

ALMA MATER STUDIRUM - UNIVERSITA' di BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE

XXV Ciclo

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3 MALATTIE DEL SANGUE, ONCOLOGIA E REUMATOLOGIA
Settore Scientifico disciplinare: MED/15 MALATTIE DEL SANGUE

**CARATTERIZZAZIONE CITOGENETICO-MOLECOLARE
ALLA DIAGNOSI DI PAZIENTI CON LEUCEMIA MIELOIDE
CRONICA IN FASE CRONICA TRATTATI CON
INIBITORI DELLE TIROSINCHINASI:
RUOLO PROGNOSTICO**

Presentata da:

Dott.ssa **SIMONA LUATTI**

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. **Stefano Pileri**

Relatore

Dott.ssa **Nicoletta Testoni**

Esame finale anno 2013

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1. Le Sindromi Mieloproliferative	3
1.2. La Leucemia Mieloide Cronica	4
1.2.1. Laboratorio	6
1.2.2. Prognosi	6
1.3. Il cromosoma Philadelphia	7
1.4. Patogenesi della LMC: ruolo di p210 ^{BCR-ABL}	12
1.4.1. Il gene ABL	12
1.4.2. Il gene BCR	14
1.4.3. La p210 ^{BCR-ABL}	16
1.5. La cellula staminale leucemica nella progressione della LMC	19
1.6. Traslocazioni t(9;22) varianti	21
1.7. Delezione del derivativo del cromosoma 9	24
1.8. Alterazioni citogenetiche addizionali al cromosoma Philadelphia	27
1.9. LMC Philadelphia-negative o Ph-masked	30
1.10. La terapia nella LMC	32
1.10.1. Imatinib Mesilato	32
1.10.2. Inibitori delle tirosinchinasi di seconda generazione	39
1.10.2.1. Nilotinib	39
1.10.2.2. Dasatinib	40
1.11. Analisi di laboratorio per la diagnosi e il monitoraggio della LMC	42
1.11.1. Citogenetica Convenzionale	42
1.11.2. Ibridazione in situ fluorescente (FISH)	43
1.11.3. PCR: principi base	45
1.12. Monitoraggio della LMC e definizione dei criteri di risposta	47
2. OBIETTIVI DELLO STUDIO	50

3. MATERIALI E METODI	51
3.1. Analisi citogenetica convenzionale	51
3.2. Bandeggio Cromosomico	52
3.2.1. Bandeggio GAW	53
3.3. FISH	54
3.3.1. Sonde utilizzate	54
3.3.2. Metodica	59
3.4. Metodica RQ-PCR	60
3.5. Analisi statistica	64
4. RISULTATI	65
4.1. I riarrangiamenti Ph-masked	65
4.2. Protocollo LMC 021-022-023	71
4.3. Traslocazioni t(9;22) varianti	72
4.3.1. Identificazione dei diversi meccanismi mediante FISH	75
4.3.2. Risposta al trattamento con Imatinib	78
4.4. Alterazioni citogenetiche addizionali al cromosoma Philadelphia alla diagnosi	81
4.4.1. Analisi citogenetica	83
4.4.2. Risposta alla terapia con Imatinib e sopravvivenza	85
5. DISCUSSIONE	89
6. BIBLIOGRAFIA	101

1. INTRODUZIONE

1.1 Le Sindromi Mieloproliferative

Le sindromi mieloproliferative sono neoplasie del sistema emopoietico caratterizzate dall'alterata produzione di cellule mieloidi, mature o immature.

Tali neoplasie possono originare da una cellula staminale già orientata verso la linea mieloide. Più spesso, però, la cellula staminale colpita dall'evento neoplastico, è multipotente e non ancora orientata: in questi casi, è il fenotipo della neoplasia ad essere mieloide, anche se nel suo decorso possono insorgere caratteristiche linfoidi (1).

Le sindromi mieloproliferative possono essere distinte in acute, subacute e croniche; tale distinzione è riferita al decorso e alla durata della malattia. In particolare, le sindromi mieloproliferative croniche sono caratterizzate da un clone neoplastico costituito da cellule che maturano e differenziano come la controparte normale.

1.2 La Leucemia Mieloide Cronica.

La leucemia mieloide cronica (LMC) rappresenta la sindrome mieloproliferativa cronica maggiormente studiata dal punto di vista biologico e costituisce un modello di riferimento per patologie analoghe.

La LMC è caratterizzata dall'aumentata espansione clonale della linea granulocitaria con trasformazione in leucemia acuta.

Il decorso clinico della LMC si articola in tre fasi: fase cronica, fase accelerata e crisi blastica.

Durante la fase cronica, della durata di circa 3-5 anni, si assiste all'espansione clonale della popolazione leucemica, ancora in grado di differenziarsi normalmente.

Con il progredire della malattia, la cellula leucemica perde la capacità di maturare. In fase accelerata (FA) i pazienti mostrano segni di progressione, senza però avere ancora caratteristiche di leucemia acuta. Tale fase è caratterizzata da: progressiva anemizzazione, riduzione o aumento delle piastrine, leucocitosi con alterazione della formula leucocitaria a causa dell'aumento dei precursori della granulocitopoiesi.

All'esame biptico, il midollo osseo può mostrare segni di fibrosi e crescenti aggregati di blasti. Possono comparire segni clinici quali: astenia, febbre, dimagrimento, sudorazioni profuse notturne, dolori ossei e muscolari.

Quando la percentuale di blasti in circolo è superiore al 10% o quando quella dei blasti midollari è superiore al 50%, allora la malattia mostra le

caratteristiche di sindrome mieloproliferativa acuta, con accumulo di blasti trasformati, bloccati ad uno stadio precoce di differenziamento. Tale fase è nota come crisi blastica (CB).

In un terzo dei casi, i blasti hanno una morfologia linfoide ed esprimono in superficie i tipici markers linfoidi come il CD10. Nei 2/3 dei casi, i blasti hanno un fenotipo simile a quello della leucemia mieloide acuta e formano un gruppo eterogeneo.

La LMC è una malattia relativamente rara, con un'incidenza di 1-1,5 casi/100.000 abitanti l'anno. Il picco d'incidenza si colloca tra la 5^a e la 6^a decade di età con un rapporto maschio/femmina di 1,4:1. E' rara nel bambino.

La diagnosi è occasionale in circa il 30% dei pazienti, l'85% dei quali è in fase cronica.

I sintomi, quando presenti, sono generici e di modesta entità. Essi possono essere distinti in due gruppi:

1. sintomi dipendenti dall'espansione della massa granulocitaria e piastrinica, legati quasi esclusivamente all'aumento di volume nella milza;
2. sintomi in parte causati dall'anemizzazione e in parte generici: astenia, calo ponderale, febbre o febbricola, dolori ossei e muscolari, sudorazioni profuse notturne.

I segni clinici della malattia, all'esame obiettivo, sono scarsi e si riassumono con splenomegalia (notevole nel 40% dei casi) dovuta a metaplasia mieloide dell'organo. Epatomegalia significativa è presente in meno del 10% dei casi.

1.2.1 Laboratorio

L'esame emocromocitometrico e morfologico del sangue periferico è fondamentale per l'orientamento diagnostico. Mostra una leucocitosi, variabile da poche migliaia di leucociti per mm^3 a centinaia di migliaia, con una formula leucocitaria caratteristica per la presenza e per la prevalenza di tutte le cellule della linea granulocitaria, in proporzione crescente dal mieloblasto al granulocito maturo. Il numero delle piastrine è normale in 2/3 dei casi, aumentato in un 1/3 dei casi. L'anemia è presente in 1/3 dei casi in forma lieve; in forma marcata nel 10% dei casi.

L'esame citologico (per aspirato) e istologico (per biopsia) del midollo osseo mostra un quadro di marcata ipercellularità con iperplasia di tutta la granulopoiesi e, in molti casi, anche della megacariocitopoiesi. Questi aspetti midollari della LMC, benché relativamente caratteristici, non sono mai assolutamente diagnostici.

La diagnosi deve obbligatoriamente includere la dimostrazione della presenza dell'alterazione cromosomica t(9;22) e/o molecolare (riarrangiamento BCR-ABL), caratteristici della malattia.

1.2.2 Prognosi

Molti elementi clinici hanno valore prognostico, ma bastano pochi fattori (età, dimensione della milza, numero delle piastrine e percentuale dei blasti nel

sangue periferico) per calcolare il rischio relativo e l'aspettativa di vita del paziente, secondo una formula elaborata da Sokal, et al. (2).

1.3 Il cromosoma Philadelphia

La leucemia mieloide cronica (LMC) è caratterizzata dalla presenza del *cromosoma Philadelphia (Ph)*(3) (Fig.1).



Figura 1 : Cariotipo 46,XY,t(9;22)(q34;q11).

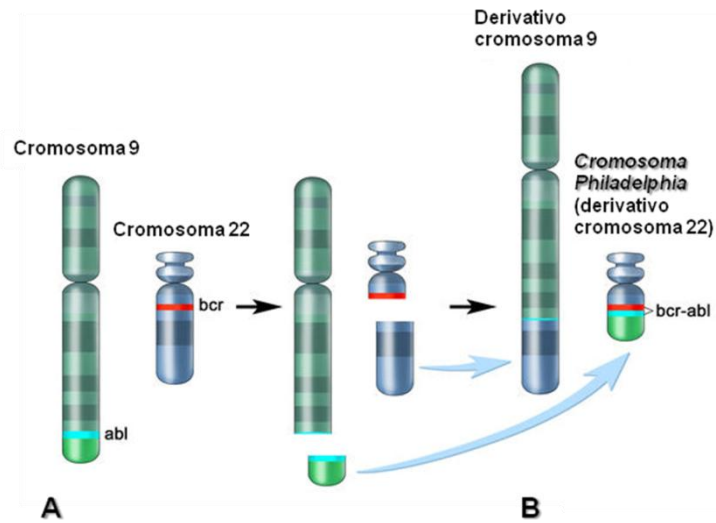


Figura 2: Traslocazione t(9;22): le rotture cromosomiche a livello dei geni ABL e BCR sui cromosomi normali (A) determina la formazione del cromosoma 9 derivativo e del cromosoma di Philadelphia (cromosoma 22 derivativo). Sul cromosoma Ph si forma il gene ibrido di fusione BCR/ABL (B)

Per molti anni, il cromosoma Philadelphia è stata la sola anomalia citogenetica conosciuta associata ad una specifica patologia umana maligna.

A livello molecolare, la traslocazione t(9;22) determina la formazione sul cromosoma Ph, di un gene ibrido, BCR/ABL, derivante dalla fusione del proto-oncogene c-ABL (originariamente situato sul cromosoma 9) con il gene BCR (originariamente localizzato sul cromosoma 22) (Fig.2).

In condizioni fisiologiche, l'attività tirosin-chinasica di Abl è regolata dalla regione che si trova all'estremità amino-terminale della proteina. Nella proteina ibrida bcr-abl, questa regione viene persa e viene sostituita dalla porzione amino-terminale di BCR, che contiene un dominio di oligomerizzazione. Il risultato è l'attivazione incontrollata di BCR/ABL, che porta ad una continua

stimolazione della proliferazione cellulare, ad un blocco dell'apoptosi e ad un'alterata adesione delle cellule allo stroma midollare. Infine va ricordato che ABL è una tirosin-chinasi non recettoriale che ha fisiologicamente sede nel nucleo e nel citoplasma e perde una delle sue funzioni chiave, che è quella di partecipare alla riparazione del DNA in seguito a stress genotossici. Questo favorisce l'instaurarsi di una instabilità genomica generalizzata, che è alla base dell'accumulo di mutazioni e alterazioni genetiche e cromosomiche addizionali che determinano la progressione della malattia dalla fase cronica alla crisi blastica.

Il punto di rottura sul cromosoma 9 è stato localizzato, nella maggior parte dei pazienti, in una sequenza intronica di 300 Kb tra gli esoni 1°, 1b e 2, mentre sul cromosoma 22 all'interno del gene BCR, formato da 23 esoni, i breakpoints possono interessare più regioni, con conseguente formazione di almeno tre distinti geni di fusione codificanti per proteine a diverso peso molecolare che risultano essere associati a tre diverse forme di leucemie (4):

- *p190*: punto di rottura sul cromosoma 22 fra gli esoni e1-e2 (Minor Breakpoint Cluster region, m-bcr), associata al 20-30% delle leucemie linfoblastiche acute (LAL);
- *p210*: punto di rottura tra gli esoni b1-b5 (Major Breakpoint Cluster region, M-bcr, circa 5.8 Kb), associata al 90% delle LMC;
- *p230*: con punto di rottura tra gli esoni e19-e20 (zona di rottura centromerica rispetto a M-bcr), associata ad un sottogruppo di pazienti con leucemia cronica neutrofila (LCN) (Fig.3).

Non è chiaro se le differenze nelle attività delle tre proteine rendono conto della loro associazione a diversi fenotipi della malattia o se l'espressione di ogni proteina avviene in una distinta linea emopoietica. È stato dimostrato che l'aumento della lunghezza della porzione di BCR nella proteina di fusione è correlata a una diminuzione dell'attività tirosinchinasica di ABL: di conseguenza la p230 mostra un'attività tirosinchinasica più bassa rispetto a p210 e p190, e a sua volta p210 ha attività inferiore a p190.

Gli oncogeni BCR-ABL differiscono per la porzione di BCR inclusa: tale caratteristica nella struttura potrebbe essere la causa delle loro caratteristiche biologiche e quindi della diversa malattia clinica associata ad ognuna. È possibile che i breakpoints in BCR che determinano p190 possano avvenire in maniera preferenziale nelle cellule B immature, mentre quelli che determinano p210 avvengano nelle cellule staminali (5).

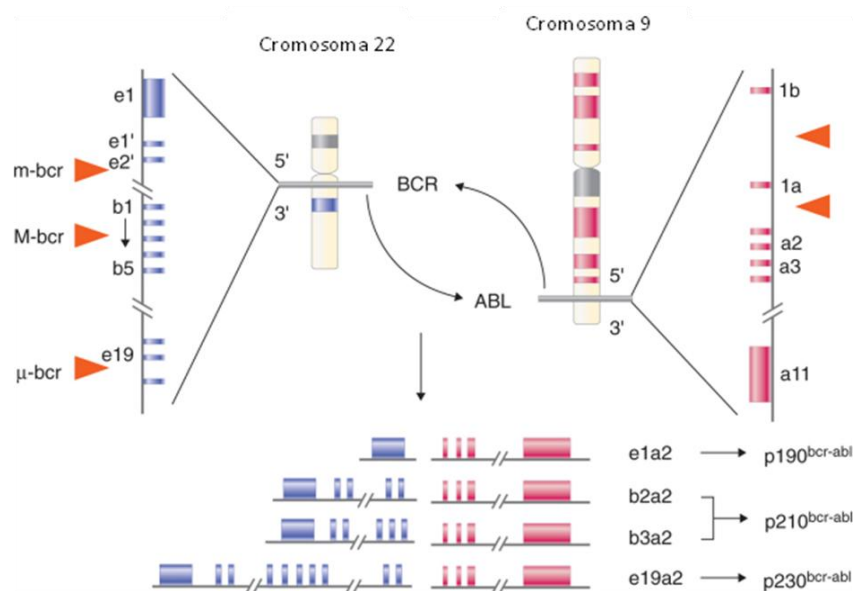


Figura 3: Traslocazione t(9,22) e formazione dei differenti trascritti chimerici.

Il cromosoma Philadelphia è presente nel 95% dei casi di leucemia mieloide cronica alla diagnosi. Inoltre, è presente nel 5% dei bambini e nel 15-30% degli adulti con leucemia acuta linfoide e nel 2% di pazienti con leucemia acuta mieloide. Nel 5% dei casi che non presentano cromosoma Philadelphia all'analisi citogenetica, il riarrangiamento BCR-ABL viene individuato con tecniche di FISH e/o di biologia molecolare. In questi casi, cosiddetti LMC Ph-negative (Ph-masked) possono avvenire probabilmente meccanismi più complessi, tra cui l'inserzione del riarrangiamento BCR-ABL dal cromosoma 22 al cromosoma 9, successiva alla t(9;22) iniziale. Per questi motivi l'alterazione non è visibile con analisi di citogenetica convenzionale.

Non è stato chiarito quali siano i meccanismi in grado di favorire la traslocazione. Una tra le ipotesi proposte prevede la presenza di siti fragili in corrispondenza dei punti di rottura sul DNA.

Secondo un'altra ipotesi, invece, sarebbe la distribuzione spaziale dei cromosomi 9 e 22 prima dell'allineamento in metafase che, comportando la vicinanza dei geni ABL e BCR, potrebbe favorire una ricombinazione illegittima. L'analisi delle sequenze fiancheggianti i punti di rottura non ha, tuttavia, rilevato la presenza di sequenze ripetute potenzialmente favorevoli le traslocazioni (6).

1.4 Patogenesi della LMC: ruolo di p210^{BCR-ABL}

Per comprendere i meccanismi attraverso i quali il gene ibrido di fusione BCR/ABL, e quindi le proteine che da esso si formano, abbia il ruolo da protagonista nella patogenesi della LMC, è importante analizzare la funzione che viene normalmente svolta dai geni coinvolti nella traslocazione t(9;22): ABL e BCR (7).

1.4.1 Il gene ABL

Il gene ABL è costituito da 12 esoni, si estende su un segmento di 230 kilobasi ed è orientato con l'estremità 5' più vicina al centromero e l'estremità 3' più vicina al telomero. La trascrizione di questo gene viene effettuata con un meccanismo di splicing alternativo per cui possono essere prodotti due mRNA di 6 o 7 kb, che possiedono rispettivamente l'esone 1a o l'esone 1b e che hanno in comune tutti gli altri esoni numerati da 2 a 11. L'esone 1b dista circa 200kb dall'estremità 5' dell'esone 1a. Esso codifica per una tirosina-chinasi non recettoriale, con una debole attività enzimatica, di peso molecolare di 145 kilodalton (p145), con importanti funzioni nella nella regolazione del ciclo cellulare e trasduzione di alcuni segnali, mediati dalle integrine e provenienti dall'ambiente extra-cellulare.

La p145 codificata da entrambi i messaggeri contiene (Fig.4):

- uno dei due domini N-terminali codificati alternativamente dagli esoni 1a o 1b;
- il dominio SH3 (SH (SRC homology) indica l'omologia esistente con il proto-oncogene cellulare cSRC corrispondente all'oncogene virale vSRC che determina il sarcoma di Rous), il quale ha una funzione regolatoria poiché lega la binding protein BP1 al fine di inibire l'attivazione della regione SH1 situata più a valle della stessa proteina;
- il dominio SH2 che ha una affinità elevata verso il primo esone di BCR. Difetti nell'integrità funzionale di SH2 diminuiscono il legame fosfotirosinico e riducono le capacità trasformanti di ABL.
- il dominio SH1 che possiede un'attività di auto-fosforilazione su un residuo di tirosina in posizione 412;
- il dominio di localizzazione nucleare il quale è in grado di legarsi al DNA nucleare, ma non durante la mitosi;
- il dominio di legame all'actina del citoscheletro;
- il dominio C-terminale.

Quando la regione N-terminale della proteina è codificata dall'esone 1a, la proteina si localizza nel nucleo, mentre quando è codificata dall'esone 1b, il residuo di glicina situato all'estremità si lega ad una molecola di acido miristico, che ha caratteristiche idrofobiche, e ciò permette alla proteina di ancorarsi alla membrana plasmatica.

Tramite il legame con la p53, la p145, a localizzazione prevalentemente nucleare, induce un blocco proliferativo in fase G1/S, a livello della quale avviene la riparazione a eventuali danni al DNA o l'innesco dell'apoptosi.

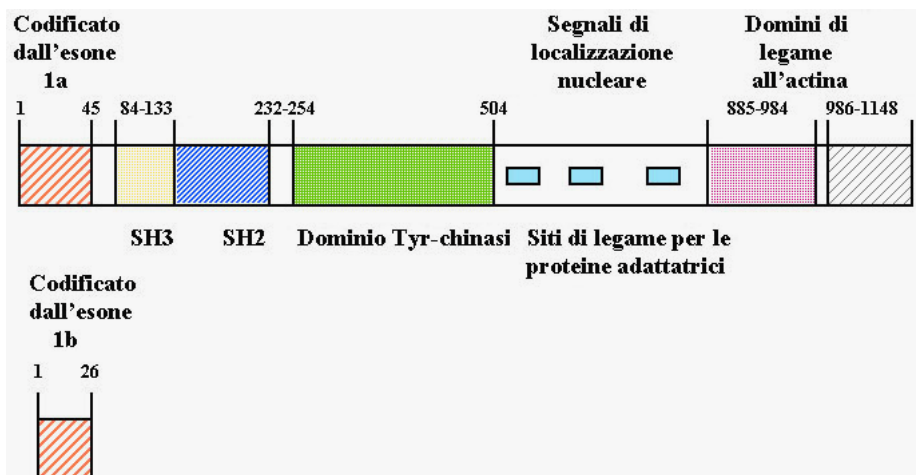


Figura 4: Struttura del gene ABL

1.4.2 Il gene BCR

Il gene BCR si estende in una regione lunga 130 kb situata sul cromosoma 22, orientata con l'estremità 5' più vicina al centromero e l'estremità 3' più vicina al telomero. E' costituito da 23 esoni ed è trascritto in due mRNA lunghi 4.5 kb e 7 kb che apparentemente codificano per la stessa proteina citoplasmatica di 160 kilodalton (p160), con un'attività serina/treonina chinasi e avente un ruolo nella trasduzione dei segnali cellulari.

Essa possiede diversi domini (Fig.5):

- il dominio N-terminale;
- il dominio con l'attività serina/treonina chinasi;
- i siti di binding SH2;
- il dominio di scambio GTP/GDP;
- il dominio C-terminale che funziona come una proteina che attiva le GTPasi (GAP) per la p21rac



Figura 5: Struttura del gene BCR

La proteina p160 si localizza esclusivamente a livello citosolico, può modificare la propria conformazione sterica tramite il legame con GTP/GDP ed è in grado di formare omotetrameri in vitro.

1.4.3 La p210^{BCR/ABL}

La formazione della proteina ibrida p210^{BCR-ABL} porta ad una alterazione strutturale di alcuni dei siti regolatori delle proteine normali ABL e BCR (8-14):

- l'attività tirosin-kinasica di ABL, normalmente presente soprattutto a livello nucleare, viene trasferita in modo prevalente nel citoplasma e costitutivamente attivata, sia a causa della perdita della azione inibitoria del dominio SH3, sia attraverso la oligomerizzazione mediata dal dominio N-terminale di BCR con conseguente autofosforilazione in siti multipli;
- la configurazione spaziale di alcuni domini di BCR si modifica, rendendoli disponibili al legame con proteine che attivano vie diverse di traduzione del segnale coinvolgenti RAS, STAT, JAK-1, JUN, MYC e PIP3-kinasi;
- aumenta in modo significativo l'affinità del dominio C-terminale di ABL per la f-actina, rispetto alla p145^{ABL}.

Queste alterazioni conferiscono alla p210^{BCR-ABL} un'elevata attività tirosinchinasica, che ha un ruolo centrale nel processo leucemogenetico poiché è in grado di mantenere una emopoiesi Ph-positiva e di indurre la progressione attraverso 4 meccanismi principali (8-14) (Fig.6):

1. modificano la capacità di adesione dei progenitori mieloidi sia allo stroma, con aumento della loro rilascio nel sangue periferico, sia alla matrice extracellulare, con perdita del controllo che essa esercita sulla proliferazione. Le cellule Ph-positive presentano una disregolazione della traduzione del segnale mediata dal sistema integrinico e sono caratterizzate da una

iperfosforilazione di Crkl, proteina coinvolta nei processi di adesione attraverso l'associazione con altri fattori tra cui la paxillina;

2. causano l'attivazione di segnali mitogenici. Il sistema RAS è coinvolto sia in maniera diretta, tramite la sua fosforilazione, che indirettamente, tramite la fosforilazione di substrati intermedi (Shc, Crkl). Il coinvolgimento del sistema JAK-STAT è stato dimostrato in numerose linee cellulari Ph-positive. I due sistemi, RAS e JAK-STAT, rendono la cellula Ph-positiva indipendente dai fattori di crescita;
3. determinano instabilità genomica. L'aumentata proliferazione avviene a spese della fase G₀/G₁ e comporta probabilmente l'abolizione del punto di controllo G₁/S, cruciale per la riparazione di eventuali danni del DNA prima della replicazione del genoma. Questo potrebbe favorire l'acquisizione delle ulteriori anomalie genetiche, che sembrano avere un ruolo importante nella progressione alla fase accelerata/blastica. Secondo un'altra ipotesi, l'instabilità genomica potrebbe essere pre-esistente alla comparsa del cromosoma Ph. Da un punto di vista citogenetico, le alterazioni più frequenti che si accompagnano alla progressione sono la trisomia dell'8, l'isocromosoma 17, la duplicazione del Ph e la trisomia del 19 (major routes). Sono state, inoltre, descritte numerose mutazioni inattivanti i geni codificanti per proteine ad attività onco-soppressiva come p53, p16, RB1. In particolare, alterazioni di p53 (delezioni, riarrangiamenti, mutazioni) si ritrovano nel 20-30% dei pazienti in crisi blastica e associate esclusivamente

a trasformazione mieloide, mentre le anomalie di RB1 sono maggiormente associate a trasformazione linfoide;

4. inibiscono la morte cellulare programmata (apoptosi), attraverso l'attivazione di alcuni pathways di trasduzione del segnale, tra cui RAS, JAK-STAT e BCL-2.

In particolare, le cellule CML esprimono un numero di molecole anti-apoptiche che possono contribuire ad accrescere la sopravvivenza delle cellule leucemiche, come le proteine della famiglia di Bcl2 (Bcl-XL, Mel-1, Bcl-2). Il ruolo e gli effetti di Bcl-2 e delle altre molecole anti-apoptiche potrebbero dipendere dalla presenza di inibitori endogeni e antagonisti espressi nelle cellule leucemiche, uno dei quali è rappresentato dalla proteina Bim. I membri della famiglia di Bcl-2, sia ad azione pro- che anti-apoptica agiscono, tra l'altro, regolando la traslocazione del citocromo c dal mitocondrio al citosol, evento che attiva la cascata delle caspasi.

Fisiologicamente, i livelli di Bim sono regolati da citochine, come IL-3, mentre la fosforilazione e la conseguente degradazione di Bim da parte di p210 è uno dei principali meccanismi attraverso cui le cellule leucemiche diventano resistenti all'apoptosi (15).

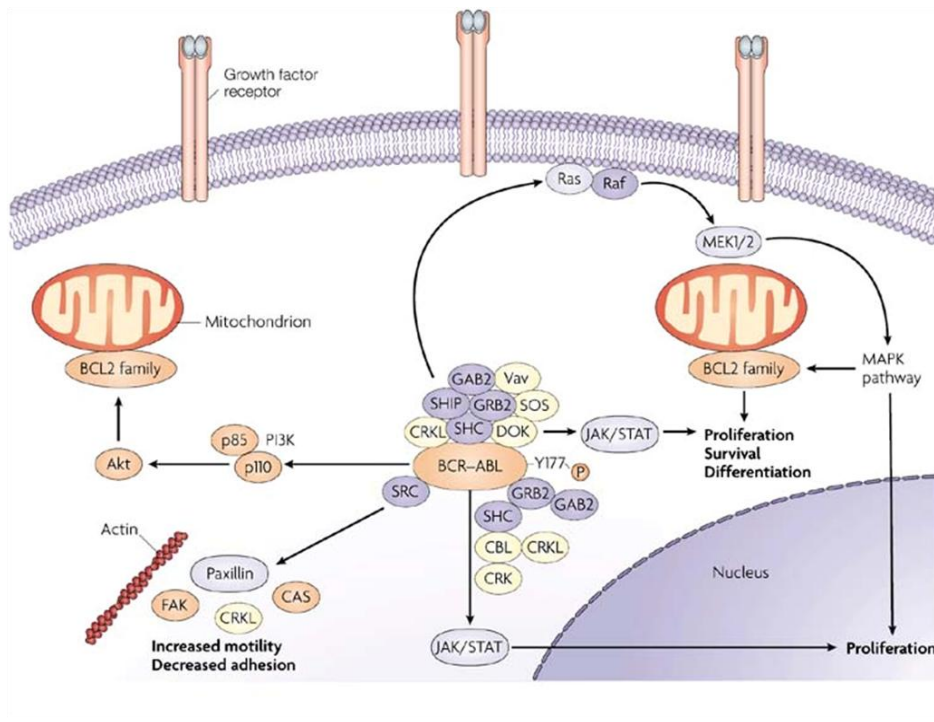


Figura 6: Meccanismo d'azione di p210^{BCR-ABL}

1.5 La cellula staminale leucemica nella progressione della LMC

La cellula staminale emopoietica colpita dall'evento neoplastico subisce profonde modificazioni, che determinano la trasformazione ad una cellula staminale leucemica Philadelphia-positiva. Inizialmente, tale cellula mantiene la propria capacità differenziativa, determinando un'iperplasia granulocitaria che si osserva tipicamente nella fase cronica della LMC.

Allo stesso tempo, però, i progenitori leucemici giocano un ruolo centrale nella progressione della malattia e, quindi, nella resistenza alla terapia. Come dimostrato da numerosi studi, nonostante la terapia, tali progenitori leucemici

Philadelphia-positivi persistono nei pazienti LMC. Questo potrebbe essere attribuito in parte alle cellule leucemiche quiescenti che risiedono in nicchie protette dove, nel tempo, acquisiscono mutazioni genetiche addizionali. Inoltre, l'interazione tra le cellule leucemiche e la nicchia midollare potrebbe determinare "segnali maligni" nel microambiente midollare (segnali infiammatori, stimolazione della produzione di citochine e interferone) che facilitano la riprogrammazione dei progenitori, al fine di evolvere in cellule leucemiche che perdono le loro capacità differenziative, tipiche della crisi blastica. In questo modo, questa popolazione di cellule quiescenti rappresenta un'importante base su cui si fonda la resistenza terapeutica e la ricaduta della malattia (16).

La riprogrammazione delle cellule staminali determina caratteristiche che permette loro di essere distinte da quelle che si ritrovano nella fase cronica: aumentata sopravvivenza, capacità di self-renewal e acquisizione della capacità di quiescenza. E' possibile che un fattore critico in questa trasformazione sia la deregolazione del ciclo cellulare, che può essere causato dall'alterazione nella fosforilazione di proteine regolatorie e/o dalla loro alterata localizzazione (8-18).

1.6 Traslocazioni t(9;22) varianti

Nella maggior parte dei casi osservati di LMC, il cromosoma Philadelphia deriva dalla traslocazione reciproca e bilanciata che coinvolge i cromosomi 9 e 22. Nel 5-10% delle varie casistiche, oltre ai cromosomi 9 e 22, possono essere coinvolti 1 o più cromosomi (fino ad un massimo di 5), determinando così *traslocazioni varianti del cromosoma Ph* (Fig.7).

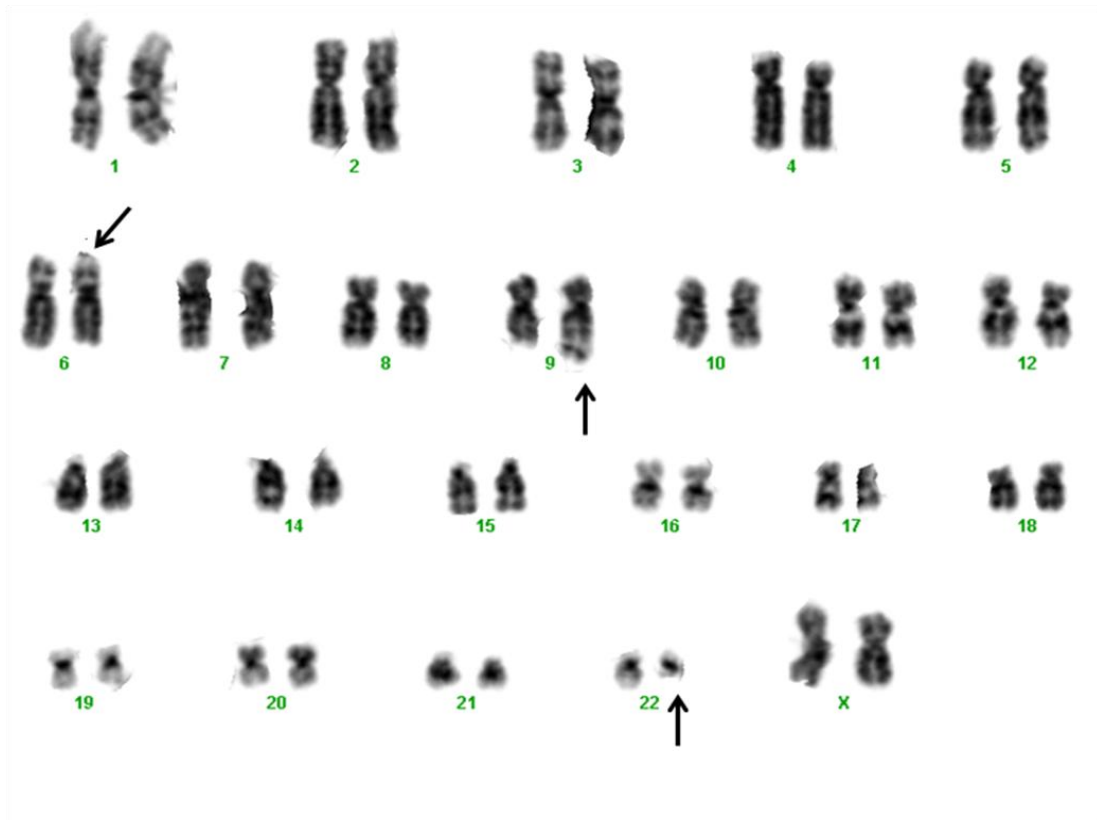


Figura 7: 46,XX,t(6;9;22)(p23;q34;q11)

Inizialmente erano state riconosciute due forme di traslocazioni varianti:

- semplice: la porzione del cromosoma 22q è traslocata in un cromosoma diverso dal 9, il quale non sarebbe coinvolto nella traslocazione;
- complessa: oltre ai cromosomi 9 e 22, ne vengono coinvolti altri (da 1 a 3).

Si pensava che le traslocazioni varianti semplici non vedessero coinvolto il cromosoma 9, poiché all'analisi di citogenetica convenzionale questo sembrava essere normale. In realtà, mediante tecniche di citogenetica molecolare (FISH) è stato dimostrato che in questi casi si trattava di riarrangiamenti più complessi (19). Il fatto che all'analisi citogenetica, i cromosomi 9 si mostravano essere normali era dovuta al coinvolgimento di piccole porzioni degli altri cromosomi difficilmente rilevabili al microscopio.

La FISH ha permesso di analizzare e caratterizzare in maniera più specifica le traslocazioni varianti. Da un lato è stato osservato come esistano bande cromosomiche più frequentemente coinvolte, come 1p, 11q23, 12p13 e 17q25 (20).

Dall'altro lato sono stati avanzati due tipi di meccanismi di origine, che presentano riarrangiamenti differenti in FISH (21-23):

- 1-step: la traslocazione avviene coinvolgendo simultaneamente 3-4 differenti cromosomi (più frequente);
- 2-step: caratterizzato da due traslocazioni sequenziali, in cui alla classica t(9;22) segue una seconda traslocazione, in cui vengono coinvolti ulteriori cromosomi.

Inoltre, esistono casi in cui la traslocazione variante è accompagnata da eventi che determinano ulteriori riarrangiamenti, contemporaneamente alla formazione del gene BCR/ABL, come inserzioni e/o delezioni.

Quando la traslocazione variante è il risultato di un meccanismo a 2-step, le traslocazioni sequenziali che la determinano avvengono in rapida successione, dove la t(9;22) variante deriva direttamente da quella classica. Ciò dimostra il motivo per cui, all'analisi citogenetica, non si osservano due cloni distinti e ad evoluzione indipendente, uno con t(9;22) classica e l'altro con traslocazione variante.

La prognosi dei pazienti con t(9;22) variante del cromosoma Ph è stata oggetto di numerosi studi. Alcuni di questi hanno suggerito come tali pazienti avessero una prognosi peggiore rispetto a quelli con traslocazione classica, probabilmente a causa delle numerose rotture cromosomiche necessarie per la formazione della traslocazione variante; queste rotture, indicherebbero una maggiore fragilità e instabilità genetica. Con l'introduzione dell'imatinib nel trattamento in prima linea della LMC, altri studi sostenevano come pazienti con traslocazioni varianti non mostravano prognosi significativamente diversa rispetto a quelli con traslocazione classica, in termini di risposte citogenetiche, molecolari e outcome.

Dato i molteplici coinvolgimenti cromosomici delle traslocazioni varianti, la sopravvivenza potrebbe essere il risultato di numerose interazioni. Nei riarrangiamenti varianti, infatti, potrebbero venire coinvolti oncogeni o geni soppressori in grado di fornire una prognosi peggiore e geni che invece non sono

cruciali per la proliferazione cellulare. Questi pazienti, quindi, presentano alterazioni che possono conferire una cattiva prognosi insieme ad alterazioni che invece ne possono conferire una miglior: il risultato che ne deriva è un equilibrio che determina una prognosi pressoché uguale a pazienti con traslocazione classica e questo ha portato lo European LeukemiaNet a sostenere che le traslocazioni t(9;22) varianti non hanno un impatto sulla risposta di questi pazienti (19-20).

1.7 Delezione del derivativo del cromosoma 9

Nel 10-15% dei pazienti con LMC sono state identificate delezioni genomiche sul derivativo del cromosoma 9 (der(9q)). Esse sono di grandi dimensioni e di ampiezza variabile fino a molte megabasi (0.5-8 Mb) e determinano la perdita di sequenza genomiche (circa 300 geni coinvolti) di entrambi i cromosomi 9 e 22, attorno al breakpoint del cromosoma 9 (26-27).

A causa della variabilità nelle dimensioni delle porzioni genomiche delete e nei punti di rottura a livello dei quali esse avvengono, questo fenomeno determina una considerevole eterogeneità nei pazienti che le presentano.

Oltre a quelle sul der(9q), sono state osservate anche delezioni a livello del breakpoint del cromosoma Ph. Si tratta però di delezioni di piccole dimensioni (8-10 kb) e senza importanza patofisiologica; infatti, la perdita di piccole regioni

introniche, solitamente, sembra non interferire con gli eventi di splicing necessari per la formazione dell'mRNA e quindi della proteina.

Le delezioni del der(9q) non sono di dimensioni tali da essere osservate all'analisi citogenetica. Si tratta, quindi, di alterazioni criptiche che possono essere identificate solo mediante FISH. In particolare, nuclei con delezione del der(9) mostrano la perdita di uno dei due segnali di fusione (che si osservano invece nei nuclei con riarrangiamento classico), poiché essa determina la perdita del gene reciproco ABL-BCR della t(9;22) (Fig.8).

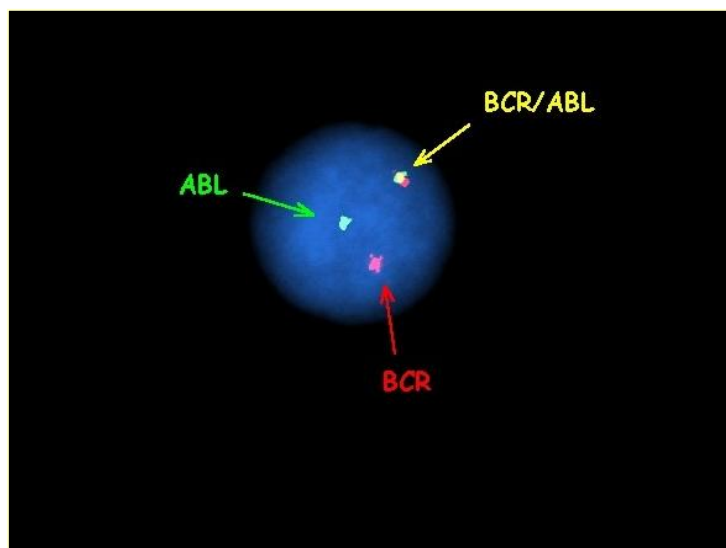


Figura 8: FISH su un nucleo in interfase con sonda Dual-Color Dual-Fusion: la delezione del der(9q) viene identificata dalla perdita di un segnale di fusione.

L'espressione di ABL-BCR non sembra essere correlata alla risposta e alla prognosi dei pazienti LMC, come anche dimostrato dal fatto che la presenza della proteina abl-bcr non è mai stata rilevata.

Le delezioni sul der(9q) si originano alla diagnosi, contemporaneamente alla traslocazione t(9;22) e, quindi, non sono dovute ad un'instabilità genomica, propria della progressione della malattia verso la crisi blastica (28).

Prima dell'introduzione dell'imatinib, era stato suggerito che pazienti che presentavano la delezione del der(9q) e che venivano trattati con chemioterapia convenzionale e/o IFN- α avevano una prognosi peggiore rispetto ai pazienti senza delezione, rappresentando quindi un gruppo di pazienti LMC a rischio elevato (29).

Il principale meccanismo molecolare a supporto della prognosi sfavorevole determinata dalla delezione del der(9q) è caratterizzato dalla perdita di uno o più geni. Essa potrebbe essere sufficiente a causare un effetto neoplastico (aploinsufficienza) oppure potrebbe richiedere la successiva inattivazione del corrispondente allele normale. Come detto, le regioni delete sono ricche in geni, alcuni dei quali sono stati identificati e sono rappresentati da: oncosoppressori, geni che codificano per fattori di trascrizione, componenti dei pathways di trasduzione del segnale o proteine che controllano il ciclo cellulare. Inoltre, le delezioni potrebbero essere una conseguenza della instabilità genetica nel momento della formazione del cromosoma Ph. Quindi, la prognosi negativa rifletterebbe la predisposizione, nel clone maligno, all'insorgenza di alterazioni genetiche addizionali (29).

Tale fattore prognostico negativo è stato successivamente sovvertito dall'introduzione dell'imatinib quale farmaco di elezione nella cura dei pazienti LMC in fase cronica, che ha determinato una prognosi sovrapponibile in termini di risposta e sopravvivenza nei pazienti con e senza delezione (30).

1.8 Alterazioni citogenetiche aggiuntive al cromosoma Philadelphia

Se da una parte il riarrangiamento BCR-ABL è considerato la causa patogenetica della LMC, dall'altro la progressione dalla fase cronica alla fase accelerata fino alla crisi blastica è frequentemente accompagnata o preceduta dall'acquisizione di alterazioni citogenetiche aggiuntive (ACA) nel clone Philadelphia positivo, definita *evoluzione clonale*.

Alla diagnosi, nei pazienti LMC in fase cronica la frequenza di tali alterazioni è di ~5%, mentre aumenta durante il corso della malattia, dal 30% in fase accelerata fino a più dell'80% nella crisi blastica. Tale fenomeno sembra riflettere l'instabilità genomica delle cellule leucemiche (6-7).

È stato osservato come le ACAs siano chiaramente non casuali, poiché ne sono state osservate di più frequenti, definite anomalie "*major route*": trisomia del cromosoma 8 (Fig.9A), isocromosoma 17 (i(17q)) (Fig.9B), duplicazione del cromosoma Ph (Fig.9C), trisomia del cromosoma 19; altre meno frequenti, le anomalie "*minor route*", sono: trisomia del cromosoma 21, monosomia del cromosoma 7 e la t(3;21)(q26;q22) (31). Un'altra anomalia aggiuntiva

frequentemente osservata è rappresentata dalla perdita del cromosoma Y nei pazienti di sesso maschile. Alcuni autori la inseriscono tra le anomalie “major route” ma il suo impatto sulla prognosi è ancora molto dibattuto: in uno studio recente è stato affermato come essa sia sfavorevole in termini di RCgC, MMolR, EFS e OS. Altri, invece, la considerano solo come una perdita fisiologica dovuta all'età (31-35).

L'ordine temporale della comparsa delle ACAs varia, ma esse sembrano mostrare un'ordine preferenziale, iniziando dall'i(17q), seguita dalla trisomia 8, dalla duplicazione del Ph e infine dalla trisomia 19.

Le ACAs sono associate a diversi profili prognostici: alcune come la t(3;21) e la duplicazione del cromosoma Ph sono indicative di una prognosi negativa e associate ad una rapida progressione verso la crisi blastica, mentre altre sono meno sfavorevoli, come la trisomia 8. Da un punto di vista molecolare la progressione viene più frequentemente associata all'overespressione di BCR-ABL, il riarrangiamento del gene EVI1 (3q26) un'aumentata attività delle telomerasi e mutazioni dei geni oncosoppressori RB1, p53 e CDKN2A (31).

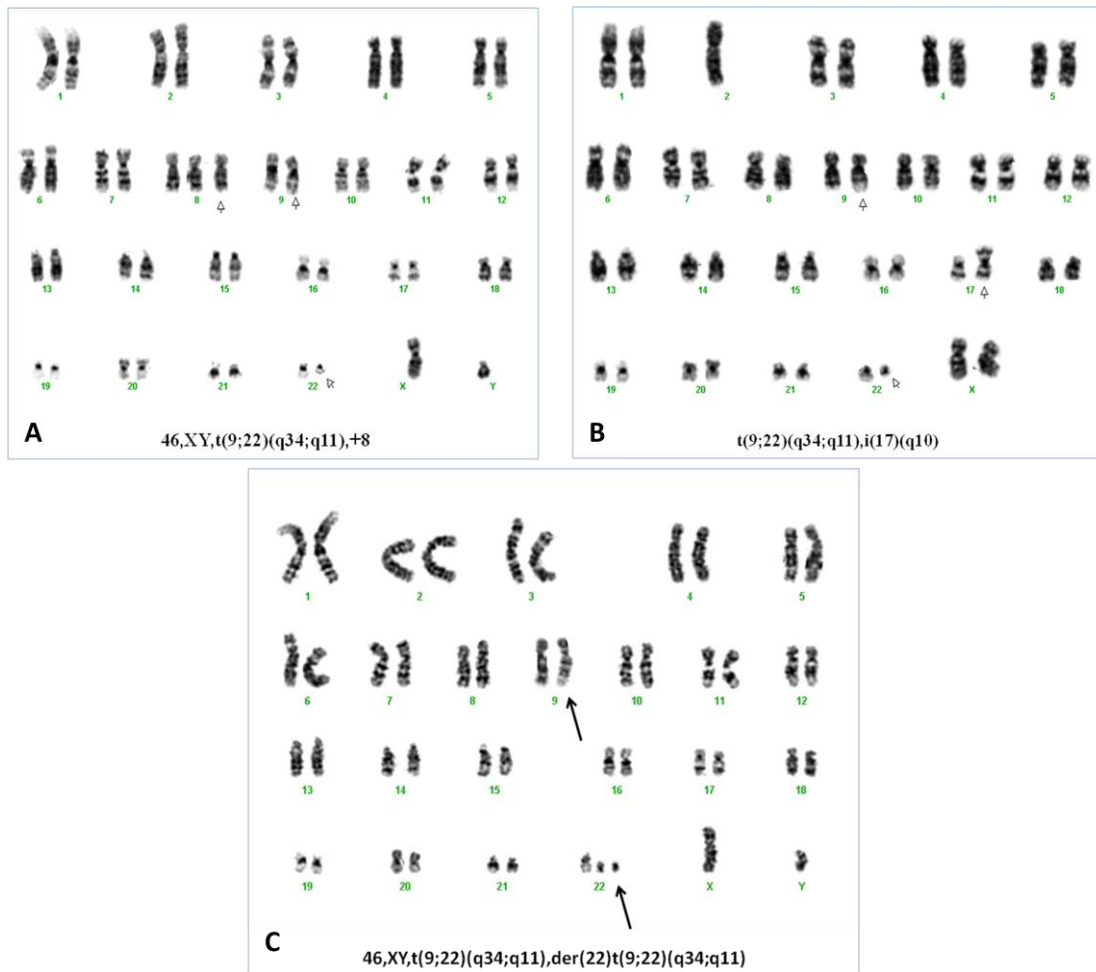


Figura 9: Cariotipi con ACAs oltre la t(9;22): A) trisomia 8; B) isocromosoma 17; C) duplicazione del cromosoma Ph

Prima dell'Imatinib, l'evoluzione citogenetica variava significativamente in relazione al trattamento utilizzato in fase cronica: ad esempio, la trisomia 8 era maggiormente osservata dopo terapia con busulfano che con idrossiurea, mentre le ACAs osservate dopo IFN- α o trapianto di midollo osseo sono spesso casuali e occasionalmente transitorie. A parte il forte impatto prognostico di alterazioni quali traslocazioni e inversioni associate a LAM/MDS come

inv(3)(q21q26) e t(3;21)(q26;q22), nella crisi blastica poche alterazioni permettono di distinguere tra BC linfoide e mieloide.: i(17q) e le mutazioni di p53 sono più comuni nella CB mieloide, mentre la monosomia 7, l'iperdiploidia e delezioni di CDKN2A sono più frequenti nella CB linfoide.

Il significato prognostico delle ACAs non è uniforme e dipende dal tipo di anomalia, poichè è stato osservato che anomalie come l'i(17q) e la duplicazione del Ph sono infauste. Tuttavia, l'impatto clinico delle ACAs così come delle anomalie genetiche è probabilmente modificato dal tipo di trattamento utilizzato (31).

Lo European LeukemiaNet stabilisce che, mentre l'insorgenza di ACAs durante la terapia rappresenti la progressione della malattia nonché una forma di resistenza e fallimento alla terapia con TKI, la presenza di anomalie aggiuntive nei pazienti LMC in fase cronica alla diagnosi rappresenti un rischio per la prognosi e quindi richieda un monitoraggio più accurato di tali pazienti.

1.9 LMC Philadelphia-negativa o Ph-masked.

Una piccola quota di LMC (5-10%), pur mostrando le tipiche caratteristiche cliniche, non presenta all'analisi citogenetica il cromosoma Ph e viene per questo definita come **LMC Philadelphia negativa (Ph-) o Ph-masked** (36).

La traslocazione nelle LMC Ph-masked può essere identificata solo mediante FISH o PCR (qualitativa e/o quantitativa).

In particolare, a differenza della PCR che permette di rilevare la sola presenza del trascritto, la FISH su metafase permette anche di identificare la posizione del riarrangiamento.

In questi casi, infatti, il gene ibrido BCR-ABL è il risultato dell'inserzione del gene ABL sul cromosoma 22 dove si trova BCR. Quindi, BCR-ABL si forma senza modificare la morfologia cromosomica e questo ne spiega il cariotipo normale all'analisi citogenetica. Nella maggioranza dei casi LMC Ph-masked, il riarrangiamento BCR-ABL si trova sul cromosoma 22 (come avviene normalmente nei casi Ph-positivi), mentre in una piccola quota di pazienti il riarrangiamento si trova nella regione 9q34 (Fig.10) (36-39).

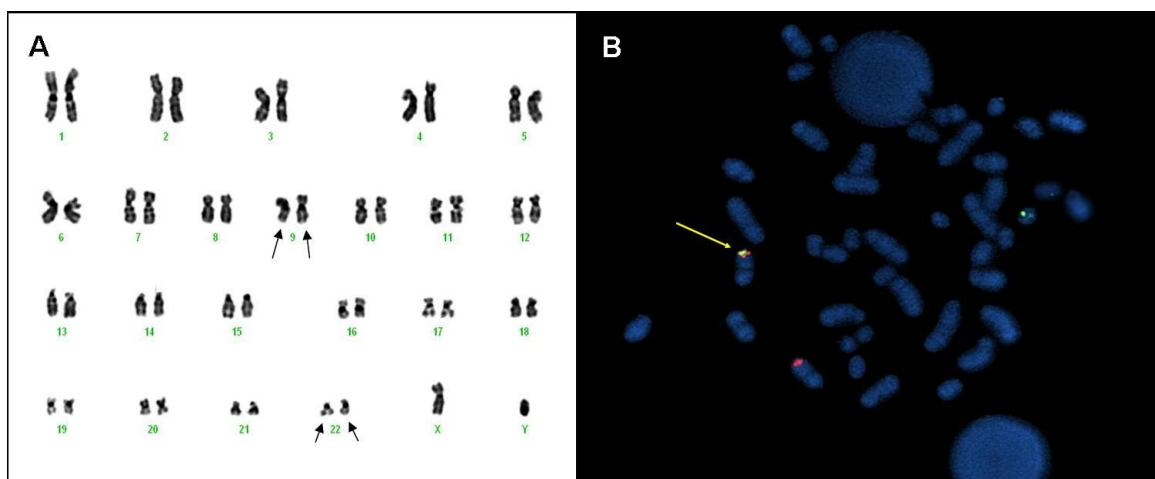


Figura 10: LMC Ph-masked: A) cariotipo con cromosomi 9 e 22 normali; B) FISH su metafase in cui si osserva la localizzazione del riarrangiamento BCR-ABL sul cromosoma 9.

In questi ultimi, la localizzazione di BCR-ABL può avvenire secondo due possibili meccanismi: un meccanismo ad uno step che vede l'inserzione completa o parziale di BCR sul cromosoma 9q34 e un secondo a due step in cui ad una classica t(9;22) ne segue una successiva che determina la posizione finale sul cromosoma 9. Quest'ultimo sembra essere il meccanismo meno probabile dal punto di vista energetico, a causa della quantità di legami che devono rompersi e successivamente riformarsi (36-38).

La prognosi dei pazienti Ph-masked è stata oggetto di controversie in quanto alcuni studi riportavano una prognosi simile a quella dei pazienti LMC Ph+, mentre altri riportavano una prognosi peggiore, in particolare nei pazienti in cui BCR-ABL si trovava sul cromosoma 9q34 (39-45). Quest'ultima osservazione derivava dal fatto che la maggior parte dei casi mostravano un rapido decorso clinico della malattia e/o erano resistenti alla chemioterapia convenzionale.

1.10 La terapia nella LMC

1.10.1 Imatinib Mesilato

A partire dal 1999, la terapia della LMC ha subito profondi cambiamenti con l'introduzione dell'Imatinib Mesilato (Imatinib o STI571 o Gleevec®/Glivec®), un agente antineoplastico sviluppato allo scopo di inibire

selettivamente alcune tirosinchinasi implicate nell'oncogenesi. Imatinib è un inibitore della classe delle 2-fenilammino pirimidine (alla quale appartiene la tirosinchinasi ABL) ed è stato creato usando la struttura del sito di legame dell'ATP delle chinasi (Fig.11) (4, 46).

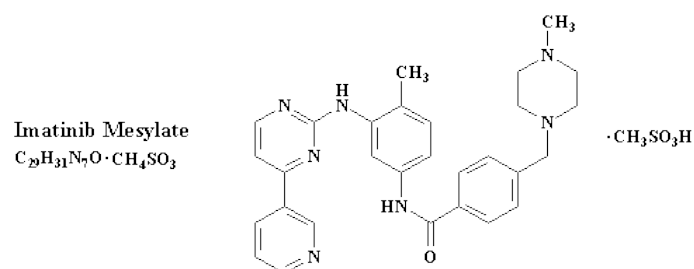


Figura 11: Imatinib Mesylate

Da studi di cristallografia, è stato osservato come Imatinib si legni alla forma inattiva di altre tirosinchinasi oltre ad ABL, come cKit, PDGFR- α e PDGFR- β . Per questo motivo, Imatinib si lega in maniera specifica anche alle sequenze ABL della proteina BCR-ABL (in tutte le sue isoforme: p190, p210, p230, ecc..) quando essa si trova nella conformazione inattiva, impedendo quindi l'interazione con l'ATP ed il passaggio alla forma attiva (Fig.12).

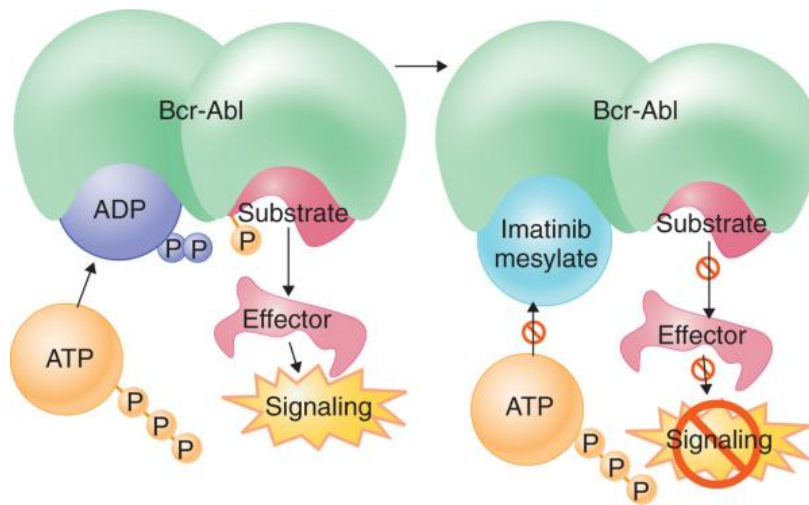


Figura 12: Interazioni dell'Imatinib nella tasca delle tirosinchinasi.

Ne consegue un blocco sia della capacità di BCR-ABL di autofosforilarsi, che della sua capacità di fosforilare proteine bersaglio, attività indispensabili per conferire e mantenere il fenotipo leucemico del clone Ph-positivo (47-48), inibendo quindi la proliferazione e inducendo l'apoptosi cellulare (4, 46) (Fig.13).

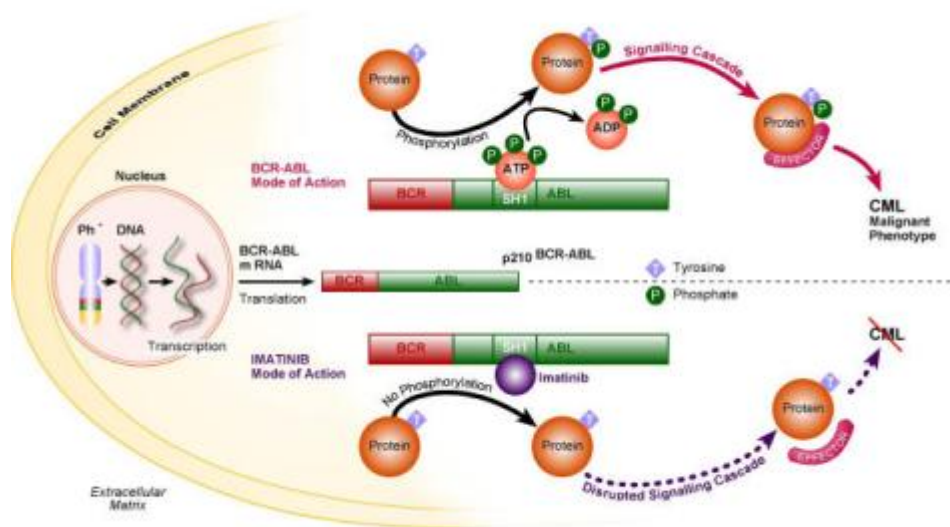


Figura 13: Azione di BCR-ABL e di Imatinib

Imatinib induce una rapida e completa risposta ematologica in quasi tutti i pazienti con LMC Ph⁺ in fase cronica (FC), in circa il 50% di quelli in fase accelerata e in minima parte in quelli che in crisi blastica (CB) o che hanno una LAL Ph⁺. La risposta citogenetica maggiore può essere raggiunta in più del 50% dei pazienti che iniziano il trattamento in FC tardiva (49-50) e in più dell'80% dei pazienti trattati alla diagnosi (51). Molte risposte citogenetiche sono complete e sembrano avere una buona efficienza in termini di sopravvivenza.

L'Imatinib ha segnato una rivoluzione nella terapia, costituendo il capostipite dei farmaci cosiddetti "intelligenti" o "mirati", poiché diretti verso uno specifico bersaglio molecolare e, dunque, con un profilo di tollerabilità estremamente favorevole.

La prima evidenza di efficacia è stata fornita dallo studio di fase I, riservato a pazienti resistenti ad IFN- α trattati a dosi variabili da 25 a 1000 mg al giorno, che ha permesso di identificare, quale dose ottimale d'attacco, la posologia di 400 mg/die, destinata a rimanere la dose di riferimento per gli studi successivi. E' risultata evidente una chiara relazione dose-risposta: i pazienti trattati con \geq 300 mg/die hanno ottenuto una remissione ematologica completa (REC) nel 98% dei casi entro 4 settimane dall'inizio della terapia. Inoltre, il 31% di questi pazienti ha ottenuto una risposta citogenetica maggiore (RCgC) (52-53).

Questi risultati hanno condotto all'apertura di 3 studi multicentrici di fase II: uno studio era mirato ad investigare la tollerabilità e l'efficacia di Imatinib 400/die in pazienti in FC resistenti od intolleranti ad IFN- α , mentre altri due erano dedicati a pazienti in fase avanzata di malattia trattati con dosi di Imatinib variabili fra 400 e 600 mg/die (54-57).

Questi studi hanno portato ad alcune importanti conclusioni:

- il profilo di tollerabilità clinica era particolarmente favorevole, con tossicità ematologica più frequente nelle fasi avanzate di malattia, in relazione più alla compromissione della riserva funzionale staminale ematopoietica normale che ad una tossicità diretta del farmaco;
- il trattamento in FC era associato ad un miglior rate di risposta ematologica e citogenetica (65% RCgM vs 24% in FA e 17% in CB);
- il raggiungimento della REC e della RCgM si associava ad un outcome significativamente migliore (la risposta citogenetica si è confermata marker surrogato di sopravvivenza in tutte le fasi di malattia);

- la dose di 600 mg/die si è mostrata superiore a 400 mg/die nelle fasi avanzate.

Il primo studio che ha permesso di dimostrare in maniera incontrovertibile che l'Imatinib consente di ottenere un livello globale di risposta significativamente superiore rispetto all'IFN è stato uno studio di fase III riservato a pazienti in prima fase cronica (studio IRIS) (58-59): il disegno dello studio prevedeva la randomizzazione (1:1) fra il regime terapeutico standard (IFN associato ad ARA-C a basse dosi) ed Imatinib 400 mg/die (553 pazienti per braccio). Con un periodo di osservazione medio di 19 mesi, l'Imatinib ha dimostrato una netta superiorità sull'IFN in termini di tollerabilità ed efficacia: in particolare, le percentuali di RCgM e di Risposta Citogenetica Completa (RCgC) (a 18 mesi) sono risultati dell'87 e 76% rispettivamente per il braccio Imatinib e del 34,7% e 14,5% per il braccio IFN + ARA-C. E' stata inoltre eseguita una valutazione della cinetica e della qualità di risposta molecolare, misurando tramite RQ-PCR (gene di controllo BCR) i livelli di BCR-ABL in 313 pazienti che avevano ottenuto una risposta citogenetica completa: una riduzione dei livelli di trascritto BCR-ABL superiore a 3 logaritmi è stata ottenuta nel 39% dei pazienti trattati con Imatinib e solo nel 2% dei pazienti trattati con IFN + ARA-C (58-59). Nonostante la brevità del periodo di osservazione, anche la sopravvivenza libera da progressione di malattia per il braccio Imatinib (96,7%) è risultata significativamente superiore a quella del braccio IFN (91,5%). Alla dimostrazione di superiore efficacia, lo studio IRIS ha

portato come valore aggiunto, la dimostrazione di una qualità di vita dei pazienti trattati con Imatinib significativamente migliore rispetto a quella dei pazienti trattati con IFN + ARA-C. Sulla base di questi risultati, nel Dicembre 2002 l'Imatinib è stato registrato come terapia di I linea nella LMC.

I risultati dello studio IRIS sono stati recentemente aggiornati con un follow-up mediano di 60 mesi: la percentuale di RCgC dei pazienti trattati con Imatinib è dell' 87%, con l' 80% di questi pazienti che ha ottenuto una riduzione dei livelli di BCR-ABL ≥ 3 log dopo quattro anni dall'inizio del trattamento. Dopo cinque anni, il 93% di loro è vivo senza progressione in FA/CB e l'83% non ha subito eventi (51).

La inibizione selettiva di BCR-ABL da parte dell'Imatinib ha cambiato in maniera sostanziale la terapia e la storia naturale della malattia. Tuttavia, nonostante l'elevata percentuale di risposte ematologiche e citogenetiche, la resistenza o la refrattarietà al trattamento si può sviluppare in una proporzione dei casi trattati. Esiste, inoltre, una minoranza dei pazienti che non è in grado di tollerare il trattamento. La resistenza all'Imatinib può essere ematologica, citogenetica e molecolare: essa attiene alla incapacità del farmaco di indurre una stabile normalizzazione dell'esame emocromocitometrico, una scomparsa delle metafasi Ph-positive o una significativa riduzione della quantità di trascritto ibrido BCR-ABL.

1.10.2 Inibitori delle tirosinchinasi di seconda generazione

Una certa quota di pazienti trattati con Imatinib, risulta essere resistente, refrattario o intollerante. La resistenza è dovuta a mutazioni puntiformi nel dominio chinamico di ABL nel 70-90% dei casi. Queste mutazioni avvengono a livello di residui implicati nel legame con Imatinib o, più comunemente, in residui importanti per la capacità da parte di bcr-abl di adottare una conformazione favorevole al legame con Imatinib. Sulla base di ciò, sono stati sviluppati nuovi farmaci: Nilotinib e Dasatinib.

1.10.2.1 Nilotinib

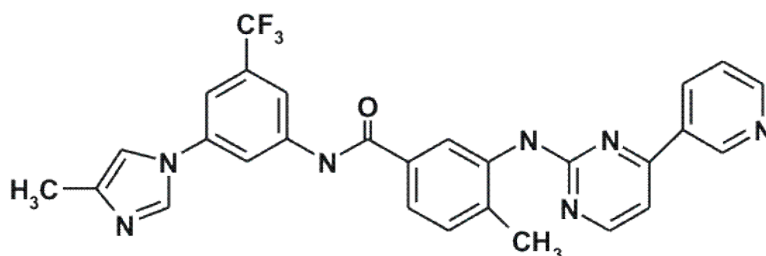


Figura 14: Nilotinib

Il legame di Nilotinib (Fig.14) alle proteine bersaglio (e quindi a bcr-abl) è, da un punto di vista energetico, più favorevole rispetto allo stesso legame con Imatinib. Questo determina una azione più selettiva di Nilotinib sulle cellule bersaglio. E' stato dimostrato, infatti, che Nilotinib ha una potenza superiore di

30 volte rispetto a Imatinib nei saggi di proliferazione e fosforilazione delle proteine. Questa caratteristica è particolarmente importante per i pazienti più anziani, poiché essi tendono ad avere più difficoltà nel tollerare il trattamento con imatinib soprattutto se ad alte dosi.

Il legame sul p-loop della proteina bcr-abl (sito di legame per l'ATP) determina il ripiegamento della proteina stessa sul sito di legame abl-ATP e quindi il blocco del loop di attivazione (a-loop) nel sito di legame con il substrato. Alla fine, bcr-abl non ha attività catalitica e quindi le sue proteine bersaglio downstream non sono attivate.

Inoltre, è stato dimostrato che Nilotinib ha proprietà pro-apoptiche determinando un'aumento dei livelli della proteina bim e agendo così da oncosoppressore nelle cellule leucemiche. Questo poiché, mentre bcr/abl agisce degradando bim e quindi impedendo il processo apoptotico, nilotinib inibendo l'attività di bcr/abl agisce da antagonista (60).

1.10.2.2 Dasatinib

Il Dasatinib (Fig.15) è un inibitore multi-target di tirosin-chinasi che appartiene alla famiglia delle proteine Src ed agisce contro le numerose molecole di BCR-ABL mutate e resistenti ad Imatinib, consentendo il trattamento della Leucemia Mieloide Cronica e delle Leucemie Linfoidi Acute Philadelphia-positive.

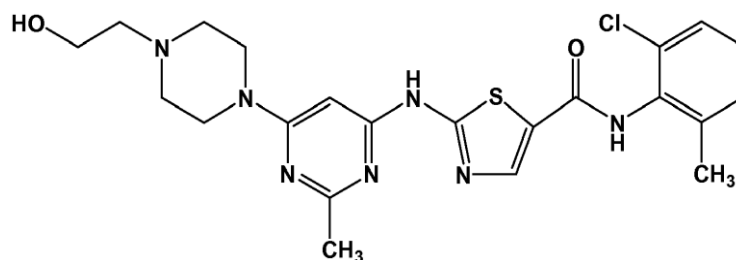


Figura 15: Dasatinib

Dasatinib è in grado di inibire chinasi quali BCR-ABL, FYN, c-KIT, LCK bloccando sia la loro autofosforilazione sia la fosforilazione di effettori a valle delle cascate di trasduzione del segnale (61). Studi *in vitro* hanno dimostrato che questo farmaco ha una efficacia di inibizione della fosforilazione circa 325 volte maggiore rispetto all'Imatinib (62): inibisce i mutanti di BCR-ABL, in particolare quelli in cui le mutazioni avvengono a livello del p-loop e dell'a-loop di ABL e in altri siti della porzione C-terminale, ad eccezione del mutante che porta una isoleucina al posto di una treonina in posizione 315 (T315I).

Inoltre Dasatinib si lega a bcr/abl quando la proteina si trova nella sua forma attiva, a differenza di Imatinib che si lega solo nella forma inattiva. La capacità di Dasatinib di inibire la proliferazione delle cellule con bcr/abl mutata ha suggerito che questo farmaco avesse un potenziale effetto terapeutico in quei pazienti che risultano resistenti a Imatinib.

1.11 Analisi di laboratorio per la diagnosi e il monitoraggio della LMC

L'analisi di laboratorio per la diagnosi della LMC si basa su metodiche quali:

- citogenetica convenzionale (CC)
- ibridazione in situ fluorescente (FISH)
- reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) e real time-PCR

allo scopo di rivelare in modo specifico il cromosoma Philadelphia e il riarrangiamento BCR-ABL.

Poiché la terapia con TKI determina la remissione citogenetica e molecolare, con il conseguente allungamento della fase cronica e il miglioramento dell'outcome dei pazienti, tali analisi sono diventate importanti non solo per la diagnosi ma anche per il monitoraggio della terapia. Infatti, un'appropriato monitoraggio permette di determinare precocemente la progressione della malattia ad uno stadio avanzato.

1.11.1 Citogenetica convenzionale

L'analisi del cariotipo su cellule di midollo è applicata per la ricerca del cromosoma Philadelphia alla diagnosi e nel monitoraggio della terapia. Essa, inoltre, è importante poiché permette di rilevare la presenza di alterazioni

citogenetiche addizionali sia nel clone Ph-positivo che in quello Ph-negativo, che non è possibile determinare con la FISH e la RT-PCR.

Tra i limiti della CC vi sono:

- la bassa sensibilità, limitata all' 1-5% di cellule
- la necessità di ottenere cellule proliferanti da un'adeguato aspirato midollare, poiché l'analisi viene effettuata solo su cellule in metafase (20-30 metafasi analizzate sono necessarie per un'analisi valutabile).

1.11.2 Ibridazione in situ fluorescente (FISH)

La FISH utilizza sonde a DNA, coniugate con fluorocromi, specifiche per determinate sequenze geniche coinvolte in un particolare riarrangiamento cromosomico. In questo modo, tale tecnica permette l'analisi anche delle cellule in interfase, per poter ottenere da un lato un'analisi valutabile nei casi in cui la CC non ha permesso di ottenere un numero sufficiente di metafasi, dall'altro ottenere un quadro completo della patologia.

Nei casi di LMC, la FISH permette di:

- alla diagnosi, caratterizzare in maniera accurata la traslocazione t(9;22) distinguendo il tipo di riarrangiamento (classico o variante), casi di LMC Ph-masked e la presenza di delezioni di sequenze dei cromosomi derivativi 9 e/o 22 (63).

- nel follow-up, stimare la quota di cellule Ph-positive midollari ancora presenti, necessaria per determinare la risposta citogenetica nei casi in cui la CC non è valutabile.
- alla diagnosi e nel follow-up, rivelare l'amplificazione del riarrangiamento BCR-ABL. In alcuni casi, infatti, essa non è associata alla duplicazione del cromosoma Ph, ma è dovuta alla duplicazione e all'inserzione del riarrangiamento in altre regioni cromosomiche: per questo motivo non risulta visibile all'analisi del cariotipo. Tale caratteristica è un indice di progressione della malattia verso la crisi blastica (Fig.16).
- determinare in maniera più sensibile, rispetto all'analisi citogenetica, la malattia minima residua dopo terapia o trapianto di cellule staminali allogeniche (64).

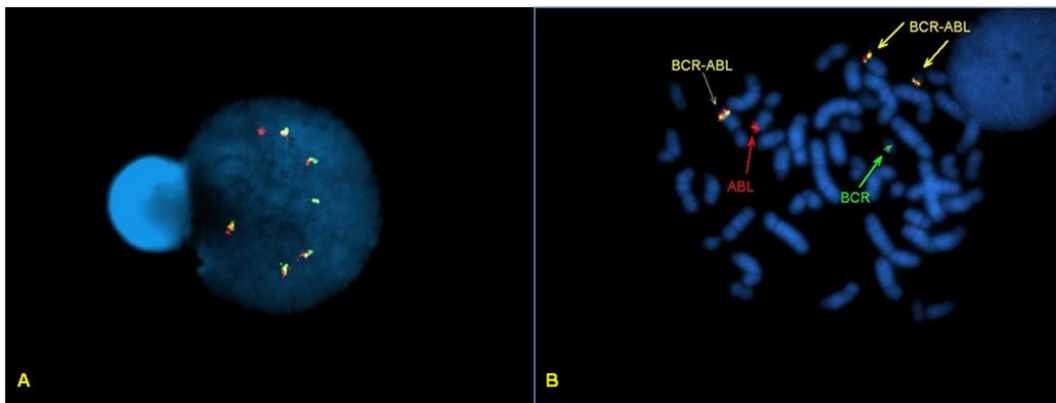


Figura 16: Nucleo (A) e metafase (B) in un caso di amplificazione di BCR/ABL in regioni cromosomiche diverse dal cromosoma Ph.

La FISH è una tecnica più sensibile rispetto all'analisi del cariotipo, poiché può essere analizzato un numero superiore di cellule sia in interfase che in metafase (200-300 nuclei in FISH vs 20-30 metafasi in citogenetica convenzionale). Dall'altro lato però, la FISH identifica solo il riarrangiamento BCR-ABL e quindi non è possibile identificare alterazioni citogenetiche addizionali sia nel clone Ph+ che in quello Ph-.

1.11.3 PCR: principi base

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica che permette l'amplificazione in vitro di sequenze specifiche di DNA o di DNA complementare (cDNA) eterogeneo. La cinetica di amplificazione della PCR è di tipo esponenziale e piccole varianti nelle condizioni di allestimento della reazione si possono tradurre in grandi variazioni di quantità di prodotto finale. Per questa ragione, come l'RT, anche la PCR consente di ottenere informazioni puramente qualitative. E' necessario conoscere la sequenza del gene target che si desidera amplificare per disegnare una coppia di primers senso (forward) e antisenso (reverse) che ibridizzeranno con le regioni fiancheggianti le sequenze di interesse rispettivamente al 5' e al 3'. La lunghezza dei primers può variare dai 15 ai 30 nucleotidi: maggiore è la lunghezza più elevata sarà la specificità. L'amplificazione esponenziale della sequenza target avviene grazie alla ripetizione di una serie di cicli che comprendono tre fasi: la prima fase prevede la denaturazione al calore (94-

96°C) del dsDNA che deve essere copiato, mentre la seconda e la terza fase prevedono rispettivamente l'appaiamento o annealing dei primers con le rispettive regioni complementari (50-65°C) e l'estensione del filamento di DNA a partire dai primers ad opera della Taq polimerasi (72°C). L'enzima, inoltre, è dotato di attività esonucleasica 5'-3' (Fig.17)

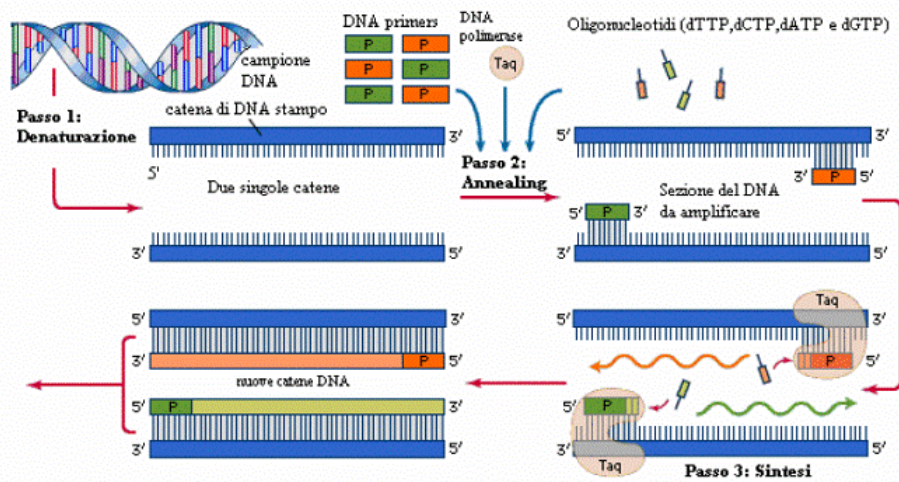


Figura 17: Fasi della PCR

La tecnica di PCR per i trascritti BCR-ABL nei pazienti alla diagnosi definisce il trascritto specifico risultante dalla traslocazione t(9;22), che nella maggior parte dei casi è rappresentato dai tipi b2a2 o b3a2. La CC non distingue tra i trascritti, che possono essere quindi identificati solo mediante RT-PCR. Essa viene eseguita anche nei casi in cui non viene identificato il cromosoma Ph mediante il cariotipo.

Nella RT-PCR, l'RNA è isolato da midollo o sangue periferico, retrotrascritto in cDNA e amplificato mediante PCR usando primers specifici per le diverse regioni degli esoni di BCR e ABL.

Tuttavia il limite di sensibilità per questo saggio è circa 1/100.000 cellule, sufficiente per la diagnosi ma non per il monitoraggio della terapia. Inoltre, essa non può essere usata per la quantificazione del trascritto nel sangue periferico, particolarmente importante nel monitoraggio dei pazienti in terapia con TKI e che risultano in risposta citogenetica completa.

Per questo motivo, il monitoraggio della terapia viene eseguito mediante Real-time PCR. Si tratta di una tecnica che permette di determinare la quantità minima di malattia in pazienti LMC con la possibilità di confrontare la situazione iniziale della malattia al momento del prelievo con quella successiva al trapianto o al trattamento farmacologico.

1.12 Monitoraggio della LMC e definizione dei criteri di risposta

L'analisi di citogenetica convenzionale (CC) eseguita su aspirato di midollo osseo rappresenta ancora un'ottimo metodo per monitorare la risposta al trattamento con Imatinib, ma è anche il solo utilizzato per determinare alterazioni cromosomiche addizionali al cromosoma Philadelphia che possono avere un ruolo prognostico.

La risposta citogenetica, basata sui risultati della citogenetica convenzionale, è così definita (65):

- completa (RCgC): 0% metafasi Ph-positive;
- parziale (RCgP): 1-35% metafasi Ph-positive;
- maggiore (RCgM): 0-35% metafasi Ph-positive;
- minore (RCgm): 36-65% metafasi Ph-positive;
- minima (RCgmin): 66-95% metafasi Ph-positive;
- nessuna risposta (NR): > 95% metafasi Ph-positive.

Purtroppo, però, la CC non è sempre efficace nei pazienti trattati con Imatinib: spesso, infatti, non vengono ottenute un numero sufficienti di metafasi valutabili necessario per l'analisi. Per questo motivo, l'analisi di ibridazione fluorescente in situ (FISH) può essere utilizzata come metodica addizionale o alternativa per valutare la risposta alla terapia (66-67).

La risposta molecolare è determinata tramite quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RQ-PCR). Per valutare la quantità di RNA nei campioni studiati e normalizzare l'espressione del trascritto bcr/abl, viene eseguita la quantificazione di un gene housekeeping, ossia un gene uniformemente espresso in tutti i tessuti: il gene ABL. La curva standard per ABL si ottiene quantificando tre diluizioni seriali a concentrazioni note (10⁴-10²-10⁰) di plasmidi che contengono ABL. La quantità di trascritto presente nei campioni analizzati è stata espressa come rapporto: bcr-abl/abl%, secondo l'International Scale. Il nostro laboratorio ha partecipato al processo di

standardizzazione ed è stato stabilito che la risposta molecolare maggiore (RMolM) corrisponde ad un rapporto bcr-abl/abl inferiore allo 0,10%. I campioni negativi in RQ-PCR sono stati analizzati tramite nested-PCR ed è stata definita risposta molecolare completa (RCgM) la negatività di quest'ultima (67-71).

La progressione di malattia è stata definita dalla presenza di almeno uno dei seguenti criteri (65).

- 15% di blasti nel midollo o nel sangue periferico;
- persistente trombocitopenia ($PLT < 100.000/mm^3$), non legata alla terapia in corso;
- $\geq 20\%$ basofili nel midollo o nel sangue periferico;
- presenza di grandi foci o clusters di cellule blastiche nella biopsia ossea;
- interessamento extramidollare (escluso l'interessamento splenico).

Il fallimento della terapia è stato definito in accordo con le Linee Guida ELN (European Leukemia Net) dalla presenza di uno dei seguenti criteri (65):

- assenza di risposta ematologica a 3 mesi;
- $< CHR$ o assenza di risposta citogenetica a 6 mesi;
- $< RCgP$ a 12 mesi o $< RCgC$ a 18 mesi;
- perdita della CHR o della $RCgC$;
- progressione o comparsa di mutazioni puntiformi in grado di conferire resistenza ad imatinib.

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Le analisi di citogenetica convenzionale e di FISH hanno permesso di evidenziare determinate caratteristiche dei pazienti con LMC: il Ph-masked, la delezione del der(9), le traslocazioni t(9;22) varianti e le ACAs nei pazienti alla diagnosi. Prima dell'introduzione dell'Imatinib e dei TKI di seconda generazione mostravano avere impatto negativo o non ben chiaro sulla risposta e sulla sopravvivenza. Se da un lato è stato dimostrato che la delezione del der(9) non ha un impatto negativo, abbiamo voluto analizzare le altre caratteristiche citogenetiche.

Obiettivi dello studio, quindi, sono stati valutare l'impatto prognostico di caratteristiche citogenetiche quali i riarrangiamenti Ph-masked, le traslocazioni varianti e ACAs alla diagnosi in pazienti affetti da LMC in fase cronica precoce, trattati con inibitori delle tirosinchinasi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Analisi citogenetica convenzionale

L'analisi citogenetica convenzionale viene eseguita su cellule midollari.

Vengono allestite colture cellulari con 20 milioni di cellule in 10 ml di terreno, immediatamente all'arrivo del campione e in sterilità. Il terreno contiene RPMI 1640 arricchito al 30% con siero fetale bovino scomplementato, glutammina (200mM) e penicillina-streptomicina (50 I.U-50 µg/ml).

Per ogni caso vengono allestite 2 colture cellulari poste a incubazione a 37°C al 5% di CO₂, per 24 e per 48 ore. Successivamente, alle colture si aggiungono 80 µl di colchicina e vengono nuovamente incubate a 37°C al 5% di CO₂ per 40 minuti.

La colchicina ha la funzione di bloccare le cellule midollari in profase e/o prometafase e/o metafase

Terminata l'incubazione, le colture sono centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti al fine di ottenere un "bottone cellulare". Una volta rimosso il sovrnatante, il bottone cellulare viene sottoposto a trattamento ipotonico, mediante l'aggiunta di 8 ml di soluzione KCl 0,075 M. La miscela così ottenuta viene poi incubata a 37°C, centrifugata per 10 minuti a 1200 rpm e il sovrnatante nuovamente eliminato. Al bottone cellulare così ottenuto vengono aggiunti 5 ml di fissativo,

costituito da acido acetico e alcool metilico nella proporzione 1:3, e agitando contemporaneamente sul vortex.

Il materiale viene sottoposto a 3 successivi lavaggi con fissativo fresco, in modo da eliminare il materiale cellulare superfluo, che potrebbe ostacolare l'analisi delle piastre metafasiche.

Quindi, il bottone cellulare ottenuto viene risospeso in fissativo e vengono allestiti due vetrini, per ogni campione, con qualche goccia di materiale. I vetrini sono "invecchiati" in termostato a 60°C da 1 a 3 giorni e poi colorati mediante bandeggio G cromosomico.

3.2 Bandeggio cromosomico

Il bandeggio cromosomico prevede l'utilizzo di diverse metodiche in grado di evidenziare una struttura cromosomica 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), che fornisce un pattern opposto ai precedenti. Nel nostro laboratorio è utilizzato il bandeggio GAW.

3.2.1 Bandeggio GAW

I vetrini, allestiti con le specifiche metodiche e invecchiati a 60°C, sono immersi in una soluzione 0,2N di HCl per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo essere stati sciacquati in acqua corrente, i vetrini vengono poi immersi per 20 minuti in una vaschetta contenente una soluzione di 1xSSC (soluzione di NaCl e Na-citrato), posta in termostato a 60°C.

In seguito, ogni vetrino viene colorato con 4 ml di colorante (3 ml di tampone a pH 6,8 e 1ml di Wright' stain 0,06%) per circa 3-4 minuti.

I vetrini bandeggiati sono esaminati al microscopio ottico e per ogni paziente vengono osservate almeno 20 metafasi alla diagnosi e 30 metafasi in corso di terapia (*Genikon 3.7.27, Nikon*).

L'analisi di ogni metafase è effettuata attraverso un sistema computerizzato collegato al microscopio e la classificazione dei cromosomi viene eseguita secondo l'International System Chromosome Nomenclature (ISCN).

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 presenti in numero inferiore di cellule sono definite non clonali.

3.3 FISH

Gli studi di FISH in doppia colorazione sono stati eseguiti con le seguenti sonde a DNA per la caratterizzazione della t(9;22).

3.3.1 Sonde utilizzate

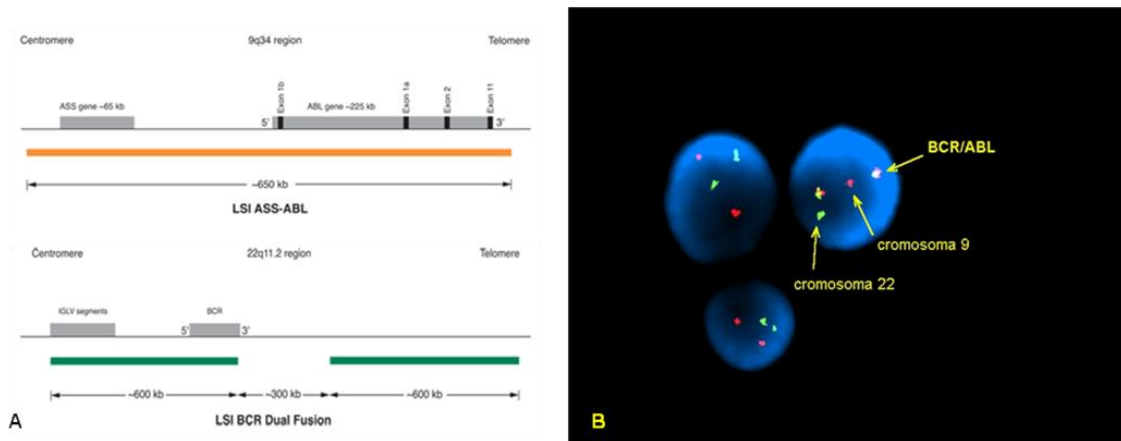
- *LSI BCR-ABL Dual-Colour Dual-Fusion Vysis (Vysis Inc., Richmond, United Kingdom)*

E' una miscela di due sonde: la sonda *LSI BCR* marcata con *Spectrum Green* (marcata con fluoresceina di colore verde) e la sonda *LSI ABL* marcata con *Spectrum Orange* (marcata con rodamina di colore rosso).

La sonda *LSI ABL* ha come target genomico una regione di 650 kb circa che si estende dall'area centromerica del gene argininosuccinato sintetasi (ASS) ad una zona telomerica rispetto all'ultimo esone ABL. La sonda *LSI BCR* copre una distanza genomica di circa 1,5 Mb, che comincia entro il locus delle sequenze variabili delle catene leggere lambda delle immunoglobuline (IGLV), si estende lungo il cromosoma 22 attraverso il gene BCR fino a terminare approssimativamente a 900 Kb da BCR in senso telomerico.

Una cellula normale mostrerà 2 segnali rossi, per i cromosomi 9 e 2 segnali verdi per i cromosomi 22, mentre una cellula con t(9;22)(q34;q11) mostrerà un segnale rosso e un segnale verde rispettivamente per i cromosomi 9 e 22 normali e due segnali di fusione rosso/verde (giallo) per i 2 cromosomi

derivativi coinvolti nella traslocazione: uno per il 9 e l'altro per il 22 (cromosoma Philadelphia) (Fig.18).



**Figura 18 : A) Diagramma della sonda Dual-Colour Dual-Fusion BCR/ABL;
B) Cellula con riarrangiamento classico (un segnale rosso, uno verde e due di fusione).**

- **LSI BCR-ABL Tri-Colour Dual-Fusion Vysis (Vysis Inc., Richmond, United Kingdom)**

E' una miscela di due sonde: le sonde LSI BCR marcata con Spectrum Green (verde) e LSI ASS-ABL marcata con Spectrum Orange (rosso) e Spectrum Aqua (blu).

La sonda LSI BCR di colore verde è quella già descritta nella Dual-Colour.

La sonda LSI ASS-ABL in realtà è costituita da due sonde, legate tra loro e marcate con due fluorocromi distinti: la sonda ABL (rossa) è quella già descritta nella Dual-Colour; la sonda ASS (circa 270Kb) coniugata con

Spectrum Aqua, copre tutto il gene ASS situato in posizione centromerica rispetto al gene ABL fino all'inizio del gene ABL stesso, il quale quindi non viene marcato da questa sonda.

Una cellula normale mostrerà 2 segnali rosso-blu per i cromosomi 9 e 2 segnali verdi per i cromosomi 22, mentre una cellula con t(9;22)(q34;q11) mostrerà un segnale rosso-blu e un segnale verde rispettivamente per i cromosomi 9 e 22 normali, un segnale di fusione rosso-blu/verde (giallo-blu) per il cromosoma 9 derivativo e un segnale di fusione rosso-verde (giallo) per il cromosoma 22 derivativo (cromosoma Philadelphia) (Fig.19)

L'introduzione di questa sonda permette di distinguere, nelle cellule in interfase, i due cromosomi 9 e Ph derivati dalla traslocazione t(9;22)(q34;q11) e quindi di diminuire la soglia di cut-off delle cellule false positive..

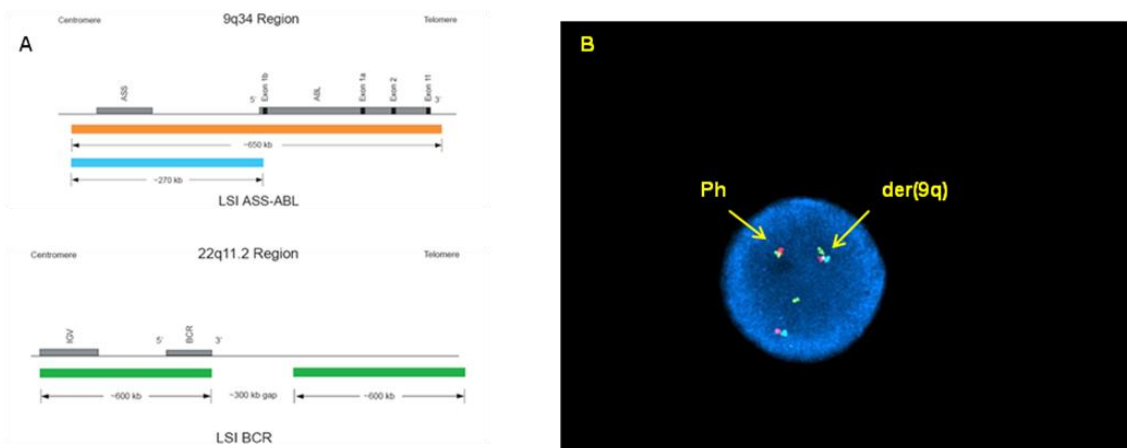


Figura 19 : A) Diagramma della sonda Tri-Colour Dual-Fusion BCR/ABL;
B) Nucleo con riarrangiamento classico BCR/ABL, nel quale le frecce indicano il derivativo del cromosoma 9 (segnale rosso-blu/verde) e il cromosoma Ph (segnale rosso/verde)

- **LSI BCR-ABL Extra-Signal Vysis (Vysis, Richmond, United Kingdom)**

E' una miscela di due sonde: la sonda *LSI BCR* marcata con *Spectrum Green* (verde) e la sonda *LSI ABL* marcata con *Spectrum Orange* (rosso). La sonda *LSI ABL* ha come target genomico una regione di 650 kb circa che si estende dall'area centromerica del gene argininosuccinato sintetasi (ASS) ad una zona telomerica rispetto all'ultimo esone ABL. La sonda *LSI BCR* copre una distanza genomica di circa 300 kb, si estende lungo il cromosoma 22 all'interno del gene BCR.

Una cellula normale mostrerà 2 segnali rossi, per i cromosomi 9 e 2 segnali verdi per i cromosomi 22, mentre una cellula con t(9;22)(q34;q11) mostrerà due segnali rossi per il cromosoma 9, un segnale verde per il cromosoma 22 normale e un segnale di fusione rosso/verde (giallo) per il cromosoma 22 derivativo coinvolto nella traslocazione (cromosoma Philadelphia) (Fig. 20).

Questa sonda viene utilizzata per accertare la presenza di delezione del derivativo del cromosoma 9. Infatti, in alcuni casi, possono avvenire delezioni nel punto di rottura 3' del gene BCR e/o nel punto di rottura 5' del gene ABL. Risulterà così la presenza di 1 segnale rosso (cromosoma 9 normale), 1 segnale verde (cromosoma 22 normale) e di un unico segnale di fusione.

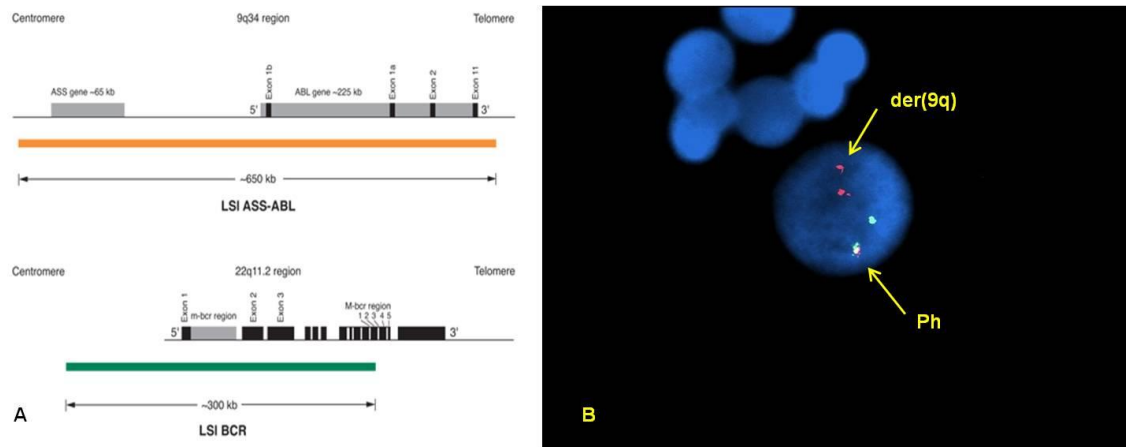


Figura 20: A) Diagramma della sonda ES BCR/ABL;
 B) Nucleo con riarrangiamento classico BCR/ABL, nel quale le frecce indicano il derivativo del cromosoma 9 (segnale rosso più piccolo rispetto a quello relativo al cromosoma 9 normale) e il cromosoma Ph (segnale rosso/verde)

- **BCR-ABL Dual-Colour Dual-Fusion O-BIOgene (O-BIOgene-Resnova, Roma, Italia)**

E' una miscela di due sonde: la sonda *LSI BCR* marcata con *Spectrum Green* (verde) e la sonda *LSI ABL* marcata con *Spectrum Orange* (rosso). La sonda *ABL* ha come target genomico due regione di 500 kb circa che ricoprono rispettivamente la regione del gene argininosuccinato sintetasi (ASS) ad una zona telomerica a monte dell'esone 11 in 3' del gene ABL. La sonda *LSI BCR* ha come target genomico due regione di 500 kb, che si estendono al 5' e al 3' del gene BCR.

Una cellula normale mostrerà 2 segnali rossi, per i cromosomi 9 e 2 segnali verdi per i cromosomi 22, mentre una cellula con $t(9;22)(q34;q11)$ mostrerà un

segnale rosso e un segnale verde rispettivamente per i cromosomi 9 e 22 normali e due segnali di fusione rosso/verde (giallo) per i 2 cromosomi derivativi coinvolti nella traslocazione: uno per il 9 e l'altro per il 22 (cromosoma Philadelphia), analogamente a ciò che si osserva con la sonda Dual-Colour Dual-Fusion Vysis.

3.3.2 Metodica

I vetrini sono allestiti con il materiale ottenuto dalla preparazione citogenetica, conservato a -20°C. In seguito, vengono pretrattati per 2 minuti a 37°C in 2XSSC (17,5g di cloruro di sodio e 8,2g di citrato tri-sodico in 1 litro di acqua distillata).

I vetrini sono poi deidratati in lavaggi successivi di 2 minuti ciascuno in etanolo a percentuali crescenti: 70%, 80% e 100%.

La miscela di ibridizzazione viene preparata con 7 µl di tampone, 2 µl di acqua distillata e 1 µl di sonda per ogni vetrino. Una volta posti 10 µl di tale miscela su ogni vetrino, si dispongono i vetrini nella macchina Hybrite (*Vysis Inc., Richmond, United Kingdom*) (che funge da camera umida e buia) dove avviene un'incubazione a 37°C per 10 minuti, la codenaturazione di sonda e vetrino a 73°C per 3 minuti e l'ibridizzazione tra DNA della sonda e DNA del materiale per 24 ore a 37°C.

Al termine dell'ibridizzazione, i vetrini vengono lavati prima per 2 minuti in una soluzione di 0,4XSSC a 72°C e successivamente in una soluzione 2XSSC/0,05% NP-40 a temperatura ambiente per 3 minuti.

Una volta lasciati asciugare all'aria, i vetrini vengono controcolorati con 4,6 diamino-2-phenylindole (DAPI III) e in seguito osservati al microscopio a fluorescenza (*Eclipse E1000, Nikon*) equipaggiato con filtri a singola banda FITC/TRITC/AQUA/DAPI.

L'analisi viene eseguita osservando, ove possibile, almeno 200 cellule alla diagnosi e 300 cellule in corso di terapia per vetrino.

Un caso viene considerato BCR-ABL negativo, quando la percentuale dei nuclei positivi per lo specifico riarrangiamento è inferiore all'1% (cut-off).

3.4 Metodica di RQ-PCR

La RQ-PCR permette contemporaneamente di amplificare il template e rilevare l'amplificato: si può monitorare la quantità di cDNA durante la fase esponenziale di crescita (quando l'efficienza dipende dalla concentrazione iniziale del template) per risalire alla quantità di template di partenza. Questa tecnica è stata utilizzata per quantificare i livelli del trascritto BCR-ABL (p210 o p190).

Questo è possibile grazie all'introduzione all'interno della reazione di una sonda complementare ad un tratto della sequenza di interesse, legata

covalentemente a 2 molecole fluorescenti, un Quencer (Q) al 3' (TAMRA, fluorocromo a bassa energia) e un Reporter (R) al 5' (FAM, fluorocromo ad alta energia). R emette luce se è eccitato ad una determinata lunghezza d'onda, Q sopprime l'intensità di fluorescenza di R quando i due sono vicini. Durante la reazione di amplificazione, l'attività 5'-3' esonucleasica della Taq-polimerasi determina la degradazione della sonda; di conseguenza, R viene allontanato da Q e si genera un segnale di fluorescenza (Fig.21).

La variazione della fluorescenza necessaria per determinare il numero di molecole contenute nel campione analizzato viene calcolato come $\Delta R_n = R(+)-R(-)$: R(+) è la fluorescenza del campione analizzato, normalizzata rispetto alla fluorescenza di ROX (un fluorocromo il cui rapporto con la luminosità del campione serve per ridurre l'errore); R(-) è la fluorescenza del Not Template Control (NTC), normalizzata rispetto a ROX. Lo strumento rileva l'intensità di fluorescenza ad ogni ciclo di reazione, monitorando la crescita esponenziale del template. Per ogni campione si otterrà un grafico con la sua curva di crescita, che partirà tanto prima quanto maggiore è la quantità di template di partenza (Fig.22).

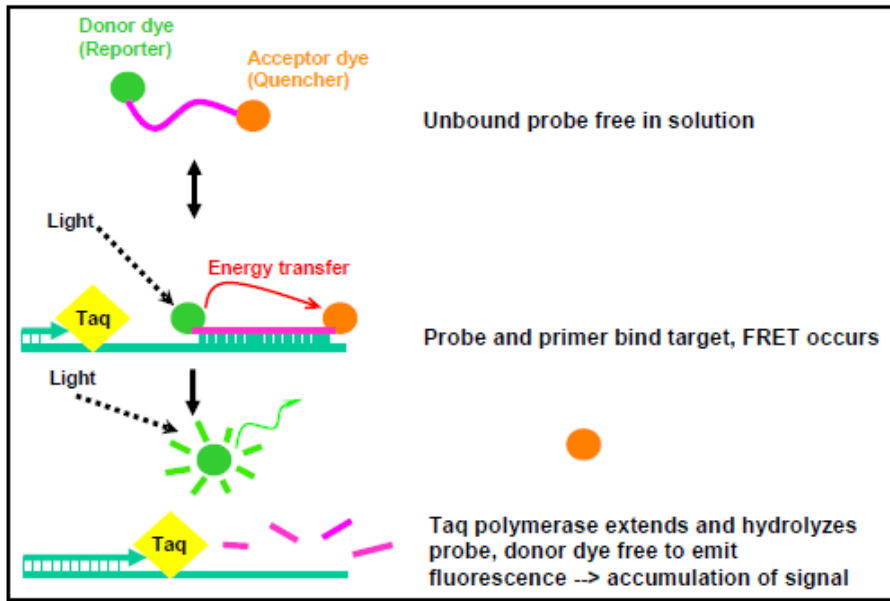


Figura 21: RQ-PCR.

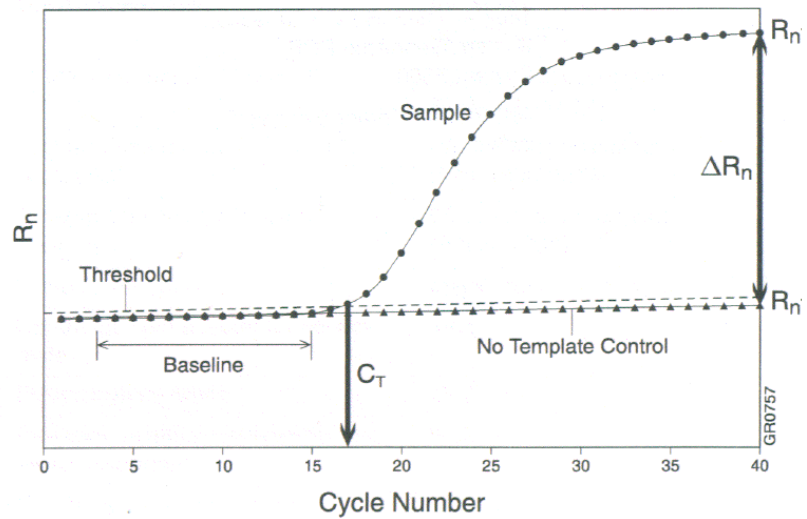


Figura 22: Curva di crescita.

Nella curva di amplificazione si evidenziano la Threshold, cioè la linea soglia scelta in fase di reazione esponenziale (nel nostro caso fissata a 0,1), che interseca le curve di tutti i campioni, e il ciclo soglia (Ct, Threshold Cycle), cioè il ciclo della reazione di amplificazione in cui si avverte un significativo aumento della fluorescenza (pari a 10 volte la deviazione standard del segnale di fluorescenza nei primi 15 cicli). Il valore di Ct è usato nell'analisi cinetica in quanto proporzionale al numero di copie iniziali del template. Esse si ricavano costruendo una curva standard a partire da plasmidi a concentrazione nota, contenenti la sequenza studiata. La curva standard mostra la relazione lineare tra Ct e il logaritmo della concentrazione iniziale del template e permette di ricavare l'espressione dell'mRNA BCR-ABL nei campioni in esame.

La quantificazione Real Time è stata condotta mediante *ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystem)*. Ciascun esperimento è stato condotto in duplicato, in un volume finale di 25 µl, utilizzando 12,5 µl di *Universal Master Mix 2X (Applied Biosystem)*, primers, sonda TaqMan e 5 µl del cDNA in esame. Contemporaneamente ai campioni sperimentali, è stata eseguita la quantificazione di cinque diluizioni note (10^6 - 10^5 - 10^3 - 10^2 -10) di un plasmide del gene in esame (IPSOGEN), per poter costruire la curva standard, da cui sono state poi ricavate le informazioni sulla quantità assoluta delle molecole di cDNA del gene target. Le condizioni della reazione di amplificazione sono le seguenti: 50°C per 2 min, 95°C per 10 min, 95°C per 15s, 60°C per 1 min, il tutto ripetuto per 50 cicli. L'acquisizione dei dati

avviene esclusivamente in fase di elongazione (a 60°C). Per normalizzare l'espressione del trascritto BCR-ABL si è rapportato il suo valore a quello di un gene housekeeping, nel nostro studio ABL. La quantità di trascritto è stata espressa come rapporto $BCR-ABL/ABL \times 100$ (58-59).

3.5 Analisi statistica

Il confronto tra i due gruppi di pazienti è stata effettuato con il test *t Student* e con il test di Fisher per le caratteristiche demografiche e cliniche. I tempi di raggiungimento delle RCgC e RMolM sono state calcolate dall'inizio del trattamento fino al raggiungimento della prima risposta. Le OS, PFS, FFS e EFS sono state calcolate dalla prima dose di Imatinib fino: alla morte (OS), alla progressione a fase accelerata o crisi blastica o morte (PFS), al fallimento della terapia o morte (FFS) e alla comparsa di qualsiasi evento avverso (EFS), mediante il metodo di Kaplan-Meier.

Tutte le analisi sono state valutate per intenzione al trattamento.

L'analisi multivariata è stata effettuata per verificare l'associazione delle ACAs con la RCgC, considerando altre variabili.

4. RISULTATI

4.1 Riarrangiamenti Ph-masked

Presso il nostro Istituto abbiamo valutato con analisi citogenetica 400 casi di LMC alla diagnosi.

Dodici casi (3%) mostravano un cariotipo normale ma risultavano essere BCR/ABL+ e pertanto definiti LMC Ph-negative; di essi, 6 sono stati trattati con Imatinib (frontline o in seconda linea) ed erano valutabili per l'analisi citogenetica, FISH e molecolare.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riportate in Tab.1. Dei 6 pazienti analizzati, 5 erano maschi e l'età mediana era di 44 anni. Quattro pazienti mostravano un rischio Sokal basso, uno intermedio e uno alto. La conta mediana di globuli bianchi era $102,5 \times 10^9/l$, la conta mediana di PLT era $324 \times 10^9/l$. L'epatosplenomegalia è stata osservata in 5 dei 6 pazienti.

Tre pazienti iniziarono la terapia citoriduttiva con idrossiurea, in seguito 2 pazienti (n°1-2; Tab.1) furono trattati con Imatinib; e uno (n°4; Tab.1) era sottoposto a trapianto allogenico di cellule staminali. Quest'ultima, dopo 4 anni, ricadeva in fase accelerata e iniziava la terapia prima con Imatinib, poi con Dasatinib e infine con Nilotinib; infine, moriva dopo un secondo trapianto di cellule staminali.

Due pazienti (n°5-6; Tab.1) venivano trattati con Imatinib frontline mentre l'ultimo (n°3; Tab.1) iniziava la terapia con Imatinib dopo un breve trattamento con IFN- α .

Pazienti	Sesso	Età ^a (anni)	Rischio Sokal	Epto- splenomegalia	Conta alla diagnosi				Trattamento	Ultimo studio
					WBC (10 ⁹ /L)	PLT (10 ⁹ /L)	Blasti BM (%)	Eo/Bso (%)		
1	M	22	basso	No	52,3	398	1	3	HU, IM	RCgC, RMolM
2	M	68	intermedio	Si	93	92	/	/	HU, IM	NR
3	M	44	basso	Si	32,9	250	/	0,6	IFN, IM	RCgC, RMolM
4	F	41	alto	Si	283	560	/	3	HU, alloBMT, IM, dasatinib, nilotinib	} deceduto ^b
5	M	47	basso	Si	112	469	<5	0.75	IM	
6	M	43	basso	Si	176	184	1	1,5	IM, nilotinib	RMolM ^b

^aalla diagnosi

^bin terapia con nilotinib

Tabella 1: Caratteristiche cliniche dei pazienti

L'analisi RT-PCR per il riarrangiamento BCR-ABL è stato eseguito per determinare il tipo di trascritto, mostrando il trascritto b₃a₂ in 5 pazienti e b₂a₂ in 1 paziente. Inoltre non è stata osservata nessuna mutazione nel gene ABL né alla diagnosi né durante il trattamento (Tab.2).

All'analisi di citogenetica convenzionale, i cromosomi 9 e 22 mostravano una morfologia normale, mentre era presente il riarrangiamento BCR/ABL all'analisi molecolare; pertanto, abbiamo valutato la presenza e la localizzazione del gene chimerico di fusione mediante analisi di FISH. Utilizzando la sonda Dual Color-Dual Fusion BCR/ABL (Vysis) è stato evidenziato che 4 pazienti

presentavano il gene di fusione sulla regione 9q34 (n°1-4), 1 paziente mostrava il gene di fusione sulla regione 22q11 (n°5) e un paziente mostrava il segnale di fusione su entrambi i cromosomi 9 e 22 (n°6) (Tab.2).

Pazienti	Pattern di FISH ^a	Localizzazione del gene BCR/ABL	cellule BCR/ABL ^{b,c} (%)	Trascritto molecolare	Stato mutazionale
1	1R1G1F	chr. 9	99	b ₃ a ₂	sconosciuto
2	1R2G1F	chr. 9	92,5	b ₂ a ₂	wild-type
3	1R2G1F	chr. 9	90,3	b ₃ a ₂	sconosciuto
4	1R2G1F	chr. 9	88	b ₃ a ₂	wild-type
5	2R1G1F	chr. 22	95,9	b ₃ a ₂	wild-type
6	1R1G2F	chr. 9 and 22	92,5	b ₃ a ₂	wild-type

^aMediante sonda Vysis LSI BCR/ABL dual-color, dual fusion FISH: R= segnale rosso, G= segnale verde, F= segnale di fusione

^bsu una conta di almeno 200 cellule

^calla diagnosi o prima dell'inizio della terapia con Imatinib

Tabella 2: FISH e caratteristiche molecolari dei pazienti

Tre pazienti (n°2-4; Fig.23B) con il riarrangiamento BCR/ABL (segnale di fusione) sul cromosoma 9 mostravano inoltre un segnale rosso (corrispondente al gene ABL) sul cromosoma 9 normale e 2 segnali verdi su entrambi i cromosomi 22; probabilmente, questo pattern di FISH era dovuto alla rottura nella regione di BCR con conseguente inserzione nella regione di ABL, rivelando così un segnale più piccolo sul derivativo del cromosoma 22. Al contrario, in un paziente (n°1) non era visibile il segnale verde sul derivativo 22 (Fig.23A).

Il paziente con il segnale di fusione sulla regione 22q11 (n°5) mostrava, inoltre, un segnale verde sul cromosoma 22 normale e due segnali rossi per ABL su entrambi i cromosomi 9 (Fig.23C). Infine, il paziente n°6 mostrava un pattern di FISH analogo a quello che si osserva in presenza di una traslocazione t(9;22) classica, con due segnali di fusione su entrambi i cromosomi derivativi 9 e 22 (Fig 23D).

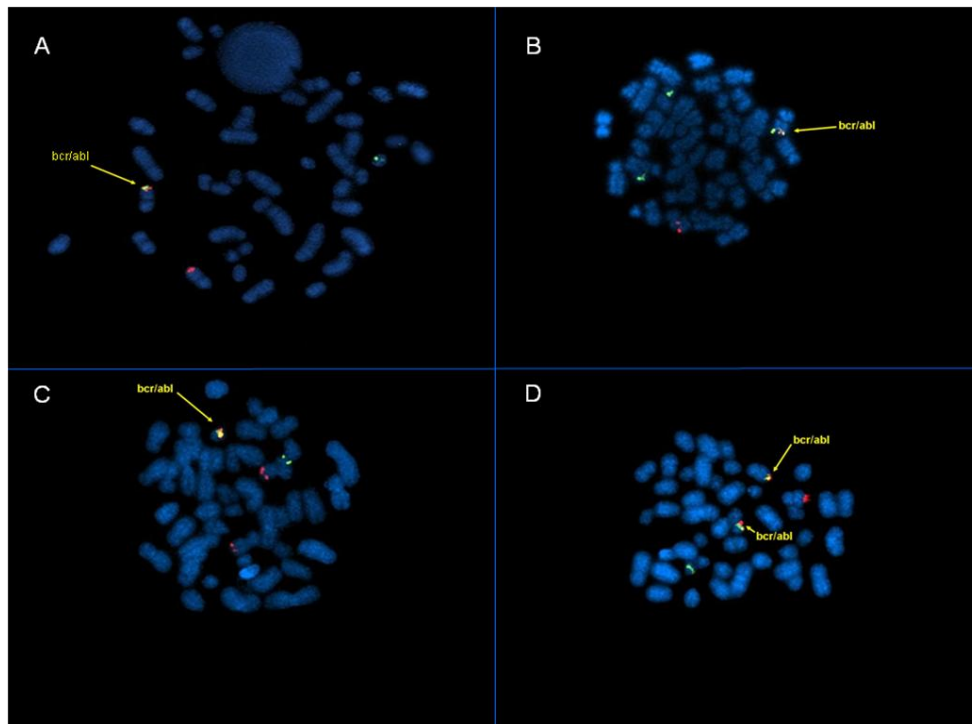


Figura 23: Analisi di FISH su metafase che mostra la localizzazione di BCR/ABL nei pazienti studiati

Pertanto, la formazione e la localizzazione del riarrangiamento BCR-ABL sul cromosoma 9 o 22 in questi pazienti (n° 1-5) sono state interpretate come

l'inserzione del gene BCR nella regione del gene ABL o viceversa come l'inserzione di ABL nella regione di BCR, rispettivamente.

Il caso n°6, invece, che mostrava un doppio segnale di fusione sui due cromosomi derivativi può essere spiegato con un meccanismo a due step, in cui la prima traslocazione, che coinvolge i breakpoint della t(9;22) classica, è seguita da una seconda traslocazione che coinvolge altri punti di rottura. Tale meccanismo può ricostituire la normale morfologia dei cromosomi 9 e 22, senza però alterare il gene di fusione BCR/ABL.

Inoltre, due pazienti (n°1 e 3) presentavano delezioni adiacenti ai breakpoint di BCR e/o ABL; il paziente n°1 mostrava delezioni su entrambi i cromosomi derivativi 9 e 22, mentre il paziente n°3 mostrava la delezione sul derivativo 9.

Le successive analisi in FISH sono state effettuate per monitorare la risposta al trattamento con Imatinib. In particolare, nel caso n°2, durante la progressione della malattia è stata osservata la comparsa di un secondo clone, caratterizzato da due segnali di fusione BCR/ABL e due segnali verdi BCR, che gradualmente sostituivano il clone osservato alla diagnosi (Fig.24A). La FISH su metafase mostrava che i due segnali di fusione erano localizzati su entrambi i cromosomi 9 (Fig.24B), suggerendo quindi l'amplificazione del riarrangiamento BCR/ABL; questo dato è stato confermato in RQ-PCR. Tale fenomeno poteva essere considerato una conseguenza della duplicazione del derivativo 9, con la contemporanea perdita del cromosoma 9 normale.

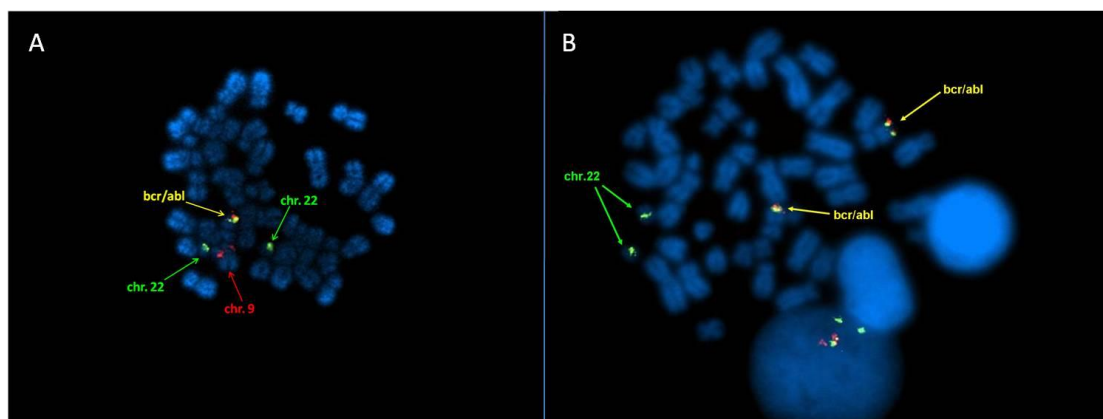


Figura 24: FISH metafascica nel paziente; clone presente alla diagnosi (A) e clone presente durante la progressione (B).

I pazienti sono stati monitorati durante la terapia mediante analisi FISH, che ha documentato la riduzione del clone di cellule BCR/ABL-positivo in 3 pazienti (n°1, 3, 5), con raggiungimento di risposta citogenetica completa (RCgC) in un periodo di 18-30 mesi. Due pazienti (n°2 e 6), invece, mostravano un'elevata quantità di cellule ancora riarrangiate: il paziente n°2 mostrava buone condizioni cliniche, ma successivamente sviluppava una neoplasia intestinale e sospendeva l'Imatinib; il paziente n°6 era resistente a Imatinib e raggiungeva la risposta molecolare maggiore (RMolM) in terapia con Nilotinib. Infine, il paziente n°4 ricadeva a 4 anni dal trapianto di cellule staminali e presentava la RCgC dopo 6 mesi di terapia con Imatinib; dopo 6 anni, iniziava la terapia con Dasatinib, quindi con Nilotinib, e infine era sottoposto ad un secondo trapianto di cellule staminali.

4.2 Protocollo LMC 021-022-023

Lo studio dell'impatto prognostico di caratteristiche citogenetiche, quali le traslocazioni t(9;22) varianti e le alterazioni citogenetiche addizionali al cromosoma Ph, alla diagnosi in pazienti con LMC in fase cronica trattati con Imatinib, è stato svolto nell'ambito di studi multicentrici prospettici all'interno di protocolli terapeutici nazionali proposti dal GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto) CML Working Party (WP):

- CML/021, studio di fase II, Imatinib 800 mg/die in pazienti a rischio Sokal intermedio;
- CML/022, studio di fase III, Imatinib 400 vs 800 mg/die in pazienti a rischio Sokal elevato;
- CML/023, studio osservazionale, Imatinib 400 mg/die.

Il trattamento e gli studi dei protocolli risultavano in accordo con le buone pratiche di laboratorio della dichiarazione di Helsinki. Novartis Pharma ha fornito il farmaco e supportato la raccolta dei campioni e il monitoraggio dei pazienti.

Lo studio ha coinvolto 559 pazienti alla diagnosi di LMC in fase cronica precoce. I tre protocolli richiedevano l'analisi citogenetica e in FISH all'esordio, dopo 6 e 12 mesi di trattamento e successivamente ogni 6 mesi, oppure in caso di fallimento o progressione della terapia. La RQ-PCR veniva effettuata su

sangue periferico e midollo osseo alla diagnosi, dopo 3-6-12 mesi di trattamento e successivamente ogni 6 mesi su sangue periferico. La RT-PCR veniva effettuata alla diagnosi per determinare il tipo di trattamento.

4.3 Traslocazioni t(9;22) varianti

Dei 559 pazienti arruolati nei protocolli 021/022/023, 30 pazienti (5%) mostravano una traslocazione t(9;22) variante. Le caratteristiche alla diagnosi dei due gruppi di studio, con e senza traslocazione variante, sono descritte in Tab.3: sono simili per caratteristiche demografiche, ematologiche, score Sokal e Hasford. La frequenza di alterazioni addizionali nel clone Ph+ era comparabile nei due gruppi, mentre la delezione del der(9q) risultava essere più frequente nei pazienti con traslocazione variante (6/30; 20%).

Le caratteristiche citogenetiche e la risposta alla terapia dei 30 pazienti con traslocazione variante sono riportati in Tab. 4. Non sono stati riscontrati breakpoints ricorrenti, ma oltre ai cromosomi 9 e 22, il cromosoma maggiormente coinvolto era il cromosoma 17 (4 casi), poi i cromosomi 1, 9, 11, 12 e 15 (3 casi), i cromosomi 3, 5, 8 e 16 (2 casi) e i cromosomi 10, 14, 19, 20 e 21 (1 caso). La maggior parte dei casi (28/30; 93%) mostrava una traslocazione che coinvolgeva 3 cromosomi, mentre solo in due casi la traslocazione coinvolgeva 4 cromosomi. Un caso (n°22) risultava Ph-negativo e un caso mostrava un'alterazione citogenetica addizionale (n°19): la t(7;19)(q21;p13).

Caratteristiche		Pazienti con traslocazione variante (N=30)	Pazienti senza traslocazione variante (N=529)	p
Età mediana (anni); (range)		52 (33-84)	52 (18-80)	0.49
Sesso Maschio/Femmina; N (%)		19/11 (63/37)	317/212 (60/40)	0.85
Milza, cm; (range)		1.5 (0 - 18)	1 (0-24)	0.76
Hb, g/L; mediana (range)		11.8 (7.9 - 16.1)	12.2 (6.4 - 17.5)	0.41
conta mediana PLT, 10 ⁹ /L; (range)		317 (124 -1364)	353 (100 - 4920)	0.36
Blasti periferici, %; (range)		2 (0 - 5)	1 (0 - 10)	0.55
%mediana Eosinofili, (range)		2 (0 - 6)	2 (0 - 15)	0.89
%mediana Basofili (range)		2 (0 - 5)	2 (0 - 19)	0.08
Score Rischio Sokal	basso	13 (43)	206 (39)	0.81
	int.	7 (23)	209 (40)	
	alto	10 (33)	114 (22)	
Score Rischio Hasford	basso	10 (33)	229 (43)	0.69
	int.	15 (50)	266 (50)	
	alto	5 (17)	34 (6)	
ACA		1 (3)	20 (4)	1.00
Delezioni der(9)		6 (20)	54 (10)	0.12
Dose Imatinib	400mg	20 (67)	403 (76)	0.27
	800mg	10 (33)	126 (24)	

Tabella 3: Caratteristiche dei pazienti alla diagnosi

Abbreviazioni: Hb, emoglobina; PLT, piastrine; ACA, alterazioni cromosomiche addizionali

Caso	Sesso	Cariotipo alla diagnosi	delezione Der(9)	Pattern di FISH	Meccanismo	RCg 12m	RCg nell'ultimo studio
1	F	46,XX,t(3;9;22)(q27;q34;q11)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
2	F	46,XX,t(5;9;22)(q13;q34;q11)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
3	M	46,XY,t(5;9;22;17)(q12;q34;q11;q11)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
4	M	46,XY,t(8;9;22)(q21;q34;q11)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
5	F	46,XX,t(8;9;22)(q22;q34;q11)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
6	M	46,XY,t(9;9;22)(p13;q34;q22)		1F2R2G	1 step	Fuori protocollo	Deceduto
7	M	46,XY,t(9;22;10)(q34;q11;q21)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
8	F	46,XX,t(9;22;11)(q34;q11;q13)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
9	M	46,XY,t(9;22;11)(q34;q11;q13)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
10	M	46,XY,t(9;22;12)(q34;q11;q24)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
11	M	46,XY,t(9;22;14)(q34;q11;q32)		1F2R2G	1 step	NE	RCgC
12	M	46,XY,t(9;22;15)(q34;q11;q22)		1F2R2G	1 step	Fuori protocollo	Deceduto
13	M	46,XY,t(9;22;15)(q34;q11;q21)		1F2R2G	1 step	Fallimento	Fallimento
14	M	46,XY,t(9;22;17)(q34;q11;p13)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
15	M	46,XY,t(9;22;17)(q34;q11;q21)		1F2R2G	1 step	PCgR	RCgC
16	F	46,XX,t(9;22;19)(q34;q11;p13)		1F2R2G	1 step	RCgC	RCgC
17	M	46,XY,t(9;9;22)(q34;q34;q11)		2F1R1G	2 step	RCgC	Failure
18	F	46,XX,t(9;22;16)(q34;q11;p12)		2F1R1G	2 step	RCgC	RCgC
19	F	46,XX,t(9;22;22)(q34;q11;q11)t(7;19)(q21;p13)		2F1R	1 step	RCgC	RCgC
20	M	46,XY,t(9;22;11)(q34;q11;q13)	BCR sul 3°chr	1F2R1G	2 step	RCgC	RCgC
21	F	46,XX,t(9;22;15)(q34;q11;q15)	BCR sul 3°chr	1F2R1G	1 step	RCgC	Deceduto
22	M	46,XY,t(1;9;22)(q21;q34;q11) Ph masked		1F2R1G	multistep	Fallimento	Fallimento
23	M	46,XY,t(9;22;12)(q34;q11;q24)	ABL1/BCR on 3° chr.	1F1R1G	2step	NE	RCgC
24	F	46,XX,t(9;9;22)(p13;q34;q22)	ABL1	1F1R1G	multistep	RCgP	RCgC
25	M	46,XY,t(1;9;22)(?;q34;q11)		NE	NE	RCgC	RCgC
26	F	46,XX,t(1;9;22)(?;q34;q11)	ABL1	NE	NE	Fallimento	Fallimento
27	F	46,XX,t(9;22;12)(q34;q11;?)		NE	NE	RCgC	RCgC
28	M	46,XY,t(3;9;22)(p21;q34;q11)	ABL1	NE	NE	RCgC	RCgC
29	M	46,XY,t(9;22;16;17)(q34;q11;?;?)		NE	NE	RCgC	RCgC
30	M	46,XY,t(9;22;21)(q34;q11;?)		NE	NE	RCgC	RCgC

Tabella 4: Caratteristiche citogenetiche e risposta al trattamento nei 30 pazienti con traslocazioni varianti.

Abbreviazioni: R segnale rosso, G segnale verde, F segnale di fusione

4.3.1 Identificazione dei diversi meccanismi mediante FISH

L'analisi in FISH risultava valutabile in 24/30 pazienti (80%): il pattern maggiormente riscontrato era un segnale di fusione sul der(22q), 2 segnali rossi sui cromosomi 9 normale e der(9q), due segnali verdi sul cromosoma 22 normale e sul terzo cromosoma coinvolto nella traslocazione. Tale pattern era indicativo di un meccanismo 1-step in cui i 3 cromosomi erano coinvolti contemporaneamente nella formazione del riarrangiamento BCR-ABL (n°1-16; 53%, Tab.4) (Fig.25A).

Due casi (n°17 e 18; Tab.4) mostravano un pattern di FISH con 2 segnali di fusione (uno sul cromosoma Ph e l'altro sul terzo cromosoma coinvolto), 1 segnale rosso (cromosoma 9 normale) e 1 segnale verde (cromosoma 22). Esso è caratteristico di un meccanismo 2-step, nel quale la classica traslocazione t(9;22) è seguita da una seconda traslocazione tra il derivativo 9q, che coinvolge il riarrangiamento ABL-BCR, e il terzo cromosoma della traslocazione (Fig.25B-C).

Sono stati poi riscontrati 4 diversi pattern di FISH, probabilmente originati da altri meccanismi e, forse, associati a delezioni dei cromosomi coinvolti (n°19-24; Tab.4):

1. Nel caso n°19 è stato osservato un pattern di 2 segnali di fusione, sul der(9q) e sul cromosoma 22, e 1 segnale rosso sul cromosoma 9 normale (2F1R); il cromosoma 22 privo di segnale sembrava di dimensioni inferiori rispetto al cromosoma normale all'analisi citogenetica. Questo pattern suggeriva un

meccanismo 1-step, in cui però il segnale di fusione, di solito sul der(22q), era localizzato sul terzo cromosoma coinvolto (l'altro cromosoma 22) (Fig.25D).

2. Nei casi n°20-22 il pattern osservato era di 1 segnale di fusione, 2 segnali rossi e 1 segnale verde (2F2R1V), come risultato di eventi differenti durante le traslocazioni, ipotizzati a seconda dei risultati di FISH su metafase.

In particolare, il caso n°20 mostrava il segnale di fusione sul der(22q), un segnale verde sul cromosoma 22 normale e due segnali rossi sui cromosomi 9 normale e der(11) (3° cromosoma coinvolto nella traslocazione), suggerendo un meccanismo 2-step con perdita del segnale di BCR che normalmente si trova sul 3° cromosoma. Nel caso n°21, la traslocazione avveniva mediante meccanismo 1-step con la perdita del segnale verde sul 3° cromosoma. Nel caso n°22, che in all'analisi citogenetica risultava essere Ph-negativo (in CC) con evidenti coinvolgimenti dei cromosomi 1 e 9, è stato ipotizzato un meccanismo multistep in quanto erano osservati 1 segnale di fusione sul der(22q), 2 segnale rossi sui cromosomi 9 normale e der(9q) e 1 segnale verde sul cromosoma 22 normale.

3. Il caso n°23 mostrava un pattern di FISH con 1 segnale di fusione sul der(22q), 1 segnale rosso sul cromosoma 9 normale e 1 segnale verde sul cromosoma 22 normale (1F1R1V). L'analisi citogenetica evidenziava il coinvolgimento del cromosoma 12, probabilmente attraverso un meccanismo 2-step con delezione della regione che dal der(9q) traslocava sul der(12) (Fig.25E).

4. Il caso n°24 è stato analizzato solo mediante sonda ES BCR-ABL: il segnale di fusione era localizzato sul braccio corto del cromosoma 9 e non si osservava alcun segnale sul der(9q), suggerendo anche in questo caso un meccanismo multistep.

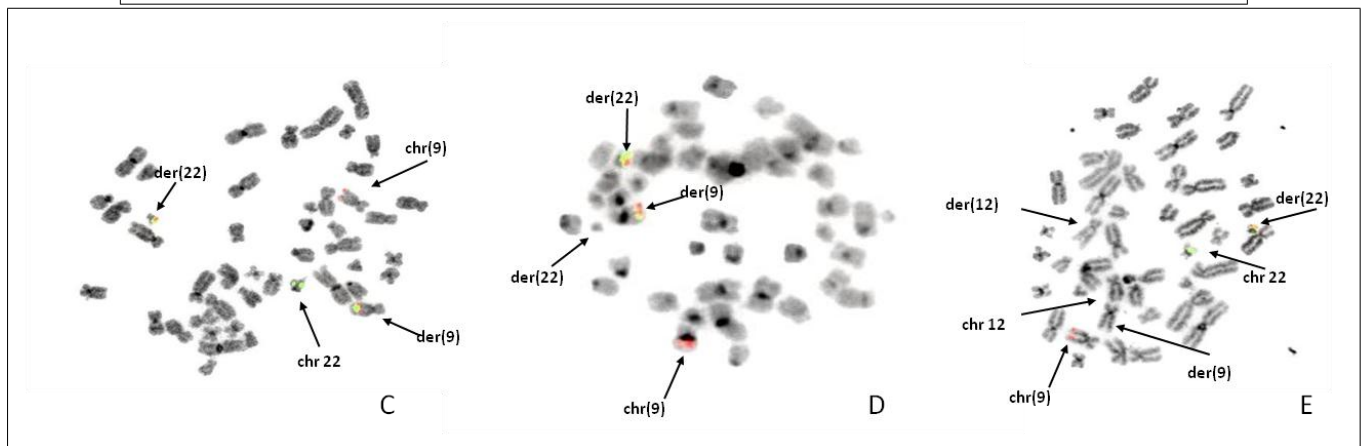
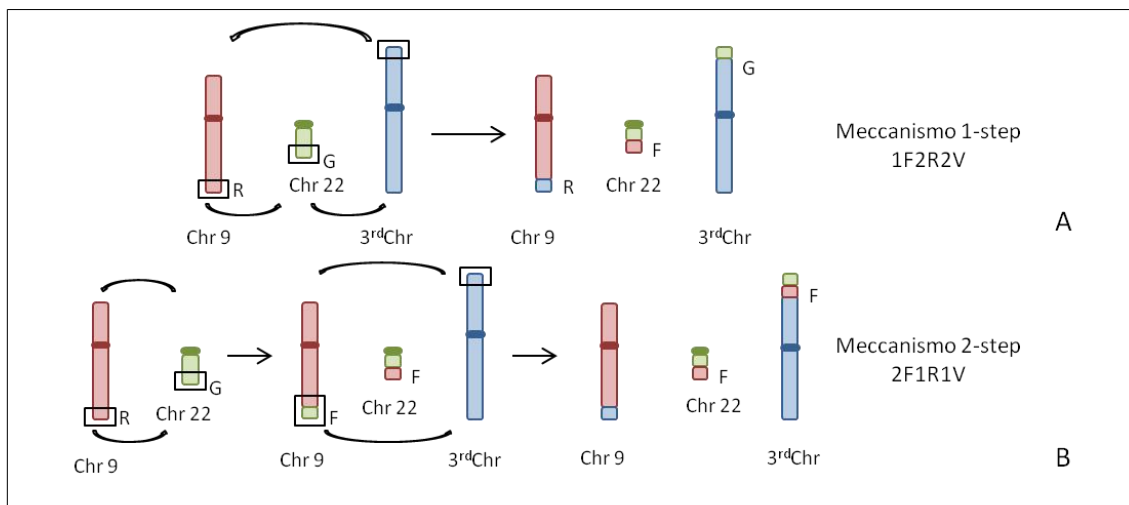


Figura 25: Meccanismi di formazione e analisi in FISH delle traslocazioni varianti:
A) meccanismo 1-step;
B) meccanismo 2-step;
C) caso n°17: 46,XY,t(9;9;22)(q34;q34;q11);
D) caso n°19: 46,XX,t(9;22;22)(q34;q11;q11),t(7;19)(q21;p13);
E) caso n°23: 46,XY,t(9;12;22)(q34;q11;q24)

4.3.2 Risposta al trattamento con Imatinib

Al momento dell'analisi il follow-up mediano della terapia con Imatinib era stato rispettivamente di 61 e 64 mesi nei pazienti con e senza traslocazione variante.

Le risposte al trattamento nei due gruppi analizzati sono riportate in Tab.5: non sono state osservate differenze significative in termini di risposta ematologica completa, RCgC e RMolM.

Risposta		Pazienti con traslocazione variante (N=30)	Pazienti senza traslocazione variante (N=529)	p
Risposta Ematologica Completa	overall	28 (93%)	518 (98%)	0.150
Risposta Citogenetica Competa	12° mese	21 (70%)	413 (78%)	0.366
	overall	25 (83%)	466 (88%)	0.394
Risposta Molecolare Maggiore	12° mese	17 (57%)	312 (59%)	0.850
	overall	25 (83%)	450 (85%)	0.793

Tabella 5: Risposta alla terapia con Imatinib

Il tempo medio di raggiungimento della RCgC era di 6 mesi in entrambi i gruppi. La RCgC nell'intero periodo di osservazione era 90% e 84% (p=0.49) e la durata mediana della risposta citogenetica era rispettivamente di 51 e 59 mesi (p=0.35) nei pazienti senza e con traslocazione variante, (Fig.26A).

La RMolM nell'intero periodo di osservazione era 90% e 84% ($p=0.66$) e il tempo mediano di raggiungimento della RMolM era rispettivamente di 6 e 9 mesi nei pazienti senza e con traslocazione variante (Fig.26B).

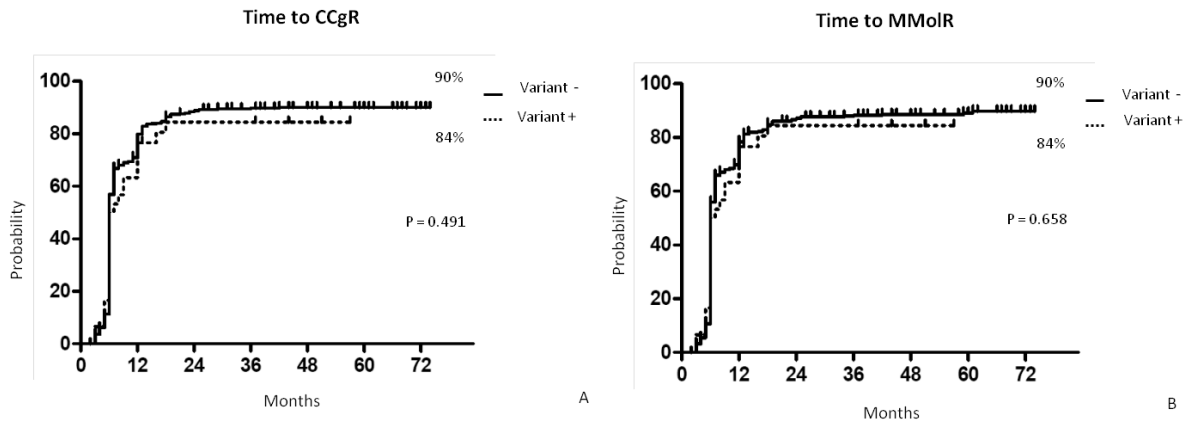


Figura 26: Risposte Citogenetica e Molecolare (analisi di Kaplan-Meier)

Le probabilità stimate per EFS, FFS, PFS e OS erano rispettivamente 64% e 70% ($p=0.82$), 74% e 73% ($p=0.72$), 87% e 83% ($p=0.42$) e 90% e 85% ($p=0.52$) per i pazienti senza e con traslocazioni varianti (Fig.27). Pertanto i 2 gruppi non erano significativamente differenti.

Sono stati osservati solo 2 casi ($n^{\circ}3$ e 29) che mostravano traslocazioni a 4-vie ed erano in RCgC e RMolM,.

Considerando il tipo di riarrangiamento, 18 casi mostravano un riarrangiamento 1-step, 4 casi un riarrangiamento 2-step e infine 2 casi un probabile meccanismo multistep. Dei 18 casi con riarrangiamento 1-step, 14 si trovavano in RCgC e RMolM, 3 casi uscivano dal protocollo, e 1 caso falliva il trattamento. Dei 4 casi che mostravano un riarrangiamento 2-step, 3 si

trovavano in RCgC e RMolM, mentre un caso falliva il trattamento dopo un anno e l'analisi citogenetica mostrava l'insorgenza di alterazioni aggiuntive: der(3)t(3;?), del(7q),add(21q). Dei 2 casi con riarrangiamento multistep, uno si manteneva in RCgC, mentre l'altro non raggiungeva la risposta ematologica completa. Non era possibile la correlazione tra l'outcome e il tipo di meccanismo coinvolto nel riarrangiamento a causa della scarsità dei pazienti per ogni gruppo.

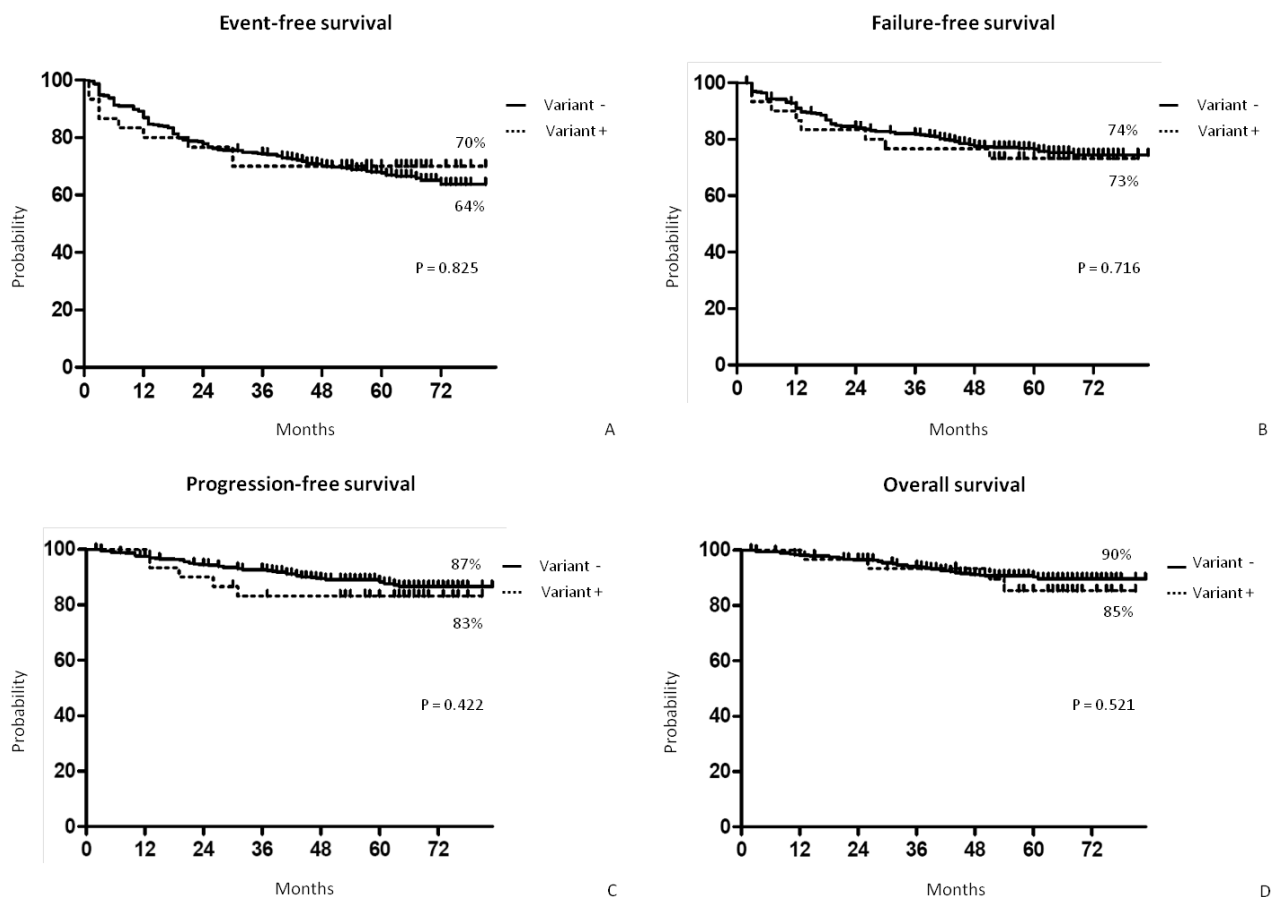


Figura 27: Curve di sopravvivenza: Event-free survival (EFS), Failure-free survival (FFS), Progression-free survival (PFS), Overall survival (OS) (Analisi di Kaplan-Meier)

4.4 Alterazioni citogenetiche aggiuntive al cromosoma Philadelphia alla diagnosi.

Dei 559 pazienti arruolati nei protocolli 021/022/023, 378 (68%) potevano essere inclusi in questa analisi, in quanto in 181 non era stato possibile valutare almeno 20 metafasi alla diagnosi. Ciò, per evitare di includere nel gruppo di pazienti senza ACAs, casi con un piccolo clone con ACAs.

Di essi, 21 pazienti (5,6%) mostravano ACAs. Le caratteristiche dei pazienti alla diagnosi sono mostrate nella Tab. 6. I due gruppi, con e senza ACAs, erano simili per le caratteristiche demografiche ed ematologiche, tranne che per il sesso e la percentuale di blasti periferici; la percentuale dei pazienti di sesso maschile (86% vs 59%; $p=0.02$) e la percentuale dei blasti periferici (2,5% vs 1%; $p=0,03$) erano significativamente più elevate nel gruppo con ACAs rispetto a quello senza. I rischi Sokal, Hasford e European Treatment and Outcome Study (EUTOS) erano equiparabili nei due gruppi. La dose di Imatinib era simile nei due gruppi. Non è stata osservata un'associazione delle ACAs con la presenza di traslocazioni varianti e con la delezione del der(9q).

Caratteristiche		Pazienti con ACAs (N=21)	Pazienti senza ACAs (N=357)	p
Età mediana (anni); (range)		45 (24-74)	50 (18-84)	0.18
Sesso maschi/femmine; N (%)		18/3 (86/14)	210/147 (59/41)	0.02
Milza, cm (range)		4 (0-21)	2 (0-23)	0.10
Hb mediana, g/dL;(range)		11.8 (8.2-16.0)	12.0 (6.4-17.5)	0.77
Conta PLT mediana, 10 ⁹ /L; (range)		406 (143-979)	346 (107-4920)	0.79
%mediana Blasti periferici; (range)		2.5 (1-8)	1 (0-10)	0.03
%mediana Eosinofili; (range)		3 (0-6)	2 (0-15)	0.53
%mediana Basofili; (range)		2 (0-10)	2 (0-19)	0.82
Sokal score; N (%)	basso	7 (33)	140 (39)	0.66
	int.	6 (29)	134 (38)	
	alto	8 (38)	83 (23)	
Hasford score; N (%)	basso	6 (29)	159 (45)	0.35
	int.	13 (62)	173 (48)	
	alto	2 (10)	25 (7)	
EUTOS score; N (%)	basso	18 (86)	338 (95)	0.20
	alto	3 (14)	19 (5)	
Traslocazioni Ph varianti; N (%)		1 (5)	24 (7)	1.00
Delezioni der(9); N (%)		4 (19)	36 (10)	0.26
Dose Imatinib; N (%)	400mg	16 (76)	258 (72)	0.81
	800mg	5 (24)	99 (28)	

Tabella 6: Caratteristiche dei pazienti nei due gruppi di studio, con ACAs e senza ACAs

4.4.1 Analisi citogenetica

Le caratteristiche citogenetiche dei 21 pazienti con ACAs sono riportate in Tab.7. Sono stati osservati: 9 pazienti (n°1-9; 43%) con perdita del cromosoma Y, 3 pazienti (n°10-12; 14%) con trisomia del cromosoma 8, 2 pazienti (n°13-14; 10%) con trisomia del cromosoma 19, 6 pazienti (n°15-20; 28%) con altre singole anomalie e 1 paziente (n°21) con cariotipo complesso (Fig.28).

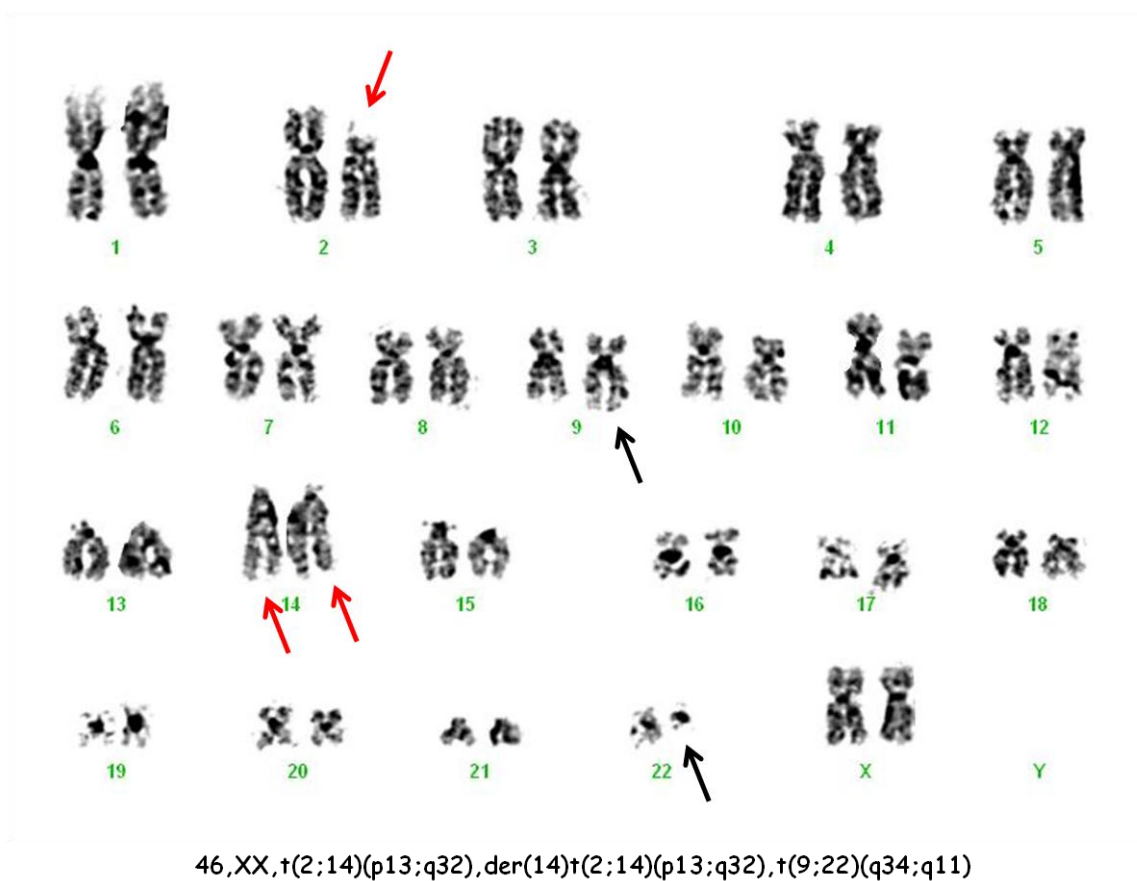


Figura 28: Cariotipo complesso del caso n°21

Le anomalie “major route”, trisomie 8 e 19, sono state osservate in 5 pazienti (24%).

Un paziente mostrava una traslocazione variante $t(9;22;22)(q34;q11;q11)$, caratterizzata sia mediante analisi di CC che di FISH. La delezione del der(9q) è stata osservata, mediante analisi in FISH, in 4 casi (n°1,7,15,20; 19%): 2 casi mostravano la perdita del cromosoma Y, 1 caso aveva $del(20)(q11q13)$ e infine 1 caso aveva $t(X;13)(q13;q32)$.

Nella maggior parte dei pazienti, le ACAs sono state osservate in tutte le cellule analizzate, mentre nei casi n° 1, 8 e 10 sono state osservate in un subclone, rispettivamente nel 65%, 33% e 14% delle metafasi.

N	Sesso	Cariotipo alla diagnosi (% metafasi con ACAs)	Delezione der(9q)	RCg 12m	Outcome
1	M	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) (65%)	Sì	RCgC	RCgC
2	M	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	RCgC	RCgC
3	M	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	RCgC	RCgC
4	M	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	NoRCg	Deceduto
5	M	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	RCgC	RCgC
6	M	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	NE	Fallimento
7	M	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) (100%)	Sì	RCgP	RCgC
8	M	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) (33%)	No	RCgC	RCgC
9	M	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	RCgC	RCgC
10	M	47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11) (14%)	No	RCgm	Deceduto
11	M	47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	RCgP	Fallimento
12	M	47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	RCgC	RCgC
13	M	47,XY,t(9;22)(q34;q11),+19 (100%)	No	RCgP	Drop-out
14	M	47,XY,t(9;22)(q34;q11),+19 (100%)	No	RCgC	Fallimento
15	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11),del(20)(q11q13) (100%)	Sì	RCgC	RCgC
16	M	46,XY,del(7)(p21),t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	NE	Fallimento
17	F	46,XX,t(1;7)(p36;q31),t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	RCgC	RCgC
18	M	46,XY,t(6;11)(q13;q13)t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	RCgC	RCgC
19	F	46,XX,t(7;19)(q21;p13),t(9;22;22)(q34;q11;q11) (100%)	No	RCgC	RCgC
20	M	46,XY,t(9;22)(q34;q11),t(X;13)(q13;q32) (100%)	Sì	RCgC	Fallimento
21	F	46,XX,t(2;14)(p13;q32),der(14)t(2;14)(p13;q32), t(9;22)(q34;q11) (100%)	No	NE	Fallimento

Tabella 7: Caratteristiche citogenetiche e risposta al trattamento nei 21 pazienti con ACAs

4.4.2 Risposta alla terapia con Imatinib e sopravvivenza

La risposta al trattamento con Imatinib è mostrata in Tab.8. Le risposte citogenetiche e molecolari erano uniformemente più basse nei pazienti che presentavano ACAs; a 12 mesi non si osservavano differenze significative, ma considerando le risposte nell'intero periodo di follow-up le percentuali di RCgC e RMolM si mostravano significativamente più basse nei pazienti con ACAs: 71% vs 89% (p=0.03) e 67% vs 86% (p=0.03) (Fig.29).

E' stata eseguita un'analisi multivariata allo scopo di osservare se il valore prognostico delle ACAs fosse dipendente da altre variabili, quali la presenza della traslocazione t(9;22) variante, la delezione del der(9q), il sesso, l'emoglobina, i livelli di basofili ed eosinofili, la dose di Imatinib somministrata e il rischio Sokal. E' stato dimostrato come l'impatto prognostico delle anomalie addizionali si mostri indipendente da esse (Tab.9).

Risposta		Pazienti con ACAs (N=21)	Pazienti senza ACAs (N=357)	p
Risposta Ematologica Completa	overall	21 (100%)	350 (98%)	1.00
Risposta Citogenetica Completa	12° mese	12 (57%)	267 (75%)	0.12
	overall	15 (71%)	317 (89%)	0.03
Risposta Molecolare Maggiore	12° mese	10(48%)	205 (57%)	0.50
	overall	14 (67%)	306 (86%)	0.03

Tabella 8: Risposta all'Imatinib: i pazienti sono stati considerati per la risposta a 12 mesi e per la loro miglior risposta durante l'intero periodo di follow-up

RCgC	Odds ratio	Deviazione standard	z	p> z	[Intervallo di confidenza 95%]	
ACAs	0.2506491	0.1418693	-2.44	0.014	0.082657	0.7600683
Varianti Ph del(9)	0.5733353	0.3446664	-0.93	0.355	0.1764819	1.86259
Sesso	2.417083	1.554654	1.37	0.170	0.6851781	8.526674
Emoglobina	1.132707	0.3962182	0.36	0.722	0.5706497	2.24836
Eosinofili	1.3555	0.1237197	3.33	0.001	1.133466	1.621029
Basofili	1.138051	0.100403	1.47	0.143	0.9573391	1.352876
Dose Imatinib	0.9109481	0.488844	-1.74	0.082	0.8200029	1.01198
score Sokal	0.8333311	0.3054995	-0.50	0.619	0.4062251	1.709497
	0.9955652	0.2284137	-0.02	0.985	0.6350055	1.560853

Tabella 9: Valutazione dell'associazione tra la presenza di ACA e la RCgC, considerando altre variabili.

Abbreviazioni: RCgC, Risposta citogenetica completa; Varianti Ph, Traslocazioni Ph varianti; del(9), delezione del derivativo del cromosoma 9

Il tempo mediano necessario per raggiungere la RCgC era rispettivamente 7 e 6 mesi nei pazienti con e senza ACAs ($p=0.45$). Nei casi in RCgC, 3 dei 15 (20%) pazienti con ACAs e 27 dei 317 (8,5%) pazienti senza ACAs successivamente perdevano la risposta citogenetica. La probabilità di sopravvivenza stimata senza ricaduta citogenetica era rispettivamente di 79% e 90% ($p=0,118$) nei pazienti con e senza ACAs.

Il tempo mediano necessario per raggiungere la MMolR era rispettivamente 13 e 18 mesi ($p=0,006$) nei pazienti con e senza ACAs.

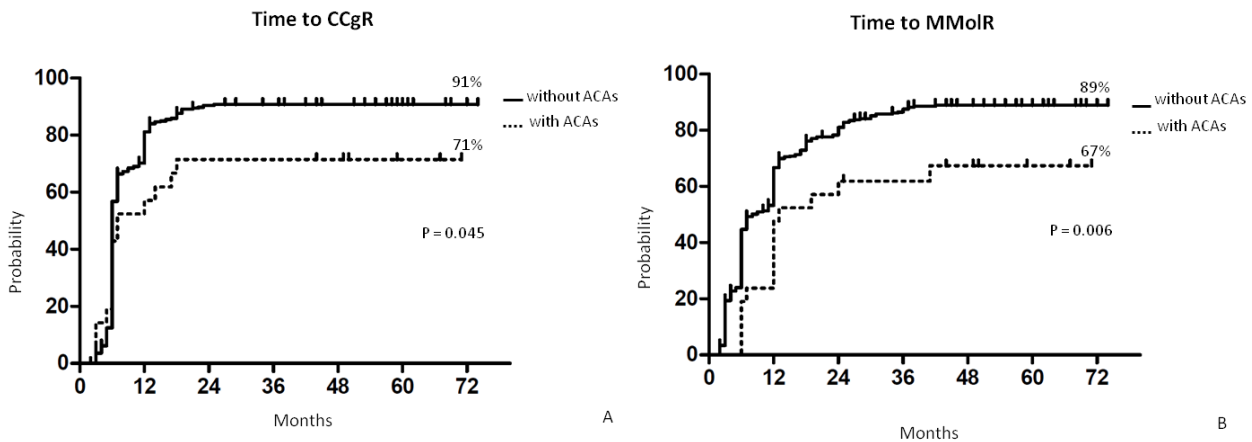


Figura 29: Analisi di Kaplan-Meier: tempi per la RCgC (A) e per la RMolM (B)

Le probabilità stimate per EFS, FFS, PFS e OS sono state 52 % vs 68% (p=0,96), 61% vs 76% (p=0,062), 85% vs 89% (p=0,453) e 89% vs 92% (p=0,764) per i pazienti con e senza ACAs, rispettivamente (Fig.30). Anche se i valori si mostravano inferiori nei pazienti con ACAs, le differenze rispetto ai pazienti senza ACAs non erano statisticamente significative. Inoltre la PFS e la OS risultavano sovrapponibili nei due gruppi, forse a causa dei passaggi ad una terapia con inibitori delle tirosinchinasi di seconda generazione (dasatinib, nilotinib).

Considerando il tipo di anomalia citogenetica, è stato osservato che:

- 7/9 casi che mostravano la perdita del cromosoma Y raggiungevano e mantenevano la RCgC e 6 raggiungevano anche la RMolM; 2 non erano in RCgC al 12° mese e fallivano il trattamento;
- 2/5 casi con una anomalia “major route” (trisomia 8 e 19) ottenevano la RCgC a 12 mesi, di questi solo 1 paziente manteneva la risposta per un

follow-up ulteriore; 2 fallivano il trattamento, 1 usciva dal trattamento e 1 moriva in RCg minima;

- 4/6 casi con altre singole anomalie ottenevano e mantenevano la RCgC o la RMolM, mentre 2 casi fallivano il trattamento con Imatinib;
- l'unico caso con cariotipo complesso (2ACAs) terminava la terapia con Imatinib a 6 mesi, a causa del fallimento del trattamento.

Comunque, non era possibile determinare il significato prognostico per ogni tipo di anomalia a causa della scarsità dei pazienti con diversi tipi di ACAs alla diagnosi.

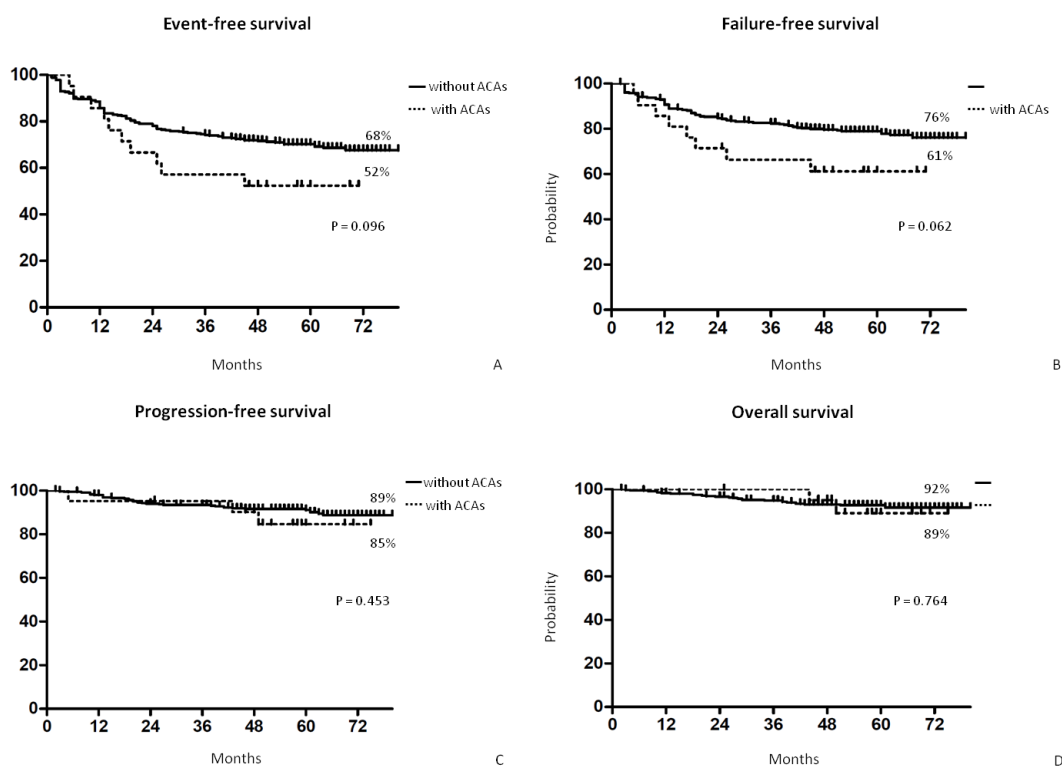


Figura 30: Curve di sopravvivenza: Event-free survival (EFS), Failure-free survival (FFS), Progression-free survival (PFS), Overall survival (OS) (Analisi di Kaplan-Meier)

5. DISCUSSIONE

Il ruolo del riarrangiamento BCR-ABL nello sviluppo e nella patogenesi della LMC è ormai ben documentato. Infatti, la formazione della proteina tirosinchinasi BCR-ABL ha un ruolo fondamentale nella patogenesi della LMC, poiché è in grado di influenzare eventi biologici quali proliferazione cellulare, arresto dell'apoptosi e diminuzione dell'adesione cellulare.

Risultati di studi clinici hanno rivelato che la terapia con Imatinib induce una remissione ematologica nei pazienti con LMC, anche nei casi in FC per i quali una precedente terapia con IFN- α non aveva avuto successo o era stata limitata per intolleranza (47).

La risposta citogenetica si osservava precocemente durante la somministrazione di Imatinib, in molti casi entro il 3° o 6° mese dall'inizio della terapia. Molti studi indicano la risposta citogenetica a 3 mesi un utile marker prognostico (54,71).

In realtà, alcuni pazienti risultano essere resistenti alla terapia con Imatinib; ciò potrebbe essere causato dall'insorgenza di mutazioni puntiformi nel sito catalitico di BCR-ABL, le quali impedirebbero a Imatinib di legarsi e inattivare la proteina stessa. Per questo motivo, sono stati sviluppati gli inibitori delle tirosinchinasi di seconda generazione che legandosi in siti diversi di BCR-ABL determinano una risposta più precoce e più potente rispetto a Imatinib: Dasatinib e Nilotinib.

Alla diagnosi, l'analisi citogenetica, convenzionale e molecolare, permette di valutare alcune caratteristiche che potrebbero avere un'impatto sulla prognosi dei pazienti LMC. Esse sono rappresentate da:

- Ph-negatività
- delezioni del derivativo del cromosoma 9
- traslocazioni t(9;22) varianti
- alterazioni citogenetiche aggiuntive al cromosoma Ph alla diagnosi.

In circa il 95% dei casi, la traslocazione t(9;22) è identificata mediante la presenza del cromosoma Ph all'analisi citogenetica, mentre è assente nel restante 5% dei casi, che vengono identificati come LMC Ph-masked.

In questi casi, la traslocazione può avvenire mediante un meccanismo 1-step o 2-step: nel primo, che si verifica nella maggior parte dei casi, la traslocazione è dovuta ad un'inserzione criptica del gene ABL nella regione di BCR sul cromosoma 22, o viceversa di BCR nella regione di ABL sul cromosoma 9; il secondo, invece, è determinato da un processo più complesso (sfavorevole dal punto di vista energetico) in cui la traslocazione classica t(9;22) è seguita da una seconda traslocazione che coinvolge diversi breakpoints, nelle stesse regioni dei cromosomi 9 e 22. In entrambi i casi, comunque, il risultato è la formazione di cromosomi derivativi 9 e 22 a morfologia normale (36-38). Numerosi case-reports hanno evidenziato come il riarrangiamento si localizzava preferenzialmente sul cromosoma 22. Inoltre, erano casi di pazienti Ph- trattati con chemioterapia convenzionale e/o IFN- α e riportavano che i pazienti con

riarrangiamento sul der(22q) avevano una prognosi simile ai pazienti Ph+, mentre pazienti con riarrangiamento sul der(9q) mostravano una peggior prognosi (39-45). Queste osservazioni avevano portato all'ipotesi che la localizzazione del riarrangiamento BCR/ABL sul der(9q) avesse un'impatto negativo sulla prognosi (39-45). Al tempo stesso, però, altri autori riportavano che il decorso clinico della LMC Ph- rientrava nella variabilità clinica propria della LMC. Tutti gli studi, comunque, rinforzavano l'idea che l'evento critico della patogenesi e il mantenimento della LMC fosse la formazione di BCR-ABL, indipendentemente dalla sua posizione.

Tre lavori, invece, riguardavano pazienti Ph-masked trattati con Imatinib (72-74). Il primo descriveva 4 casi trattati con Imatinib dei quali solo 1 raggiungeva la risposta citogenetica maggiore, suggerendo che essi fossero più resistenti a Imatinib, ma senza considerare la localizzazione del riarrangiamento (72). Il secondo riguardava un paziente che aveva sviluppato duplicazione del der(9q) ma che in trattamento con Imatinib aveva avuto riduzione della quantità di cellule BCR-ABL+ (73). Infine, il terzo studio riportava due pazienti dei quali uno era al momento ancora in fase cronica e l'altro era trattato con Imatinib dopo trapianto allogenico di cellule staminali (74).

Noi abbiamo riportato 6 casi che, all'analisi citogenetica, mostravano cariotipo normale ma erano BCR-ABL+ all'analisi molecolare. Era stata eseguita l'analisi in FISH per determinare la localizzazione del riarrangiamento ed è stato osservato come la maggior parte dei nostri pazienti (5/6; 83,3%) mostrava BCR-ABL sul der(9q), al contrario di quanto riportato in letteratura.

Inoltre, mentre in 5 pazienti il meccanismo era dovuto ad un'inserzione di BCR su ABL (4 casi) o viceversa di ABL su BCR (1 caso), in un paziente si trattava di un meccanismo 2-step in cui la traslocazione classica t(9;22) era seguita da una seconda traslocazione.

Tutti i pazienti sono stati trattati con Imatinib frontline o in seconda linea, dopo chemioterapia convenzionale, IFN- α o trapianto di cellule staminali, ed è stato osservato che 4/6 (66,7%) pazienti in trattamento con Imatinib erano in RCgC valutato in FISH, 1 paziente perdeva la RMolM dopo trattamento con Imatinib, e successivamente anche dopo nilotinib e dasatinib. Infine, un paziente non rispondeva al trattamento e la FISH su metafase mostrava la duplicazione del riarrangiamento BCR/ABL sul secondo cromosoma 9, con la contemporanea perdita del cromosoma 9 normale. Tale fenomeno rappresenta un meccanismo di progressione o resistenza della malattia, analogamente alla duplicazione del cromosoma Ph e all'amplificazione del riarrangiamento BCR/ABL.

La risposta dei pazienti Ph-masked veniva valutata mediante l'analisi in FISH e la RQ-PCR. In particolare, la risposta citogenetica veniva raggiunta in 18-36 mesi dall'inizio della terapia con Imatinib, mentre i pazienti Ph+ raggiungono la RCgC in 12 mesi nel 69% dei casi.

Inoltre, sono state osservate delezioni nel 33,3% dei pazienti Ph-masked, superiore rispetto a quella determinata nei pazienti Ph+ (12%). Nello studio, la presenza di tali delezioni non sembrava influenzare la prognosi dei pazienti in trattamento con Imatinib o altri TKI, poiché è stato osservato che i due pazienti con delezioni del der(9q) si trovavano ancora in RCgC. La questione se il

riarrangiamento BCR-ABL sul der(9q) possa influenzare la prognosi, così come la concomitante presenza di delezioni, non è conclusiva a causa anche del basso numero di pazienti studiati e dell'eterogeneità della terapia adottata.

Nei protocolli di terapia 021/022/023 del GIMEMA WP sono stati arruolati 559 pazienti trattati con Imatinib in prima linea. In questi pazienti è stato valutato se caratteristiche citogenetiche quali delezioni del der(9q), traslocazioni t(9;22) varianti e alterazioni citogenetiche addizionali al cromosoma Ph alla diagnosi, in pazienti LMC in fase cronica precoce, potevano avere un ruolo nella risposta al trattamento. Lo studio aveva lo scopo di determinare se in terapia con Imatinib, tali variabili mantenevano il valore prognostico già stabilito dopo chemioterapia convenzionale e/o IFN- α .

Delezioni del der(9q) sono state identificate nel 10-15% dei pazienti con LMC; sono di grandi dimensioni e di ampiezza variabile fino a molte megabasi e determinano la perdita di sequenze genomiche (circa 300 geni coinvolti) di entrambi i cromosomi 9 e 22, attorno al breakpoint del cromosoma 9. Tali delezioni insorgono contemporaneamente alla traslocazione t(9;22), forse a causa di un'instabilità genomica causata dalle rotture necessarie per la traslocazione stessa. Esse sono criptiche e per questo rivelate solo mediante analisi in FISH (27-29).

Prima dell'introduzione dell'Imatinib, la presenza di delezioni del der(9q) determinava una prognosi sfavorevole, mentre è stato riportato come pazienti in terapia con Imatinib mostravano risposte citogenetiche, molecolari e

sopravvivenze sovrapponibili a quelle osservate per i pazienti che non presentavano la delezione (30).

Nel 5-10% delle diverse casistiche, nella traslocazione t(9;22), oltre ai cromosomi 9 e 22, possono essere coinvolti 1 o più cromosomi (fino ad un massimo di 5), determinando così traslocazioni t(9;22) varianti. Numerosi studi hanno determinato che esse possono formarsi tramite due meccanismi: il primo è un meccanismo 1-step, in cui il coinvolgimento del terzo cromosoma è contemporaneo alla formazione del cromosoma Ph; l'altro è un meccanismo 2-step, in cui alla traslocazione classica ne segue un'altra tra il der(9q) e il terzo cromosoma. Quest'ultima è più rara e più sfavorevole dal punto di vista energetico, poiché coinvolge un numero maggiore di rotture cromosomiche, analogamente a quanto già osservato per i casi Ph-negativi. Oltre a questi, vi possono essere altri meccanismi, spesso associati a inserzioni e/o delezioni, determinati da riarrangiamenti più complessi (19-23).

Il significato prognostico delle traslocazioni t(9;22) varianti è stato discusso in studi precedenti, ma i dati relativi all'outcome dei pazienti trattati con Imatinib erano scarsi e riguardavano case reports, studi di pochi pazienti a diversi stadi della malattia e trattati in maniera eterogenea (IFN- α e TKI). Inoltre, alcuni di essi riportavano che pazienti con traslocazioni t(9;22) varianti avevano un'outcome sfavorevole (21,75-78), al contrario di altri che sostenevano che esse non influenzavano la risposta e la sopravvivenza (23,26,31,64,79-80).

In questa analisi, sono stati studiati 559 pazienti LMC in fase cronica precoce, arruolati nei protocolli di terapia 021-022-023 del GIMEMA WP per lo studio della LMC e trattati con Imatinib frontline. Di essi, 30 pazienti (5%) mostravano una traslocazione t(9;22) variante, in accordo con le altre casistiche già riportate. Non erano osservate regioni cromosomiche maggiormente coinvolte, ma 15 cromosomi erano coinvolti nelle traslocazioni varianti.

Confrontando i pazienti con e senza traslocazione t(9;22) variante è stato osservato come i due gruppi fossero equiparabili per caratteristiche demografiche e cliniche, mentre un maggior numero di pazienti con traslocazione variante veniva trattato con alte dose di Imatinib, ma la differenza non era significativa.

L'analisi in FISH con sonde dual color-dual fusion BCR-ABL ha permesso di studiare i meccanismi alla base della traslocazione: in particolare, il meccanismo 1-step è stato osservato in 18/24 (75%) casi valutabili, il meccanismo 2-step in 4 casi (16,7%) e infine un meccanismo più complesso in 2 casi (8,3%).

In accordo con le casistiche riportate in letteratura, la frequenza delle delezioni del der(9q) in questi pazienti risultava più elevata rispetto ai pazienti con traslocazione classica (20% vs 10%, rispettivamente). E' stato così ipotizzato come le numerose rotture che si verificano durante la formazione del cromosoma Ph determinano una maggiore probabilità per la perdita di materiale genomico, in particolare di geni oncosoppressori, soprattutto quando viene coinvolto un numero maggiore di regioni cromosomiche (21,26,81,82).

Sebbene il numero di pazienti con traslocazione t(9;22) variante fosse piccolo, è stato possibile osservare come tale caratteristica citogenetica non influenzi la risposta alla terapia con Imatinib. Infatti, si è dimostrato come le RCgC e MMolR, la stabilità della RCgC nel tempo e l'outcome dei 30 pazienti studiati erano sovrapponibili a quelli osservati nei pazienti con traslocazione t(9;22) classica. Infine, non sono state rilevate differenze in termini di risposta o sopravvivenza in relazione al tipo di meccanismo e al numero di cromosomi coinvolti, anche se il numero dei pazienti che mostravano un meccanismo 2-step o più complesso era piccolo.

Le alterazioni cromosomiche addizionali al cromosoma Ph (ACAs) sono osservate nel 5% dei pazienti LMC in fase cronica alla diagnosi (32,81,82). Tuttavia, la loro comparsa, nota come evoluzione clonale, è più comunemente associata alla progressione della malattia, rappresentando il 30% dei casi in fase accelerata e l'80% dei casi in crisi blastica.

Il significato prognostico delle ACAs alla diagnosi è stato oggetto di numerosi studi riportati in letteratura, anche se si tratta di case reports, studi di pazienti poco numerosi o a differenti stadi della malattia, più spesso in fase accelerata e/o trattati con terapie differenti (32,85-90). Essi riportavano come entro diversi stadi della malattia le ACAs non influenzano la risposta alla terapia, anche se l'evoluzione clonale è stata vista avere un'impatto significativo quando associata ad altre caratteristiche della fase accelerata.

Dall'altro lato, però, un'altra osservazione riportava come le ACAs presenti in pazienti in fase cronica precoce rappresentavano uno dei fattori avversi per la PFS a 6 mesi e le ACAs erano presenti in 4 dei 6 pazienti che progredivano entro 1 anno dall'inizio della terapia (91).

In questo studio, 21/378 pazienti (5,6%) mostravano ACAs alla diagnosi, confermando che non si tratta di alterazioni frequenti in fase cronica precoce, come già riportato in altre casistiche. L'alterazione più frequente osservata era la perdita del cromosoma Y (43%). Di solito, essa è associata all'età dei pazienti anche se non vi sono dati univoci sul suo significato nei pazienti con LMC (31-35). In questo studio, la perdita del cromosoma Y è stata considerata come un'ACA, poiché non presente nei pazienti in RCgC, confermando la sua associazione con la malattia, a differenza di quanto riportato in alcune altre casistiche. Le altre ACAs osservate erano: trisomia del cromosoma 8 in 3 pazienti (14%), trisomia del cromosoma 19 in 2 pazienti (10%), altre singole anomalie in 6 pazienti (28%) e infine un cariotipo complesso in 1 paziente (5%). Le trisomie 8 e 19 rientrano nelle anomalie "major route", osservate quindi in 5 pazienti (24%).

I due gruppi studiati (con e senza ACAs) erano simili per le caratteristiche demografiche e cliniche alla diagnosi, tranne che per la percentuale di blasti periferici e il sesso. Nella nostra casistica, la presenza delle ACAs sembra più comune nei pazienti di sesso maschile in quanto la perdita del cromosoma Y è l'anomalia più frequente; in realtà, tale sbilanciamento in favore dei pazienti di sesso maschile scompare se escludiamo i 9 pazienti con perdita del cromosoma

Y dallo studio. La percentuale mediana dei blasti periferici era più elevata nel gruppo con ACAs, ma tale piccola differenza sembra essere priva di significato biologico e clinico.

Sebbene il numero di pazienti con ACAs alla diagnosi sia relativamente basso, la presenza delle ACAs influenza la risposta alla terapia con Imatinib: infatti, le RCgC e RMolM erano significativamente più basse rispetto a quelle osservate nei pazienti senza anomalie addizionali; anche i tempi per raggiungere tali risposte erano più lunghi nei pazienti con ACAs.

Studi precedenti hanno dimostrato che il raggiungimento della RCgC nei pazienti in terapia con Imatinib rappresenta un'importante fattore prognostico per la OS e PFS e che la risposta molecolare precoce è importante per la stabilità senza progressione e per la durata della RCgC (51,92).

La differenze di RCgC e RMolM, in termini di percentuali e tempi, non si traducono in differenze nella sopravvivenza e decorso clinico. Infatti, il numero di eventi negativi era più elevato nei pazienti con ACAs, ma le corrispondenti curve di EFS e FFS non risultavano significativamente differenti nei due gruppi di pazienti ($p=0.09$ vs $p=0.06$). Inoltre, le PFS e OS erano sovrapponibili probabilmente a causa del basso numero di eventi avversi oppure perché alcuni pazienti, che fallivano la terapia con Imatinib, raggiungevano la risposta dopo terapia con TKI di seconda generazione.

Non è stato possibile determinare l'impatto prognostico sulla risposta e sulla sopravvivenza in relazione al differente tipo di alterazione, a causa del basso numero di pazienti per ognuna di esse; infatti, solo 3, 2 e 1 paziente avevano

rispettivamente trisomia 8, trisomia 19 e presenza di 2ACA. Inoltre 6 pazienti mostravano 6 differenti alterazioni singole, non frequenti in casi di LMC. Tuttavia, è stato osservato che pazienti con un'anomalia "major route" (trisomia 8 o 19) mostravano un'outcome peggiore, anche se in questo gruppo non sono state riscontrate alterazioni quali i(17q) e il doppio cromosoma Ph, segni di progressione di malattia, come invece riportato in un recente studio (33).

L'unico paziente con cariotipo complesso (senza però anomalie "major route") falliva il trattamento e terminava la terapia con Imatinib. L'aumentata instabilità genomica può facilitare la comparsa di un clone con fenotipo maligno.

Recentemente, uno studio ha riportato che la perdita del cromosoma Y aveva un impatto prognostico sfavorevole nei pazienti in terapia con Imatinib, in termini di RCgC, RMolM, EFS e OS (35). In questa casistica, invece, tale osservazione non viene confermata, in accordo con un altro studio.

Le ACAs possono essere osservate in tutte le cellule oppure in un subclone, definendo in quest'ultimo caso un'evoluzione clonale a cattiva prognosi. In questa casistica tale correlazione non è possibile, poiché solo tre pazienti presentavano le ACAs in un subclone: di essi, 2 mostravano la perdita del cromosoma Y e si trovavano in RCgC, mentre 1 paziente, che presentava la trisomia 8, moriva in RCg minima.

Questo studio suggerisce che le ACAs osservate alla diagnosi, sebbene non frequenti, hanno ancora un'impatto negativo nei pazienti con LMC in fase cronica precoce trattati con Imatinib, analogamente a quello che si era osservato nei pazienti trattati con terapie convenzionali.

Quindi, le ACAs rappresentano tutt'oggi una categoria più a rischio in termini di risposta e suggeriscono un più attento monitoraggio e il trattamento con TKI di seconda generazione.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Tura S. – *Lezioni di Ematologia* – Esculapio Editore, 2003, 222-230.
2. Cortes J.E., Talpaz M., Kantarjian H. – *Chronic myeloid leukemia: a review* – British Journal of Hematology 76: 27-32.
3. Rowley J.D. – *A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia indentified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining* – Nature 1973; 243: 290-293.
4. Walz C., Sattler M. – *Novel target therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML)* – Oncology Hematology 2006; 57 (2): 145-64
5. Advani A.S., Pendergast A.M. – *Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects* – Leukemia Research 2002; 26: 713-72.
6. Neves H, Ramos C, da Silva MG, et al. - *The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RAR α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation* - Blood. 1999;93:1197-207.
7. Pendergast AM. - *BCR-ABL protein domain function and signaling. In: Carella et al. Chronic Myeloid Leukemia: biology and treatment* - Dunitz Ed; 2001: 19-39.
8. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. - *The molecular biology of chronic myeloid leukemia.* - Blood. 2000;96:3343-56.

9. McWhirter JR, Wang JY. - *An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias* - EMBO J. 1993;12:1533-46.
10. Bathia R, Verfaillie C. - *Abnormalities in hemopoietic progenitor adhesion. In: Carella et al. Chronic Myeloid - Leukemia: biology and treatment. Dunitz Ed; 2001:41-54*
11. Pierce A, Spooncer E, Wooley S, et al. - *Bcr-Abl protein tyrosine kinase activity induces a loss of p53 protein that mediates a delay in myeloid differentiation* - Oncogene. 2000 Nov 16;19(48):5487-97.
12. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. - *Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression* - Leukemia. 2002;16:1402-11.
13. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, et al. - *Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis* - Oncologist. 2000;5:405-15.
14. Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, et al. - *Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR-ABL+ leukemic cells and induces apoptosis* - Blood Cells Mol Dis. 1997;23:380-94.
15. Kuribara R., Honda H., Matsui H. et al. - *Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl expressing hematopoietic progenitors* - Mol. Cell. Biol. 2004; 24: 6172-6183.
16. Crews L.A., Jamieson C.H.M. - *Chronic Myeloid Leukemia Stem Cell Biology* - Curr Hematol Rep 2012; 7:125-132.

17. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al. - *Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products* – Science 1990;247(4946):1079-82.
18. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. - *Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210 BCR-ABL gene of the Philadelphia chromosome* - Science 1990; 247:824-30.
19. Naumann S., Decker H.J. – *Genesis of variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myelogenous leukemia* – Cancer Genetics and Cytogenetics 2003, 147: 18-22.
20. Mitelman F. – *The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia* – Leukemia and lymphoma, 11: 11-15.
21. Gorusu M., Benn P., Li Z., Fang M. – *On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia* – Cancer Genet Cytogenet 2007; 173(2):97-106.
22. Huret JL - *Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukaemia.* – Hum Genet 1990;85(6):565-568.
23. Richebourg S, Eclache V, Perot C et al - *Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib therapy.*- Cancer Genet Cytogenet 2008;182(2):95-102.

24. Bennour A, Sennana H, Laatiri MA, Elloumi M, Khelif A, Saad A - *Molecular cytogenetic characterization of variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: genesis and deletion of derivative chromosome 9.* - Cancer Genet Cytogenet 2009;194(1):30-37.
25. Zaccaria A., Testoni N., Tassinari A. et al. – *Cytogenetic and molecular studies in patients with chronic myeloid leukemia and variant Ph translocations* – Cancer Genetics and Cytogenetics 1989; 42: 191-202.
26. El-Zimaity MM, Kantarjian H, Talpaz M, et al - *Results of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukaemia with variant Philadelphia chromosome.* - Br J Haematol 2004;125(2):187-195.
27. Sinclair P.B., Nacheva E.P., Leversha M et al. – *Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia* – Blood 2000; 95(3): 738-744.
28. Huntly B.J.P, Reid A.G., Bench A.J. et al. – *Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia* – Blood 2001; 98(6): 1732-1738.
29. Lee Y.K., Kim Y.R., Min H.C. et al. – *Deletion of any part of the BCR or ABL gene on the derivative chromosome 9 is a poor prognostic marker in chronic myeloid leukemia* – Cancer Genet Cytogenet 2006; 166: 65-73.
30. Castagnetti F., Testoni N., Luatti S. et al – *Deletions of the derivative chromosome 9 do not influence the response and the outcome of chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with imatinib mesylate: GIMEMA CML Working Party Analysis* – JCO 2010; 28(16): 2748-2754.

31. Johansson B., Fioretos T., Mitelman F. – *Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia* – Acta Haematologica 2002, 107: 76-94.
32. Markt S, Marin D, Foot N, et al. - *Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression.* - Haematologica. 2003;88(3):260-267.
33. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, et al. - *Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV.* - Blood. 2011;118(26):6760-6768.
34. Deininger MW. *Cytogenetic studies in patients on imatinib.* - Semin Hematol. 2003;40(2 Suppl 2):50-55.
35. Lippert E, Etienne G, Mozziconacci MJ, et al. *Loss of Y chromosome in Philadelphia-positive cells predicts a poor prognosis of chronic myeloid leukaemia patients to imatinib mesylate therapy.* - Haematologica 2010;95(9):1604-1607.
36. Van der Plas DC, Grosveld G, Hagemeijer A - *Review of clinical, cytogenetic and molecular aspects of Ph-negative CML* - Cancer Genet Cytogenet 1991, 52(2): 143-156
37. Hagemeijer A, Buijus A, Smit E, et al - *Translocation of BCR to chromosome 9: a new cytogenetic variant detected by FISH in two Ph-negative, BCR-positive patients with chronic myeloid leukemia* - Genes Chromosome Cancer 1993; 8(4): 237-245

38. Nacheva E., Holloway T., Brown K., et al - *Philadelphia-negative chronic myeloid leukaemia: detection by FISH of BCR/ABL fusion gene localized either to chromosome 9 or chromosome 22* - Br J Haematol 1994, 87(2): 409-412
39. Brunel V., Sainty D., Costello R., et al - *Translocation of BCR to chromosome 9 in a Philadelphia-Negative Chronic Myeloid Leukemia* - Cancer Genet Cytogenet 1995, 85: 82-84
40. Takahashi N., Miura I., Ohshima A., et al - *Duplication of chromosome 9 carrying a BCR/ABL chimeric gene in Philadelphia chromosome negative chronic myeloid leukemia* - Cancer Genet cytogenet 1996, 89:166-169
41. Estop A.M., Sherer C., Cieply K., et al - *A Ph-negative chronic myeloid leukemia patient with a non-classical BCR/ABL rearrangement characterized by fluorescence in situ hybridization* - Cancer Genet Cytogenet 1997, 96: 174-176
42. Abruzzese E., Pettenati M.J., Cox K., - *Identification of BCR/ABL fusion on chromosome 9 by fluorescence in situ hybridization in two chronic myeloid leukemia cases* - Cancer Genet Cytogenet 1998, 105: 164-167
43. Vieira L., Alves A.C., Marques B, et al - *Insertion of the 5' part of BCR within the ABL gene at 9q34 in a Philadelphia-negative chronic myeloid leukemia* - Cancer Genet Cytogenet 1999, 114: 17-21
44. Verma R.S.,Chandra P. - *Clinical significance of reverse BCR/ABL gene rearrangement in Ph-negative chronic myelogenous leukemia* - Leukemia Research 2000, 24: 631-635

45. Michalova K, Zemanova Z, Brezinova J, et al - *Location of the BCR/ABL fusion genes on both chromosomes 9q34 in Ph negative Chronic Myeloid Leukemia* - *Leukemia and Lymphoma* 2002, 43(8): 1695-1700.
46. Capdeville R., et al. – *Glivec (STI571, Imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug* – *Nature Reviews, Drug Discovery* July 2002; 1:493-502.
47. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. - *Effects of a selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells* - *Nature Med.* 1996;2:561-6.
48. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. - *Inhibition of the Abl Protein-tyrosine Kinase in vitro and in vivo by a 2-Phenylaminopyrimidine derivative* - *Cancer Res.* 1996;56:100-4.
49. Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, Luthra R, Giles F, Verstovsek S, Faderl S, Thomas D, Garcia-Manero G, Rios MB, Shan J, Jones D, Talpaz M. - *Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon- α .* - *Blood* 2004;104:1979-88
50. Baccarani M, Pane F, Saglio G. - *Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia.* - *Haematologica* 2008; 93: 161-166.
51. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. - *Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.* - *N Engl J Med* 2006;355:2408-17.

52. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. - *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.* – N Engl J Med. 2001;344:1031-7.
53. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. - *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome.* - N Engl J Med. 2001; 344:1038-42.
54. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. - *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia.* - N Engl J Med. 2002; 346:645-52.
55. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. - *Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study.* - Blood. 2002; 99:3530-9.
56. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. - *Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study.* - Blood. 2002; 99:1928-37.
57. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, et al. - *Treatment of Philadelphia Chromosome-positive, Accelerated-phase Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib Mesylate.* - Clin Cancer Res. 2002; 8:2167-76.

58. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. - *Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia.* - N Engl J Med. 2003;348:994-1004.
59. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. - *Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia.* - N Engl J Med. 2003;349:1423-1432.
60. Belloc F., Moreau-Gaudry F., Uhalde M – *Imatinib and Nilotinib induce apoptosis of Chronic Myeloid Leukemia cells through a Bim dependent pathway modulated by cytokines* - Cancer Biol Ther 2007;6(6):912-9
61. Nam S., Kim D., Cheng J.Q. et al.; *Action of the Src family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825) on human prostate cancer cells;* Cancer Res., 2006; 65:9185-9189;
62. Steinberg M.; *Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia;* Clinical Therapeutics, 2007; vol. 29, n° 11.
63. Specchia G., Albano F., Anelli L., Greco G. et al. – *Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia are associated with loss of tumor suppressor genes* – Leukemia and lymphoma 2003; 1-5.
64. O'Brien S., Thall P., Siciliano M.J. – *Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia* – Bailliere's Clinical Haematology 1997; 10: 259-272.

65. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. - *Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.* - Blood. 2006; 108:1809-20.
66. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, et al. - *GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients.* - Clin Cancer Res 2006;12:3037-42.
67. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. - *Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program.* - Leukemia 2003;17:2318-57.
68. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. - *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects.* - Leukemia. 2003;17:1013-1034.
69. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. - *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia.* - Leukemia. 1999;13:1901-28.

70. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. - *Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results.* - *Blood.* 2006;108:28-37.
71. Rosti G., Testoni N., Martinelli G., Baccarani M. – *The cytologic response as a surrogate marker of survival* – *Seminars in Hematology* 2003; 40 (suppl. 2): 56-61.
72. Haigh S., Cuthbert G. - *Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia* - *Cancer Genet Cytogenet* 2004, 155: 132-137
73. Fugazza G, Garuti A, Marchelli S, et al - *Masked Philadelphia chromosome due to atypical BCR/ABL location on the 9q34 band and duplication of the der(9) in a case of chronic myelogenous leukemia* - *Cancer Genet Cytogenet* 2005, 163: 173-175
74. Batista D.A.S., Hawkins A, Murphy F.M., et al - *BCR/ABL rearrangement in two cases of Philadelphia chromosome negative chronic myeloid leukemia: deletion on the derivative chromosome 9 may or not be present* - *Cancer Genet Cytogenet* 2005, 163: 164-167
75. Bernstein R, Pinto MR, Wallace C, et al - *The incidence, type, and subsequent evolution of 14 variant Ph1 translocations in 180 South African patients with Ph1-positive chronic myeloid leukemia.* - *Cancer Genet Cytogenet* 1984;12(3):225-238.

76. Loncarevic IF, Römer J, Starke H, et al - *Heterogenic molecular basis for loss of ABL1-BCR transcription: deletions in der(9)t(9;22) and variants of standard t(9;22) in BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia.* - Genes Chromosomes Cancer 2002;34(2):193-200.
77. Reid AG, Huntly BJ, Grace C, et al – *Survival implications of molecular heterogeneity in variant Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia.* - Br J Haematol 2003;121(3):419-427.
78. Stagno F, Vigneri P, Del Fabro V, et al - *Influence of complex variant chromosomal translocations in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors.* - Acta Oncol 2010;49(4):506-508.
79. Sandberg AA - *Chromosomes and causation of human cancer and leukemia: XL, The Ph1 and other translocations in CML.* - Cancer 1980;46(10):2221-2226.
80. De Braekeleer M - *Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia.* - Cytogenet Cell Genet 1987;44(4):215-222.
81. De Melo VA., Milojkovic D., Marin D., et al. – *Deletions adjacent to BCR and ABL1 breakpoints occur in a substantial minority of chronic myeloid leukemia patients with masked Philadelphia rearrangements.* – Cancer Genet Cytogenet 2008; 182(2):111-115.
82. Zagaria A., Anelli L., Albano F., et al. – *Molecular cytogenetic characterization of deletions on der(9) in chronic myelocytic leukemia.* - Cancer Genet Cytogenet 2008; 167(2):97-102.

83. Sokal JE, Gomez GA, Baccarani M, et al. - *Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis of Philadelphia chromosome positive chronic granulocytic leukemia.* - Blood 1988;72(1):294-298.
84. Kantarjian HM, Smith TL, McCreddie KB, et al. - *Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patients characteristics and therapy with survival.* - Blood 1985;66(6):1326-1335.
85. Zaccaria A, Testoni N, Valenti AM, et al. - *Chromosome abnormalities additional to the Philadelphia chromosome at the diagnosis of chronic myelogenous leukemia: pathogenetic and prognostic implications.* - Cancer Genet Cytogenet. 2010; 199(2):76-80.
86. Schoch C, Haferlach T, Kern W, et al. *Occurrence of additional chromosome abnormalities in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate.* Leukemia 2003;17(2):461-463.
87. Cortes JE, O'Dwyer ME. *Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia.* Hematol Oncol Clin North Am 2004; 18(3):671-84.
88. Cortes JE, Talpaz M, Giles F, et al. *Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy.* Blood 2003;101(10):3794-800.
89. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, et al. *The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML.* Blood 2002;100(5):1628-33.

90. Verma D., Kantarjian HM., Shan J., et al. – *Survival outcomes for clonal evolution in chronic myeloid leukemia patients on second generation tyrosine kinase inhibitor therapy.* – Cancer 2010; 116: 2673-2681.
91. Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, et al. - *European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor* - Blood 2008;112(12):4437-4444.
92. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, et al. - *Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis.* - J Clin Oncol. 2008;26(20):3358-63.