



## **Leucemia Linfatica Cronica: caratterizzazione citogenetica**

**Approvato dal Gruppo di Studio sulla Patologia Molecolare**

**A cura di:** Patrizia Scaravaglio, Emilia Giugliano

**Coordinatori:** Francia di Celle Paola, Venesio Tiziana

**Partecipanti:**

Cappia Susanna, Casorzo Laura, Di Benedetto Massimo, Falcone Patrizia Agnese, Giugliano Emilia, Giustetto Doriana, Maffè Antonella, Mariani Sara, Orecchia Sara, Pegoraro Fabiola, Rapa Ida, Saponaro Sara, Scaravaglio Patrizia, Scatolini Maria, Schillaci Francesca, Trisolini Elena, Veggiani Claudia, Verdun Di Cantogno Ludovica



# **Leucemia Linfatica Cronica: caratterizzazione citogenetica**

Laboratorio di Medicina Interna II ad indirizzo Ematologico  
Laboratorio di Citogenetica

Dott.ssa Patrizia Scaravaglio  
Dott.ssa Emilia Giugliano

Documento condiviso dal Gruppo di Patologia Molecolare  
3 ottobre 2019

# LLC: PRESENTAZIONE CLINICA

Disordine linfoproliferativo cronico acquisito, di natura monoclonale, caratterizzato dall'espansione di piccoli linfociti apparentemente maturi che si accumulano nel sangue periferico, midollare e negli organi linfatici

## DIAGNOSI

Caratterizzata da leucocitosi con linfocitosi,  
Il numero di linfociti circolanti  $> 5000/\text{mm}^3$

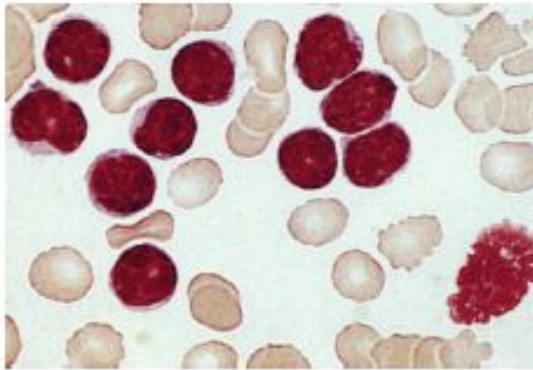
Senza linfocitosi

- Infiltrazione linfonodale, midollare o splenica
- Assenza di linfocitosi nel periferico

- Assenza di linfocitosi nel periferico
- Assenza di sintomatologia
- Esami di routine identificano una clonalità per cellule B

# B-CLL diagnostic criteria

---



Accumulation of  
small lymphocytes  
"mature appearing"

Dameshek 1981

**Bone marrow not required for diagnosis**

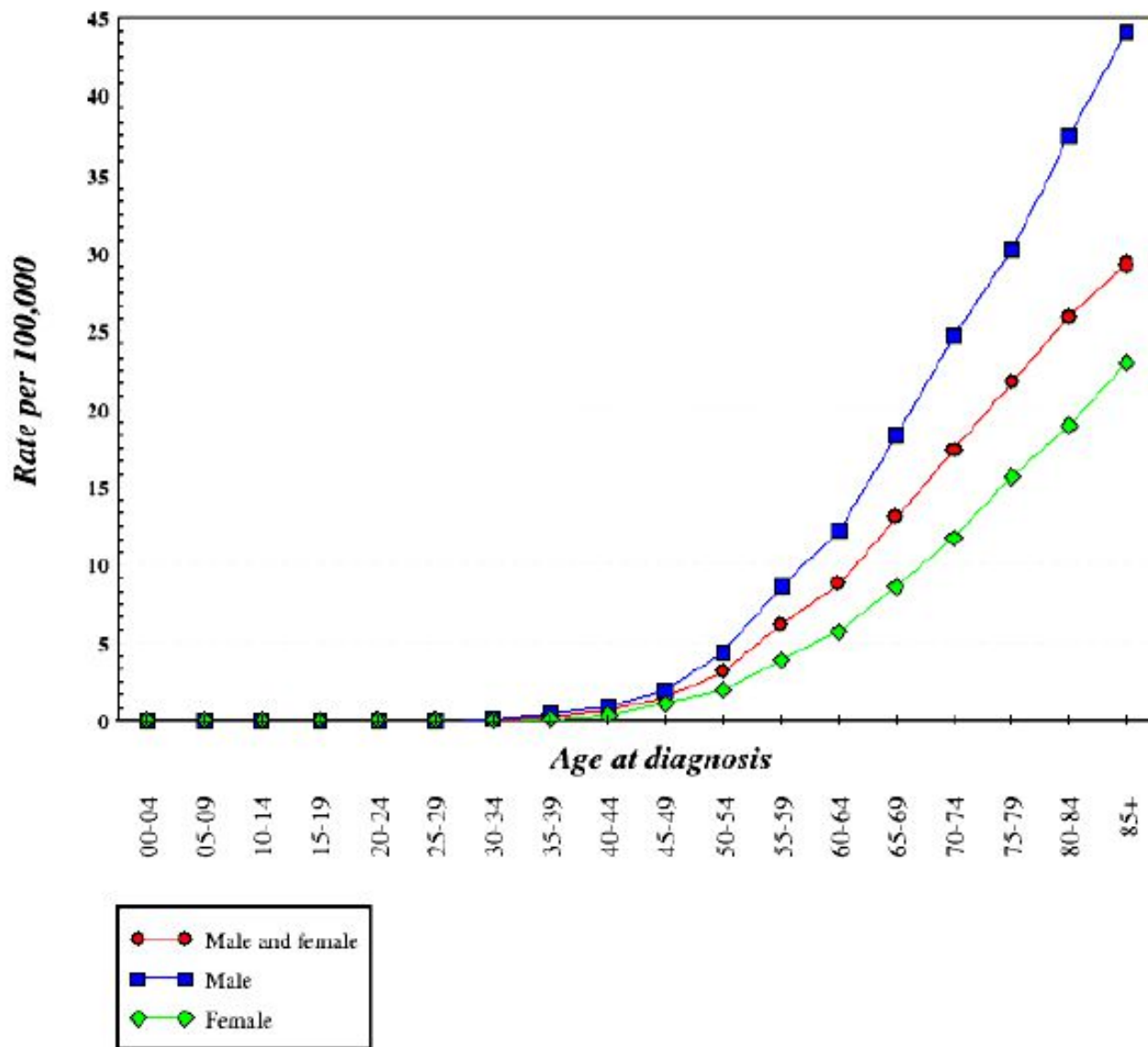
The 2007 IWCLL guidelines

Lymphocytosis  $>5 \times 10^9/L$  in blood

A specific B-cell phenotype

# Leucemia Linfatica Cronica: epidemiologia

- La più frequente forma leucemica dell'adulto (25% delle leucemie) e la più frequente nei paesi Occidentali.
- Incidenza pari a a  $3 \times 100.000$  abitanti anno (paesi occidentali), ma circa  $30 \times 100.000$  abitanti anno dopo i 70 anni
- Età mediana di insorgenza 65 anni
- M/F: 2/1
- Circa il 20-30% dei pazienti ha un'età < 55 anni; 1/3 < 60 anni
- Rara negli orientali anche dopo immigrazione nei paesi occidentali (l'influenza genetica ha maggior importanza dei fattori ambientali nella patogenesi della malattia)



Biological heterogeneity



Clinical heterogeneity



Different prognosis

**Esame  
morfologico  
striscio sangue  
periferico**

**Analisi  
citofluorimetrica  
sangue periferico**



**Analisi citogenetica  
FISH**

**Analisi mutazionale**



# LLC: Alterazioni Citogenetiche

Alcune alterazioni citogenetiche hanno dimostrato ruolo patogenetico

- Delezione 17p13: localizzato gene p53
- Trisomia 12: iperespressione gene MDM2 in grado di legare e inattivare la p53 normale
- Delezione 11q22: localizzato gene ATM (segnali di apoptosi in risposta al danneggiamento del DNA)

Alcune alterazioni citogenetiche sono associate a caratteristiche tipiche di alcune forme di malattia

Delezione 11q: malattia caratterizzata da marcata linfoadenopatia ma anche da refrattarietà a chemioterapici che danneggiano DNA

Delezione 17p: malattia caratterizzata da refrattarietà a terapia con analoghi purinici

# iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL

Michael Hallek, Bruce D. Cheson, Daniel Catovsky, Federico Caligaris-Cappio, Guillermo Dighiero, Hartmut Döhner, Peter Hillmen, Michael Keating, Emili Montserrat, Nicholas Chiorazzi, Stephan Stilgenbauer, Kanti R. Rai, John C. Byrd, Barbara Eichhorst, Susan O'Brien, Tadeusz Robak, John F. Seymour, and Thomas J. Kipps

Blood 2018 131:2745–2760; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806398>

Diagnostic test	General practice	Clinical trial
<b>Tests to establish the diagnosis</b>		
CBC and differential count	Always	Always
Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes	Always	Always
<b>Assessment before treatment</b>		
History and physical, performance status	Always	Always
CBC and differential count	Always	Always
Marrow aspirate and biopsy	When clinically indicated (unclear cytopenia)	Desirable
Serum chemistry, serum immunoglobulin, and direct antiglobulin test	Always	Always
Chest radiograph	Always	Always
Infectious disease status	Always	Always
<b>Additional tests before treatment</b>		
Molecular cytogenetics (FISH) for del(13q), del(11q), del(17p), add(12) in peripheral blood lymphocytes	Always	Always
Conventional karyotyping in peripheral blood lymphocytes (with specific stimulation)	NGI*	Desirable
TP53 mutation	Always	Always
IGHV mutational status	Always	Always
Serum $\beta_2$ -microglobulin	Desirable	Always
CT scan of chest, abdomen, and pelvis	NGI	Desirable
MRI, PET scans	NGI	NGI
Abdominal ultrasound†	Possible	NGI

General practice is defined as the use of accepted treatment options for a CLL patient not enrolled on a clinical trial.

CBC, complete blood count; MRI, magnetic resonance imaging; NGI, not generally indicated; PET, positron emission tomography.

\*Conventional karyotyping in peripheral blood lymphocytes (with specific stimulation) may be useful before therapy, if established methodology is available.

†Used in some countries to monitor lymphadenopathy and organomegaly.

## FISH on interphase cells

---

- 12 centromere (trisomy 12)
- 13q14 deletion
- 17p13 deletion (p53, tumor-suppressor gene)
- 11q23 deletion (ATM gene)

<b><i>Anomalia</i></b>	<b><i>Frequenza</i></b>	<b><i>Caratteristiche</i></b>
Delezione 13q	50-60%	Prognosi favorevole e morfologia tipica se anomalia isolata
Trisomia 12	10-25%	Morfologia mista; prognosi sfavorevole se in citog. convenzionale
Delezione 11q	11-25%	LLC tipica; età giovanile; linfoadenomegalie; malattia progressiva
Delezione 17p	3-7%	LLC/PL; refrattarietà agli analoghi purinici; breve sopravvivenza

# Delezione 13q14

- Anomalia più frequente : circa 50% dei casi
- Associata a prognosi favorevole quando isolata
- Individuati geni target tra cui DLEU2 codificante per due micro RNA che regolano la funzione di BCL-2
- Differenze di predittività del decorso in presenza di delezione omozigote o eterozigote, grandezza del clone con delezione e ampiezza della delezione
- Alta percentuale di cellule con nuclei deleti (>70%) rappresenta un marker indipendente di progressione: rischio intermedio ( Van Dyke DL, 2016)
- Ampie delezioni che includono RB1 (13q14.1-q14.2) hanno significato prognostico incerto
- Gruppo eterogeneo di pazienti meritevole di ridefinizione del rischio
- Significato clinico più complesso

# Trisomia 12

- 15% dei pazienti
- Più frequente acquisizione di materiale cromosomico
- Anomalia precoce insieme alla del 13q14 nella patogenesi della LLC
- Spesso è associata a varianti morfologiche ( LLC atipica e LLC/PLL)
- Nel 25% dei casi associata a mutazioni del gene NOTCH1 soprattutto nei pazienti con IGVH non mutato ( Scarfò L, 2016) e decorso più aggressivo
- Lesione a prognosi intermedia (Scarfò L, 2016)
- Buona risposta alla chemioimmunoterapia con sopravvivenza più lunga rispetto alla sola chemioterapia

# Delezione 11q22

- 7-25% a seconda dello stadio della malattia
- Biologicamente associata a IGHV non mutato, CD38+
- Delezione del gene dell'ataxia teleangectasia (ATM) coinvolto nel processo di trasduzione del segnale attivato in risposta a rotture del DNA.
- Valore prognostico sfavorevole superato dall'utilizzo di nuove strategie terapeutiche all'interno di trial clinici  
(International CLL-IPP working group, 2016)

# Delezione 17p13

- 7% delle LLC
- Spesso associata a mutazione inattivante dell'allele TP53 residuo
- Resistenza all'apoptosi e instabilità genetica → anomalie cromosomiche complesse
- Prognosi sfavorevole sia della del 17p13 che della mutazione indipendentemente dalla presenza della delezione
- Associata a chemiorefrattarietà
- Aumentato rischio di progressione
- Trattamenti con nuovi inibitori (target therapy)



# Guideline recommendations for *TP53* analysis in clinical practice

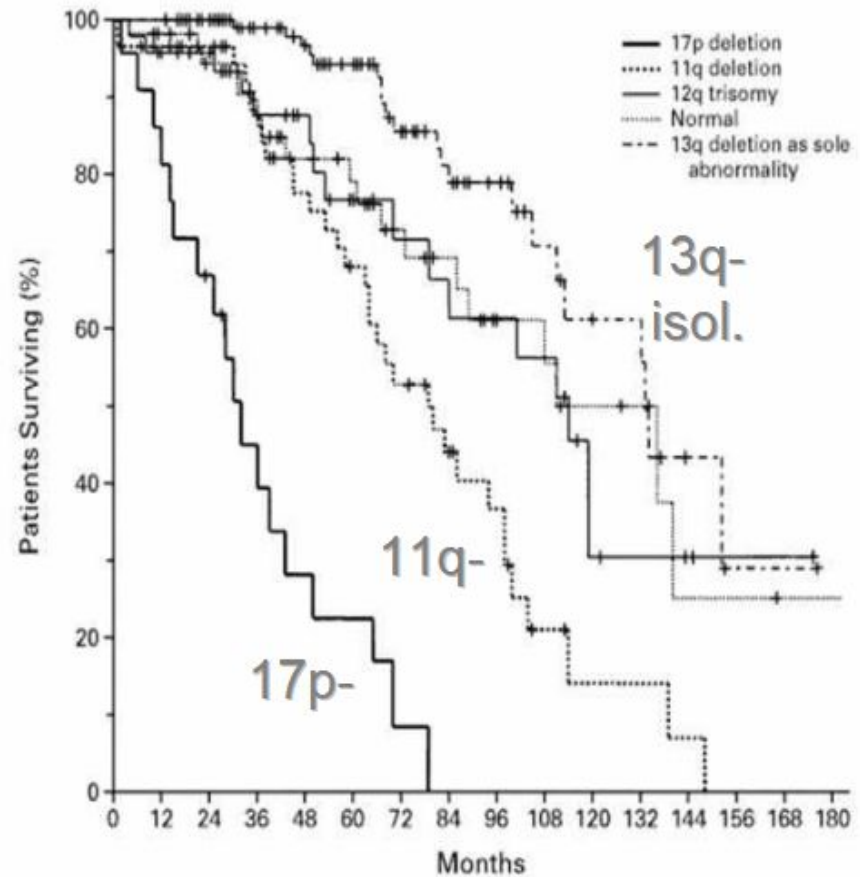
	<b>When</b>	<b>What</b>
<b>iwCLL</b>	Before treatment	17p deletion and <i>TP53</i> mutation
<b>ERIC</b>	Before treatment	<i>TP53</i> mutation
<b>BCSH</b>	Before treatment	17p deletion and <i>TP53</i> mutation
<b>NCCN</b>	Before treatment	17p deletion and <i>TP53</i> mutation
<b>ESMO</b>	Before treatment	17p deletion and <i>TP53</i> mutation

# Sopravvivenza in rapporto alla citogenetica

(Döhner et al, NEJM 343: 1910, 2000 ):

## Sopravv. mediana

Normale	111 mesi
+12	114 mesi
13q- isol	133 mesi
17p-	32 mesi
11q-	79 mesi

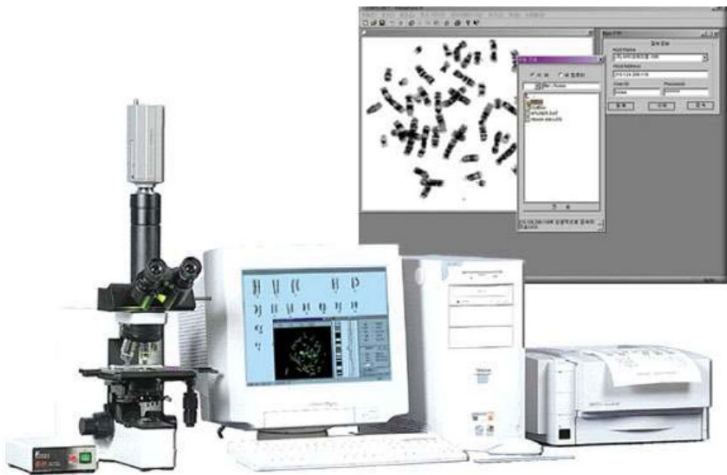
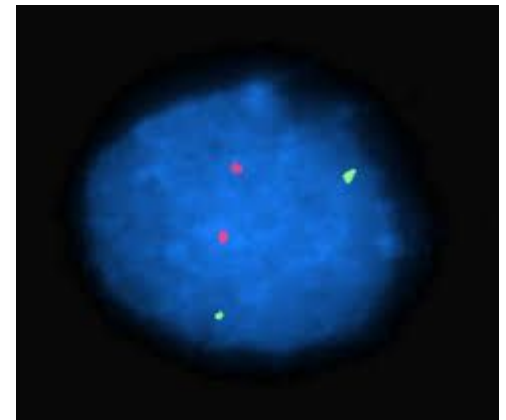
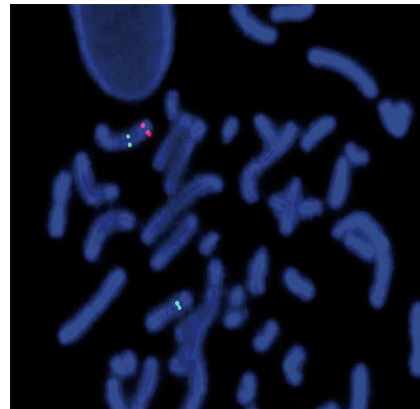
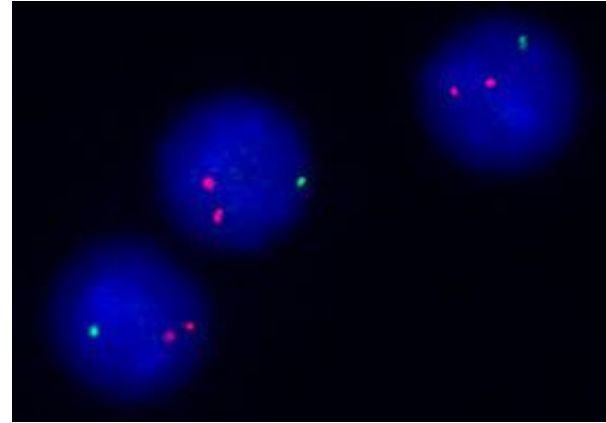
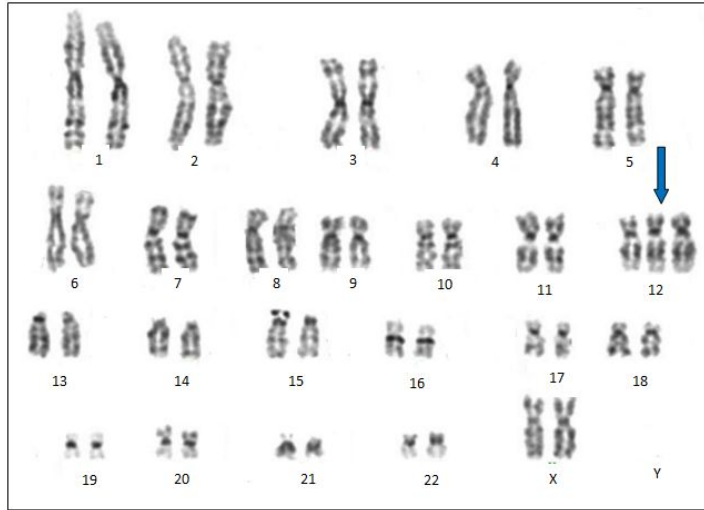


### No. AT RISK

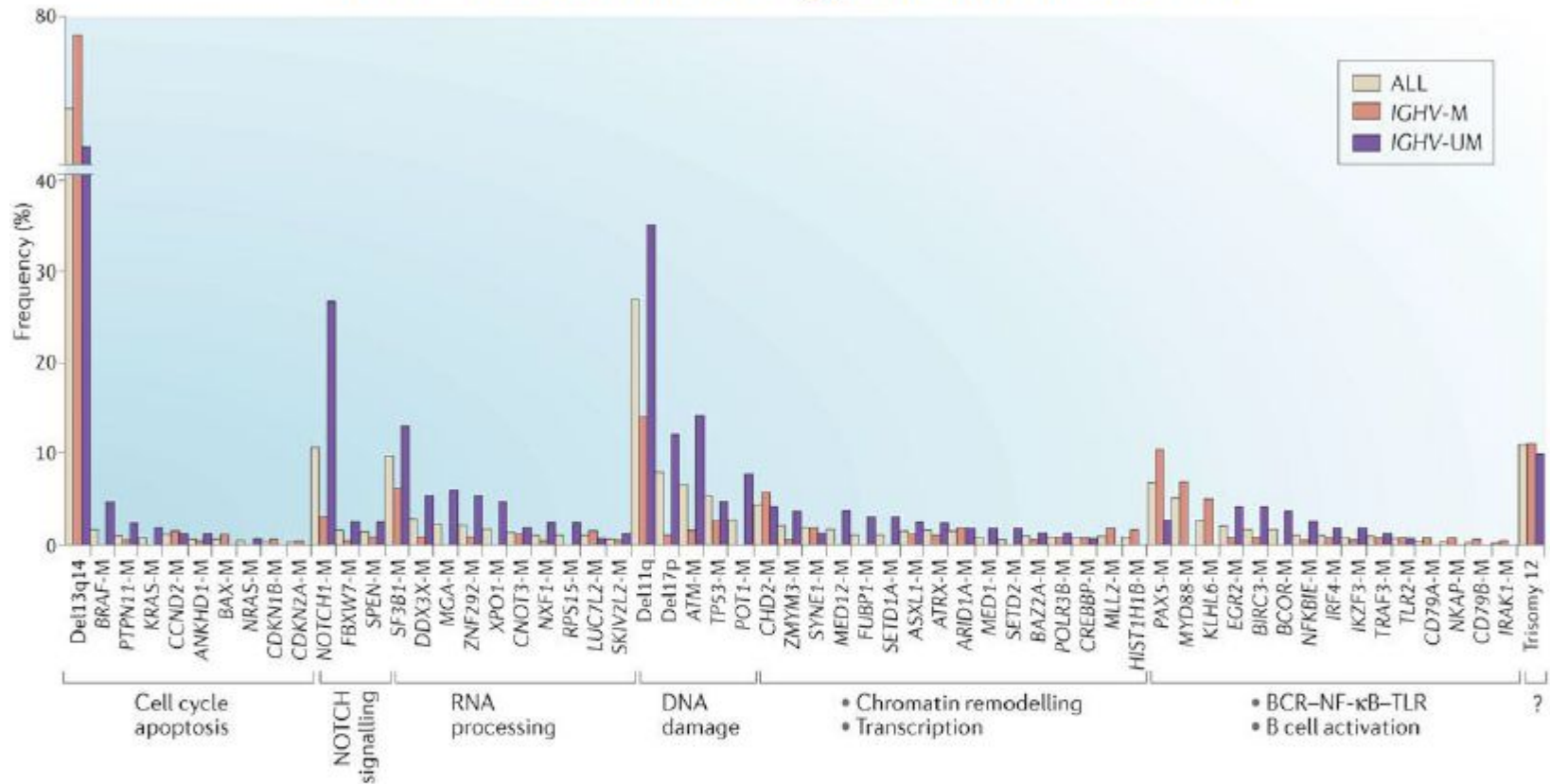
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180
17p deletion	23	18	13	8	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11q deletion	56	53	47	43	33	27	20	15	10	4	2	2	1	0	0	0
12q trisomy	47	44	41	29	24	17	14	13	12	11	4	3	2	1	1	0
Normal	57	51	45	37	30	27	20	17	12	11	6	5	2	2	1	1
13q deletion as sole abnormality	117	117	106	91	80	63	45	36	24	16	12	11	3	1	1	0

# Cariotipo complesso

- Numero maggiore uguale a 3
- Scarsa risposta sia alla terapia convenzionale che ai nuovi farmaci inibitori
- Utilizzo di immunostimolazione indotta CpG-oligonucleotide DSP30 e IL2
- Rappresenta una condizione a prognosi sfavorevole presente in circa il 30% dei casi con FISH negativa
- Anomalie cromosomiche possono comparire tardivamente durante il decorso della malattia indicando un'evoluzione clonale



# CLL-associated genetic lesions



Nature Reviews | [Cancer](#)

## Anomalie cromosomiche più frequenti

- Del13
- Tris12
- Del11
- Del17

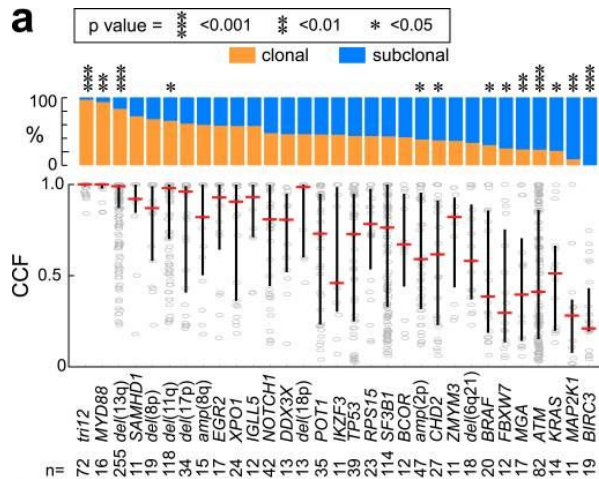
## Mutazioni geniche più frequenti

- TP53
- NOTCH1
- SF3B1
- MYD88
- BIRC3

- L'introduzione della FISH ha permesso l'individuazione di aberrazioni cromosomiche in circa l'80% dei casi di LLC
- Ogni paziente viene oggi incluso in uno specifico gruppo in base a una classificazione citogenetica gerarchica che attribuisce importanza decrescente alle seguenti lesioni: 17p- > 11q- > +12 > 13q-
- Cariotipi complessi associati a fattori prognostici e quadro clinico sfavorevole
- Analisi citogenetica convenzionale associata a FISH in caso di progressione di malattia

## Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse

Dan A. Landau<sup>\*1,2,3,4</sup>, Eugen Tausch<sup>\*5</sup>, Amaro N Taylor-Weiner<sup>\*1</sup>, Chip Stewart<sup>1</sup>, Johannes G. Reiter<sup>1,2,6,8</sup>, Jasmin Bahlo<sup>7,14</sup>, Sandra Kluth<sup>7,14</sup>, Ivana Bozic<sup>8,9</sup>, Mike Lawrence<sup>1</sup>, Sebastian Böttcher<sup>10</sup>, Scott L. Carter<sup>1,11</sup>, Kristian Cibulskis<sup>1</sup>, Daniel Mertens<sup>12</sup>, Carrie Sougnez<sup>1</sup>, Mara Rosenberg<sup>1</sup>, Julian M. Hess<sup>1</sup>, Jennifer Edelmans<sup>5</sup>, Sabrina Kless<sup>5</sup>, Michael Kneba<sup>10</sup>, Matthias Ritgen<sup>10</sup>, Anna Fink<sup>7,13</sup>, Kirsten Fischer<sup>7,13</sup>, Stacey Gabriel<sup>1</sup>, Eric Lander<sup>1</sup>, Martin A. Nowak<sup>8,9,14</sup>, Hartmut Döhner<sup>5</sup>, Michael Hallek<sup>\*\*7,13,15</sup>, Donna Neuberg<sup>\*\*16</sup>, Gad Getz<sup>\*\*1,17,†</sup>, Stephan Stilgenbauer<sup>\*\*5,†</sup>, and Catherine J. Wu<sup>\*\*1,2,3,4,†</sup>



- possibile individuare precocemente, con analisi mirate di sequencing, lesioni genetiche “driver” della recidiva
- 30% dei casi il clone predominante alla recidiva era già identificabile a livello subclonale prima del trattamento
- Mutazione TP53 e del(17p) vantaggio selettivo post terapia

