

LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

R. Piazza

rocco.piazza [AT] unimib.it

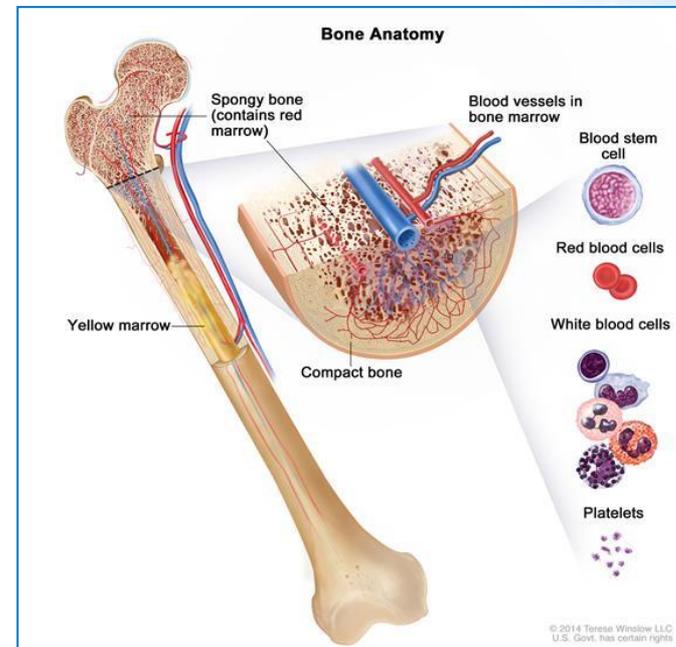
EMOPOIESI NORMALE

CON IL TERMINE EMOPOIESI SI IDENTIFICA IL PROCESSO DI PRODUZIONE DI TUTTE LE COMPONENTI CORPUSCOLATE DEL SANGUE, IN PARTICOLARE:

ERITROCITI

LEUCOCITI

PIASTRINE

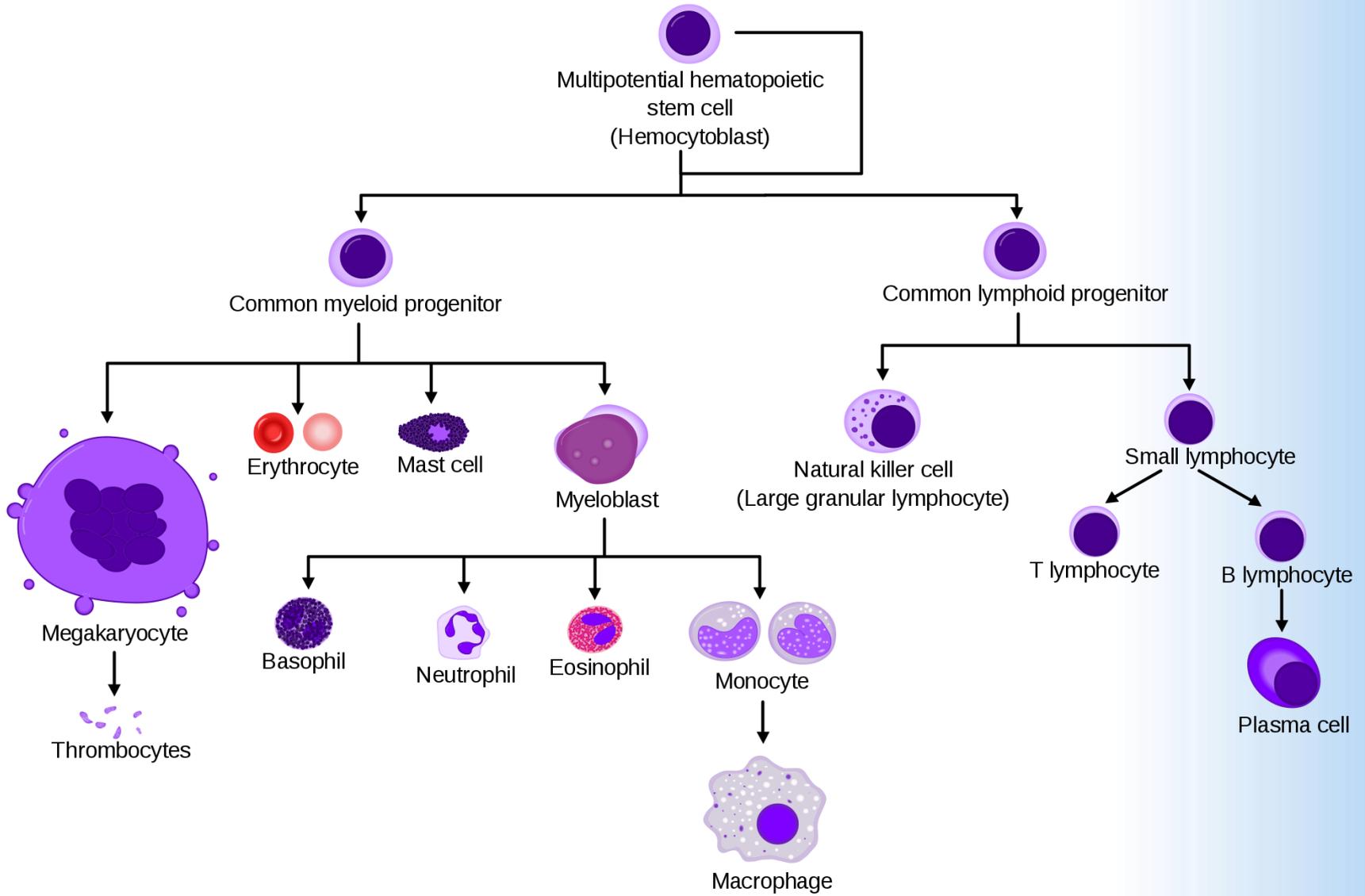


<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/bone-marrow>

EMOPOIESI NORMALE

IL NOSTRO ORGANISMO SI TROVA IN UNA CONDIZIONE DI EQUILIBRIO DINAMICO IN CUI IL TURNOVER CELLULARE ESTREMAMENTE RAPIDO A CUI E' SOTTOPOSTO E' ESSENZIALE PER LA SOPRAVVIVENZA

CARDINE DI QUESTO SISTEMA DI CONTINUO RINNOVO CELLULARE E' RAPPRESENTATO DALLA **CELLULA STAMINALE**



By Mikael Häggström and A. Rad - Image:Hematopoiesis

LINFOCITI

I linfociti rappresentano un sottogruppo dei leucociti. Vengono prodotti nel midollo osseo, da cui migrano, una volta completato il processo di differenziamento, verso il sangue periferico, il timo ed i linfonodi.

Insieme agli altri leucociti costituiscono il sistema immunitario, un complesso di cellule deputate alla difesa del nostro organismo da agenti patogeni quali batteri o virus ma anche dalle cellule neoplastiche

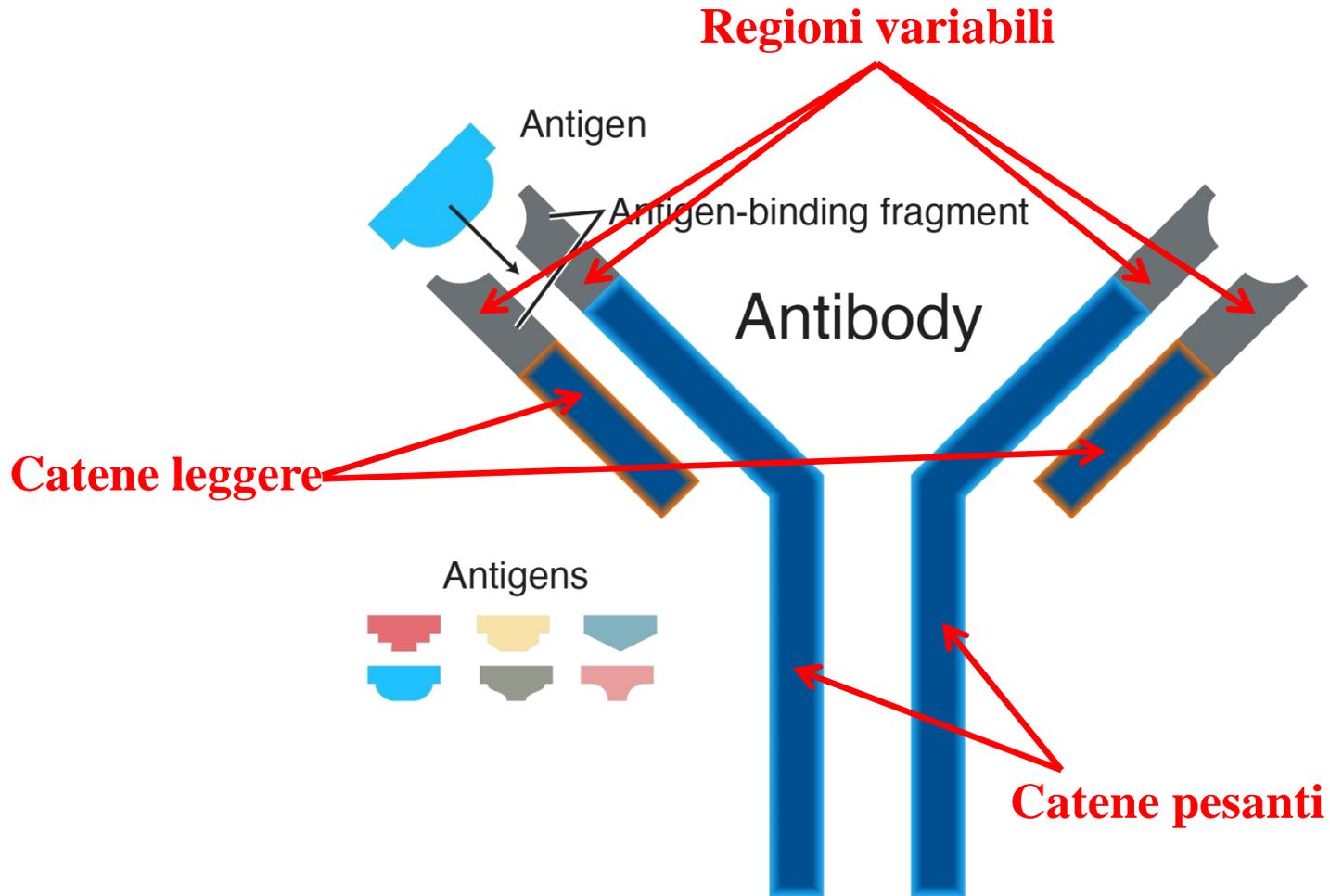
LINFOCITI B e T

Ci sono due categorie principali di linfociti: i linfociti B e T. Entrambi questi tipi cellulari originano dal midollo, tramite un processo di differenziamento che ha origine dalla cellula staminale ematopoietica.

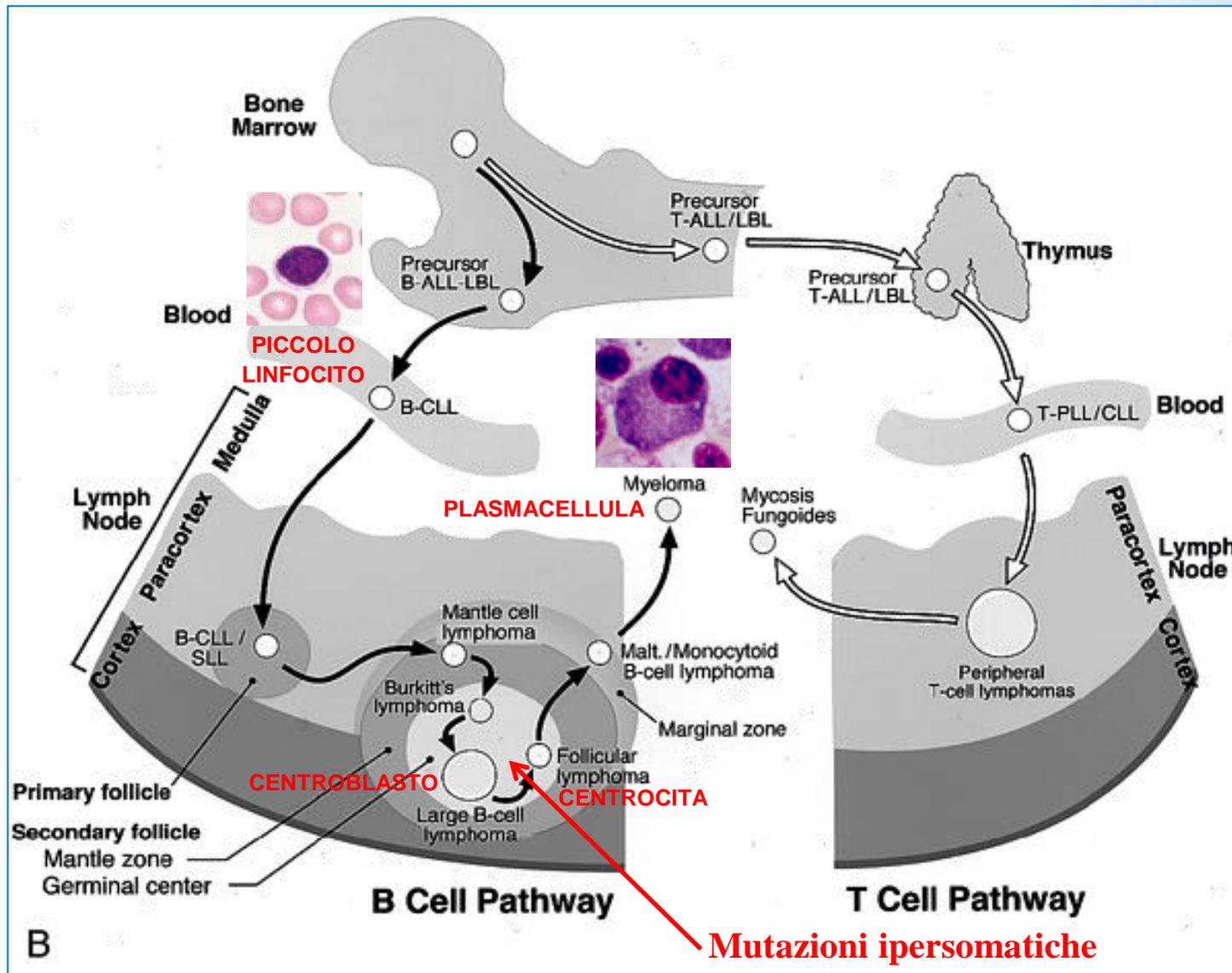
Una volta completato il processo di differenziamento le cellule T migrano nel timo, mentre le B in parte rimangono nel midollo ed in parte migrano nel sangue periferico e nei linfonodi.

Il ruolo delle cellule B è quello di produrre anticorpi, che agiscono direttamente contro antigeni espressi dagli agenti patogeni. Ogni cellula B è in grado di produrre solo uno specifico anticorpo, diretto contro un antigene. Se l'antigene è presente nell'organismo, questo verrà raggiunto e legato dall'anticorpo: successivamente, il patogeno che lo esprime verrà distrutto.

ANTICORPI



LINFOCITI B - MATURAZIONE



LINFOCITI B - SOTTOTIPI

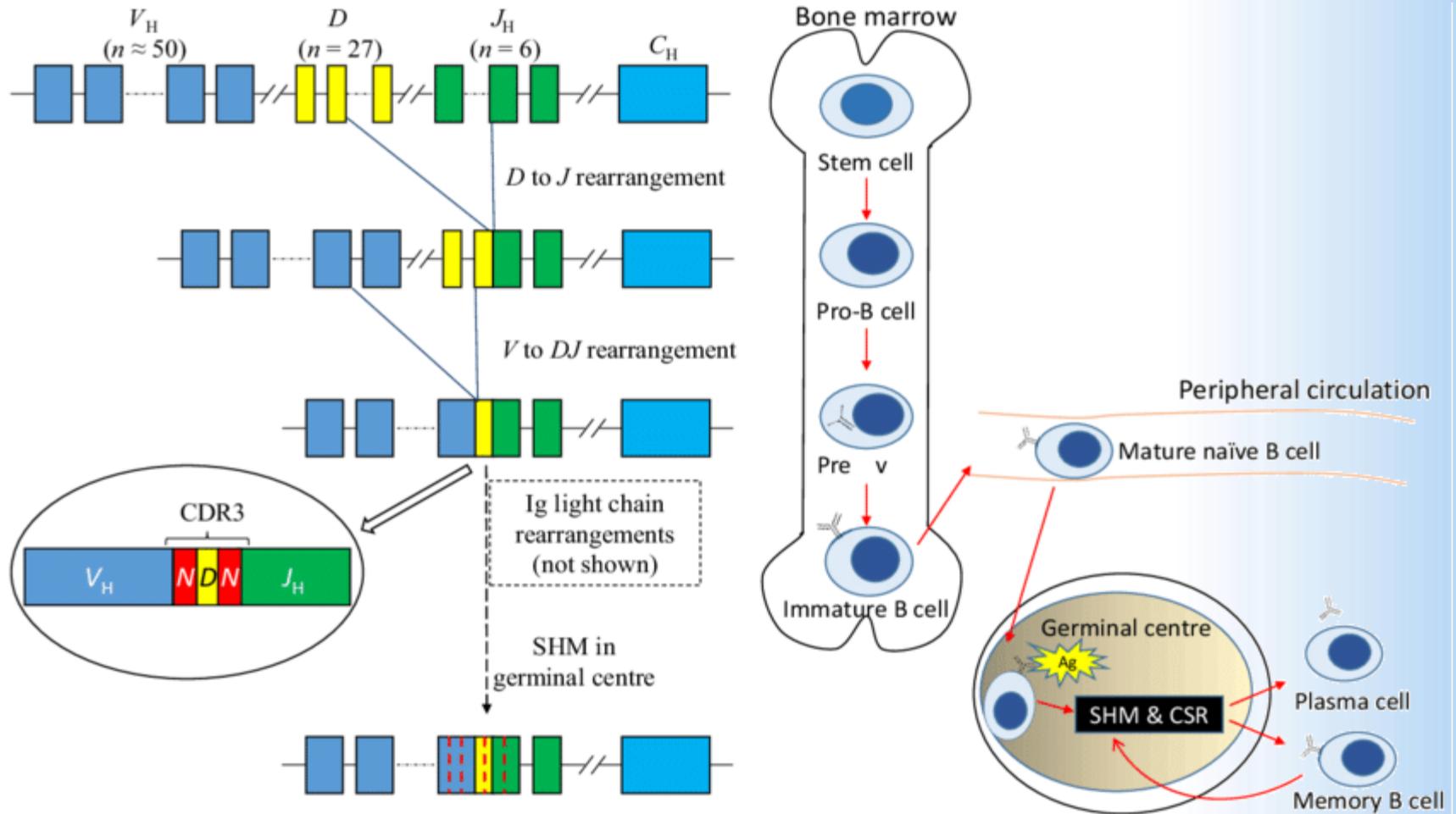
Quando un linfocita B riconosce, con il suo specifico anticorpo, un agente patogeno, questo linfocita va incontro, nel linfonodo, ad un complesso processo di espansione, attraverso cicli multipli di divisione cellulare, e di ulteriore differenziamento, divenendo o una 'Memory B cell' o una Plasmacellula.

La plasmacellula può essere considerata come una cellula iperspecializzata nella produzione di anticorpi.

Le Memory B cells sono cellule in grado di sopravvivere nel nostro organismo per periodi di tempo molto prolungati. Il loro ruolo funzionale è quello di garantire una protezione di lunga durata ad un patogeno che ha già infettato il nostro organismo.

In caso di reinfezione da parte dello stesso patogeno infatti, le Memory B cells sono in grado di proliferare rapidamente e di differenziare in plasmacellule, consentendo di montare rapidissimamente una risposta anticorpale valida contro il patogeno.

IPERMUTUAZIONE SOMATICA



LINFOCITI T

Il compito delle cellule T è simile a quello dei linfociti B, in quanto anch'essi hanno come obiettivo la protezione dell'organismo da patogeni. Tuttavia i linfociti T agiscono con un meccanismo diverso: sono in grado di riconoscere cellule malate (e.g. infettate da virus o neoplastiche) sulla base dell'esposizione sulla superficie cellulare, da parte di queste ultime, di piccoli frammenti proteici 'anomali', come per esempio frammenti proteici derivati dal virus che le ha infettate. In questo caso i linfociti T attivano dei processi in grado di distruggere la cellula infetta o neoplastica.

DEFINIZIONE

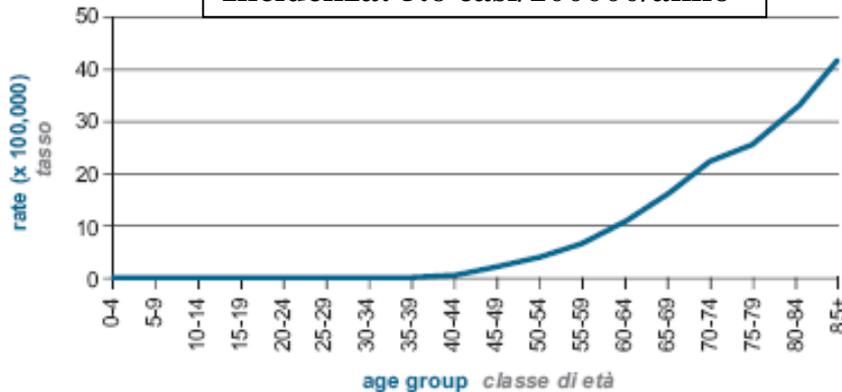
La Leucemia Linfatica Cronica (CLL) è una patologia a carattere monoclonale caratterizzata da un accumulo progressivo di linfociti funzionalmente incompetenti.

EPIDEMIOLOGIA

La CLL rappresenta, nel mondo occidentale, la più comune forma di leucemia dell'adulto.

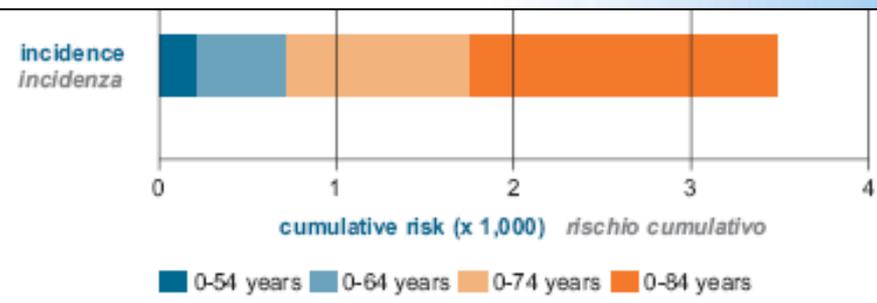
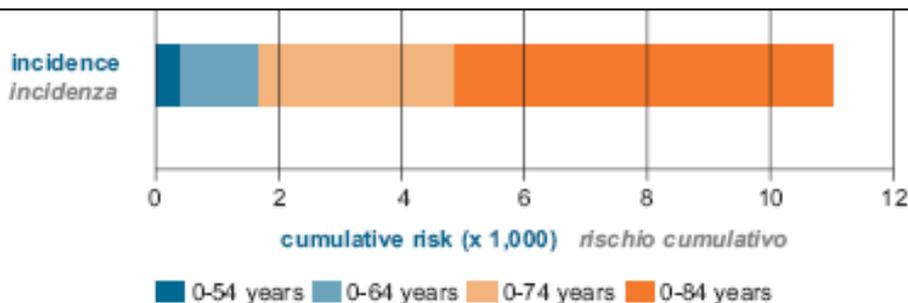
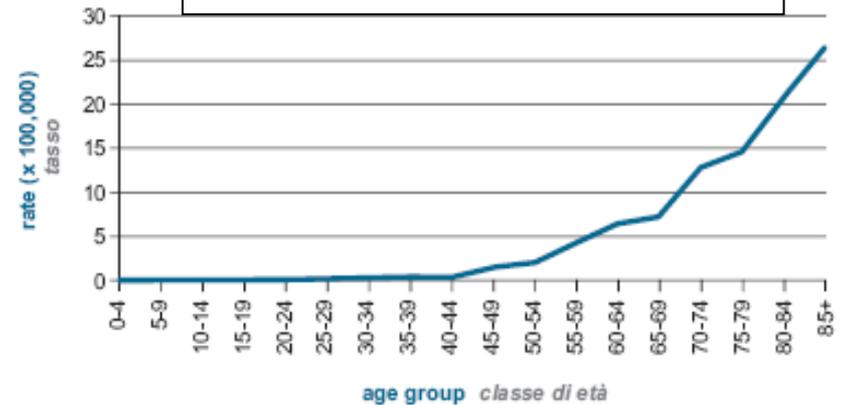
♂ Maschi Males

Incidenza: 5.6 casi/100000/anno



♀ Femmine Females

Incidenza: 4.3 casi/100000/anno

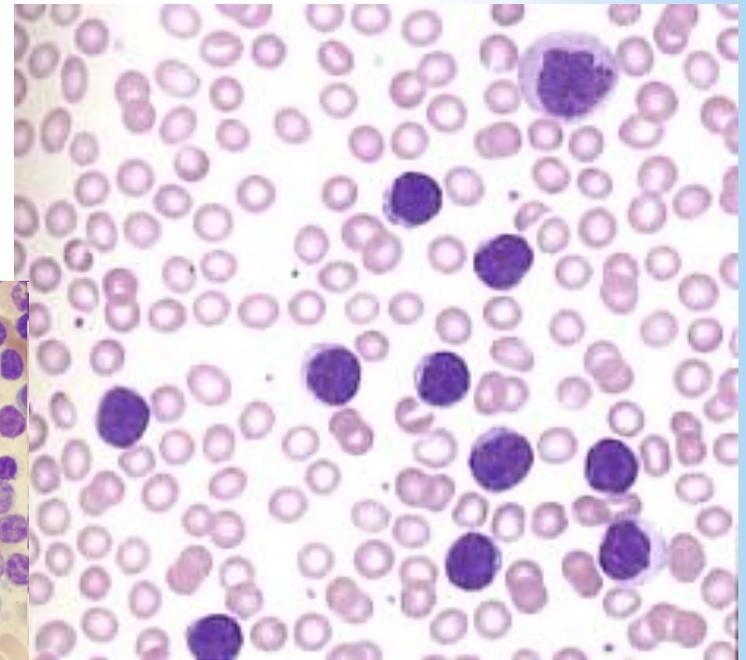
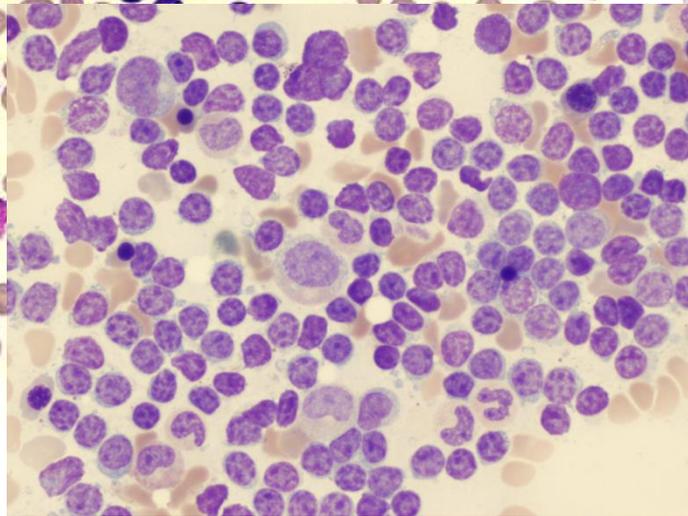
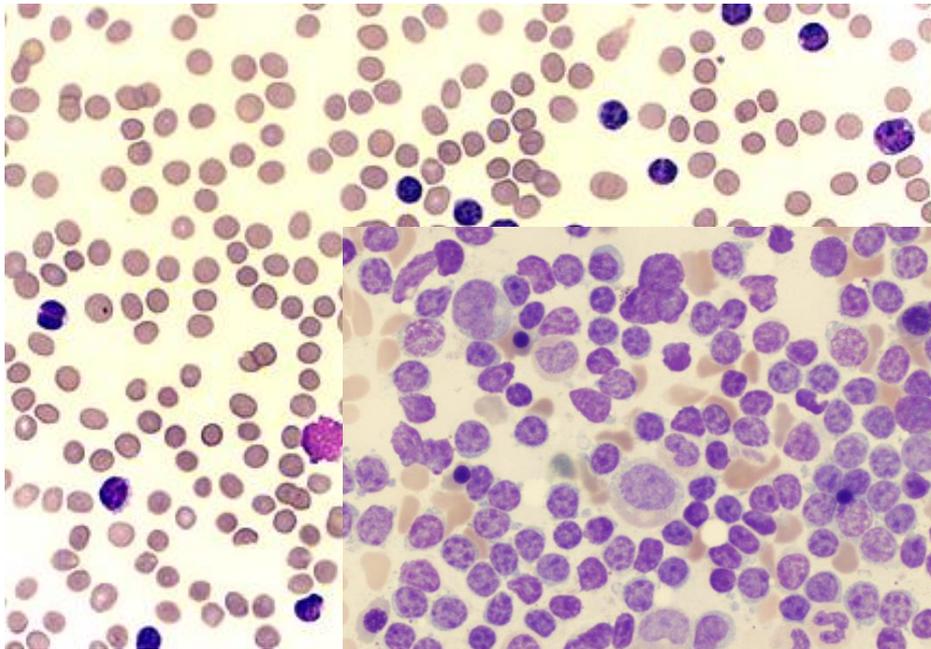


La Familiarità per CLL rappresenta un importante fattore di rischio!

FISIOPATOLOGIA

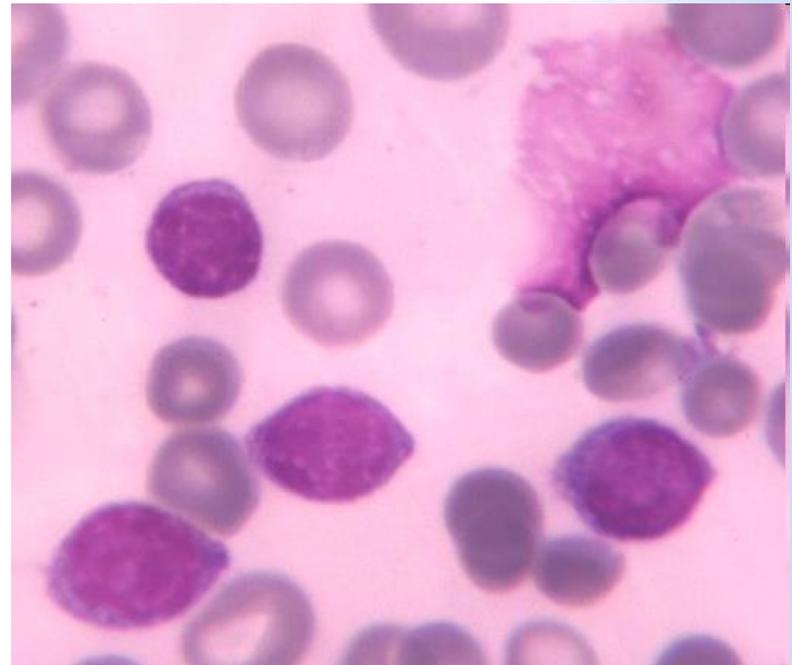
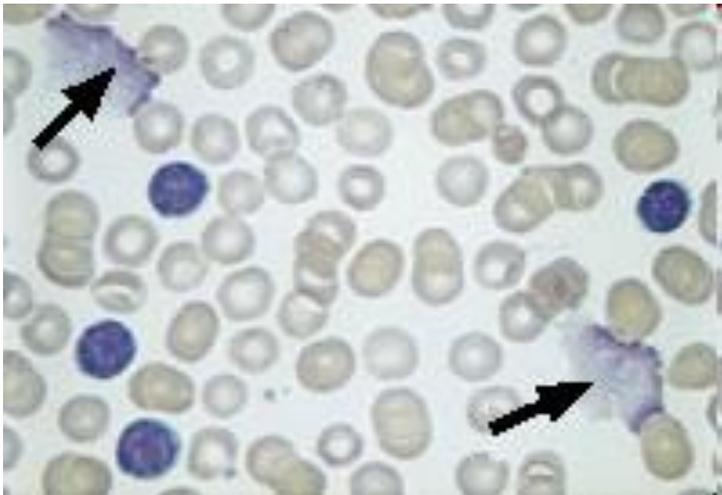
La CLL trae origine da linfociti di tipo B (~95%), bloccati durante uno degli step differenziativi del pathway di maturazione linfoide. Morfologicamente le cellule CLL presenti nel sangue periferico sono simili ai piccoli linfociti maturi.

Essendo una leucemia cronica la componente blastica midollare non è elevata (Normale: fino al 5%. Leucemie acute: $\geq 20\%$).



FISIOPATOLOGIA

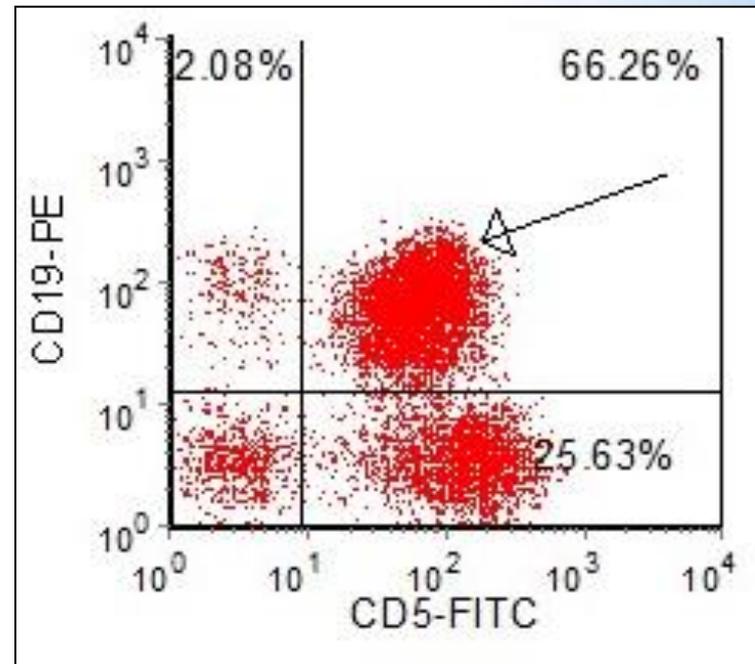
OMBRE DI GUMPRECHT (OMBRE NUCLEARI, SMUDGE CELLS)



FISIOPATOLOGIA - IMMUNOFENOTIPO

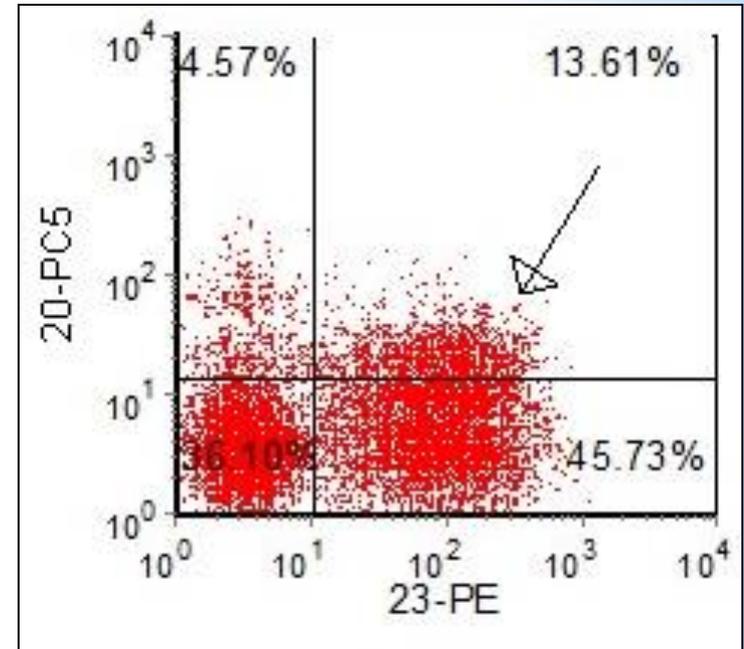
Le cellule B CLL espongono caratteristicamente antigeni di superficie di tipo B quali CD19, CD20 (bassa intensità), CD21, and **CD23**. Esprimono inoltre l'antigene **CD5**, che è un marcatore più tipicamente presente in cellule linfatiche di tipo T.

Il recettore CD5 è tipico di una popolazione di linfociti B anergizzati responsabili della produzione di anticorpi anti-self presenti a livello del mantello. Si ritiene probabile che la CLL di tipo B tragga origine da una cellula B-memoria con probabile reattività verso il self o verso antigeni comuni, che sia riuscita a svincolarsi dai processi di anergizzazione.



FISIOPATOLOGIA - IMMUNOFENOTIPO

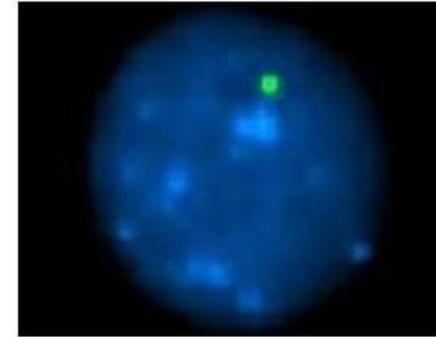
La positività per il CD23 fornisce uno degli strumenti fondamentali per effettuare una diagnosi differenziale tra Leucemia Linfatica Cronica e Linfoma Mantellare (leucemizzato), caratterizzato anch'esso da positività per CD5 ma negativo per CD23.



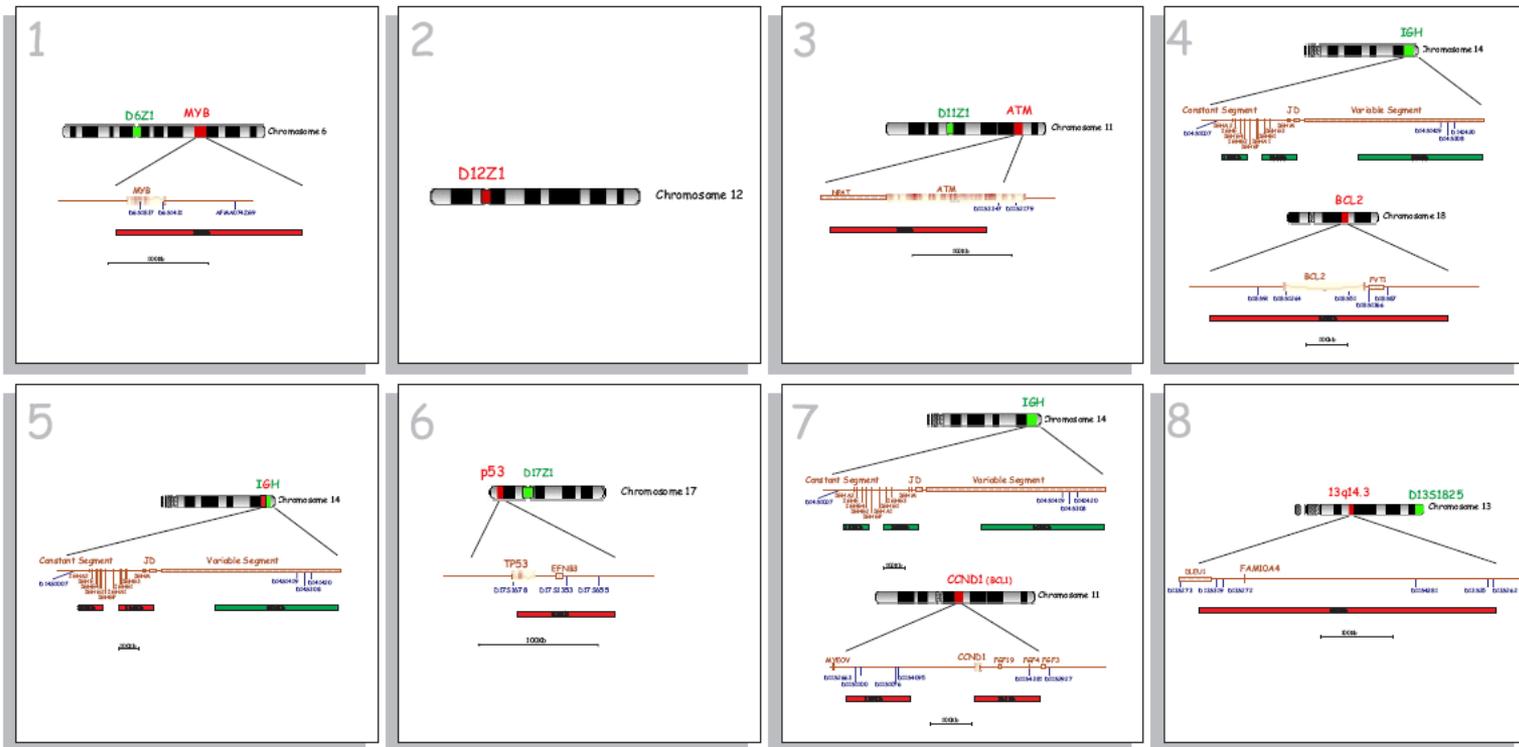
Le cellule B CLL esprimono livelli bassi di immunoglobuline di membrana, più frequentemente di tipo M, D o M/D. Inoltre, queste cellule esprimono livelli ugualmente bassi di una delle due catene leggere delle immunoglobuline (kappa o lambda).

FISIOPATOLOGIA - CITOGENETICA

Nel 40-50% dei pazienti affetti da CLL non si rilevano anomalie cromosomiche con tecniche di citogenetica convenzionale. Tuttavia circa l'80% dei pazienti ha anomalie rilevabili con FISH.



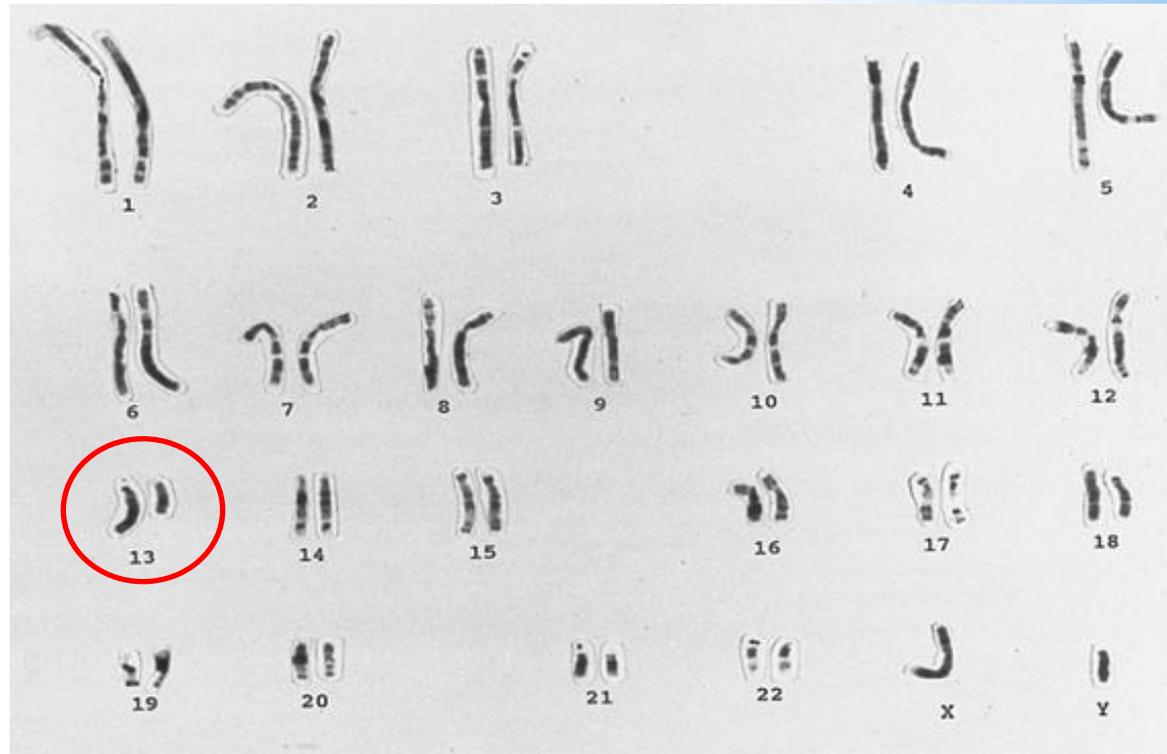
13q deletion



FISIOPATOLOGIA - CITOGENETICA

Tra le anomalie genetiche presenti in cellule CLL ve ne sono alcune particolarmente ricorrenti. In particolare sono state individuate le seguenti anomalie: 17p-, 11q-, trisomia 12 e 13q- che rappresentano lesioni con prognosi progressivamente migliore.

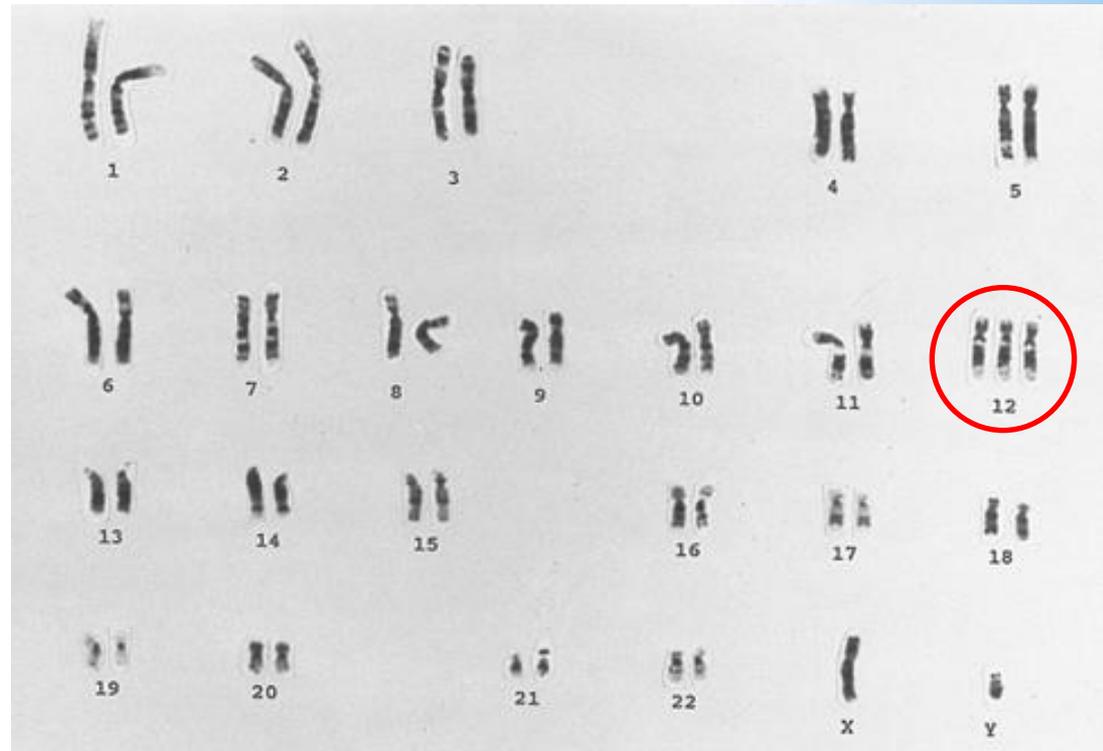
La più comune anomalia genetica è rappresentata dalla delezione 13q. Tale anomalia ricorre in oltre il 50% dei pazienti. Individui con delezioni a carico di 13q hanno in genere una malattia relativamente benigna, che tipicamente si manifesta come una malattia stabile o lentamente ingravescente.



FISIOPATOLOGIA - CITOGENETICA

La presenza di una trisomia 12, osservata nel 15% dei pazienti, è associata a morfologia atipica ed a una malattia con andamento progressivo.

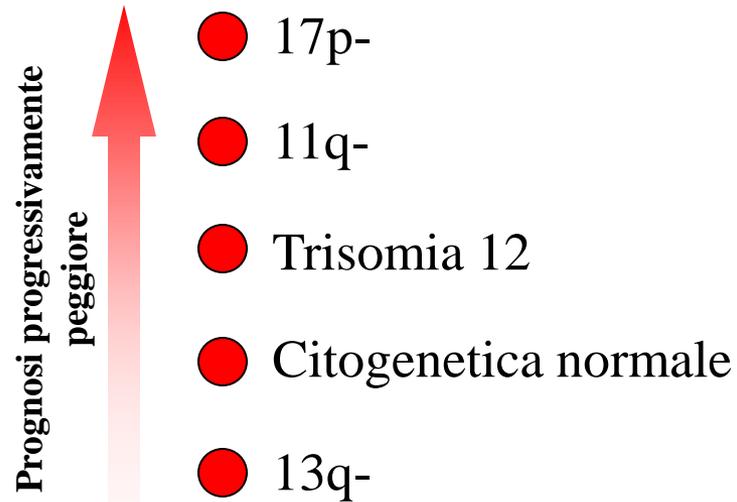
La delezione del braccio corto del cromosoma 17 è stata associata a progressione rapida, remissione di breve durata e ridotto overall survival. Oltre l'80% dei pazienti con 17p- ha inoltre mutazioni somatiche a nucleotide singolo a carico dell'allele di p53 non deleto. La combinazione di delezione e mutazioni puntiformi causa una pressoché totale perdita di funzione di p53.



La delezione della regione 11q22-q23, riscontrata nel 19% dei pazienti, è associata con malattia aggressiva, esteso coinvolgimento linfonodale e sopravvivenza ridotta.

FISIOPATOLOGIA

FATTORI PROGNOSTICI

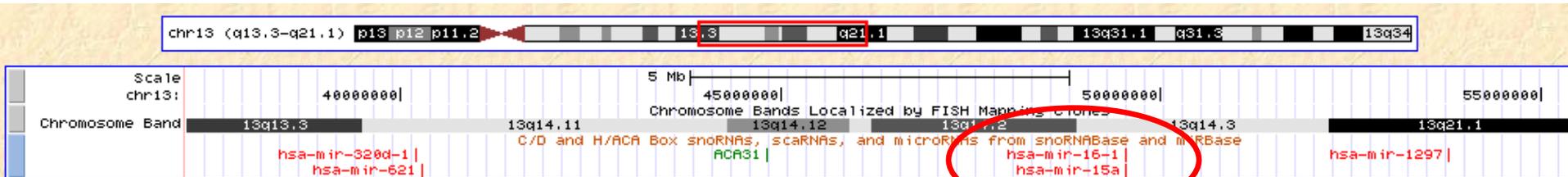


Altri fattori associati a malattia ad alto rischio sono:

- **Elevati livelli di Beta2 Microglobulina**
- **Tempo di divisione cellulare dei linfociti CLL breve**
- **Elevati livelli di CD23 solubile**

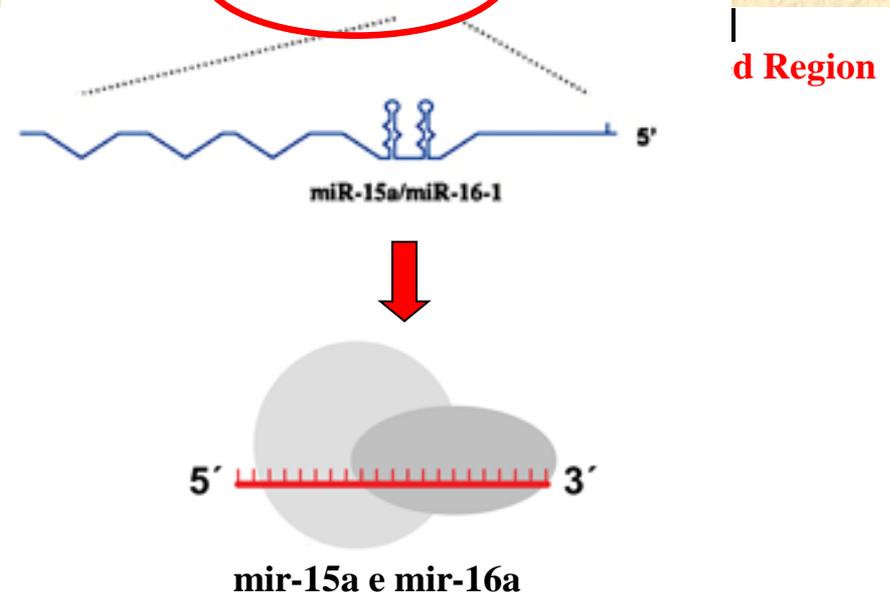
FISIOPATOLOGIA – 13q-

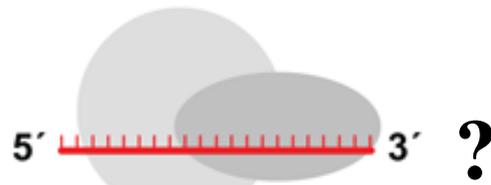
- E' stato dimostrato che il protooncogene BCL2 è overespresso nelle forme di leucemia linfatica cronica caratterizzate da 13q-.
- In particolare l'upregolazione di BCL2 si associa con delezioni della regione 13q14.



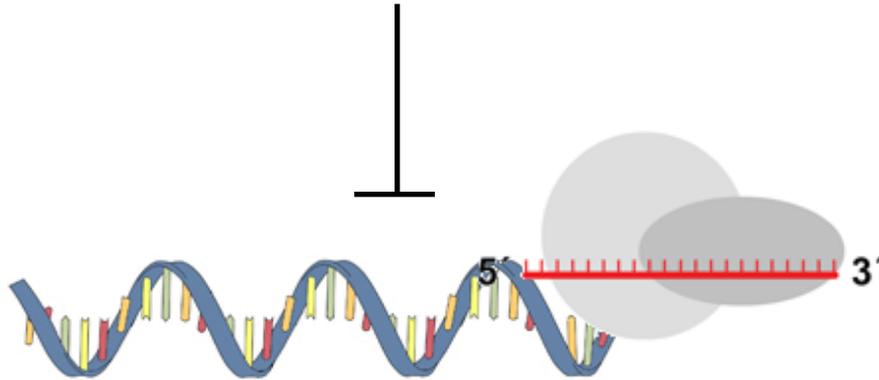
miRNA15a e miRNA16-1 sono localizzati in 13q14. Entrambi codificano per microRNA.

Analisi genetiche hanno dimostrato delezione o down-regolazione di questi due microRNA nel 70% dei casi di leucemia linfatica cronica.



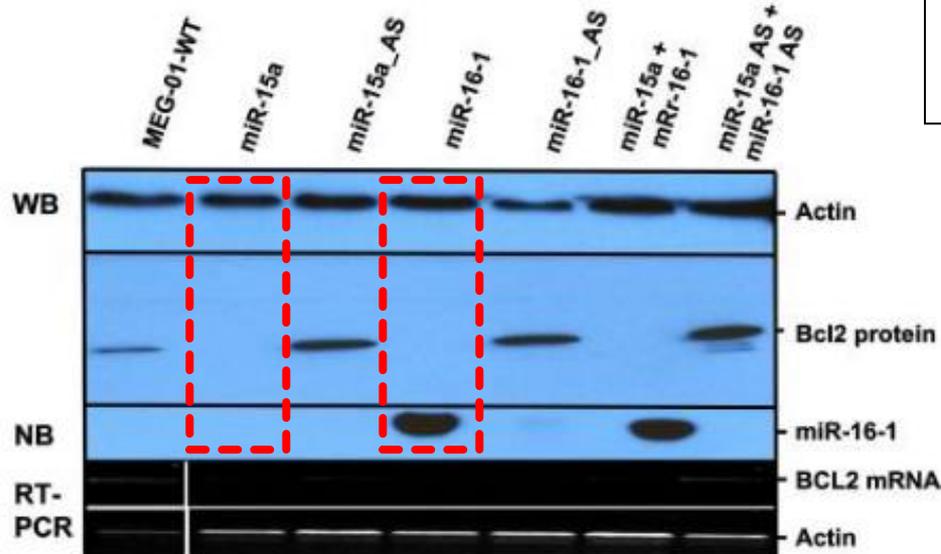


mir-15a e mir-16a

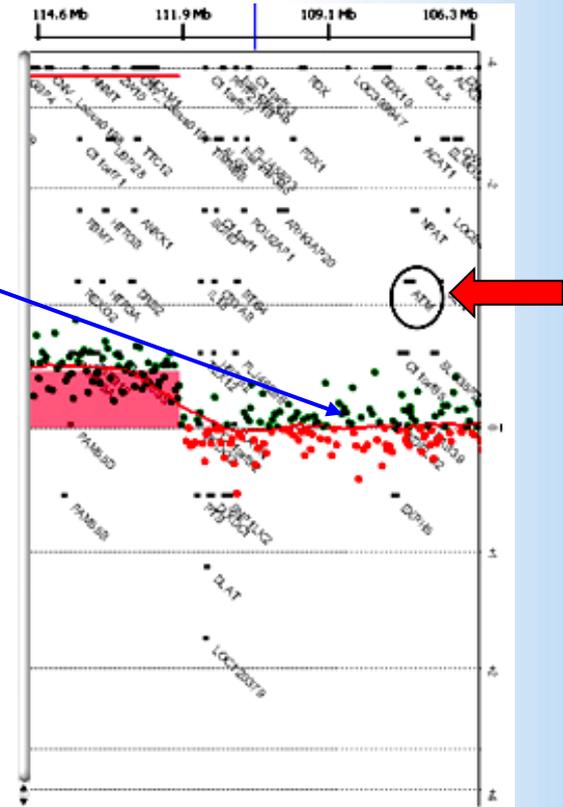
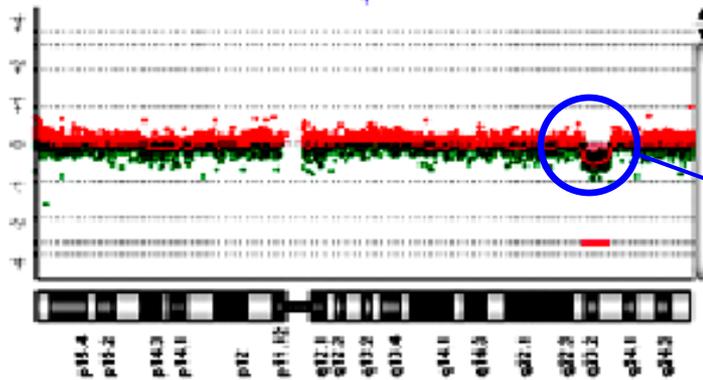
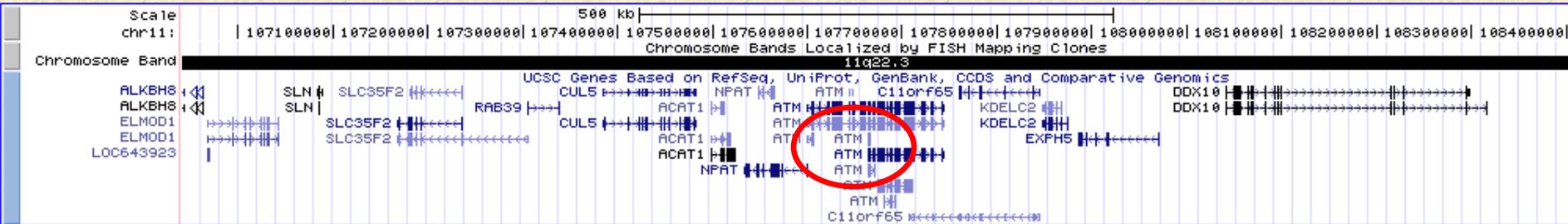


BCL2

Studi molecolari hanno dimostrato come miR-15a/16-1 siano in grado di legare il mRNA del gene antiapoptotico BCL2, inducendone la degradazione.



FISIOPATOLOGIA – 11q-

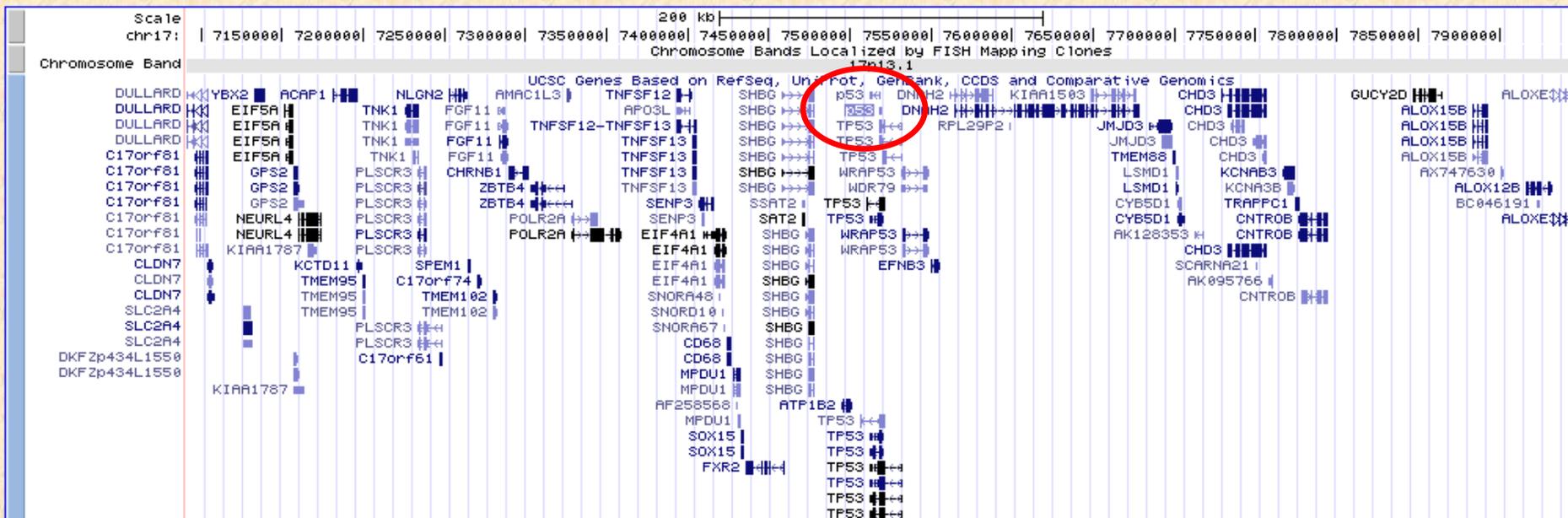


La delezione 11q- causa la perdita dell'oncosoppressore ATM.

La delezione 11q- è associata a prognosi severa (meno di 17p-).

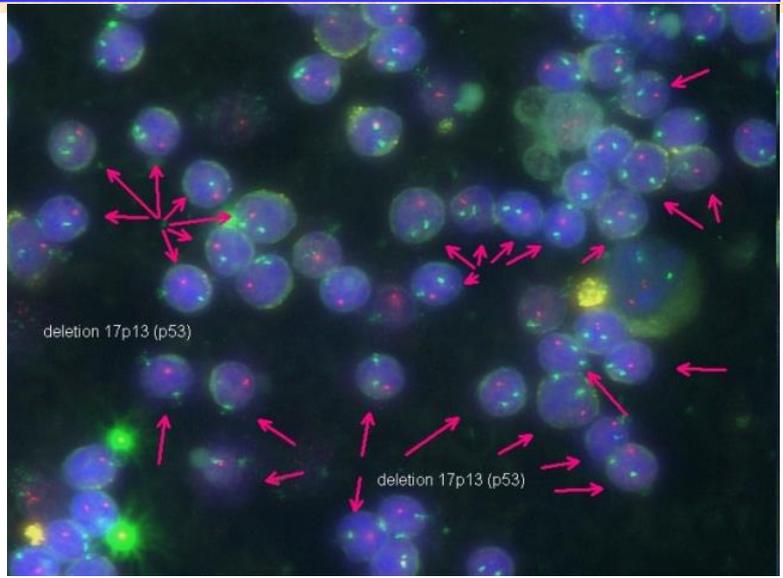
FISIOPATOLOGIA – 17p-

chr17 (p13.1) p13.3 p13.2 p13.1 17p12 17p11.2 17q11.2 17q12 q21.31 17q22 23.2 24.2 q24.3 q25.1 17q25.3

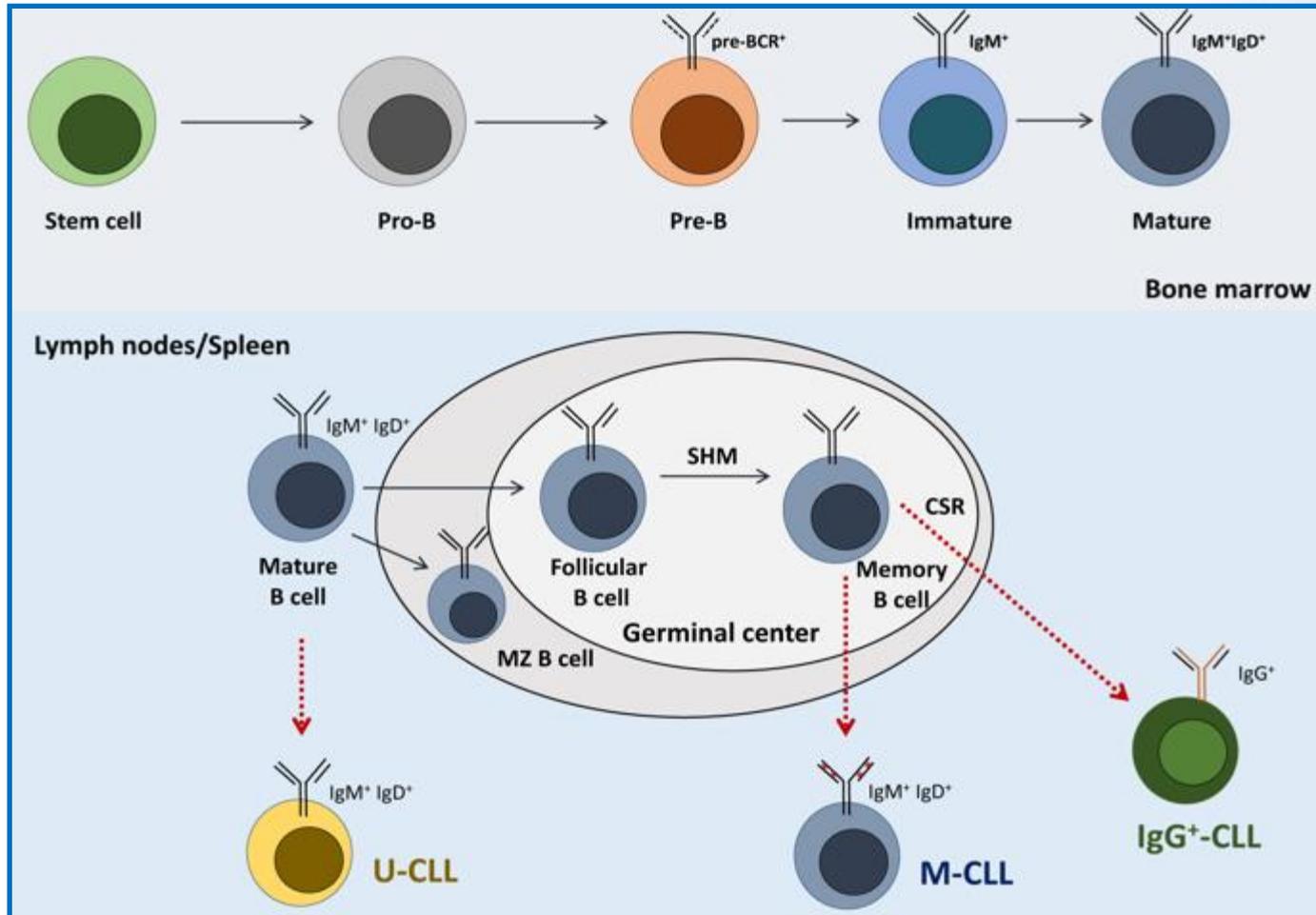


La delezione 17p- causa la perdita dell'oncosoppressore p53.

La delezione 17p- è associata a prognosi severa.



BCR STEREOTIPATO



BCR stereotipato (es. IGHV1-69 IGHV4-39) in circa il 30% dei casi

BCR STEREOTIPATO

Con BCR stereotipato si intende l'occorrenza della medesima immunoglobulina o di immunoglobuline molto simili tra loro in più pazienti affetti da Leucemia Linfatica Cronica.

Le probabilità che questo si verifichi per puro caso sono stimate essere intorno a 10^{-12} .

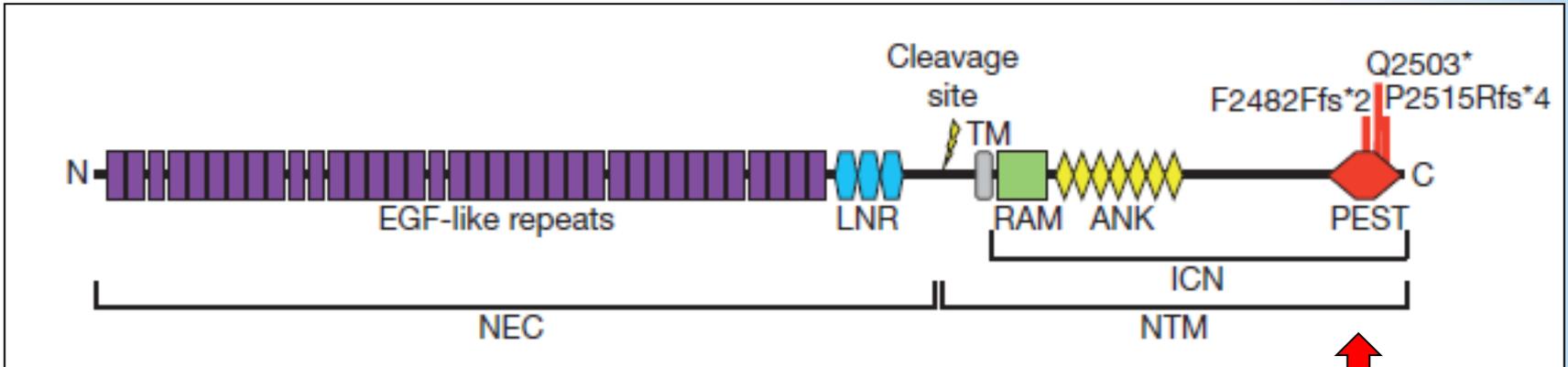
Questo vuol dire che, molto probabilmente, specifici antigeni giocano un ruolo fondamentale nell'innescare una risposta proliferativa, forse cronica, a cui fa seguito poi l'evoluzione in senso clonale.

Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia

Xose S. Puente¹, Magda Pinyol², Víctor Quesada¹, Laura Conde³, Gonzalo R. Ordóñez¹, Neus Villamor³, Georgia Escaramis⁴, Pedro Jares³, Sílvia Beà³, Marcos González-Díaz⁵, Laia Bassaganyas⁴, Tycho Baumann⁶, Manel Juan⁷, Mónica López-Guerra³, Dolors Colomer³, José M. C. Tubío^{4,8}, Cristina López³, Alba Navarro³, Cristian Tornador⁴, Marta Aymerich³, María Rozman³, Jesús M. Hernández⁵, Diana A. Puente¹, José M. P. Freije¹, Gloria Velasco¹, Ana Gutiérrez-Fernández¹, Dolors Costa³, Anna Carrió³, Sara Guijarro³, Anna Enjuanes³, Lluís Hernández³, Jordi Yagüe⁷, Pilar Nicolás⁹, Carlos M. Romeo-Casabona⁹, Heinz Himmelbauer¹⁰, Ester Castillo¹⁰, Juliane C. Dohm¹⁰, Silvia de Sanjosé¹¹, Miguel A. Piris¹², Enrique de Alava⁵, Jesús San Miguel⁵, Romina Royo¹³, Josep L. Gelpi¹³, David Torrents¹³, Modesto Orozco¹³, David G. Pisano¹⁴, Alfonso Valencia¹⁴, Roderic Guigó¹⁵, Mónica Bayés¹⁶, Simon Heath¹⁶, Marta Gut¹⁶, Peter Klatt¹⁷, John Marshall¹⁸, Keiran Raine¹⁸, Lucy A. Stebbings¹⁸, P. Andrew Futreal¹⁸, Michael R. Stratton¹⁸, Peter J. Campbell¹⁸, Ivo Gut¹⁶, Armando López-Guillermo⁶, Xavier Estivill⁴, Emili Montserrat⁶, Carlos López-Otín^{1*} & Elías Campo^{3*}

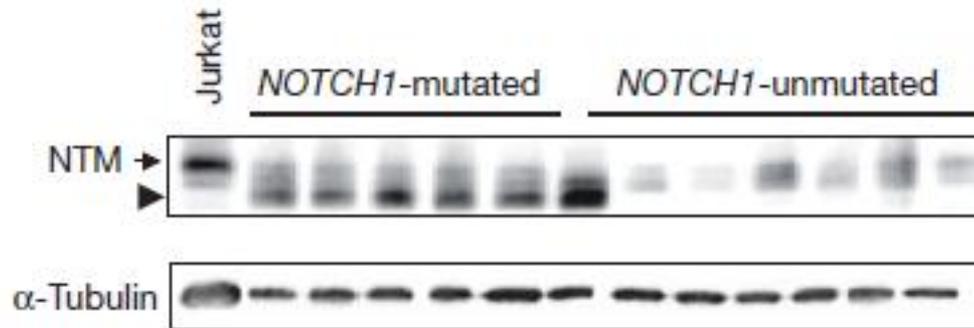
Table 1 | Genes recurrently mutated in chronic lymphocytic leukaemia

Gene	Protein	Mutation	Mutated cases / total	Overall frequency (%)	Frequency in IGHV-unmutated (%)	Frequency in IGHV-mutated (%)
<i>NOTCH1</i>	Notch 1	P2515Rfs*4 Q2503* F2482Ffs*2	29/255 1/255 1/255	12.2	20.4	7
<i>MYD88</i>	Myeloid differentiation primary response gene 88	L265P	9/310	2.9	0.8	5.6
<i>XPO1</i>	Exportin 1	E571K E571G	3/165 1/165	2.4	4.6	0
<i>KLHL6</i>	Kelch-like 6	F49L/L65P L90F L58P/T64A/Q81P	3/160	1.8	0	4.5



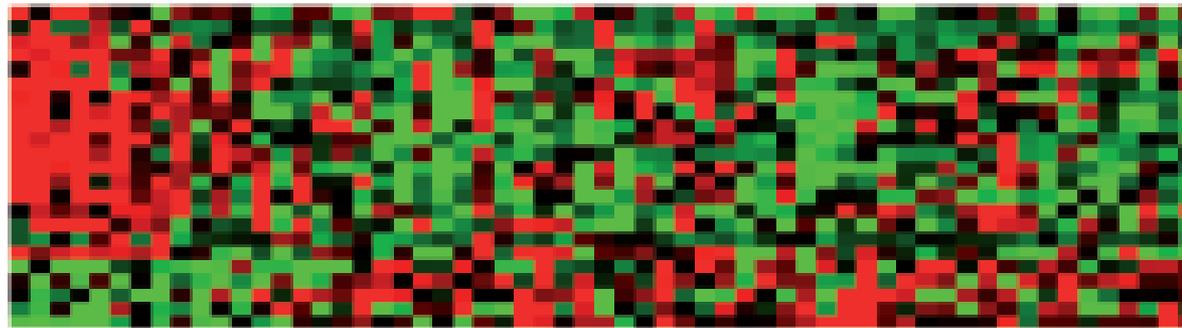
Domini PEST: bassa emivita proteica

Dominio PEST

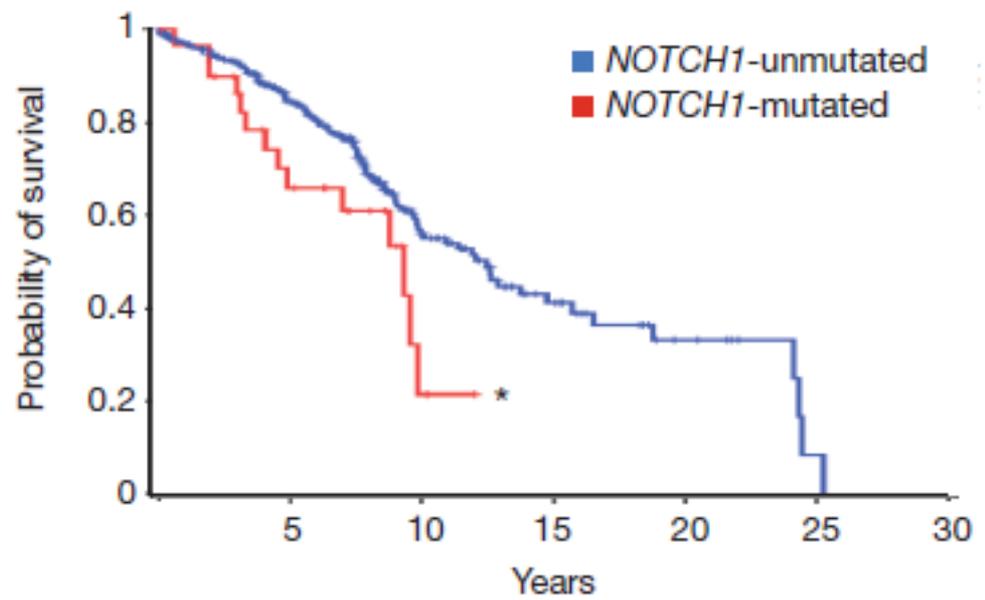


NOTCH1-
mutated

NOTCH1-unmutated



- DTX3
- HES1
- NOTCH4
- CTBP1
- PSENEN
- DVL2
- DTX4
- NOTCH2
- APH1A
- NCSTN
- CREBBP
- DVL3
- NCOR2
- PSEN1
- JAG2
- NOTCH1
- JAG1
- DTX1
- ADAM17
- MAML2
- EP300
- NUMB
- NUMBL

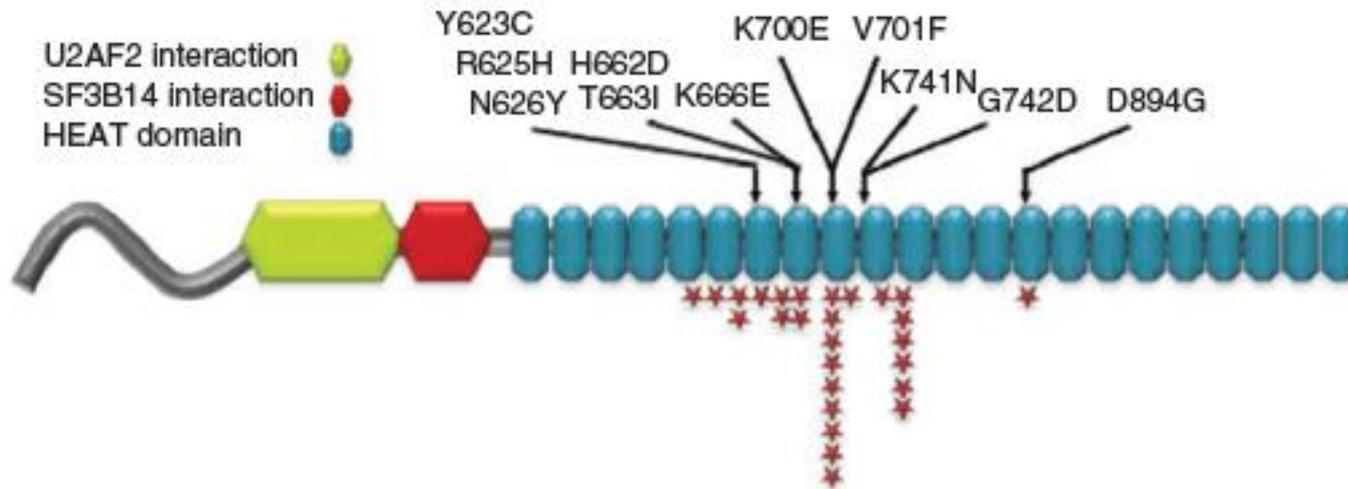


Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor *SF3B1* gene in chronic lymphocytic leukemia

Víctor Quesada¹, Laura Conde², Neus Villamor², Gonzalo R Ordóñez¹, Pedro Jares², Laia Bassaganyas³, Andrew J Ramsay¹, Sílvia Beà², Magda Pinyol⁴, Alejandra Martínez-Trillos⁵, Mónica López-Guerra², Dolors Colomer², Alba Navarro², Tycho Baumann⁵, Marta Aymerich², María Rozman², Julio Delgado⁵, Eva Giné⁵, Jesús M Hernández⁶, Marcos González-Díaz⁶, Diana A Puente¹, Gloria Velasco¹, José M P Freije¹, José M C Tubío³, Romina Royo⁷, Josep L Gelpí⁷, Modesto Orozco⁷, David G Pisano⁸, Jorge Zamora⁸, Miguel Vázquez⁸, Alfonso Valencia⁸, Heinz Himmelbauer⁹, Mónica Bayés¹⁰, Simon Heath¹⁰, Marta Gut¹⁰, Ivo Gut¹⁰, Xavier Estivill³, Armando López-Guillermo⁵, Xose S Puente¹, Elías Campo^{2,11} & Carlos López-Otín^{1,11}

Table 1 Most common recurrently mutated genes in CLL

Gene	Case ID	Exon	Encoded alteration	Total frequency	Freq. in IGHV-mutated cases	Freq. in IGHV-unmutated cases
<i>NOTCH1</i>	415	34	p.Phe2482Phefs*2	12.1% (31/255)	2.8% (2/72)	10.1% (7/69)
	457	34	p.Gln2503*			
<i>SF3B1</i>	12, 15, 19, 24, 48, 69, 85, 89, 92, 96, 102, 112, 138, 163, 184, 209, 410, 431, 436, 447, 448, 467, 507, 511, 520, 527, 531, 537, 722	34	p.Pro2515Argfs*4	9.7% (27/279)	7.9% (6/76)	20.5% (15/73)
	247	14	p.Tyr623Cys			
	119	14	p.Arg625His			
	6, 182	14	p.Asn626Tyr			
	154	14	p.His662Asp			
	53, 651	14	p.Thr663Ile			
	102, 116	14	p.Lys666Glu			
	9, 29, 156, 209, 365, 632, 734, 755, 758	15	p.Lys700Glu			
	19	15	p.Val701Phe			
	85	16	p.Lys741Asn			
	68, 79, 99, 197, 604, 742	16	p.Gly742Asp			
	83	18	p.Asp894Gly			



CLINICA - CLL

L'esordio della CLL può essere subdolo. Una percentuale non trascurabile (~30%) dei pazienti non manifesta, all'atto della diagnosi, alcun sintomo. In questi casi il sospetto diagnostico viene praticamente sempre posto in essere attraverso un normale esame emocromocitometrico.

I sintomi più tipici sono:

- **Linfoadenopatie (molto frequenti: 85-90% alla diagnosi)**
- **Astenia**
- **Infezioni frequenti, sia batteriche che virali**
- **Sanguinamenti mucocutanei, porpora/petecchie**
- **Dispepsia, sazietà precoce, dolore all'ipocondrio sinistro (splenomegalia)**
- **Sintomi B (febbricola, sudorazione notturna, perdita di peso)**
- **Autoimmunità (10%: anemia emolitica, piastrinopenia, s. di Evans)**

CLINICA – SINDROME DI EVANS

La sindrome di Evans è una patologia autoimmune caratterizzata da presenza di autoanticorpi (tipicamente IgG caldi) anti-eritrociti ed anti-piastrine che causano emolisi prevalentemente splenica e piastrinopenia.

E' frequentemente associata a patologie caratterizzate da anomalie a carico dei linfociti. Viene riscontrata frequentemente in pazienti affetti da CLL ma può essere presente anche in pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico o altre patologie con base autoimmune.

● Viene trattata con:

● Corticosteroidi: trattamento di prima scelta

● IgG: utili soprattutto nel trattamento corticosteroideo prolungato. Consentono in genere un buon controllo della piastrinopenia

● Rituximab e agenti immunosoppressori: trattamento di seconda scelta

● Splenectomia: trattamento riservato ai casi refrattari

CLINICA - CLL

- **Obiettività clinica:**

- **Pallore**

- **Linfoadenomegalie (85-90%)**

- **Splenomegalia (30-50%)**

- **Porpora/petecchie**

- **Epatomegalia (10-20%)**

LABORATORIO – TEST PRINCIPALI

● Emocromo:

- Linfocitosi assoluta con linfociti B > 5000/ul
- Frequentemente presenti prolinfociti: devono essere < 55% dei linfociti totali, altrimenti la diagnosi è: leucemia prolinfocitica (prognosi più severa!)
- Anemia
- Piastrinopenia
- All'esame microscopico (striscio): ombre di Gumprecht

● Citofluorimetria:

- **CD5**, CD19, CD20(dim), CD23

LABORATORIO – TEST AGGIUNTIVI

- **FISH/Citogenetica (FISH è preferibile):**

- **Anomalie cromosomiche (13q-, trisomia 12, 11q-, 17p-)**

- **Eco-addome:**

- **Splenomegalia**

- **Epatomegalia**

- **Stato mutazionale del locus IgVH:**

- **Germline/Ipermutato**

PROCEDURE

- **Biopsia/aspirato midollare: non strettamente necessari per la diagnosi: emocromo + citofluorimetria sono sufficienti. Utile in casi complessi/dubbi e per prognosi (infiltrato diffuso = prognosi scarsa).**
- **Biopsia linfonodale: in caso di aumento improvviso nelle dimensioni di uno o più linfonodi è utile per valutare una trasformazione in linfoma/leucemia ad alto grado.**

STADIAZIONE

● Classificazione di Rai:

● **Stadio 0: linfocitosi**

Basso rischio

● **Stadio I: linfocitosi + linfadenopatie**

● **Stadio II: linfocitosi + spleno/epatomegalia**

Rischio intermedio

● **Stadio III: linfocitosi + anemia**

● **Stadio IV: linfocitosi + piastrinopenia**

Alto rischio

● Classificazione di Binet:

● **Stadio A: linfocitosi, Hb > 10g/dl; Plt > 100000/ul; meno di 3 linfonodi positivi**

● **Stadio B: linfocitosi, Hb > 10g/dl; Plt > 100000/ul; 3 o più linfonodi positivi**

● **Stadio C: linfocitosi + Hb < 10g/dl e/o Plt < 100000/ul;**

TRATTAMENTO

In genere il paziente affetto da CLL non viene trattato finché non diventa sintomatico o non c'è evidenza di progressione di malattia

- **Il paziente viene trattato in presenza di:**
 - **Evidenza di progressione**
 - **Sintomi di tipo B**
 - **Fenomeni autoimmuni**
 - **Splenomegalia massiva**
 - **Linfoadenomegalia massiva**
 - **Aumento rapido del numero di linfociti in circolo (tempo di raddoppiamento inferiore ai 6 mesi)**

COMPLICANZE/EVOLUZIONE

- **Anemia e/o piastrinopenia progressivamente ingravescenti**
 - **Infiltrazione midollare**
 - **Fenomeni autoimmuni**
 - **Sequestro splenico**
- **Infezioni**
 - **Ipogammaglobulinemia + anomala funzione linfocitaria**
 - **Leucopenia da infiltrazione midollare**
- **Sindrome di Richter (2-8%): evoluzione in linfoma/leucemia acuta (linfoma a grandi cellule)**
- **Evoluzione prolinfocitica (prolinfociti > 55%). Talora reversibile. Frequentemente associata a perdita di p53 e farmacoresistenza**

PROGNOSI

La mediana di sopravvivenza di un paziente affetto da CLL è di circa 5-10 anni.

Malgrado la CLL colpisca in larga prevalenza soggetti anziani, nella maggior parte dei casi questi soggetti muoiono a causa della malattia.

La CLL ha quindi un impatto sia *quoad valetudinem* sia *quoad vitam*.

LABORATORIO – TEST PRINCIPALI

● Emocromo:

● **Linfocitosi assoluta con linfociti B > 5000/ul**

● **Frequentemente presenti prolinfociti: devono essere < 55% dei linfociti totali, altrimenti la diagnosi è: leucemia prolinfocitica (prognosi più severa!)**

● **Anemia**

● **Piastrinopenia**

● **All'esame microscopico (striscio): ombre di Gumprecht**

● Citofluorimetria:

● **CD5, CD19, CD20(dim), CD 23**

MONOCLONAL B-CELL LYMPHOCYTOSIS (MBL)

- **La maggior parte delle CLL è preceduta da una linfocitosi monoclonale a cellule B di tipo indolente (MBL). La MBL è caratterizzata dalla presenza di una componente monoclonale B costituita da meno di 5000 cellule per microlitro**
- **La MBL è rilevabile in circa il 5% della popolazione anziana**
- **In MBL è frequentemente presente la Delezione 13q-, che pertanto viene considerata un early event in CLL. Le mutazioni a carico di NOTCH1 sono al contrario molto rare**
- **La presenza di MBL implica un rischio di evoluzione in leucemia linfatica cronica pari a circa 1% per anno**