppure stadio II e III.

Il protocollo comprendeva differenti fasi terapeutiche; la cui durata è di seguito riportata:

- FASE 1, dal primo al quarto mese: terapia di induzione della risposta con talidomide-desametasone;
- FASE 2, al quinto mese: terapia di mobilizzazione e raccolta di PBSC con ciclofosfamide ad alte dosi; a seguire, talidomide-desametasone sino alla fase 3.
- FASE 3, al sesto mese: primo trapianto autologo di PBSC condizionato con melphalan ad alte dosi; a seguire, talidomide-desametasone sino alla fase 4.
- FASE 4, al nono mese: secondo trapianto autologo di PBSC condizionato con melphalan ad alte dosi.
- FASE 5, dal decimo mese: terapia di mantenimento con alfa-Interferone.

Sono state applicate metodologie sia di citogenetica convenzionale che di citogenetica molecolare (FISH).

Il laboratorio di biologia molecolare, inoltre, ha caratterizzato l'eventuale presenza della t(4;14) attraverso metodologie di RT-PCR.

Il prelievo in eparina di midollo osseo viene suddiviso in due aliquote, nei casi in cui la quantità del materiale lo consente. Una viene utilizzata per l'analisi citogenetica convenzionale e l'altra per l'analisi in FISH dopo separazione delle cellule che presentano l'anticorpo CD138.

4.2. SEPARAZIONE POSITIVA DELLA POPOLAZIONE PLASMACELLULARE (Metodo MACS)

Il metodo MACS (Magnetic Activated Cell Sorter, Miltenyi Biotec) permette di separare le cellule CD138+ (plasmacellule) dalle restanti cellule presenti nel campione di midollo osseo.

Questa tecnica si avvale di microsfere coniugate con anticorpi monoclonali CD138 di topo (clone B-B4; isotipo: IgG1 di topo) (Miltenyi Biotec).

Le microsfere CD138 possono essere utilizzate per isolare o depletare le plasmacellule umane CD138+. L'anticorpo CD138 è espresso su plasmacellule normali o maligne, ma non sulle cellule B circolanti, cellule T e monociti.

Per la separazione, le cellule sono marcate magneticamente con microsfere e separate su una colonna posta in un campo magnetico con separatore MACS (Miltenyi Biotec).

Le cellule CD138 marcate sono trattenute nella colonna, quelle non marcate, invece, defluiscono da essa. Dopo la rimozione della colonna dal campo magnetico, le cellule possono essere raccolte (Fig.2).

4.2.1 Preparazione delle cellule mononucleate da midollo

Il midollo viene diluito con soluzione fisiologica 1:3 (Fresenius Kabi) e stratificato con gradiente di separazione Ficoll Hipaque (GE Healthcare) (ogni 4 ml di Ficoll, 5 ml di midollo) in seguito a una centrifugazione a 1500 rpm per 25 minuti. Al termine viene raccolto "l'anello dei bianchi", risospeso in soluzione fisiologica e centrifugato a 1800 rpm per 10 minuti.

Successivamente si risospende il pellet con 3 ml di soluzione tampone (pH 7) (2,5 gr BSA, SIGMA; 250 ml PBS; 80 mg/ml

EDTA) e le cellule vengono contate per determinare la quantità di cellule raccolte.

4.2.2. Marcatura magnetica

Dopo aver centrifugato a 1200 rpm per 10 minuti, il pellet viene risospeso in 80µl di soluzione tampone (per un totale di 10 milioni di cellule) e 20µl di MACS 138 microsfere (Miltenyi Biotec) e incubato a 4°C per 15 minuti. Per quantità inferiori di cellule si utilizza lo stesso volume; invece per un numero superiore a 10 milioni di cellule si utilizza una proporzione:

$$80\mu\text{l} : 10^7 = x : \text{n}^\circ \text{ di cellule} \quad x = \text{volume soluzione tampone}$$

$$20\mu\text{l} : 10^7 = x : \text{n}^\circ \text{ di cellule} \quad x = \text{volume MACS}$$

In seguito viene aggiunto il quantitativo di soluzione tampone necessario e centrifugato a 1300 rpm per 7 minuti. Il pellet così ottenuto viene risospeso in 1 ml di soluzione tampone.

4.2.3. Separazione delle cellule CD138+

Per effettuare la separazione delle CD138+, si posiziona in un campo magnetico una colonna di separazione (25MS Columns Miltenyi Biotec).

La colonna viene condizionata con 500µl di soluzione tampone e successivamente il materiale viene fatto passare dopo essere stato filtrato (Pre-separation filters Miltenyi Biotec). In seguito si eseguono 4 lavaggi con 500µl di soluzione tampone e, al termine, le cellule sono eluite con 1 ml di soluzione tampone. Viene quindi ripetuto un secondo passaggio in colonna seguito da tre lavaggi.

Al termine le cellule CD138+ purificate vengono centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti. Per verificare l'avvenuta selezione plasmacellulare, vengono allestiti vetrini di citocentrifugati della

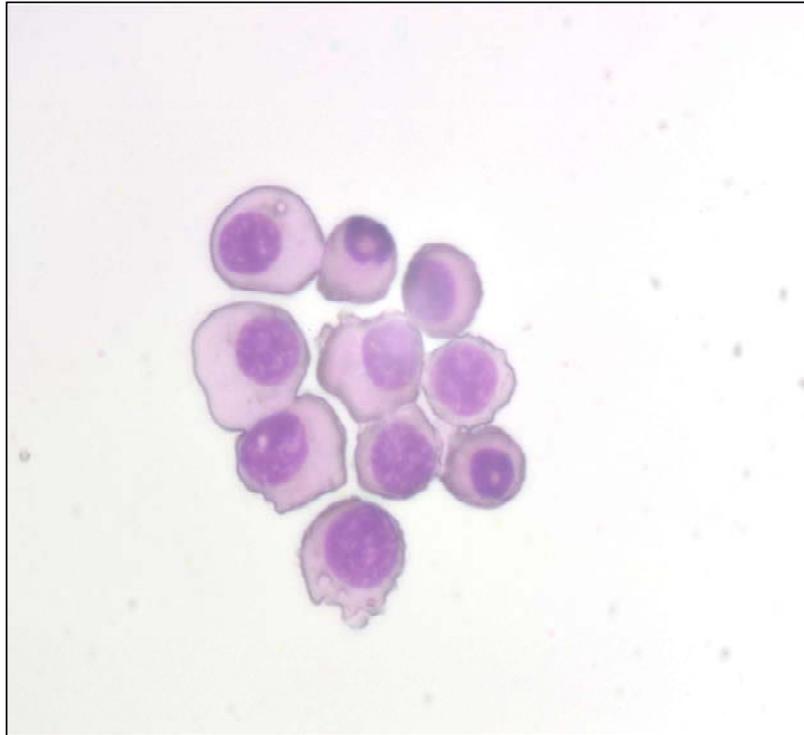


Figura 4: Popolazione plasmacellulare ottenuta dopo separazione delle cellule CD138+.

Il pellet viene ipotonizzato con 2ml di soluzione KCl 0.075 M per 10 minuti a 37°C, centrifugato per 10 minuti a 1200 rpm, e successivamente fissato con 1 ml di fissativo; nuovamente centrifugato per 10 minuti a 1200 rpm, risospeso in fissativo, e conservato a -20°C.

Le cellule così ottenute e conservate vengono utilizzate per i successivi studi di FISH.

4.3. ANALISI CITOGENETICA MOLECOLARE

Gli studi di FISH in doppia colorazione sono eseguiti con le seguenti sonde a DNA per la valutazione delle specifiche alterazioni citogenetiche.

4.3.1. Sonde utilizzate

Le sonde sono a DNA, marcate direttamente con fluorocromi rossi (SpectrumOrange) o verdi (SpectrumGreen).

Delezione/Monosomia del cromosoma 13:

- **LSI D13S319** SpectrumOrange (Vysis Inc.): ha come target genomico il locus D13S319 normalmente localizzato a livello della banda cromosomica 13q14.3 (Fig.5). Nei nuclei interfascici di cellule normali si distinguono due segnali rossi fluorescenti. Nei casi in cui si abbia monosomia 13 o delezione parziale della banda 13q14, l'interfase o la metafase appariranno con un unico segnale rosso.

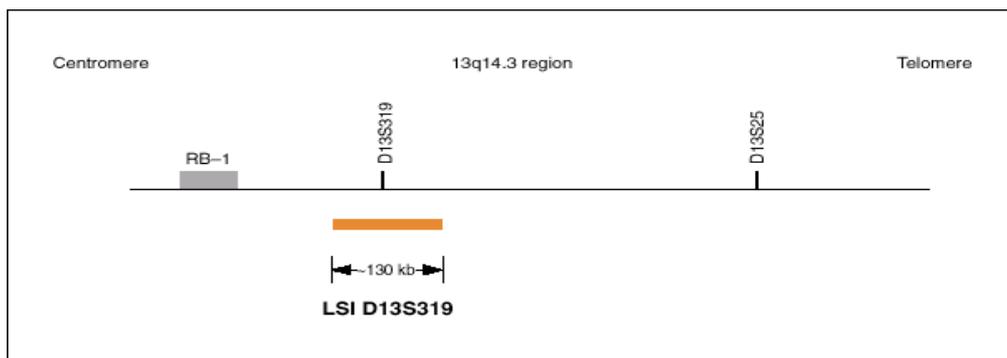


Figura 5: Mappatura della sonda LSI D13S319 (da Vysis Inc.).

- **LSI 13 SpectrumGreen (Vysis Inc.):** ha come target genomico una regione di 440 kb circa e copre il locus del gene RB1 (180 kb) (Fig.6). Nei nuclei interfasici di cellule normali si distinguono due segnali verdi fluorescenti. Nei casi in cui si abbia monosomia 13 o delezione parziale della banda 13q14, si evidenzierà un unico segnale verde (Fig.6).

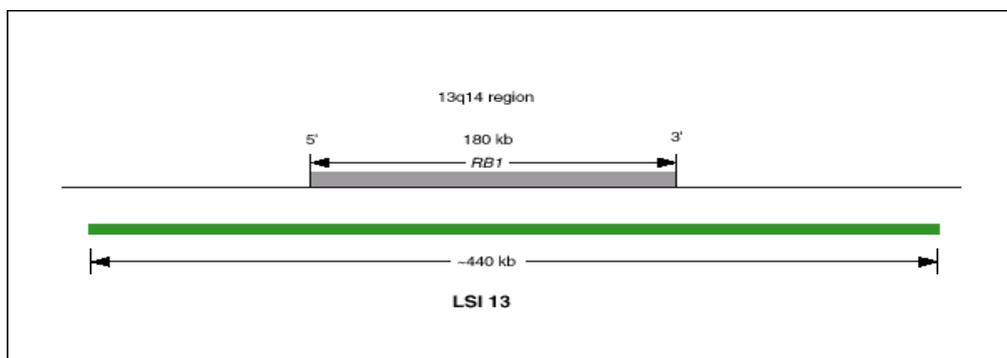


Figura 6: Mappatura della sonda LSI 13 (da Vysis Inc.).

Queste due sonde, che ibridizzano due regioni contigue sullo stesso cromosoma, permettono di discriminare falsi positivi. Una cellula normale è caratterizzata da due segnali verdi e due segnali rossi. Cellule con delezione o monosomia del cromosoma 13 mostreranno un segnale verde e un segnale rosso (Fig.7).



Figura 7: FISH di due nuclei interfaseici. Il nucleo a destra presenta 4 segnali (2 verdi e 2 rossi) che identificano la presenza di entrambi i cromosomi 13 normali. Il nucleo a sinistra con due segnali (1 rosso ed 1 verde) identifica la perdita di una banda cromosomica 13q14.

Delezione del cromosoma 17:

- **LSI p53 SpectrumOrange** (Vysis Inc.): ibridizza una regione del cromosoma che si trova a livello della banda 17p13.1, di 145 kb comprensiva del gene p53 (Fig.8). Interfasi normali sono caratterizzate da due distinti segnali rossi, mentre un segnale rosso evidenzia la delezione della banda 17p13.

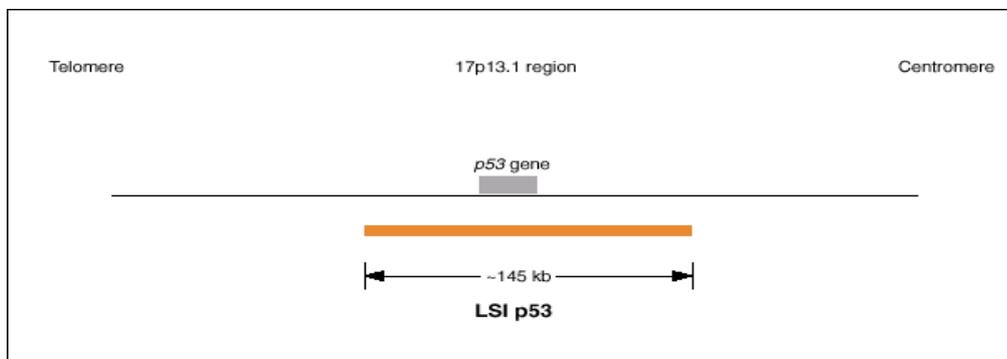


Figura 8: mappatura della sonda LSI p53 (da Vysis Inc.).

- **CEP 17 (α satellite) SpectrumGreen** (Vysis Inc.): ibridizza la regione centromerica del cromosoma 17 (banda 17p11.1-q11.1, locus D17Z1), il cui segnale risulta molto intenso al microscopio a fluorescenza. La presenza di due segnali verdi indica la presenza di entrambi i cromosomi, mentre un solo segnale verde è segno di perdita del centromero del 17, indice di monosomia del cromosoma 17.

Dallo studio di FISH in doppia colorazione per le alterazioni del cromosoma 17 con le suddette sonde è deducibile che si è in presenza di una cellula normale se sono copresenti due segnali

rossi e due segnali verdi (Fig.9), mentre cellule con del17p saranno indicate da due segnali verdi ed un segnale rosso (Fig.10).

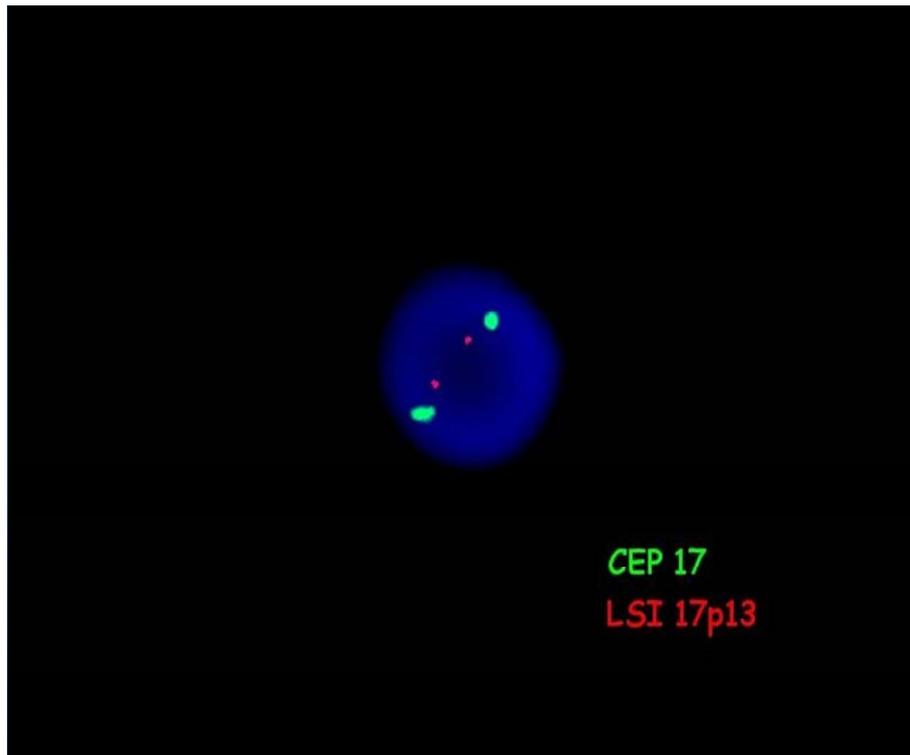


Figura 9: FISH di nucleo interfaseico normale.
I segnali verdi identificano il centromero del cromosoma 17; i segnali rossi identificano la banda 17p13.1.

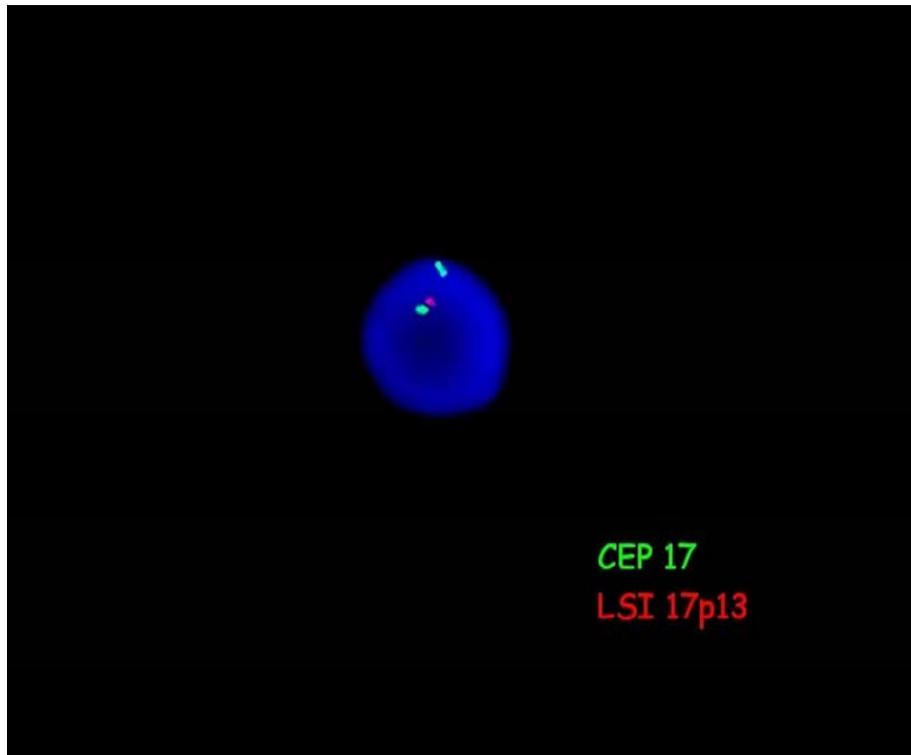


Figura 10: FISH di nucleo interfase con presenza di 1 solo segnale rosso e 2 segnali verdi. Presenza di delezione della banda cromosomica 17p13.

4.3.2. Metodica FISH

I vetrini sono allestiti con le cellule ottenute dalla separazione immunomagnetica su colonna, conservate a -20°C . In seguito vengono pretrattati per 30 minuti a 37°C in 2XSSC (17.5g di cloruro di sodio, 8.2g di citrato tri-sodico e arrivare a 1 litro con acqua distillata) e 0.3% Igepal (NP-40) a pH 7.

I vetrini vengono deidratati con lavaggi successivi in etanolo a percentuali crescenti: 70%, 80%, 100%, per due minuti ciascuno.

La miscela di ibridazione viene preparata con $7\mu\text{l}$ di buffer di ibridazione, $1\mu\text{l}$ di sonda marcata con SpectrumOrange, $1\mu\text{l}$ di

sonda marcata con SpectrumGreen e 1 µl di acqua distillata, per ogni campione. Vengono quindi posti 10 µl di tale miscela su ciascun vetrino e coperti con il vetrino coprioggetto (24x24 mm) e disposti in ibridizzatore Hybrite (Vysis Inc.) dove avviene una codenaturazione di sonda e DNA a 68°C per 1 minuto e, successivamente, l'ibridazione tra esse per 24 ore a 37°C.

Al termine delle 24 ore, i vetri sono lavati in una soluzione di 2XSSC e 0.3% NP-40 a 70°C per 2 minuti, poi in una soluzione 2XSSC e 0.3% NP-40 a 60°C per 3 minuti ed infine in una soluzione di PBD 1X a temperatura ambiente per 5 minuti. Dopo aver lasciato asciugare i vetrini all'aria, vengono controcolorati con 4.6 diamino-2-phenylindole (DAPI III, Vysis Inc.) e osservati al microscopio a fluorescenza a tripla banda: FITC/TRITC/DAPI e collegato ad un sistema di analisi computerizzato (Nikon Instruments).

Per ogni paziente verranno analizzate, dove possibile, 200 cellule.

4.4. ANALISI CITOGENETICA CONVENZIONALE

In condizioni di sterilità si allestiscono due colture cellulari con 20 milioni di cellule in 10 ml di terreno (RPMI 30% , Bio Whittaker; FCS scomplementato, Biocrom AG; 200mM glutammina, INC Biomedicals Inc.; 5000 UI/ml-5000 µg/ml penicillina-streptomina, INC Biomedicals Inc.); entrambe vengono incubate a 37°C al 5% di CO₂ rispettivamente per 24 ore e 72/120 ore.

Dopo tale periodo vengono aggiunti 80µl di colchicina (GIBCO) per 40 minuti (a 37°C al 5% di CO₂), allo scopo di arrestare le cellule in profase e/o prometafase e/o metafase, in

quanto la colchicina impedisce la formazione delle fibre del fuso mitotico.

Dopo coltura il materiale viene centrifugato a 1200 rpm per 10 minuti e il pellet cellulare viene sottoposto a trattamento ipotonico aggiungendo 8 ml di soluzione KCl 0.075 M per 10 minuti e viene incubato a 37°C allo scopo di rompere le membrane cellulari.

Il materiale viene, quindi, centrifugato per 10 minuti a 1200 rpm e fissato con 5 ml di fissativo (acido acetico glaciale ed alcool metilico, 1:3; Carlo Erba).

In seguito vengono eseguiti tre lavaggi con acido acetico glaciale ed alcool metilico in modo da eliminare gradualmente il materiale cellulare superfluo, che può ostacolare l'analisi delle metafasi.

Al termine della metodica vengono allestiti due vetrini, che vengono trattati per evidenziare il bandeggio cromosomico per la successiva analisi delle metafasi.

4.5. TECNICA DEL BANDEGGIO CROMOSOMICO

Il bandeggio cromosomico prevede l'utilizzo di diverse metodiche in grado di evidenziare una struttura cromosomica esistente, ma normalmente non visibile.

Non si tratta di un semplice artefatto, ma di un sistema per avvicinarsi ad una più approfondita conoscenza dell'organizzazione della catena di DNA quando si dispone a formare la struttura definitiva del cromosoma.

I bandeggi G e Q (Giemsa e Quinacrina) sono i più usati ed evidenziano lo stesso pattern di bande; quando si vuole avere una migliore identificazione dei tratti telomerici dei cromosomi, si

ricorre al bandeggio R/T (Reverse/Telomerico) che fornisce un pattern opposto ai precedenti.

4.5.1. Bandeggio GTG

I vetrini allestiti vengono immersi in una soluzione 0,2N di HCl per 5 minuti a temperatura ambiente; successivamente dopo essere stati sciacquati sotto acqua corrente, vengono immersi per 20 minuti in una soluzione 1xSSC (soluzione di NaCl e Nacitrato; Carlo Erba) a 60°C.

In seguito, dopo essere stati abbondantemente sciacquati in acqua corrente per evitare che residui di SSC danneggino i cromosomi, ogni vetrino viene colorato con 4 ml di colorante (Wright's stain 0,06%, SIGMA, e tampone a pH 6.8; 1:3) per circa 3 minuti, sciacquati e asciugati su piastra. I vetrini vengono poi esaminati al microscopio ottico e per ogni paziente vengono osservate almeno 30 metafasi.

In questo modo ciascun cromosoma viene identificato dalla sua lunghezza relativa, dalla collocazione del centromero e dalla sequenza di bande visibili (che variano per lunghezza ed intensità). Il numero di bande e la loro morfologia è caratteristico di ogni coppia di cromosomi e permette la sicura identificazione del cromosoma e delle sue eventuali alterazioni.

Le bande G corrispondono a zone di alta condensazione della cromatina (eterocromatina intercellulare), mentre le bande negative corrispondono a zone di minor condensazione (eucromatina).

L'esame di ogni metafase viene effettuato attraverso un sistema di analisi computerizzato (Nikon Instruments) collegato al microscopio ottico e la classificazione dei cromosomi viene eseguita secondo l'International System Chromosome Nomenclature (83).

Le alterazioni cromosomiche sono valutate come clonali quando: due o più cellule presentano la stessa anomalia strutturale o lo stesso cromosoma soprannumerario e tre o più cellule presentano la stessa monosomia. Le alterazioni che sono presenti in un numero inferiore di cellule vengono definite non clonali.

4.6. ANALISI STATISTICA

Il confronto fra distribuzione di diversi parametri tra due gruppi era eseguito con metodo del χ^2 (chi-quadrato).

La sopravvivenza globale è stata calcolata con il metodo Kaplan-Meier (84) dalla data della diagnosi alla data di morte o dell'ultimo contatto (se vivi).

La sopravvivenza libera da eventi è stata calcolata dalla data della diagnosi alla data di ricaduta/progressione o morte, quale venga prima, o alla data dell'ultimo contatto (se vivi e non ricaduti/ non progrediti). Il confronto è stato eseguito con il log rank test (85).

5. RISULTATI

Il mieloma multiplo è caratterizzato dalla presenza di numerose alterazioni numeriche e strutturali. Diversi studi hanno messo in evidenza come la delezione del cromosoma 13 ($\Delta 13$) sia associata a severa prognosi, sia in pazienti trattati con chemioterapia convenzionale che in pazienti trattati con terapia ad alte dosi, e come questa alterazione sia strettamente associata alla traslocazione t(4;14): ulteriore alterazione a prognosi sfavorevole. Per valutarne l'impatto prognostico abbiamo studiato tali alterazioni in pazienti con mieloma multiplo alla diagnosi arruolati nel protocollo terapeutico ad alte dosi: Bologna '02 (BO 02).

Da gennaio 2002 ad aprile 2006 sono stati analizzati 365 pazienti con MM alla diagnosi. Inizialmente i pazienti sono stati caratterizzati in FISH con sonde specifiche per il cromosoma 13. Per superare il problema dell'eventuale elevata infiltrazione mieloide normale, l'analisi è stata eseguita sul comparto plasmacellulare, ottenuto dalla separazione immunomagnetica delle cellule midollari. Sono state utilizzate sonde a DNA contigue specifiche per la banda 13q14, per far sì che ogni sonda facesse da controllo all'altra ed evitare, quindi, artefatti o falsi positivi dovuti alla metodica stessa.

Una delle sonde è marcata con rodamina, che emette fluorescenza rossa, l'altra è coniugata con fluorescina che emette fluorescenza verde. Pertanto le interfasi normali presentavano 2 segnali rossi e 2 verdi, mentre le interfasi con delezione 13 mostravano la presenza di un solo segnale verde e un solo segnale rosso (Fig.7).

Con questo tipo di indagine, ovviamente non era possibile valutare se l'alterazione del cromosoma 13 eventualmente

presente era rappresentata da monosomia o da una delezione parziale del cromosoma 13.

Per ogni caso sono state analizzate, ove possibile, almeno 200 cellule (da 100 a 643 cellule per ogni paziente, numero mediano di cellule osservate: 213).

Duecentottantanove su 365 (79%) pazienti studiati risultavano valutabili: 136 pazienti (47%) erano deleti a livello della banda cromosomica 13q14 e 153 pazienti (53%) non presentavano l'alterazione cercata. Nei pazienti che mostravano la delezione del cromosoma 13, questa era presente in una percentuale cellulare che variava da 14,7% a 100% (valore mediano 89,3%).

I 136 casi deleti in FISH sono stati studiati successivamente in citogenetica convenzionale per valutare la presenza dell'eventuale alterazione del cromosoma 13 anche in metafase. Per ogni paziente sono state analizzate dalle 10 alle 51 metafasi (valore mediano 30). Un cariotipo alterato era riscontrato in 30 pazienti (22% dei pazienti studiati in CC). Quindi nel 10% della totalità dei pazienti studiati l'alterazione a livello della banda 13q14 era già evidenziabile con metodologie di CC. La percentuale delle cellule alterate sull'intera popolazione osservata variava da 2% a 100% (valore mediano 19%).

L'alterazione del cromosoma 13 si presentava come delezione parziale del braccio q in 7 pazienti (23,3%) e come monosomia totale in 23 pazienti (76,7%). Dodici pazienti (40%) mostravano un cariotipo iperdiploide, con un corredo cromosomico da 47 a 55 cromosomi; 2 (7%) presentavano un cariotipo pseudodiploide (a 46 cromosomi ma alterato) ed infine un cariotipo ipodiploide era osservato in 13 pazienti (43%). Dei restanti: due pazienti risultavano ipotetraploidi ed un paziente presentava sia metafasi pseudodiploidi che ipodiploidi. Il cariotipo era sempre complesso, con numerose alterazioni di tipo strutturale e/o numerico, come è dimostrato dall'elevato numero mediano di

cromosomi coinvolti per metafase: 9; le alterazioni potevano coinvolgere fino a 22 cromosomi. La complessità dei cariotipi è evidente osservando la Tabella 3, in cui vengono descritte dettagliatamente le aberrazioni clonali riscontrate e la percentuale delle metafasi alterate. Esempi di cariotipo complesso con alterazione del cromosoma 13 sono rappresentati dalle Fig. 11-12. La delezione del cromosoma 13 in CC è risultata, quindi, strettamente associata a numerose ulteriori alterazioni citogenetiche.

Le altre alterazioni strutturali osservate coinvolgevano maggiormente i cromosomi 1,2,3,6,14. L'unica alterazione strutturale frequente della banda 14q32 identificabile in CC: t(11;14)(q13;q32) (Fig.13), non è mai stata da noi riscontrata associata alla delezione del cromosoma 13.

Le ulteriori aberrazioni numeriche più frequentemente riscontrate erano trisomie dei cromosomi 3,5,9,11,15 e 19.

In 9 pazienti (30%) erano osservati 1 o più cromosomi markers non identificati.

Alterazioni numeriche e/o strutturali del cromosoma 1 erano presenti in 21 pazienti (70%).

La presenza della t(4;14)(p16;q32) è stata invece analizzata nel laboratorio di biologia molecolare del nostro Istituto attraverso l'utilizzo di metodiche di RT-PCR.

Una volta caratterizzate entrambe le alterazioni, abbiamo analizzato la correlazione con le caratteristiche clinico-biologiche, la risposta alle varie fasi del trattamento e la sopravvivenza.

Abbiamo potuto analizzare solo i pazienti che avevano raggiunto un follow-up idoneo all'analisi. Questi pazienti sono, per il momento, 142. Di questi 69 (49%) presentavano la $\Delta 13$ e 73 (51%) ne erano privi. Dei 69 casi deleti 13 in FISH, 15

presentavano alterazione del cromosoma 13 anche in CC (Tab.4): 8 erano ipodiploidi e ipotetraploidi, 7 iperdiploidi.

La t(4;14) era evidenziabile molecolarmente in 43 pazienti (30%), mentre 99 pazienti (70%) non ne mostravano la presenza.

Venticinque pazienti (18%) erano positivi per entrambe le alterazioni genetiche studiate, mentre 55(39%) non ne presentavano nessuna (Tab.5).

Dei 69 pazienti con $\Delta 13$, 25 (36,2%) presentavano anche la t(4;14). La correlazione tra le 2 alterazioni non è significativa ($p=0,1$).

Valutando accuratamente le metafasi dei pazienti con delezione 13q positivi anche per la t(4;14), abbiamo osservato che in nessuna delle metafasi era possibile evidenziare la t(4;14), che viene appunto identificata come alterazione citogeneticamente silente.

La delezione del cromosoma 13 non sembra essere associata ad alcuna caratteristica clinico-biologica presente alla diagnosi dei pazienti. L'età, il sesso, il numero di piastrine, il livello di emoglobina, di $\beta 2$ microglobulina, di PCR e di LDH, la percentuale di plasmacellule nel midollo e lo stadio della malattia non differivano statisticamente tra i 2 gruppi: con o senza delezione 13q (Tab.6).

Per valutare la risposta alla terapia viene utilizzata una tabella di definizione di risposta al trattamento: 1. progressione; 2. nessuna risposta (NR); 3. remissione parziale (PR); 4. remissione parziale molto buona (very good partial remission – VGPR); 5. remissione completa con immunofissazione positiva (CR IF+); 6. remissione completa con immunofissazione negativa (CR IF-).

Abbiamo analizzato la risposta dei pazienti al trattamento terapeutico, considerando le loro caratteristiche genetiche: presenza o assenza della delezione del cromosoma 13 e della t(4;14). Abbiamo valutato la risposta in termini di percentuale dei

pazienti che raggiungeva almeno la VGPR, cioè la riduzione di almeno il 90% di componente monoclonale.

Inizialmente abbiamo analizzato tali risposte solo tenendo conto delle alterazioni del cromosoma 13.

E' stata valutata la risposta alla terapia con talidomide e desametasone, quindi alle prime fasi del protocollo terapeutico, in analisi per intenzione al trattamento. Non è stata osservata una differenza significativa tra i pazienti con delezione 13 e pazienti senza delezione 13: il 30% verso il 36% raggiungeva almeno la VGPR (Fig.14).

Ponendoci nelle stesse condizioni precedenti, quindi con analisi per intenzione al trattamento e considerando la percentuale dei pazienti che raggiunge almeno la VGPR, abbiamo considerato la risposta al doppio trapianto autologo, quindi ad una fase successiva della terapia nella sua applicazione completa e non si è osservata, neanche in questo caso una differenza significativa tra i pazienti dei 2 gruppi: il 71% dei pazienti con $\Delta 13$ verso l'83,5% dei pazienti senza $\Delta 13$ raggiungeva una risposta parziale molto buona (Fig.15).

Analizzando la sopravvivenza totale (overall survival - OS), in analisi per intenzione al trattamento, si osservava invece una differenza significativa tra i pazienti con delezione del cromosoma 13 e quelli senza la delezione, anche se con $p=0.05$, quindi al limite della significatività (Fig.16).

Successivamente le stesse analisi sono state riformulate inserendo anche i dati molecolari riguardanti l'eventuale presenza della $t(4;14)$.

Per quanto riguarda la risposta dopo talidomide + desametasone, una VGPR era ottenuta dal 50% dei pazienti con $t(4;14)$ e dal 31% dei pazienti senza traslocazione. Anche in questo caso eravamo in assenza di una differenza significativa tra i 2 gruppi.

Se, però, consideriamo i pazienti che presentavano entrambe le alterazioni, solo il 12% raggiungeva almeno la VGPR, mostrando una differenza significativa rispetto ai pazienti che portavano soltanto una delle due alterazioni, quindi sia rispetto ai pazienti che avevano solo la delezione del 13 (41%) che rispetto ai pazienti che presentavano solo la t(4;14) (50%) (Fig.14).

Per quanto riguarda la risposta alla successiva terapia dopo doppio trapianto autologo la percentuale dei pazienti che raggiungeva la VGPR era minore in quelli con entrambe le alterazioni (68%), ma la differenza con gli altri gruppi non era significativa: 72% per i pazienti con solo la delezione 13q, 94% per i pazienti con solo la t(4;14) e 80% per i pazienti senza nessuna delle 2 alterazioni analizzate (80%) (Fig.15). Inoltre similmente alla delezione 13q, la t(4;14) da sola non sembrava avere nessun impatto prognostico.

Infine in analisi per terapia ricevuta, valutando, quindi, i pazienti che effettivamente sono stati sottoposti al doppio trapianto autologo non si evidenziavano differenze significative di sopravvivenza totale e di sopravvivenza libera da eventi (event free survival –EFS) tra i 2 gruppi: pazienti che presentavano entrambe le alterazioni e pazienti che non ne presentavano alcuna. (Fig.17).

Analizzando i più recenti dati riportati in letteratura, ci siamo resi conto dell'emergenza, nella patogenesi del MM, di un'altra alterazione ancora poco caratterizzata ma forse prognosticamente importante: la delezione della banda 17p13. Tale delezione causa la perdita del gene oncosoppressore p53 e sembra essere associata ad una prognosi particolarmente infausta.

Abbiamo voluto, quindi, caratterizzare questa alterazione nei pazienti arruolati nel protocollo BO 02, di cui avevamo ancora un residuo di cellule CD138 positive stoccate.

Anche per l'analisi della delezione della banda 17p13 è stata utilizzata una metodica di FISH sul comparto plasmacellulare. Le sonde utilizzate, in questo caso, sono LSI p53, specifica per il locus p53 nella banda 17p13, coniugata con rodamina, e CEP 17, specifica per la zona centromerica del cromosoma 17, coniugata con fluorescina.

Per ogni paziente sono state analizzate, dove possibile, 200 plasmacellule. Le cellule normali presentano due segnali rossi e due segnali verdi, mentre quelle con la delezione della banda 17p13 hanno un solo segnale rosso e due segnali verdi ed in caso di monosomia del cromosoma 17 le cellule presentano un solo segnale rosso ed un solo segnale verde (Fig.9-10).

Quando è stato iniziato lo studio per la caratterizzazione della delezione del 17p l'arruolamento dei pazienti nel protocollo BO 02 non era ancora stato chiuso, per cui nei pazienti di più recente diagnosi doveva essere effettuata ancora l'analisi della delezione del cromosoma 13. Per questo si è pensato di utilizzare un'unica analisi che permettesse di studiare contemporaneamente entrambe le alterazioni (delezione 13 e delezione 17), con conseguente risparmio economico e di tempo. Per questo tipo di FISH è stata utilizzata una sonda specifica per la banda 13q14 coniugata con fluorescina ed una sonda specifica per la banda 17p13 coniugata con rodamina. Per cui i casi senza alcuna alterazione presentano cellule con due segnali rossi e due segnali verdi, i casi con solo la delezione del 13 presentano cellule con due segnali rossi ed un segnale verde, quelli con solo la delezione del 17 presentano cellule con due segnali verdi ed un segnale rosso, mentre i pazienti con entrambe le alterazioni presentano cellule con un segnale rosso ed un segnale verde (Fig.18-19-20). Per ogni caso sono state analizzate, ove possibile, almeno 200 cellule.

Per il momento abbiamo studiato 173 casi, di cui 159 (92%) valutabili: 11 pazienti (7%) erano deleti a livello della banda cromosomica 17p13 e 148 pazienti (93%) non presentavano l'alterazione cercata. Nei pazienti che mostravano la delezione del cromosoma 17, questa era presente in una percentuale cellulare che variava da 10,7% a 76,6% (valore mediano 25,8%).

Dei 142 pazienti di cui si avevano già i dati della delezione del 13 e della t(4;14) e che avevano raggiunto il follow-up indispensabile per l'analisi, era rimasto materiale di soli 85 pazienti (60%). Di questi, 81 sono risultati valutabili e 7 (8,6%) sono risultati portatori della delezione 17p (Fig.21). Quindi l'incidenza di questa alterazione è molto minore rispetto alle altre analizzate, ed anche per questo motivo i dati di risposta alla terapia non sono per il momento concludenti. Infatti dopo la prima fase di terapia il 43% dei pazienti con delezione verso il 35% dei pazienti senza delezione raggiungeva una remissione parziale, il 57% verso il 67% dopo il primo trapianto e il 57% verso il 74% dopo due trapianti. Queste differenze non erano significative in analisi per intenzione di trattamento (Fig.22). La stessa condizione si riscontrava in analisi per terapia ricevuta, in cui la VGPR era raggiunta dal 50% verso il 73% dopo il primo autotrapianto e dal 67% verso l'84% dopo il secondo trapianto (Fig.23).

N° pz	CARIOTIPO	% Met. Alt.
1	46,XX(27) 43,X0,dic(1)(q11),-8,der(11),add(11)(p15),-13,-X(2) 42-44,X0,del(1)(p22p32),t(7;16)(q11;q22),-8,der(11),der(12)t(8;12)(q13;p13),-13,del(14)(q22q32), der(15)t(15;X)(p12;q13),del(20)(q11),-X(11)	32,5
2	46,XX(15) 52,XX,t(5;8)(q13;q24),+5,der(6)t(1;6)(q21;q13),+7,+9,-13,+15,+15,+19,+21(12)	44,4
3	46,XY(33) 45,XY,-13(1) 54,XY,del(1)(p22),der(1),+3,+5,+10,+11,-13,-14,+15,+15,+19,+3Ms(2)	8,3
4	46,XX(21) 50,XX,del(4)(p14),del(4)(p14),-7,+10,+11,del(13)(q14q21),+15,+15,+16,+2Ms(2)	8,7
5	46,XY(4) 44,X0,del(1)(p21p32),del(2)(p13p21),t(4;14)(p16;q32),-6,del(7)(p12p15),t(12;14)(q13;q32),-13,-Y,+r(10) 44-45,X0,del(1)(p21p32),del(2)(p13p21),del(3)(p23),t(4;14)(q16;q32),-6,+der(6)dic(1;6)(p13;q21),del(7)(p12p15), del(12)(p12),-13,-Y,+1-2Ms(8) 44,X0,del(1)(p21p32),-2,del(3)(p23),t(4;14)(p16;q32),-6,+der(6)dic(1;6)(p13q21),del(7)(p12p15), +der(8)add(8)(p23),del(12)(p12),-13,-18,-Y,+1-2Ms(2) 44-45,X0,del(1)(p21;p32),t(1;11)(q32;q23),del(2)(p13;p21),del(3)(p23),-6,+der(6)dic(1;6)(p13;q21), del(7)(p12;p15),del(12)(p12),-13,-Y,+1-2Ms(2), altre alterazioni non clonali -13(4)	86,7

6	46,XY(34) 50-53,XY,del(3q),+5,+7,del(8p),+9,+10,+11,-13,add(14q),-17,+19,+21,csb,ctb(6)	15
7	46,XY(45) 46,XY,del(1)(q11),der(1)t(1;6)(q11;q11),der(2)t(1;2)(q11;p21),add(6)(p21),del(9)(p22),del(10)(p11),del(13)(q14q21),del(14)(q13q32);der(20)t(1;20)(q11;p13),der(20)(29) 45,XY,del(1)(q11),der(1)t(1;6)(q11;q11),add(6)(p21),i(9)(q10),del(10)(p11),del(13)(q14q21),del(14)(q13q32),dic(1;20)(p34;q23),-20(8) 45,XY,del(1)(q11),der(1)t(1;6)(q11;q11),add(6)(p21),del(9)(p22),del(10)(p11),del(13)(q14q21),del(14)(q13q32),der(20)t(1;20)(q11;p13),der(20),-22(2) 45,XY,del(1)(q11),der(1)t(1;6)(q11;q11),der(2)t(1;2)(q11;p21),add(6)(p21),del(9)(p22),del(10)(p11),del(13)(q14q21),del(14)(q13q32);der(20)t(1;20)(q11;p13),-20(2) 45,XY,del(1)(q11),der(1)t(1;6)(q11;q11),der(2)t(1;2)(q11;p21),add(6)(p21),i(9)(q10),del(10)(p11),del(13)(q14q21),-14,der(20)t(1;20)(q11;p13),der(20)(1) tetraploidi 13q- (7)	52,1
8	46,XX(39) 43-45,XX,del(1)(p13p34),+3,-13,-14,der(20)t(1;20)(q11;p13),der(20)(9)	18,8
9	46,XY(45) 45XY,der(2)t(1;2)(q11;p25),der(5)t(3;5)(q21;q11),-13,add(14)(q32)(1) 45,XY,id.,der(3)t(1;3)(q11;p13)(3) 45,XY,id.,der(7)t(1;7)(q11;q37)(1)	10

10	46,XX(49) 47,XX,del(1p),-2,del(3p),+11,-13,add(18)(q13),+M(1)	2
11	46,XX(49) 44,X0,t(1;6)(q21;q23),+der(1)dic(1;?)(p11;?),-11,del(12)(q11;q13),-13,der(14)t(11;14)(p11;p11),del(18)(q21), add(20)(q13)(1)	2
12	46,XY(21) 54,XY,+3,+5,+7,+9,-13,+15,+15,+19,+21,+M (5)	19,2
13	46,XY(48) 51,XY,+5,+6,+7,+9,-13,+15,+22(1)	2
14	46,XY(2) 45,XYY,+Y,del(1)(q21),-13,-14,-15,-16,-16,+4Ms(4) 81-90,XXYY, stesse alterazioni in tetraploidia (26)	93,8
15	46,XX(25) 45,XX,del(6)(q23),+9,t(11;X)(q21;p22),t(12;14)(p11;p11),-13,-15,t(16;17)(p13;q23)(6)	19,4
16	46,XX(8) 85-87,XX,del(1)(p12),add(3)(q27),add(8)(q24),-13,-X,alterazioni numeriche N.C. (22)	73,3
17	46,XX(24) 46,X0,+der(1)t(1;15)(p10;p10),+add(8)(p23),-13,-15,+19,-X(4) id. add(10)(q25) (2)	20

18	46,XY(10) 44,XY,t(1;8)(p22;p23),der(6)t(6;10)(q13;q11),-10,del(11)(q21;q23), del(13)(q14q21) ,-18,add(20)(p13) (20)	66,7
19	46,XY(21) 46,X0,-Y,+3, del(13)(q14q21) ,-14,+15(1) 74-79,XXY,der(1),+2,+3,+3,der(3),+4,+5,+6,+7,+8,+9,+11,+12, del(13) ,+15,+19,+20,+20,+20,+22,+22,+6-8Ms, alterazioni numeriche e strutturali non clonali (3)	16
20	46,XX,(28) 47,XX,del(4)(q21;q31),+ del(13)(q14;q21) ,+15(1) 48,XX,del(4),+9,+ del(13q)(q14q21) ,+15(1)	6,7
21	46,XY(29) 55,X0,+dic(1;3)(p32;q21),+der(1)del(1p),+2,del(5)(p13),+9,+11,+12, del(13)(q14q21) ,+17,+18,+19,+20,-Y (1)	3,3
22	46,XY(48) 35,X0,del(1)(q12),der(1),add(4)(p15),der(5),-6,del(7)(p15),-8,-10,-12,- 13 ,-14,-14,del(16),-17,add(17)(q23),-20,-22, -Y, +alterazioni non clonali (12)	20
23	46,XY(10) 38-46,XY,+der(1)del(1)(p13),del(2)(p21),der(4), del(13)(q14q21) +Ms e perdite random (4) tetraploide con le stesse alterazioni (1)	33,3
24	46,XY(23) 45,XY,+3,-4,-6,-8,del(9q),+11,-12,- 13 ,del(17p),+21,+M(1) 50,XY,+3,-4,-6,+8,del(9q),+10,+11,del(12p),- 13 ,-15,-16,del(17p),+21,+21,M(1)	8

25	46,XX(29) 45,XX,der(1),der(2),add(3)(q27),del(12)(p12),-13,der(X) (2)	6,5
26	46,XY(16) ipotetraploidi (85-89) con alterazioni numeriche e strutturali (-13)	23,8
27	46,XX (2) 45,XX,-13 (1)	33,3
28	45-50,X0,-X,+3,der(5)t(1;5)(p22;q11),+6,+der(7)t(1;7)(q12;q26),-13,inv(14)(q24;q24),+15,+der(X)t(X,1)(q12;q26), +alterazioni non clonali(4)	100
29	46,XY(29) 42,XY,dup(1)(q21;q44),der(7)t(1;7)(q21;p22),der(12)t(1;12)(q21;p13),-8,-13,-15,-21(3)	9,4
30	46XX(49) 45,X0,+1,-2,-2,-3,+5,-7,-7,+9,+9,+10,+11,+14,+14,-16,-16,+17,-18,-18,-19,+20,+21,-X(1) 47,XX,+2,+2,-4,-7,+9,-12,-13,-15,-16,-18,+20,+20,+21,+21(1)	3,9

r= ring (cromosoma ad anello); csb= rotture cromosomiche; ctb= rotture cromatidiche; dic= dicentrico; dup= duplicazione.

Tabella 3: Cariotipi alterati riscontrati in 30 pazienti e percentuale di metafasi alterate.

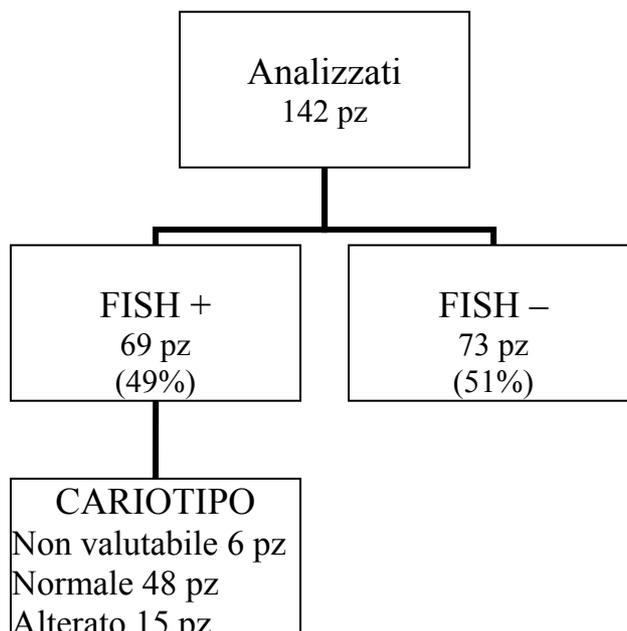


Tabella 4: Pazienti studiati in FISH ed in citogenetica convenzionale per l'analisi della delezione del cromosoma 13 ($\Delta 13$).

Alterazione presente	N° pz (%)
$\Delta 13 \leftarrow FISH$	
neg	73 (51%)
pos	69 (49%)
$t(4;14) \leftarrow RT-PCR$	
neg	99 (70%)
pos	43 (30%)
$\Delta 13 e t(4;14)$	
neg	55 (39%)
pos	25 (18%)

Tabella 5: Valutazione dei 142 pazienti analizzati.

	$\Delta 13$ neg	$\Delta 13$ pos
N° pz	73	69
Età (range)	57 (35-66)	57 (40-66)
Sesso (M:F)	38:35	34:35
Hb (range)	11,5 (6,8-16,2)	10,6 (6,1-17,7)
PLTs (range)	214 (81-498)	216 (40-572)
IgA comp. M (%)	22	29
$\beta 2$-m (range)	2,8 (1,2-12,0)	3,17 (0,1-13,3)
PCR	3,3 (1,1-110)	3,5 (1,4-76,6)
LDH	280,5 (111-960)	296 (106-2325)
% PC (range)	50 (5/100)	55 (10-100)
Stadio I	15	12
Stadio II	26	27
Stadio III	59	61

Tabella 6: Caratterizzazione clinico-biologica in pazienti alla diagnosi, con presenza o assenza di alterazioni del cromosoma 13 (in termine di valore mediano).

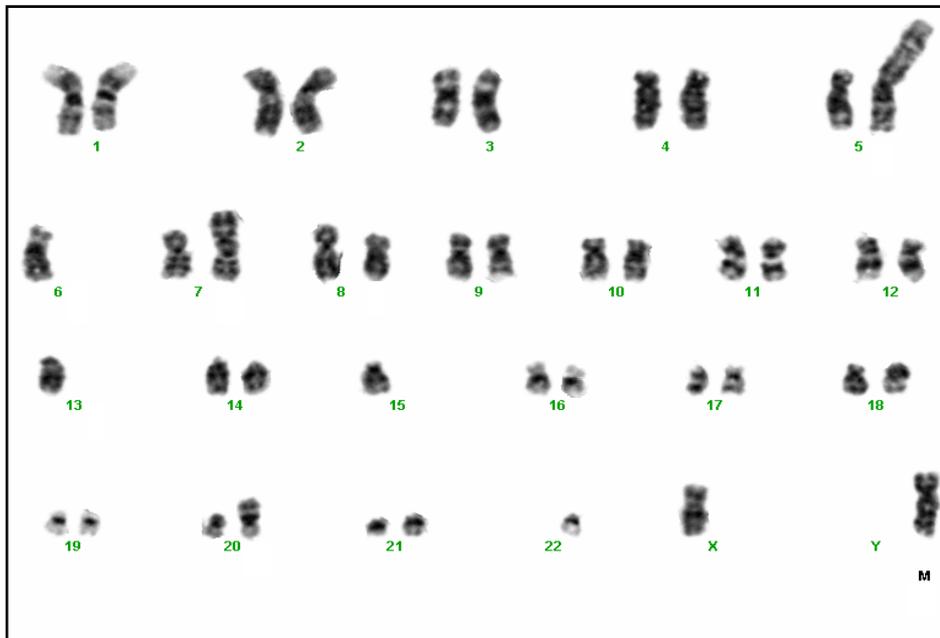


Figura 11: Cariotipo 42,X0,der(5)t(1;5)(q11;p15),-6,add(7)(p22),del(8)(p21),-13,-15, der(20)t(6;20)(p12;p13),-22,-Y,+M.

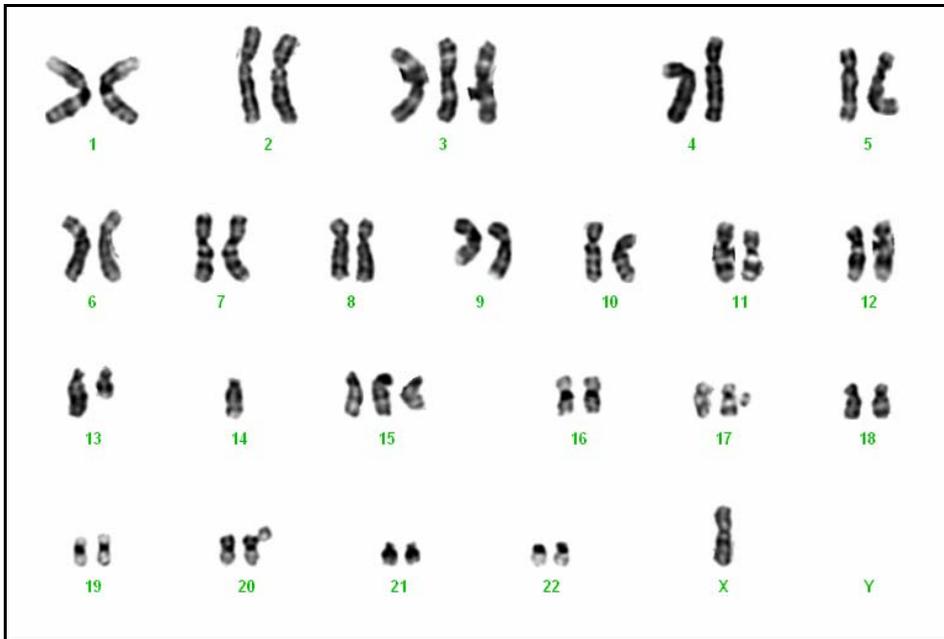


Figura 12: Cariotipo 46,X0,+3,del(13)(q14q21),-14,+15,csb(17)e(20),-Y.

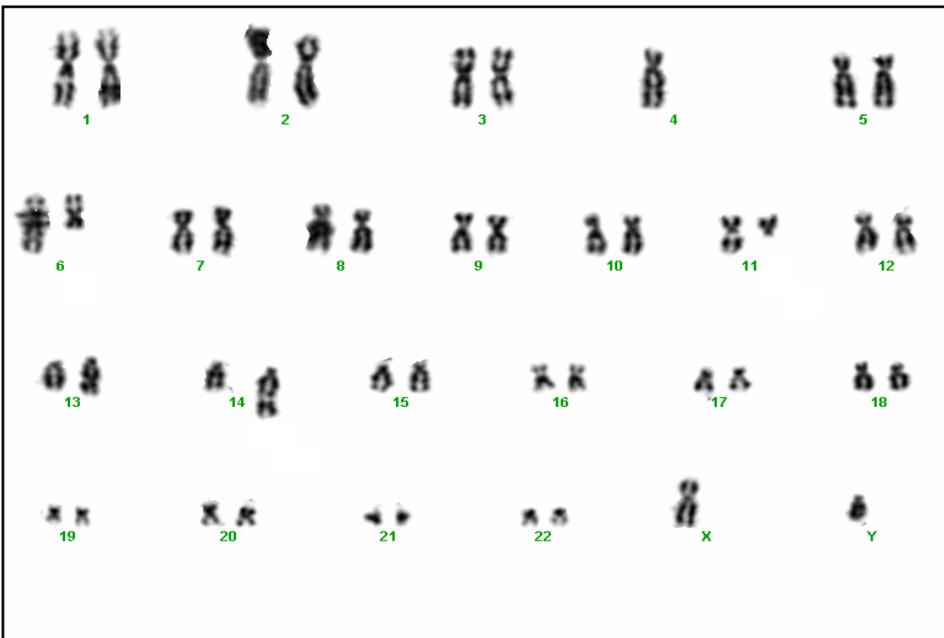


Figura 13: Cariotipo 45,XY,-4,del(6)(q15),t(11;14)(q13;q32).

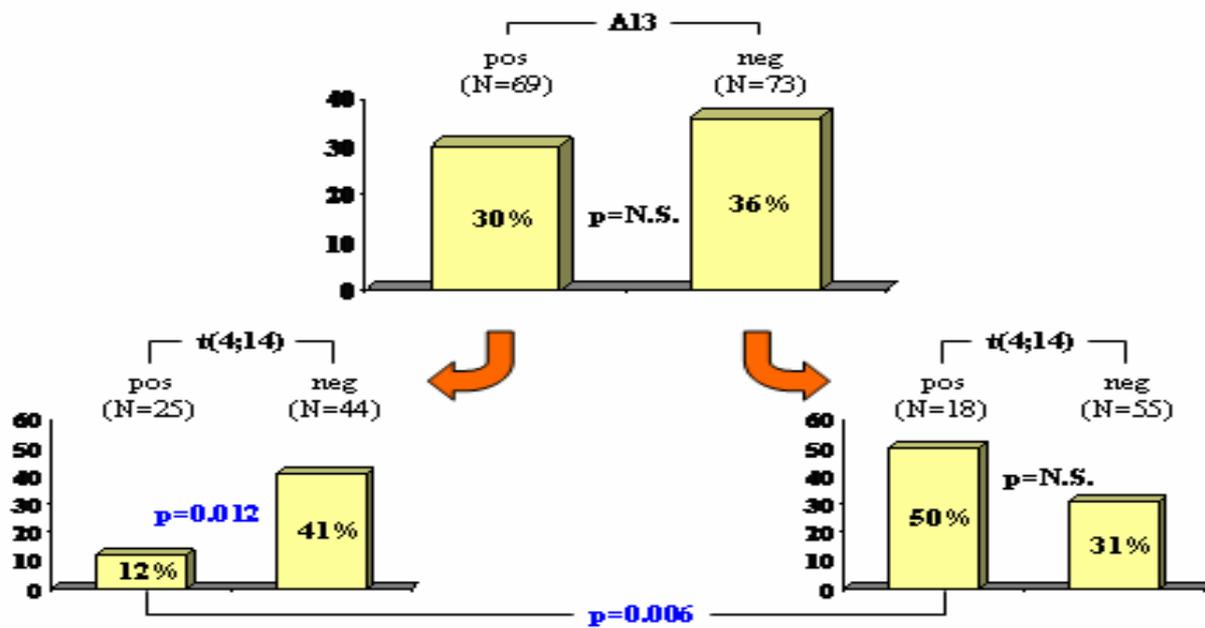


Figura 14: Risposta dei pazienti alla terapia con talidomide e desametasone, (in analisi per intenzione al trattamento) in relazione alle loro caratteristiche genetiche.

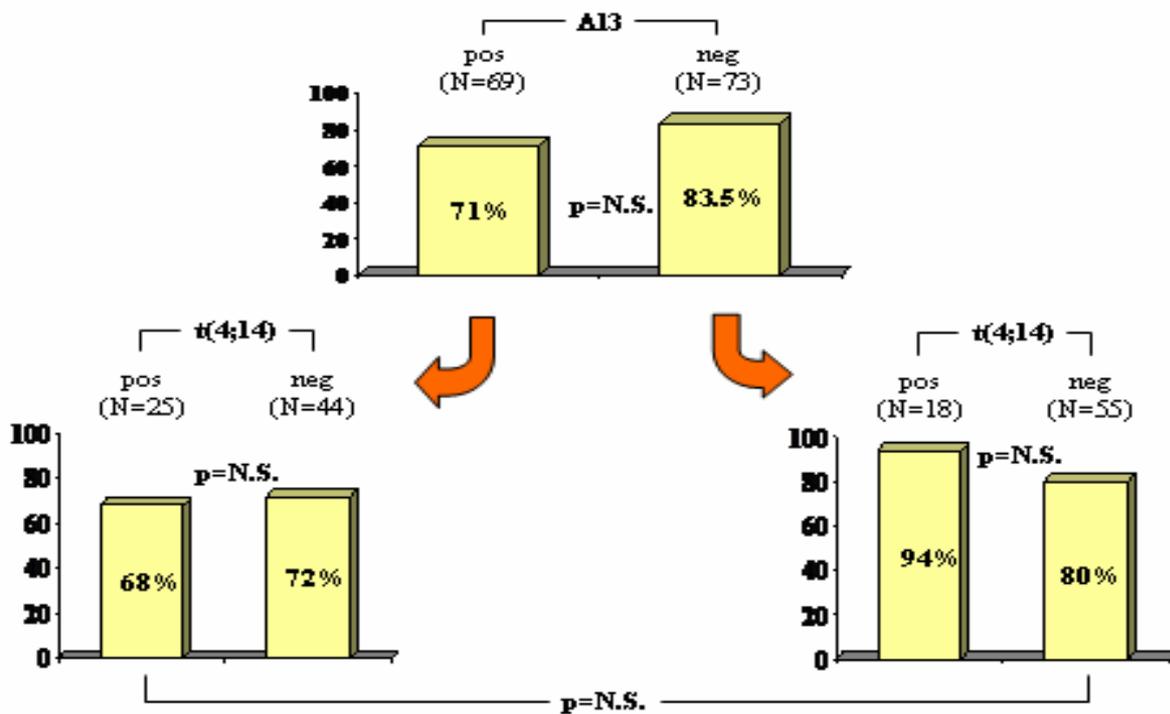


Figura 15: Risposta dei pazienti al doppio trapianto autologo (in analisi per intenzione al trattamento) in relazione alle loro caratteristiche genetiche.

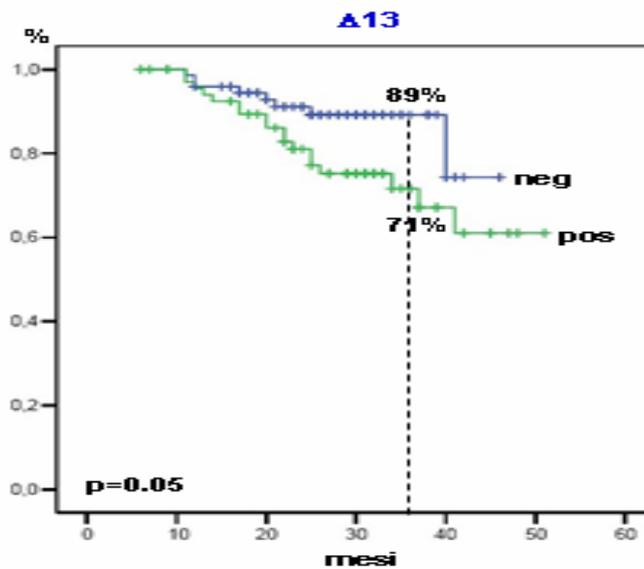


Figura 16: Sopravvivenza totale (overall survival - OS) in pazienti con delezione del cromosoma 13 e quelli senza la delezione (in analisi per intenzione al trattamento).

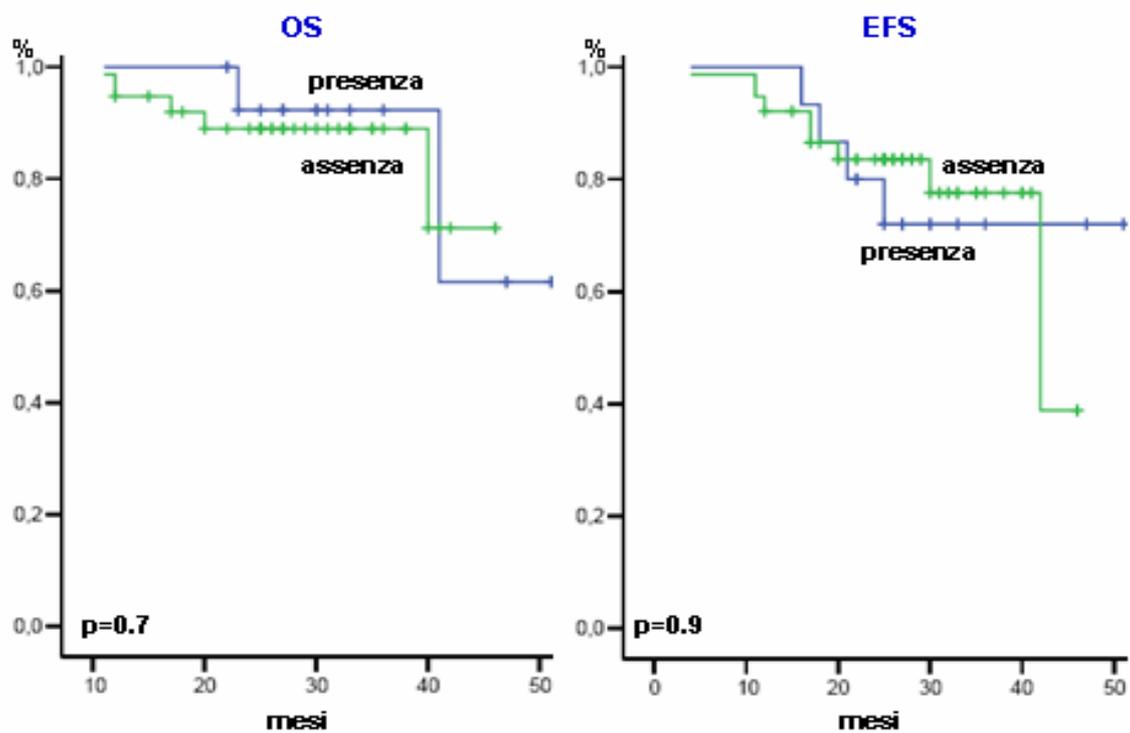


Figura 17: Sopravvivenza totale e sopravvivenza libera da eventi, in pazienti che presentano entrambe le alterazioni e pazienti che non le presentano, in analisi per terapia ricevuta (doppio trapianto autologo).

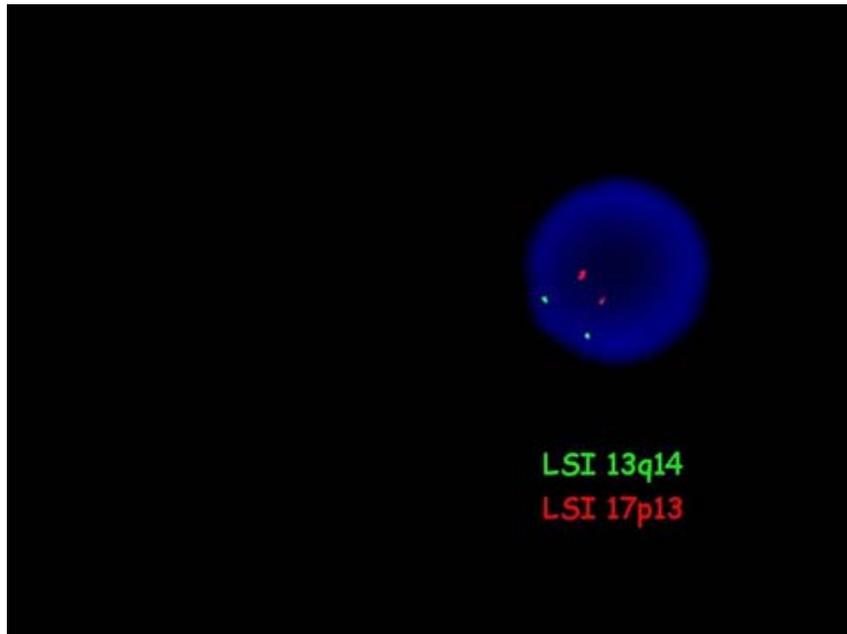


Figura 18: FISH di nucleo interfaseico normale.
I segnali verdi identificano la banda 13q14; i segnali rossi identificano la banda 17p13.1.

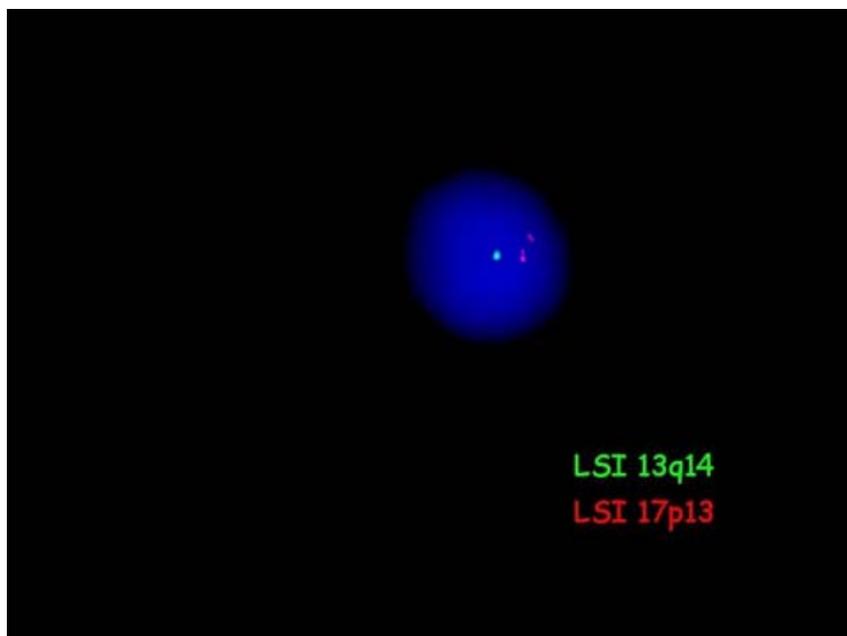


Figura 19: FISH di nucleo interfaseico con presenza di 1 solo segnale verde e 2 segnali rossi. Presenza di delezione della banda cromosomica 13q14.



Figura 20: FISH di nucleo interfase con presenza di 1 solo segnale rosso e 2 segnali verdi. Presenza di delezione della banda 17p13.

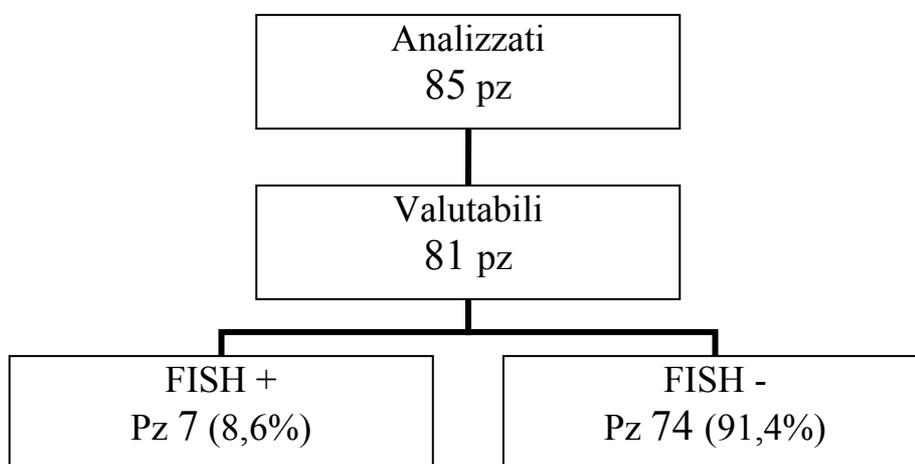


Figura 21: Pazienti studiati in FISH per la delezione del cromosoma 17.

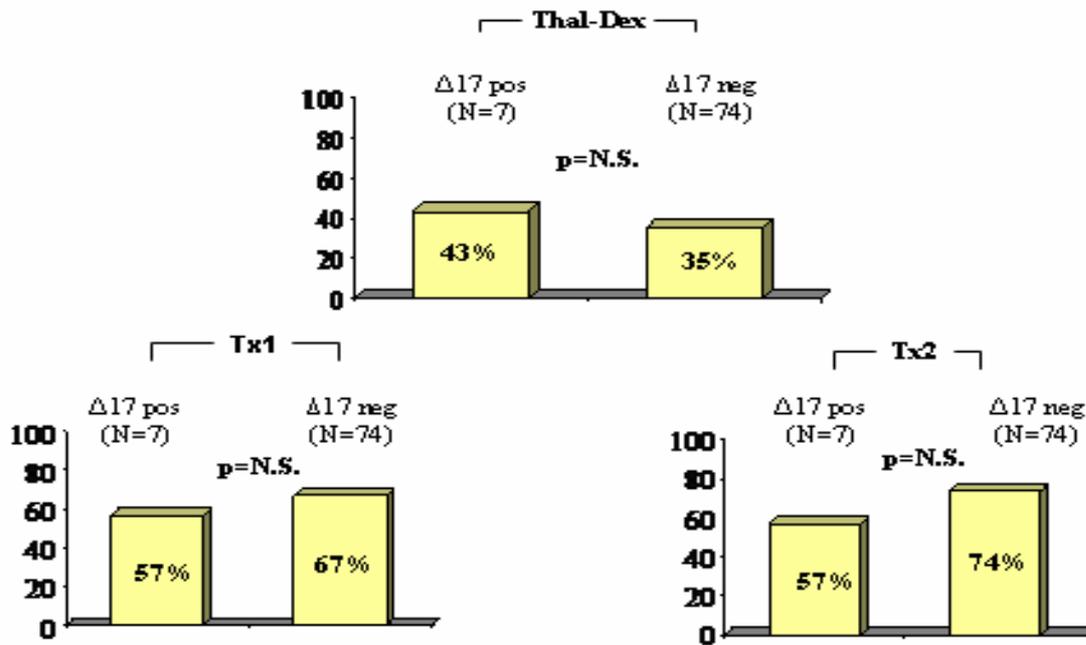


Figura 22: Risposta dei pazienti con/senza delezione del cromosoma 17 in analisi per intenzione al trattamento.

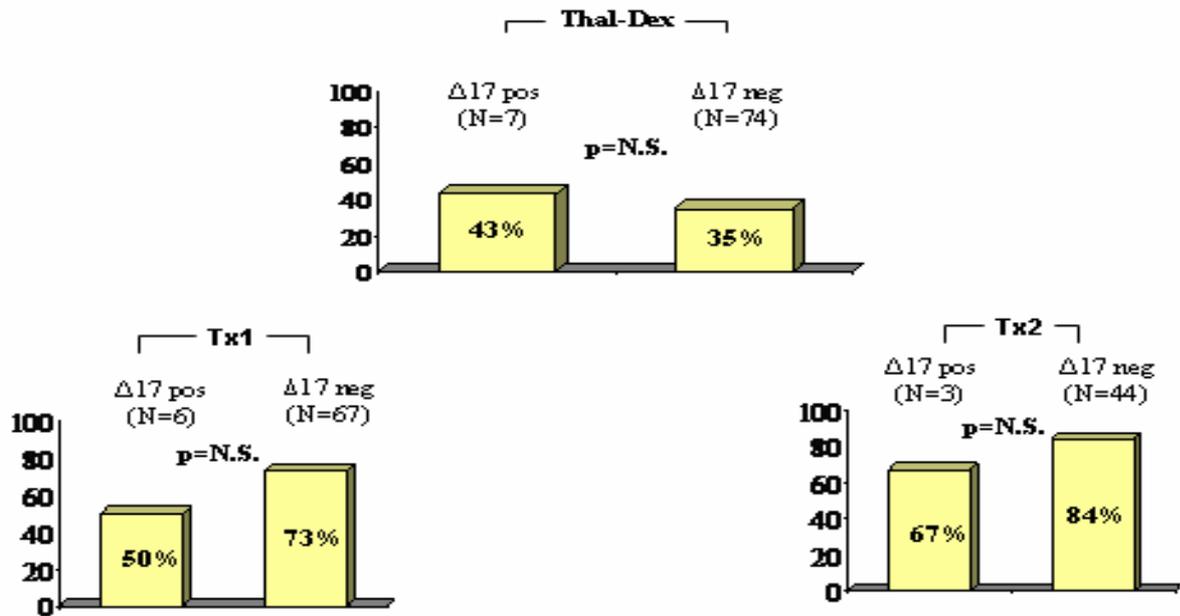


Figura 23: Risposta dei pazienti con/senza delezione del cromosoma 17 in analisi per terapia ricevuta.

7. DISCUSSIONE

Nel mieloma multiplo il cariotipo è spesso complesso, con numerose alterazioni strutturali e numeriche. L'osservazione di ricorrenti riarrangiamenti strutturali e alterazioni numeriche ha portato sia alla identificazione di meccanismi molecolari alla base dell'eziologia della patologia sia ad importanti applicazioni cliniche. Numerosi studi in letteratura hanno evidenziato anomalie genetiche che compaiono con maggior frequenza e possono essere associate a specifiche caratteristiche clinico-biologiche.

Inizialmente l'attenzione è stata rivolta verso le alterazioni delle braccia lunghe del cromosoma 13 che è spesso coinvolto in delezioni parziali o totali. Importante è la loro caratterizzazione in relazione al valore prognostico, confermato da recenti studi: la presenza della delezione totale o parziale del cromosoma 13 riveste un ruolo a prognosi peggiore, in particolare i pazienti mostrano una EFS (sopravvivenza libera da eventi) e una OS (sopravvivenza totale) significativamente inferiori rispetto agli altri.

Per quanto riguarda le anomalie strutturali, l'evento più frequente (circa il 40% dei casi) è l'alterazione della banda cromosomica 14q32: locus del gene delle catene pesanti delle immunoglobuline (IgH), coinvolto nella $t(4;14)(p16;q32)$, presente nel 15-20% dei casi. Essa causa l'overespressione di MMSET e di FGFR3, ma l'effetto prognostico negativo di tale alterazione sembra essere indipendente dai livelli di espressione di FGFR3, quindi sicuramente il ruolo più importante è giocato dall'oncogene MMSET di cui non si conosce ancora chiaramente la funzione. La valenza prognostica sfavorevole, sembra essere indipendentemente dal tipo di terapia utilizzata (chemioterapia

convenzionale o terapia ad alte dosi). Inoltre questi studi mostrano una stretta associazione della t(4;14) alla delezione del 13.

In questo studio abbiamo caratterizzato pazienti con MM alla diagnosi arruolati nel medesimo protocollo terapeutico (BO 2002). Questo protocollo prevede l'utilizzo di una terapia innovativa, che consiste nella somministrazione di talidomide e desametasone, seguita da doppio trapianto autologo di cellule staminali da sangue periferico.

In particolare la t(4;14) è stata studiata nel laboratorio di biologia molecolare del nostro Istituto, mentre la delezione del cromosoma 13 è stata caratterizzata attraverso l'utilizzo di metodiche di FISH e di citogenetica convenzionale.

Fino a pochi anni fa, gli studi di citogenetica nel mieloma multiplo, erano ostacolati dalla difficoltà di ottenere un sufficiente numero di metafasi analizzabili, prevalentemente a causa della bassa attività mitotica del clone neoplastico e della frequente bassa infiltrazione midollare. Per questo motivo è nata l'esigenza di utilizzare la FISH che permette una migliore caratterizzazione da un punto di vista citogenetico-molecolare, in quanto analizza cellule in interfase e può individuare anche alterazioni criptiche e sottostimate alla citogenetica convenzionale.

Tuttavia anche l'utilizzo di questa metodica presenta delle difficoltà. Dal Workshop Europeo sulla FISH nel Mieloma Multiplo, tenutosi a Londra l'11 Marzo 2005, è emerso che uno dei problemi principali, per questo tipo di analisi, soprattutto per i laboratori coinvolti in studi multicentrici, come il nostro, è la qualità dell'aspirato midollare. Infatti questo spesso contiene una percentuale di plasmacellule molto minore rispetto a quella presente negli strisci per lo studio morfologico. Sarebbe opportuno inviare al laboratorio che deve effettuare l'analisi in

FISH, la prima porzione di aspirato midollare e per ulteriori aspirazioni l'ago dovrebbe essere riposizionato anziché continuare a prelevare dal sito iniziale. Inoltre i campioni dovrebbero essere processati il più presto possibile dopo il prelievo, per rendere il risultato di FISH accettabile. Per questi motivi è fondamentale effettuare una selezione o concentrazione delle PC midollari. Le metodiche possono essere diverse. In molti laboratori, compreso il nostro, viene utilizzata una metodica di selezione positiva tramite un sistema immunomagnetico di separazione su colonna, che utilizza l'anticorpo anti-CD138, antigene presente sulle PC normali e neoplastiche. Un altro problema è il calcolo del cut-off, a causa della difficoltà di trovare il materiale di controllo ideale. Per questo motivo viene consigliato di utilizzare livelli di cut-off relativamente uniformi e conservati. I valori consigliati sono del 10%.

Quindi, considerando tutti questi fattori, per la caratterizzazione della delezione del 13 si è proceduto con l'analisi di FISH eseguita soltanto sul comparto plasmacellulare.

Inizialmente si è ottimizzata la metodica per la caratterizzazione della delezione del cromosoma 13 con la selezione delle cellule CD 138+ migliorando notevolmente l'accuratezza dell'indagine. Con tale analisi la delezione è stata osservata nel 47% dei pazienti alla diagnosi. Quindi la popolazione da noi studiata era in linea con quanto riportato da altri autori: 30-50% era la frequenza riscontrata nelle varie casistiche (69,74-76).

L'analisi dei parametri clinico-biologici mostrava nei pazienti con delezione 13q una tendenza a livelli più bassi di Hb, alla presenza di componente M IgA, ad aumento di β 2-microglobulina, di PCR e LDH (Tab.6). Ma nessuna differenza tra i due gruppi risultava significativa.

In citogenetica convenzionale l'alterazione era invece presente nel 10% dei casi, quindi con una frequenza, anche in questo, sovrapponibile alle percentuali riportate in letteratura (10-15%) (19). Nella maggior parte dei nostri casi tale delezione si presenta sotto forma di monosomia (76,7%) piuttosto che di delezione parziale (23,3%), in accordo con le osservazioni precedenti (69,74-76).

Sebbene il MM sia frequentemente aneuploide, il cromosoma 13 è raramente trisomico, anche in casi con presenza di metafasi alterate (19). Anche nella nostra casistica nessun caso presentava 3 segnali per il cromosoma 13 in FISH. L'alterazione del 13 è sempre associata a quadri citogenetici complessi (Tab.3), a differenza di altre alterazioni quali la t(11;14) che avevamo osservato (in altri studi) presente spesso come unica anomalia e raramente associata ad un'unica ulteriore alterazione. Questi dati possono suggerire che l'alterazione 13q possa essere lo specchio di un'elevata instabilità cromosomica. La delezione è prevalente nei casi non iperdiploidi rispetto ai casi iperdiploidi (60% verso 40%) (33). La percentuale mediana delle plasmacellule che presentavano la delezione era 89,3% (range 14,7-100%) Questo dato è in linea con studi precedentemente riportati, in cui la frazione di cellule con 13q- variava da 75% a 90% (69-70,72-73). Comunque esiste una variabilità nella taglia del clone alterato e nell' 11,3% dei casi, la percentuale delle plasmacellule che presentano la delezione è inferiore al 50%. Questi dati suggeriscono che il 13q- possa essere un evento secondario che determina un vantaggio di crescita per il clone cellulare che lo possiede.

Quindi le caratteristiche genetiche della popolazione di pazienti da noi esaminata rispecchiavano le caratteristiche delle popolazioni oggetto degli studi riportati in letteratura.

Universalmente è stato dimostrato che l'alterazione del cromosoma 13 è un fattore prognostico indipendente nel MM alla diagnosi, infatti la sua presenza è stata associata ad una minore risposta alla terapia ed ad una minor sopravvivenza sia totale che libera da eventi. Questo appare vero per i pazienti trattati con chemioterapia (CHT) convenzionale, con alte dosi di CHT e con autotrapianto di cellule staminali (29,62,69,78-80). Mentre sono scarsi i dati circa la rilevanza dell'alterazione 13 nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo (TMO) allogenico. Diversamente nel nostro studio la presenza di tale alterazione sembra non influenzare la prognosi. Infatti la risposta alla terapia sia a livello delle prime fasi sia dopo doppio trapianto di midollo era simile tra i 69 pazienti con delezione e i 73 pazienti senza delezione (Fig.14-15). Invece, differente era la sopravvivenza totale tra i 2 gruppi: a 3 anni era vivo l'89% dei pazienti senza delezione verso il 71% dei pazienti con delezione 13 ($p=0.05$) (Fig. 16). La risposta alla terapia comunque non variava nei 15 casi in cui la delezione 13 era osservata in citogenetica convenzionale. Questo è in contrasto con quanto descritto finora, in quanto l'alterazione 13 evidenziata in CC rappresentava un fattore prognostico ulteriormente favorevole. Questo è verosimilmente dovuto ad una combinazione di marcatori prognostici negativi quali l'effetto "intrinseco" della delezione e l'aumentata proliferazione cellulare.

Dei 15 pazienti con cariotipo alterato, 8 presentavano un cariotipo ipodiploide e ipotetraploide, nessuno presentava una buona remissione parziale dopo talidomide+desametasone e solo 3 la raggiungevano dopo doppio trapianto autologo. Invece tutti i 7 casi iperdiploidi mostravano una tale risposta già dopo talidomide+desametasone. Ovviamente la nostra casistica è estremamente scarsa per essere minimamente conclusiva, ma in

questo caso, rispecchia la differenza in termini prognostici dei due gruppi già riportata in letteratura (33-40).

Solo 25 pazienti mostravano sia la delezione del cromosoma 13 sia la t(4;14). Nella nostra casistica, quindi, non era osservata una stretta associazione tra le alterazioni, come invece viene riportato da alcuni autori (40,50). Solo il 12% dei pazienti con entrambe le alterazioni raggiungeva una buona remissione parziale dopo talidomide+desametasone verso il 41% con la sola del(13q), il 50% dei pazienti con la sola t(4;14) e il 31% che non presentavano nessuna delle 2 alterazioni studiate (Fig.14). Tale differenza significativa veniva però persa dopo il doppio trapianto autologo (Fig.15). Anche la sopravvivenza totale e la sopravvivenza libera da eventi era sovrapponibile sia in presenza che in assenza delle 2 alterazioni (Fig.17).

Quindi queste analisi preliminari ci portano a concludere che, se al trattamento con talidomide e desametasone segue il doppio trapianto autologo, si può superare l'impatto dell'effetto sfavorevole associato a queste 2 alterazioni genetiche.

Un'altra alterazione ancora poco caratterizzata, ma che sembra avere particolare importanza nella patogenesi del mieloma multiplo è la delezione della banda 17p13 che causa la perdita del gene oncosoppressore p53; quest'ultimo codifica per un fattore di trascrizione che può attivare numerosi geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nei meccanismi di riparazione del DNA e di morte cellulare programmata. Quindi la sua espressione agisce sull'induzione dell'arresto del ciclo cellulare e/o l'apoptosi in risposta a diversi fattori di stress.

I diversi studi effettuati per studiare la delezione 17p13 nel mieloma multiplo riportano percentuali differenti sulla frequenza della delezione (dal 5 al 33.8% dei casi) (40, 86-89), sia per differenze nell'efficienza della FISH sia per le diverse caratteristiche intrinseche delle varie popolazioni di pazienti

esaminate. Comunque nella maggior parte dei casi la percentuale si aggira intorno al 5-10% al momento della diagnosi (29,40,81,87). La delezione sembra essere più frequente negli stadi più avanzati della malattia ed essere associata ad altre caratteristiche che conferiscono aggressività. La percentuale mediana delle plasmacellule con delezione 17p risulta minore rispetto alla traslocazione IgH e alla delezione 13q (60%). Nel nostro studio è ancora più bassa: 25,8%. Ma il numero dei casi valutati è ancora molto scarso. La ragione critica della perdita 17p non è stata ancora sistematicamente valutata. Gli studi finora effettuati hanno dimostrato che la delezione del 17p13 è associata ad una prognosi sfavorevole sia in pazienti trattati con chemioterapia convenzionale (42, 87-88) che in pazienti trattati con terapia ad alte dosi (89). Al momento non sono stati pubblicati studi sulla delezione del 17p13 in pazienti trattati con terapie innovative.

Nel nostro studio sui 142 pazienti di cui avevamo già il dato della delezione del 13q e della t(4;14), e che avevano un follow-up tale da poter effettuare analisi di risposta al trattamento, la FISH è risultata possibile solo in 85 casi e, di questi, 81 sono risultati valutabili. Soltanto 7 pazienti (8,6%) sono risultati positivi in FISH (Fig.21). Pertanto al momento la casistica è ancora troppo scarsa e quindi le analisi di risposta alla terapia perdono di significatività: comunque il 57% dei pazienti con delezione del 17p13 verso il 74% dei restanti pazienti raggiungeva una buona risposta parziale alla fine dell'intero ciclo terapeutico (Fig.22).

Sicuramente è importante proseguire con l'analisi di questa alterazione, per averne una caratterizzazione migliore in termini sia di meccanismi molecolari coinvolti sia di prognosi.

Come recenti studi stanno dimostrando, la caratterizzazione citogenetico-molecolare è basilare per migliorare l'efficacia del

trattamento terapeutico nel MM. L'identificazione di alterazione legata alla patogenesi del MM definisce nuove opportunità per lo sviluppo di farmaci disegnati su basi genetiche.

La rilevanza prognostica di specifiche traslocazioni IgH come la t(4;14), le delezioni 13q e 17p potrebbe essere utilizzata nella stratificazione dei pazienti a diversa prognosi in protocolli terapeutici più o meno aggressivi.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Tura S.- Lezioni di ematologia- Società Editrice Esculapio 2003; 410-433.
2. Sirohi B, Powles R – Multiple myeloma – The Lancet 2004; 363: 875-887.
3. Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P, Alexanian R – Plasma cell myeloma: new biological insights and advances in therapy – Blood 1989; 73: 865-879.
4. Durie BG, Salmon SE – A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival – Cancer 1975; 36: 842-854.
5. Durie BG, Stock-Novack D, Salmon SE, et al. – Prognostic value of pretreatment serum beta 2 microglobulin in myeloma: a Southwest Oncology Group study – Blood 1990; 75: 823-830.
6. Bataille R, Boccadora M, Klein B, et al. – C-reactive protein and beta 2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system – Blood 1992; 80: 733-737.
7. Drewinko B, Alexanian R, Boyer H, et al. – The growth factor of human myeloma cells – Blood 1981; 57: 333-338.
8. Greipp PR, Lust JA, O’Fallon WM, et al. – Plasma cell labeling index and beta 2 microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma – Blood 1993; 81: 3382-3387.
9. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD, Jr., Stewart AK, Avet-Loiseau H – Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report – Cancer Research 2004, 64: 1546-1558.

10. Harousseau JL, Shaughnessy JD and Richardson P – Multiple Myeloma – *Hematology* 2004; 2004: 503-518.
11. Anderson KC – Multiple Myeloma. *Advances in disease biology: therapeutic implications* – *Semin Hematol.* 2001; 38: 6-10.
12. Cavo M, Zamagni E, Tosi P, Tacchetti P, Cellini C, Cangini D, De Vivo A, Testoni N, Nicci C, Terragna C, Grafone T, Perrone G, Ceccolini M, Tura S, Baccarani M – Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma – *Blood* 2005; 106: 35-39.
13. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, et al. – Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy – *Blood* 2000; 96: 2943-2950.
14. Davies SE, Raje N, Hideshima T, et al. – Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma – *Blood* 2001; 98: 210-216.
15. Cavenagh JD, Oakervee H – Thalidomide in multiple myeloma: current status and future prospects – *Br J Haematol.* 2003; 120: 18-26.
16. Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A, Weber D – Treatment of plasma cell dyscrasia with thalidomide and its derivatives – *J Clin Oncol.* 2003; 23: 4444-4454.
17. Nadal E, Gine E, Bladè J, et al. – High-dose therapy/autologous stem cell transplantation in patients with chemosensitive multiple myeloma: predictors of complete remission – *Bone Marrow Transplant.* 2004; 33: 61-64.
18. Lewis JP, Mackenzie MR – Non-random chromosomal aberrations associated with multiple myeloma – *Hematol Oncol.* 1984; 2: 307.

19. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR – The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis – *Blood* 1985; 66: 380.
20. Gould J, Alexanian R, Goodacre A, Pathak S, Hecht B, Barlogie B – Plasma cell karyotypes in multiple myeloma – *Blood* 1988; 71: 453.
21. Ho PJ, Campbell LJ, Gibson J, Brown R, Joshua D – The biology and cytogenetics of multiple myeloma – *Rev Clin Exp Hematol* 2002; 6.3: 276-300.
22. Kearney L – The impact of the new FISH technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br J Haematol* 1999; 104: 648-658.
23. Drach J, Schuster J, Nowotny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegel M, Rothermundt C, Gsur A, Jager U, Heinz R, Lechner K, Ludwig H, Huber H – Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization – *Cancer Research* 1995; 55: 3854-3859.
24. Flactif M, Zandecki M, Lai JL et al. – Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) as a powerful tool for the detection of aneuploidy in multiple myeloma – *Leukemia* 1995; 9: 2109-2114.
25. Zandecki M, Lai JL, Facon T – Multiple Myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal – *Br J Haematol* 1996; 94: 217-227.
26. Sawyer J, Lukacs JL, Thomas E, Swanson C, Goosen L, Sammartino G, Gilliland J, Munshi N, Tricot G, Shaughnessy J, Barlogie B – Multicolour Spectral Karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in MM – *Br J Haematol*. 2001; 112: 167-174.
27. Rao PH, Cigudosa JC, Ning Y, Calasanz MJ, Iida S, Tagawa S, Michaeli J, Klein B, Dalla-Favera R, Jhanwar SC, Ried T,

- Chaganti RSK – Multicolour Spectral Karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma – *Blood* 1998; 92: 1743-1748.
28. Cigudosa JC, Rao PH, Calasanz MJ, Odero MD, Michaeli J, Jhanwar SC, Chaganti RSK – Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by Comparative Genomic Hybridization – *Blood* 1998; 91: 3007-3010.
 29. Liebisch P, Döhner H –Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma – *European Journal of Cancer* 2006, 42: 1520-1529.
 30. Chen Z, Issa B, Huang S, Aston E, Xu J, Yu M, Brothman AR, Glenn M – A practical approach to the detection of prognostically significant genomic aberrations in multiple myeloma – *Journal of Molecular Diagnostics* 2005, 7: 560-565.
 31. Magrangeas F, Lodè L, Wulleme S, Minvielle S, Avet-Loiseau H – Genetic heterogeneity in multiple myeloma – *Leukemia* 2005, 19: 191-194.
 32. Ross FM, Ibrahim AH, Vilain-Holmes A, Winfield MO, Chiecchio L, Protheroe RKM, Strike P, Gunasekera JL, Jones A, Morgan CJ – Age has a profound effect on the incidence and significance of chromosome abnormalities in myeloma – *Leukemia* 2005, 19: 1634-1642.
 33. Debes-Marun C, Dewald G, Bryant S, Picken E, Santana-Dávila S, González-Paz N, Winkler J, Kyle R, Gertz M, Witzig T, Dispenzieri A, Lacy M, Rajkumar S, Lust J, Greipp P and Fonseca R – Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma – *Leukemia (Baltimore)* 2003; 17: 427-436.
 34. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C – Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma – *Blood* 2001; 98: 2229-2238.

35. Smadja NV, Leroux D, Soulier J, Dumont S, Arnould C, Taviaux S, Taillemite JL, Bastard C – Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid patients – *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 38: 234-239.
36. Greipp PR, Trendle MC, Leong T, Oken M, Kay NE, Van Ness B, Kyle RA – Is flow cytometric DNA content Hypodiploidy prognostic in multiple myeloma? – *Leuk Lymphoma* 1999; 35: 83-89.
37. Smith L, Barlogie B, Alexanian R – Biclonal and hypodiploid multiple myeloma – *Am J Med* 1986; 80:841-843.
38. Calasanz MJ, Cigudosa JC, Otero MD, Garcia-Foncillas J, Marin J, Ardanaz MT, Rocha E, Gullon A – Hypodiploidy and 22q11 rearrangements at diagnosis are associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma – *Br J Haematol* 1997; 98: 418-425.
39. Fassas AB, Spencer T, Sawyer J, Zangari M, Lee CK, Anaissie e, Muwalla F, Morris C, Barlogie B, Tricot G – Both hypodiploidy and deletion of chromosome 13 independently confer poor prognosis in multiple myeloma – *Br J Haematol* 2002; 118: 1041-1047.
40. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR – Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma – *Blood* 2003; 101:4569-4575.
41. Pèrez-Simòn JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, González M, Fernández-Calvo J, Moro MJ, Hernández JM, San Miguel JF, Orfao A – Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes – *Blood* 1998; 91:3366-3371.

42. Bergsagel PL, Chesi M, Brents LA, Kuehl WM – Translocations into IgH switch regions – the genetic hallmark of multiple myeloma – *Blood* 1995; 86:223-223.
43. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM – Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma – *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:13931-13936.
44. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R and Intergroupe Francophone du Myelome – Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features and clinical presentation – *Blood* 2002; 99: 2185-2191.
45. Nishida K, Tamura A, Nakazawa N, Ueda Y, Abe T, Matsuda F, Tashima K, Taniwaki M – The *Ig heavy chain* gene is frequently involved in chromosomal translocations in multiple myeloma and plasma cell leukemia as detected by *in situ* hybridization – *Blood* 1997; 90:526-534.
46. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Dewald GW – Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance – *Blood* 2002; 100: 1417-1424.
47. Fonseca R, Harrington D, Oken M, Kyle R, Dewald G, Bailey R, Van Wier S, Henderson K, Hoyer J, Blood E, Kay N, Van Ness B, Greipp PR – Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients – *Blood* 2002; 99: 3735-3741.
48. Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schrock E, Ried T, Kuehl WM, Bergsagel PL – Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3 – *Nat Genet* 1997; 16: 260-264.

49. Fonseca R, Oken M, Greipp PR – The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathies of undetermined significance – *Blood* 2001; 98: 1271-1272.
50. Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, Bataille R, Avet-Loiseau H – Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy – *Blood* 2002; 100 :1579-1583.
51. Chesi M, Nardini E, Lim R, Smith K, Kuehl W, Bergsagel P - The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts – *Blood* 1998; 92:3025-3034.
52. Richelda R, Ronchetti D, Baldini L, Cro L, Viggiano L, Marzella R, Rocchi M, Otsuki T, Lombardi L, Maiolo AT, Neri A – A novel chromosomal translocation t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma involves the *fibroblast growth factor receptor 3* gene – *Blood* 1997; 90:4062-4070.
53. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, Martelli ML, Brents LA, Chen T, Schrock E, Riel T, Kuehl WM – Frequent dysregulation of the *c-maf* proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma – *Blood* 1998; 91: 4457-4463.
54. Sawyer JR, Lukacs JL, Munshi N, Desikan KR, Singhal S, Mehta J, Siegel D, Shaughnessy J, Barlogie B – Identification of new nonrandom translocation in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping – *Blood* 1998; 92:4269-4278.
55. Shaughnessy J, Gabrea A, Qi Y, Brents L, Zhan F, Tian E, Sawyer J, Barlogie B, Bergsagel PL, Kuehl M – Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma – *Blood* 2001; 98: 217-223.

56. Hanamura I, Iida S, Akano Y, Hayami Y, Kato M, Miura K, Harada S, Banno S, Wakita A, Kiyoi H, Naoe T, Shimizu S, Sonta SI, Nitta M, Taniwaki M, Ueda R – Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations – *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 638-644.
57. Iida S, Rao PH, Butler M, Corradini P, Boccadoro M, Klein B, Chaganti RS, Dalla-Favera R – Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma – *Nat Genet* 1997; 17: 226-230.
58. Yoshida S, Nakazawa N, Iida S, Hayami Y, Sato S, Wakita A, Shimizu S, Taniwaki M, Ueda R – Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma – *Leukemia (Baltimore)* 1999; 13: 1812-1816.
59. Kuehl WM, Bergsagel PL – Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions – *Nat Rev Cancer* 2002; 2:175-187.
60. Tassone P, Tagliaferri P, Rossi M, Gaspari M, Terraciano R, Venuta S – Genetics and molecular profiling of multiple myeloma: novel tools for clinical management? – *European Journal of Cancer* 2006, 42: 1530-1538.
61. Stewart AK, Fonseca R – Prognostic and therapeutic significance of myeloma genetics and gene expression profiling – *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23: number 26.
62. Fonseca R, Harrington D, Oken M, Dewald G, Bailey R, Van Wier S, Henderson K, Blood E, Rajkumar S, Kay N, Van Ness B, Greipp P – Biologic and prognostic significance of interphase FISH detection of chromosome 13 abnormalities ($\Delta 13$) in multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group (EOCG) study – *Cancer Res* 2002; 62: 715-720.
63. Hoechtlen-Vollmar W, Menzel G, Bartl L, Lamerz R, Wick M, Seidel D – Amplification of cyclin D1 gene in multiple

- myeloma: clinical and prognostic relevance – *Br J Haematol* 2000; 109: 30-38.
64. Soverini S, Cavo M, Cellini C, Terragna C, Zamagni E, Ruggeri D, Testoni N, Tosi P, De Vivo A, Amabile M, Grafone T, Ottaviani E, Giannini B, Cangini D, Bonifazi F, Neri A, Fabris S, Tura S, Baccarani M, Martinelli G – *Cyclin D1* overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation – *Blood* 2003; 102: 1588-1594.
 65. Lai JL, Michaux L, Dastugue N, Vasseur F, Daudignon A, Facon T, Bauters F, Zandecki M - Cytogenetics in multiple myeloma: a multicenter study of 24 patients with t(11;14)(q13;q32) or its variant – *Cancer Genet Cytogenet.* 1998; 104(2):133-138.
 66. Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA et al. – Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): a report on 13 cases – *Br J Haematol* 1998; 101:296-301.
 67. Garand R, Avet-Loiseau H, Accard F, Moreau P, Harousseau JL, Bataille R – t(11;14) and t(4;14) translocations correlated with mature lymphoplasmacytoid and immature morphology, respectively, in multiple myeloma – *Leukemia* 2003; 17: 2032-2035.
 68. Fonseca R, Debes-Marun C, Picken E, Dewald G, Bryant S, Winkler J, Blood E, Oken M, Santana-Dávila S, González-Paz N, Kyle R, Gertz M, Dispenzieri A, Lacy M, Greipp P – The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma – *Blood* 2003; 102:2562-2567.
 69. Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Kromer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J – Deletion of 13q

- remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescent in situ hybridization – *Blood* 2000; 95: 1925-1930.
70. Shaughnessy j, Jacobson J, Sawyer J, McCoy J, Fassas A et al. – Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy 1: interpretation in the context of global gene expression – *Blood* 2003; 101: 3849-3856.
 71. Higgins MJ, Fonseca R – Genetics of multiple myeloma – *Best Prac Res Clin Haematol* 2005; 18(4): 525-536.
 72. Fonseca R, Oken M, Harrington D, Bailey R, Van Wier S, Henderson K, Kay N, Van Ness B, Greipp PR, Dewald G – Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q-arm or monosomy – *Leukemia (Baltimore)* 2001; 15: 981-986.
 73. Avet-Loiseau H, Daviet A, Saunier S, Bataille R – Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13 – *Br J Haematol* 2000 ; 111: 1116-1117.
 74. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Genevieve F, Zandecki M, Lai J, Leleu X, Jouet J, Bauters F, Harousseau J, Bataille R, Mary JY, Intergroupe Francophone du Myelome – Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum β_2 -microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy – *Blood* 2001; 97: 1566-1571.
 75. Shaughnessy JJ, Tian E, Sawyer J, McCoy J, Tricot G, Jacobson J, Anaissie E, Zangari M, Fassas A, Muwalla F, Morris C, Barlogie B – Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescent in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of Total Therapy II – *Br J Haematol* 2003; 120: 44-52.

76. Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, Facon T, Brigaudeau G, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R – Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome*. – *Blood* 1999; 94: 2583-2589.
77. Konigsberg R, Ackermann J, Kaufmann H, Zojer N, Urbauer E, Kromer E, Jager U, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J – Deletions of chromosome 13q in monoclonal gammopathy of undetermined significance – *Leukemia (Baltimore)* 2000; 14: 1975-1979.
78. Seong C, Delasalle K, Hayes K, Weber D et al. – Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma – *Br J Haematol* 1998; 101: 189-194.
79. Perez-Simon JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD et al. – Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosome – *Blood* 1998; 91: 3366-3371.
80. Desikan R, Barlogie B, Sawyer J, Ayers D, Tricot G et al. – Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities – *blood* 2000; 95:4008-4010.
81. Chang H, Sloan S, Li D, Stewart AK – Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions – *British Journal of Haematology* 2004, 127: 280-284.
82. Inoue J, Otsuki T, Hirasawa A, Imoto I, Matsuo Y, Shimizu S, Taniwaki M, Inazawa J – Overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma – *Am J Pathol* 2004; 165: 71-81.

83. Harden DG, Klinger HP (eds.) – ISNC International System for Human Cytogenetic Nomenclature – Cytogenet cell Genet (suppl.) 1985: 1-117.
84. Kaplan EL, Meier P – Nonparametric estimation for incomplete observations – J Am Stat Assoc 1958, 53: 457-481.
85. Peto R, Pike MC, Armitage P, et al. – Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and example – Br J Cancer 1977, 35: 1-39.
86. Drach J, Ackermann J, Fritz E, Kromer E, Schuster R, Gisslinger H, DeSantis M, Zojer N, Fiegl M, Roka S, Schuster J, Heinz R, Ludwig H, Huber H – Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy – Blood 1998; 92(3):802-809.
87. Avet-Loiseau H, Li JY, Godon C, Morineau N, Daviet A, Harousseau JL, Facon T, Bataille R – P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma – Br J Haematol 1999;106(3):717-719.
88. Chang H, Qi C, Yi QL, Reece D, Stewart AK – p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation – Blood 2005; 105: 358-360.
89. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, Fonseca R – Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and –17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy – Blood 2005; 106: 2837-2840.