

LE LEUCEMIE ACUTE
DALLA MORFOLOGIA AI MICROARRAY:
COME E PERCHÉ SI STA MODIFICANDO L'APPROCCIO DIAGNOSTICO ALLE
LEUCEMIE

*Giuseppe Basso & Barbara Buldini Laboratorio di Onco Ematologia, Dipartimento di
Pediatria, Università di Padova*

La diagnosi di leucemia acuta è un processo in continua evoluzione grazie all'introduzione di nuove tecniche analitiche destinate a fornire le informazioni necessarie per una moderna pratica clinica.

Negli anni settanta, la diagnosi era relativamente semplice: anche un medico non specialista, con limitate nozioni di ematologia era in grado di identificare nel sangue periferico o nel sangue midollare la presenza di cellule anomale e di porre la diagnosi di leucemia acuta.

Questo era tutto quello che allora era necessario; non esistevano protocolli terapeutici specifici per i diversi tipi di leucemia acuta, ma solo una monochemioterapia. I risultati erano limitati e transitori, indipendentemente dalla natura della cellula coinvolta nel processo leucemico.

I progressi terapeutici derivanti dall'utilizzo di nuovi farmaci e soprattutto dal loro uso combinato (poli chemioterapia), hanno posto fortemente il problema di conoscere in modo più approfondito la cellula leucemica, dal momento che la risposta alla terapia con i primi protocolli di polichemioterapia, risultava molto diversa nelle leucemie acute di origine linfoide da quelle di origine mieloide.

Nasceva, pertanto, l'esigenza di associare la morfologia a tecniche più "obbiettive" in grado di aumentarne la capacità discriminante e di dirimere i casi dubbi: a tal fine, venivano introdotte inizialmente tecniche di citochimica.

Nel tentativo di spiegare la risposta eterogenea alla terapia è stato introdotto negli anni ottanta, lo studio immunologico dei linfociti; dapprima mediante lo studio delle rosette per identificare i linfociti di origine T e le immunoglobuline di superficie per i linfociti di origine B, e successivamente con l'uso di anticorpi poli e monoclonali. L'introduzione nella *routine* diagnostica di ampi pannelli di anticorpi e di strumenti come i citometri a flusso ha aperto nuove prospettive alla definizione diagnostica delle leucemie: è possibile valutare contemporaneamente, in un numero elevato di cellule, molti parametri per ogni singola cellula. La successiva introduzione delle tecniche di biologia molecolare, citogenetica e genetica molecolare hanno ulteriormente ampliato la comprensione dell'eterogeneità delle cellule leucemiche, con la relativa importanza clinica.

Oggi la diagnosi si è adeguata al nuovo concetto di qualità, e non solo per quanto riguarda le esigenze espresse, ma anche per quelle implicite. Tutto questo trova un esempio nella crescente complessità della prestazione offerta: si è passati dai "criteri minimi" necessari per fare una diagnosi, alla individuazione di classi di rischio, per la stratificazione dei pazienti, fino allo studio di quella che oggi si definisce come malattia residua minima (MRD), precisi marcatori di malattia che permettono di seguire la risposta alla terapia.

Gli innumerevoli progressi terapeutici ottenuti in oncoematologia pediatrica, ed in particolare nelle leucemie acute, sono principalmente dovuti alle conoscenze derivate dal laboratorio che hanno permesso un più approfondito approccio diagnostico, una classificazione del rischio basata anche su variabili biologiche, lo sviluppo di terapie specifiche in rapporto alla risposta alla terapia e alla comprensione dell'attivazione di caratteristiche vie di segnale intracellulare. Le metodologie che attualmente costituiscono lo *standard* diagnostico in tutti i migliori gruppi internazionali sono: la morfologia, la citochimica, la citogenetica classica e molecolare, la genetica molecolare, la citometria a flusso. L'applicazione contemporanea di tali tecnologie è volta ad ottenere il risultato più

informativo possibile per coloro che dovranno alla fine applicare un adeguato protocollo terapeutico. Ogni metodologia ha una definita sensibilità e specificità; è solo il loro uso combinato che contribuisce alla diagnosi finale e permette di valutare accuratamente la risposta alla terapia formulando una possibile prognosi. Le nuove tecnologie che valutano contemporaneamente l'espressione di migliaia di geni rappresentano oggi la nuova frontiera nella diagnostica delle leucemie acute: grandi sono le aspettative su una possibile applicabilità *routinaria* di queste metodologie. Anche lo studio delle proteine e dei circuiti di attivazione cellulare rappresentano un nuovo approccio rivolto al disegno e alla produzione di farmaci intelligenti; se ne intravede un possibile ruolo nel curare non più la malattia, ma il difetto specifico alla base della malattia.

In questi ultimi anni si è passati da una diagnosi sostanzialmente morfologica, utilizzando la classificazione FAB sia per le leucemie linfoblastiche acute (LLA) che per quelle mieloblastiche (LMA) ad una più complessa. L'introduzione negli anni '80-'90 dei marcatori immunologici e di quelli citogenetici ha cambiato profondamente l'approccio diagnostico nelle leucemie acute.

Identificazioni di classi a diverso rischio di ricaduta

Una corretta stratificazione dei pazienti in diverse classi di rischio assume un ruolo fondamentale nel trattamento, nel tentativo di selezionare una terapia che sia adeguata e non ingiustificatamente troppo tossica. Sono stati identificati alcuni fattori genetici responsabili di maggior resistenza alla chemioterapia o di abnorme tossicità.

Si riconoscono tre classi di rischio nelle Leucemie Acute pediatriche: Standard, Intermedio e Alto.

Fattori che predicono l' *outcome* clinico

Attualmente la possibilità di guarigione è di almeno il 70% nelle LLA e di circa il 50% nelle LMA. I fattori che influenzano l' *outcome* sono rappresentati principalmente dalle caratteristiche genetiche della cellula coinvolta e dalla sua responsività ai regimi di chemioterapia valutabile mediante lo studio della Malattia Residua Minima (MRD).

Il primo fondamentale momento nel trattamento di una leucemia è una diagnosi adeguata.

Morfologia

L'esame morfologico costituisce ancora un cardine nella diagnosi di leucemia; ha il grande vantaggio di non essere costoso, di essere rapido, di essere in grado di definire nella maggior parte dei casi se si tratta di una leucemia. E' inoltre, al momento il *golden standard* nelle mielodisplasie, anche se nuove tecnologie sembrano poter essere più informative.

Il grande limite di questa tecnica sta nell'operatore: l'interpretazione è soggettiva, soprattutto nelle forme più immature e dipende in gran parte dall'esperienza dell'esaminatore. La morfologia, associata alla citochimica è in grado di distinguere tra LLA e LMA in oltre 80% dei casi; un esaminatore esperto, inoltre, può riconoscere da caratteristiche peculiari, alcuni sottotipi geneticamente importanti come la Leucemia Acuta Promielocitica-LAP (M3) o quelle con il coinvolgimento del CbFB (M2 t(8;21) o M4eo con inv 16). Limite di tale tecnica è il non essere molto sensibile, oltre ad avere una bassa specificità.

Citogenetica e genetica molecolare

La leucemia è una malattia genetica, infatti, nella maggior parte dei casi una anomalia genetica è identificabile; circa il 50% di queste anomalie sono anomalie ricorrenti.

Recentemente anche la WHO ha riconosciuto l'importanza diagnostico-prognostica di alcune anomalie genetiche, tanto da considerarle fondamentali per una attuale classificazione internazionale.

La citogenetica classica offre alcuni vantaggi come quelli di identificare tutte le anomalie eventualmente presenti, il costo relativamente basso, senza la necessità di attrezzature particolarmente sofisticate. Gli svantaggi principali sono: la percentuale di successi non è mai troppo alta, con numerosi falsi negativi; l'analisi è molto operatore dipendente; il tempo impiegato è generalmente non compatibile con scelte terapeutiche tempestive. Questo ha stimolato l'applicazione di tecniche molecolari come la RT-PCR per identificare i prodotti di fusione derivanti dalle più frequenti traslocazioni, e la FISH. I vantaggi sono principalmente l'identificazione rapida e veloce delle traslocazioni cercate, la possibilità di lavorare su RNA o nuclei interfascici e una facile interpretazione dei risultati. Lo svantaggio principale è rappresentato dall'incapacità a identificare in genere il gene *partner* o le aberrazioni aggiuntive. La FISH è in genere costosa e necessita di multiple reazioni per uno *screening* adeguato. La RT-PCR è rapida, economica, estremamente specifica ed utilizzabile per la MRD, ma non è in grado di identificare traslocazioni complesse ed è applicabile a solo il 40% di tutte le leucemie.

La Citometria a flusso

E' attualmente la metodica più accurata per identificare e numerare le cellule leucemiche. E' una metodologia molto versatile e può essere alla portata di qualsiasi laboratorio di analisi. I vantaggi più rilevanti consistono nella rapidità di analisi, con capacità di formulare un referto in breve tempo, senza essere troppo costosa (anche se non propriamente economica, considerato il costo iniziale dell'attrezzatura); è in grado di identificare sottogruppi di pazienti con rilevanza prognostica e sottotipi di leucemie geneticamente ben definiti, oltre ad essere in grado di valutare il *follow up* della malattia con lo studio della malattia residua minima. I maggiori limiti sono legati alla capacità dell'operatore, basata anche su un'esperienza adeguata, e ai controlli che il laboratorio è in grado di attivare.

Gene profiling

La nuova frontiera si basa sulla possibilità di miniaturizzare l'analisi di espressione dei geni; sull'analisi di alterazioni piccole (mutazioni) e grandi (delezioni e amplificazioni) del genoma; su metodi accurati per identificare in modo selettivo l'espressione di un gene; sulla identificazione di *pathways* metabolici specifici; e infine sullo sviluppo di terapie personalizzate. In questa fase, distinguere tra ciò che è veramente necessario per la diagnosi e per l'approccio terapeutico e ciò che è destinato a rimanere nell'ambito della ricerca è ancora prematuro. Sicuramente nell'ambito delle nuove acquisizioni, i microarray, in grado di analizzare l'espressione di migliaia di geni simultaneamente, rappresentano un segno concreto delle mutate prospettive di conoscenza biologica (basi molecolari delle malattie) e clinica (diagnosi, classificazione, prognosi, terapia) su cui attivarsi, sia per seguire gli sviluppi della biologia molecolare, sia per percepire i ritorni e le potenzialità sul piano più strettamente clinico e i primi contributi che queste nuove tecnologie offrono in alcuni "percorsi" diagnostici di interesse pediatrico, relativi alle leucemie acute. Nonostante i limiti impliciti in un così vasto campo di conoscenza e innovazione, emergono nuove possibilità di aumentare le nostre conoscenze sull'eziologia di alcune patologie, di avere diagnosi più accurate con classificazioni più precise, probabilmente in tempi più brevi, e di formulare quesiti importanti specie per quanto concerne la definizione di *pathways* metaboliche delle malattie e l'identificazione di nuovi bersagli per interventi terapeutici sempre più mirati.

In conclusione l'approccio diagnostico delle leucemie acute si sta avviando ad una semplificazione dovuta ad una sempre maggior sofisticazione delle tecnologie a disposizione del laboratorio, per cui non è lontano il momento in cui gli arrays di espressione entreranno nella pratica routinaria insieme alla morfologia e alla citometria a flusso, tecniche che al momento non appaiono sostituibili.

Bibliografia

1. B.Bain; Diagnosis from the blood smear N Engl J Med 2005;353 498-507
2. CH Pui and W. Ewans Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia N EngJ. J Med 2006;354: 166-178
3. L Bullinger and P Valk Gene Expression Profiling in Acute Myeloid Leukemia J Clin Oncol 2005; 23:6296-6305
4. SC Raimondi, MN Chang, Y Ravindranath FG Behm, MV Gresk et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with Acute Myeloid Leucemia: clinical Characteristics and Treatment outcome in a Cooperative Pediatric Oncology Group Study-POG8821 Blood 1999; 94:3707-3716
5. 2006 Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometry Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. Clinical Cytometry in press 2007