

Valoarea prognostică a markerilor tradiționali și a biomarkerilor în leucemia limfatică cronică în practica clinică

Prognostic value of traditional markers and biomarkers in chronic lymphocytic leukemia in clinical practice

Dr. Elena ANDRUȘ, Prof. Dr. Ana Maria VLĂDĂREANU

Clinica Hematologie, Spitalul Universitar de Urgență, București

REZUMAT

Leucemia limfatică cronică este o boală cu evoluție naturală îndelungată, care beneficiază de o terapie cu eficiență redusă și foarte rar de răspuns complet la tratament. Tot mai mulți pacienți sunt diagnosticați în stadii asimptomatice și la vârste tot mai tinere. Progresele recente în descoperirea mecanismelor moleculare implicate în patogeneza bolii, însoțite de apariția de noi agenți terapeutici, lansează o provocare continuă pentru clinicieni în stabilirea conduitei terapeutice la acești pacienți. În paralel, au fost realizate studii pentru a evidenția acei factori care influențează efectiv răspunsul terapeutic și durata acestuia – markerii de prognostic, în scopul adoptării unei strategii terapeutice cât mai adaptate la caz. Deși stadializarea clinică rămâne baza pentru evaluarea prognosticului în leucemia limfatică cronică, o serie de markeri biologici, în special markeri serici, anomaliiile citogenetice, statusul mutațional IgVH, expresia CD38 și ZAP-70 în celulele leucemice, oferă informații prognostice importante și independente. Înainte de a fi încorporați în practica clinică de zi cu zi, acești markeri necesită însă standardizare și validare în studii prospective mai mari. În prezent se încearcă combinarea acestor markeri prognostici pentru a obține un sistem integrat de stratificare a riscului, cu largă aplicabilitate clinică.

Cuvinte cheie: leucemie limfatică cronică, markeri de prognostic, biomarkeri

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia is a disease with long natural evolution, receiving low efficiency therapy and rarely with complete response to treatment. More and more patients are diagnosed in asymptomatic stages and at younger ages. Recent progress in uncovering the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of the disease, accompanied by the emergence of new therapeutic agents, generates an ongoing challenge for clinicians in establishing optimal therapeutic management of these patients. In parallel, studies were conducted to highlight the factors that effectively influence therapeutic response and duration of response – prognostic markers – in order to adopt the best therapeutic strategy for the patient. Although clinical staging remains the basis for evaluating prognosis in chronic lymphocytic leukemia, a number of biological markers, in particular serum markers, cytogenetic abnormalities, IgVH mutation status, CD38

Adresă de corespondență:

Dr. Elena Andruș, Spitalul Universitar de Urgență, Splaiul Independenței nr. 169, București

and ZAP-70 expression in leukemic cells, provides important and independent prognostic information. Before being incorporated into everyday clinical practice, however, these markers require, standardization and validation in larger prospective studies. Currently they try to combine these prognostic markers in order to obtain an integrated risk stratification system, with broad clinical application.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, prognostic markers, biomarkers

INTRODUCERE

Hemopatie malignă frecvent întâlnită în patologia adultului, leucemia limfatică cronică (LLC) rămâne o boală cu prognostic extrem de variabil, în ciuda progreselor făcute în descifrarea biologiei bolii și a apariției de noi agenți terapeuți. LLC este o tumoră „lichidă” constituită dintr-o populație clonală de celule B CD19+ CD5+, cu aspect morfologic relativ matur, dar incompetente imunologic. Prin progresia bolii, limfocitele clonale se acumulează în ganglioni, splină, ficat și alte organe, determinând mărirea de volum a organelor respective. Boală cu cinetică lentă, LLC se datorează unui defect în programul de moarte celulară programată, care determină inhibarea apoptozei și acumularea limfocitelor patologice, condiție ce explică parțial sensibilitatea relativ scăzută a clonei maligne la medicamentele citotoxice.

Riscul apariției bolii crește progresiv cu vârsta și este de două ori mai mare la bărbați decât la femei, vârsta medie la diagnostic fiind cuprinsă între 64-70 de ani. (1) Supraviețuirea generală medie la pacientul cu LLC este de aproximativ 10 ani. (2-5) Prognosticul individual al pacientului cu LLC este însă, extrem de variabil: uneori boala are o evoluție indolentă, fără să reducă speranța de viață, în timp ce în alte cazuri boala progresează rapid, are un comportament agresiv, cu supraviețuire după diagnostic inferioară, sub 2-3 ani. (6,7) Având în vedere evoluția variabilă și absența unui tratament curativ, managementul pacienților cu LLC trebuie planificat în funcție de prognostic.

MARKERI TRADIȚIONALI DE PROGNOSTIC ÎN LLC

În literatura de specialitate au fost identificați peste 35 de markeri de prognostic pentru LLC, pornind de la cei „tradiționali” (*traditional markers*), până la markeri nou descoperiți/biomarkeri (*novel markers*).

Markerii tradiționali de prognostic pornesc de la sistemele de stadializare clinică (Rai, Binet), la care se adaugă alți factori clinici și de laborator (nivelul limfocitelor din sânge, timpul de dublare a limfocitelor, morfologia limfocitelor, gradul de infiltrare medulară). Markerii noi de prognostic implică aspectele moleculare ale patogenezei LLC. (Fig. 1)

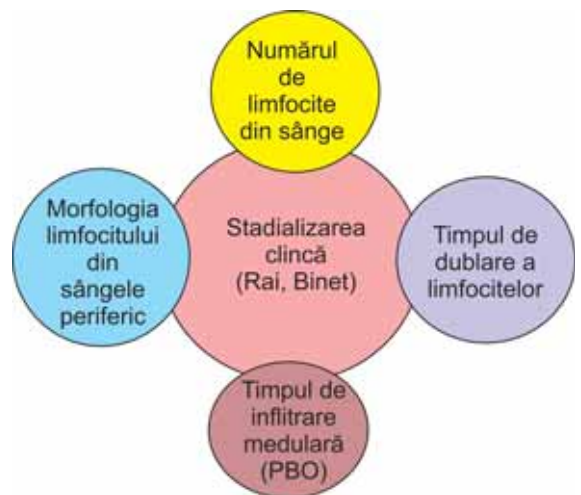


FIGURA 1. Markerii tradiționali de prognostic în leucemia limfatică cronică

Primul sistem de stadializare a fost introdus de Rai în 1975 și permite clasificarea în 5 stadii clinice. În 1981, a fost descrisă clasificarea Binet care împarte pacienții în 3 categorii de risc. Pacienții cu boală cu risc scăzut (Rai 0, Binet A) au o supraviețuire mediană de aproape de 15 ani, cei cu boală cu risc intermediar (Rai I sau II, Binet B) au o supraviețuire mediană de 5-7 ani, iar majoritatea pacienților cu boală cu risc ridicat (Rai III, IV; Binet C) au o speranță de viață de mai puțin de 3-4 ani. (6,7) Stadializarea clinică validată de nenumărate studii este o metodă simplă de estimare a prognosticului, dar prezintă unele limitări (nu pot fi identificați pacienții care vor dezvolta boală progresivă sau cei cu LLC indolentă). Deși stadiul clinic de boală se corelează bine cu supraviețuirea, fiecare stadiu este heterogen, limitând folosirea stadia-

lizării ca unic factor în aprecierea supraviețuirii. Mai ales în stadiile mici ale LLC sunt necesari factori suplimentari de apreciere a prognosticului.

Criteriile Rai și Binet nu reflectă întotdeauna masa tumorală reală. Mai mult, sistemele de stadializare clinică nu fac diferența între anemia hemolitică autoimună și trombocitopenia imună și anemia și trombocitopenia cauzate de infiltrarea medulară, ambele fiind încadrate la stadiul III, IV sau C. (8,9)

Un studiu prognostic pe 256 de pacienți cu LLC a dovedit că un sistem de stadializare cantitativă – *masa tumorală totală (TTM)*, este un indicator mai bun al încărcăturii tumorale decât numărul de limfocite. (10) Scorul TTM se calculează însumând rădăcina pătrată a numărului de limfocite periferice ($\times 10^9/\text{microL}$), diametrul celui mai mare ganglion palpabil (cm) și splenomegalia apreciată de la rebordul costal (cm). Pacienții cu TTM > 9 la momentul diagnosticului au avut o supraviețuire medie de 39 de luni, comparativ cu 101 luni la cei cu TTM < 8,9 ($p < 0,0005$).

Un alt sistem de evaluare a prognosticului citat în literatură, care se bazează pe TTM, este *distribuția masei tumorale (Tumor Distribution)*. (11) Valoarea TD e reprezentată de procentul masei tumorale totale care infiltrează sângele periferic și măduva osoasă. Acest parametru împarte pacienții cu LLC în trei categorii: leucemie pură dacă TD=100%, predominanța leucemiei dacă TD=50-99%, predominanța limfomului dacă TD < 50%. Valori mari TD au fost asociate cu rate de răspuns terapeutic mai mari și cu supraviețuire mai îndelungată.

Alți factori cu valoare prognostică importantă în LLC includ o serie de markeri clinici (vârstă, sex, statusul de performanță – PS), markeri biologici (numărul de limfocite, tipul de infiltrare medulară, timpul de dublare a limfocitelor) și markeri serici (LDH, beta2-microglobulina, timidinkinaza).

Aprecierea statusului de performanță (PS) are valoare prognostică semnificativă (criteriile ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), WHO (World Health Organization), CIRS (Cumulative Illness Rating Scale)). (12,13)

Timpul de dublare a limfocitelor (Lymphocyte Doubling Time) se referă la numărul de luni în care se dublează numărul de limfocite. LDT poate fi folosit ca un marker cinetic, fiind un bun predictor pentru PFS și supraviețuirea globală. (14) La pacienții în stadiul Binet A PFS mediană, a fost de 20 de luni la cei cu LDT < 12 luni,

comparativ cu PFS de 75 de luni la cei cu LDT > 12 luni ($p = 0,01$). (15) O creștere de > 50% a numărului de limfocite în 2 luni sau LDT într-o perioadă peste 2 luni, sau LDT sub 6 luni, sunt indicatori pentru tratament. (16,17)

Biomarkerii serologici (timidinkinaza – TK, $\beta 2$ -microglobulina – $\beta 2\text{MG}$ și CD23 solubil – sCD23) furnizează informații valoroase despre progresia bolii și supraviețuire. (5,18) Nivelurile serice ale TK se corelează cu masa tumorală și cu activitatea proliferativă a celulelor LLC și prezic progresia bolii, chiar și la pacienții cu boală în stadiu incipient. Niveluri ridicate de sCD23 au fost, de asemenea, corelate cu caracteristici prognostice adverse, cum ar fi infiltratul medular difuz, timp rapid de dublare și progresia bolii în LLC stadiu incipient. $\beta 2\text{MG}$ se corelează bine cu stadiile clinice și pare a fi un puternic marker prognostic. Markerii serologici nu pot fi folosiți însă pe scară largă pentru aprecierea prognosticului datorită variabilității valorilor de referință în funcție de laborator.

Stratificarea riscului utilizând valoarea LDH a separat pacienții în categorii diferite de risc, corelându-se și cu stadiile Rai. (19,20) Imunochimioterapia (FCR) aplicată la cei cu LDH crescut ($\times 2$ VN) se asociază cu răspuns inferior. (21)

$\beta 2$ -microglobulina conferă caracteristici adverse de prognostic, niveluri ridicate $\beta 2\text{MG}$ fiind evidențiate la pacienții cu supraviețuire redusă. (22) Comparativ cu alți markeri prognostici, $\beta 2\text{MG}$ se pare că are valoare prognostică independentă. (23) PFS la pacienții cu niveluri $\beta 2\text{MG}$ > 3,5 mg/L a fost de 13 luni, comparativ cu 75 de luni, la cei cu $\beta 2\text{MG}$ < 3,5 mg/L. (24)

S-a încercat folosirea $\beta 2\text{MG}$, alături de alte criterii, pentru stabilirea unui model de apreciere a indexului prognostic, asemănător cu celelalte sisteme de scorificare a prognosticului: IPI (International Prognostic Index), FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) sau MIPI (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index). Modelul indexului prognostic în LLC a fost tentat de Wierda et al. (19) și include aprecierea a 6 parametri: vârsta, nivelul $\beta 2\text{MG}$, numărul absolut de limfocite, sex, stadiu RAI și numărul ariilor ganglionare afectate. Astfel, au putut fi identificate grupuri prognostice distincte de pacienți. (25,26) În ceea ce privește regimul terapeutic inițial, dintre caracteristicile cu valoare prognostică independentă asociate cu RC au fost vârsta și $\beta 2\text{MG}$. Lipsa de răspuns la tratament a fost corelată independent cu vârsta, $\beta 2\text{MG}$, procentul de limfocite din măduva osoasă și regimurile terapeutice folosite. Supraviețuire

globală mai bună au avut cei cu vârstă tânără, cu niveluri scăzute de $\beta 2\text{MG}$. Acest index prognostic în LLC a rămas valabil pentru aprecierea prognosticului și a timpului până la inițierea tratamentului, doar pentru pacienții aflați în stadiul 0 de boală. (26)

Activitatea serică a timidinkinazei (s-TK) se corelează cu numărul de celule tumorale cu capacitate de diviziune, reflectând masa tumorală și rata proliferării tumorale. Posibilitatea identificării pacienților aflați în stadii mici de boală, dar cu risc de progresie rapidă utilizând nivelurile serice s-TK, ar putea avea mare utilitate clinică. Într-o analiză a Grupului German de lucru pentru LLC (German CLL study group), nivelurile serice s-TK au fost cotate printre primii patru parametri predictivi pentru supraviețuire redusă.

MARKERI NOI DE PROGNOSTIC (NOVEL MARKERS)

Markerii genetici/moleculari de prognostic se referă la aberațiile genice identificate prin FISH (examen citogenetic), statusul mutațional IgVH (Immunoglobulin Heavy Variable Genes), precum și determinări mRNA și/sau expresia anumitor markeri (proteine) la nivelul celulelor tumorale (CD38, ZAP-70, lipoproteinlipaza). Anomaliile genetice pot fi evaluate acum cu ajutorul tehnicilor microarray: CGH (array-Comparative Genomic Hybridization), SNP (Single Nucleotide Polymorphism arrays), tehnica FISH interfază (iFISH).

CGH (*array-Comparative Genomic Hybridization*) este un test cu mare sensibilitate, care permite detectarea noilor modificări ale numărului de copii cu importanță patogenică și prognostică. (27) Fezabilitatea acestei metode a fost apreciată pe 106 cazuri de LLC și a demonstrat înaltă sensibilitate și specificitate, întrunind criteriile pentru aplicarea ei în oncologia clinică. (28) Comparativ cu CGH cromozomial, array-CGH are o rezoluție spațială mai bună, detectând cele mai mici regiuni afectate. Cu această tehnică, au fost identificate modificări genetice care nu erau detectate anterior, precum mutațiile de la nivelul cromozomului 19 și oncogena MYCN de la nivelul 2p24. (28)

SNP-arrays (*Single Nucleotide Polymorphism arrays*) sunt recent folosite pentru identificarea alterărilor genomice în LLC29; de asemenea, SNP-array permite detectarea disomiei uniparentale (UPD), o potențială cauză a pierderii heterozigoției (LOH) fără modificări ale numărului de copii (copy number changes). Într-un prim

studiu, utilizând o analiză Affymetrix SNP-array pe 70 de cazuri de LLC, anomaliile cromozomiale au fost identificate în 65,6% și respectiv 81,5% dintre cazuri. (29) Aceste anomalii nu sunt detectabile prin metode obișnuite, dar pot influența patogeneza LLC. Mai multe studii au arătat că SNP-arrays pot aduce informații suplimentare în ceea ce privește anomaliile genomice comune, precum deleția 13q14. (30) Cariotipul aberant în LLC poate constitui un factor de prognostic independent, ținând cont că majoritatea acestor cazuri poartă deleții 11q22-q23 sau 17p13. (30,31)

Stabilirea profilului genomic utilizând aceste tehnici de înaltă rezoluție (CGH-arrays, SNP-arrays) poate fi extrem de utilă în aprecierea prognosticului pacientului cu LLC, dar pentru implementarea lor sunt necesare analize detaliate pe loturi mari de pacienți, în studii prospective ulterioare. (Fig. 2)

Tehnica FISH permite detecția sensibilă a aberațiilor genomice specifice nu numai pe cromozomii aflați în metafază, ci și în interfază (*interphase cytogenetics*), și reprezintă abordarea standard pentru analiza aberațiilor genomice în LLC. La baza implementării acestei tehnici în practica curentă a stat un studiu pe 325 de pacienți cu LLC, la care s-a efectuat FISH, iar anomaliile genomice au fost identificate la mai mult de 80% dintre pacienți. (32) Analize multivariate au stabilit că anomaliile genetice constituie un factor de prognostic independent. Deleția 13q14 ca unică modificare a fost asociată cu supraviețuire mai îndelungată (OS ~133 de luni), în timp ce pacienții cu deleție 11q22-q23, și mai ales 17p13 au avut supraviețuire scurtă (OS 79 de luni, respectiv de 32 luni). Rata de supraviețuire mai bună (intermediară) a fost la pacienții LLC fără aberații genomice identificate sau cu trisomie 12 (în medie 111 luni, respectiv 114 luni). (32)

Cea mai frecventă aberație genomică întâlnită în LLC este *deleția 13q14* și semnifică prognostic favorabil (supraviețuire medie mult mai bună comparativ cu alte anomalii cromozomiale și chiar cu cariotipul normal). (32)

Unele studii arată că *deleția 11q22-q23* se asociază cu prezența genei ATM (*ataxia telangiectasia mutated gene*). (33) Într-un studiu pe 155 de pacienți cu LLC, 12% au avut mutații ATM care au fost corelate cu statusul nonmutațional IgVH, fiind considerate, astfel, factor de prognostic independent. (34) Alela reziduală ATM este mutantă în 20-30% din cazurile de LLC cu deleție 11q22-q23 și se corelează cu o rată de răspuns mai mic la fludarabină. (34-36)

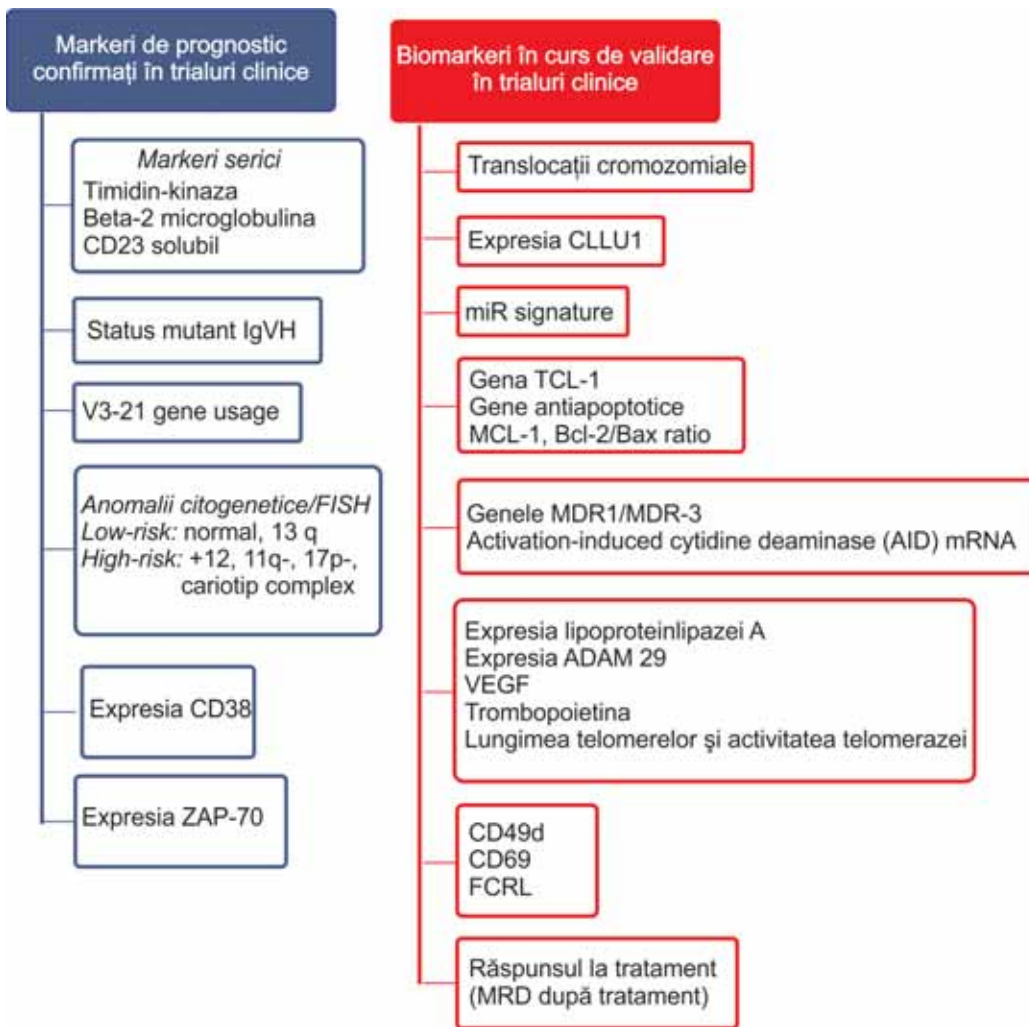


FIGURA 2. Markeri tradiționali și biomarkeri cu valoare prognostică în leucemia limfatică cronică – Moreno C., Montserrat E. – New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev.* 2008; 22(4):211-219.

Pacienții cu *trisomie 12*, anomalie identificată în 10-20% din cazurile de LLC în majoritatea studiilor prin tehnica FISH, par să aibă o evoluție clinică mai agresivă. (36)

În timp, pacienții pot acumula aberații genomice cu risc înalt; achiziția de noi anomalii genomice a fost asociată cu statusul non mutant IgVH, pozitivitatea ZAP-70 și rată scurtă de supraviețuire. (37,38)

Deleția 17p13/locusul TP53 (tumor suppressor gene) este detectată prin FISH în 4-9% dintre cazurile de LLC netratate. (39,40) Mutațiile TP 53 generează prognostic rezervat. (40,41) Incidența mutațiilor TP53 este mult mai mare în cazurile cu deleție 17p13 (care asociază mutații în 80-90% dintre cazuri), decât în cazurile fără deleție 17p13 (incidența mutațiilor TP53 fiind sub 10%). (41-44) Screeningul pentru deleția 17p13 prin tehnica FISH este singurul test biologic recomandat înaintea inițierii tratamen-

tului. Pacienții cu alterări TP53 sunt candidați pentru terapii alternative, datorită răspunsului minimal sau lipsei de răspuns la terapia standard cu fludarabină. (17)

Cercetările au aratat că eficacitatea agenților biologici mai noi (Alemtuzumab, Lenalidomidă, Flavopiridol) este independentă de background-ul genetic al pacientului, răspunsul obținut fiind comparabil atât la pacienții cu deleție 17p, cât și la cei fără această mutație. (45-50) Cu toate acestea, deși se obțin remisiuni cu aceste medicamente, totuși durata remisiunii și OS sunt foarte reduse. (45-50) EBMT recomandă allo-transplantul pentru consolidarea răspunsului la această categorie de pacienți. (51)

Detectarea anomaliilor citogenetice incriminate în LLC prin utilizarea tehnicii FISH este posibilă la aproximativ 90% dintre pacienți. Astfel, rezultă două grupuri de risc: pacienți cu risc redus (cariotip normal sau anomalii izolate, del

13q) și pacienți cu grad ridicat de risc (cu del 17p, del 11q). Semnificația prognostică a anomaliilor citogenetice este independentă de cea a stadializării clinice și de statusul mutant IgVH. (32,52-54)

STATUSUL MUTAȚIONAL IgVH

Cunoașterea *statusului mutațional IgVH (immunoglobulin heavy variable genes)* permite împărțirea pacienților cu LLC în două categorii. Pacienții care exprimă gene IgVH nonmutante (unmutated-LLC) pot avea mai frecvent trisomie 12, morfologie atipică a limfocitelor, evoluție mai agresivă a bolii, rezistență la terapie. Pacienții cu gene IgVH mutante au frecvent anomalii care implică 13q14. Pacienții care au mutații ale genei IgVH3-21 au o evoluție asemănătoare celor cu status nonmutant. (55-57)

Majoritatea autorilor susțin că semnificația prognostică a mutațiilor IgVH este independentă de cea a stadializării clinice și a anomaliilor citogenetice, în special la pacienții cu stadiu incipient de boală. Există totuși o excepție de la această regulă: expresia regiunii variabile V3-21 a genei imunoglobulinelor care este asociată cu un prognostic nefavorabil independent de statusul mutațional. (58)

Deoarece determinarea mutațiilor IgVH necesită echipamente specifice pentru secvențierea ADN-ului și este consumatoare de timp, nu poate fi folosită de rutină pentru stratificarea riscului. De aceea s-a încercat obținerea unui marker la fel de folositor ca statusul mutațional IgVH în evaluarea prognosticului pacienților cu LLC, dar mult mai accesibil.

DETERMINĂRI mRNA ȘI EXPRESIA ANUMITOR MARKERI LA NIVELUL CELULELOR TUMORALE (CD38, ZAP-70)

Expresia CD38 pe limfocitele leucemice a fost primul marker dovedit a fi corelat cu mutațiile IgVH. (59) Potrivit unor studii, expresia CD38 poate varia în timp. (18) Expresia CD38 evaluată prin citometria în flux și mutațiile IgVH sunt factori de prognostic independenți. (60,61)

Pacienții cu status nonmutant IgVH și expresie CD38 > 30% au avut o supraviețuire medie de 8 ani, în timp ce la pacienții cu status mutant IgVH și expresie CD38 < 30% supraviețuirea a fost de 26 de ani. Există trei modalități de expresie a CD38 la bolnavul cu LLC: negativ, pozitiv și bimodal. (62,63) Clona CD38 este identificată, în general, la pacienții care vor dezvolta

boală progresivă și vor avea durată redusă de supraviețuire, indiferent de stadiul de boală. (63)

Există și limitări ale utilizării CD38: pragul care definește pozitivitatea CD38 este controversat, nivelurile cut-off-urilor propuse fiind destul de variabile, în funcție de autor. (62-66)

Un alt indicator prognostic este *CD49d*, a cărei expresie crescută se corelează cu expresia crescută a ZAP-70, CD38, status nonmutant IgVH, cu timp scurt de la diagnostic până la începerea tratamentului, precum și cu supraviețuire globală scurtă. (67)

ZAP-70 (*70-kDa zeta associated protein*) este o proteină citoplasmatică cu activitate tirozinkinazică, ce este exprimată în mod obișnuit doar în celulele killer sau celulele T. Ea poate fi detectată atât la pacienții care prezintă gene IgVH nonmutante, cât și la pacienții cu gene IgVH mutante. Expresia ZAP-70 este un predictor puternic al necesității introducerii tratamentului la pacienții cu LLC, comparativ cu statusul mutațional al genelor IgVH. Pacienții ZAP 70 pozitivi și status nonmutant al IgVH au un risc mai mare de a dezvolta citopenii immune. (68) Majoritatea cazurilor mutante sunt ZAP-70 negative, în timp ce formele nonmutante sunt ZAP-70 pozitive. (69)

Expresia ZAP-70 în celulele leucemice poate fi evaluată prin diferite metode, cum ar fi Western Blot, RT-PCR cantitativ, imunohistochimie și fluxcitometrie. (70-73) Expresia ZAP-70 în limfocitele din sângele periferic depinde de linia de celule, cele mai ridicate niveluri de ZAP-70 fiind observate în celulele NK și T, în timp ce exprimarea pe celulele B este scăzută sau absentă.

Unele studii au constatat că există o foarte bună corelație între expresia ZAP-70, detectată flowcitometric și mutațiile IgVH; ZAP-70 a avut o valoare prognostică echivalentă cu statusul mutant IgVH. (70) Alți autori susțin că ZAP-70 este mai util decât statusul mutațional IgVH pentru a estima timpul până la progresia bolii (74,75), expresia ZAP-70 rămânând destul de stabilă pe parcursul evoluției bolii. (76) (Tabelul 1)

TABELUL 1. Statusul mutant IgVH și expresia ZAP-70 – categorii de risc (83)

Biomarkeri	Categorie de risc	Supraviețuire (ani)
ZAP-70 - /M-IgVH	Risc scăzut	10 ani
ZAP-70 - /U-IgVH	Risc intermediar	6,3 ani
ZAP-70 +/M-IgVH	Risc înalt	3 ani
ZAP-70 +/U-IgVH		2,5 ani

Cercetările actuale susțin că ZAP-70 și CD38 pot oferi informație prognostică complementară. (77-79) Astfel, pacienții care exprimă ambii

markeri au prognosticul cel mai prost, cei la care niciunul dintre acești markeri nu este prezent ar avea prognostic bun, iar cazurile discordante ar intra într-o categorie intermediară de risc.

CD38 este exprimat la suprafața limfocitelor sau a altor celule nonhematopoietice și joacă un rol în activarea limfocitelor, dar și în proliferare și protecția împotriva apoptozei. În celulele LLC, CD38 induce semnale pentru proliferare și supraviețuire, permițând celulelor leucemice să interacționeze cu CD31, ligand pentru CD38 exprimat de celulele stromale din micromediul medular și din alte țesuturi limfoide. Celulele CD38 pozitive se asociază de regulă cu expresie crescută a Ki-67 și ZAP-70. (80)

CXCR4 – receptor pentru chemokine exprimat la nivel crescut la suprafața celulelor LLC, mediază migrarea celulelor LLC către celulele stromale, care secretă ligandul pentru CXCR4, numit SDF-1 (stromal cell derived factor-1 sau CXCL12). (81,82) Ligatura CD38 de ligandul CD31 exprimat pe celulele stromale induce fosforilarea ZAP-70. ZAP-70 favorizează migrarea celulelor LLC sub acțiunea SDF-1/CXCL12, prin creșterea semnalizării CXCR4. Mai mult, ZAP-70 îmbunătățește capacitatea celulelor LLC de a răspunde la antigen prin recrutare de ZAP-70 și Syk la porțiunea citoplasmatică a complexului BCR activat (CD79 a/b). Astfel, celulele leucemice ZAP-70/CD38 se adună în micromediul medular unde primesc semnale de creștere și supraviețuire. (85)

Celulele ZAP-70+ au capacitate crescută de migrare către ganglionii limfatici, precum și sensibilitate crescută la semnalele intercelulare. Astfel, se ajunge la o acumulare mai rapidă a limfocitelor cu creșterea încărcăturii tumorale, caracteristică formelor progresive de boală.

CLL Research Consortium a stabilit utilitatea ZAP-70, CD38, statusului mutațional IgVH în aprecierea timpului până la începerea tratamentului într-un studiu efectuat pe 1.000 de pacienți cu LLC. (83) Astfel, au rezultat 3 categorii de risc: pacienții ZAP-70 + sunt *high risk* indiferent de statusul mutant IgVH; cei ZAP-70 – se împart în *low risk* (cu status mutant IGVH) și cu risc intermediar (IgVH nonmutant). (83) Se pare că CD38 nu a avut valoare prognostică independentă. Totuși, standardizarea tehnicii ZAP-70 rămâne a fi stabilită la nivel internațional, înainte de a fi impusă în practica clinică de zi cu zi. (84)

MARKERI DE PROGNOSTIC ÎN CURS DE VALIDARE ÎN STUDII CLINICE

Este bine cunoscut faptul că celulele tumorale au activitate telomerazică crescută. *Lun-*

gimea telomerelor este invers corelată cu *activitatea telomerazei*. Unii autori consideră că acești markeri se corelează cu supraviețuire medie redusă.

MCL1 (Myeloid Cell Leukemia sequence 1)/ gena BCL2 mediază semnalele antiapoptoză. Expresia crescută a acestei gene reflectă imposibilitatea obținerii remisunii complete după tratamentul cu fludarabină și clorambucil.

CCLU1 (CLL upregulated gene 1) localizată pe cromozomul 12q22, are expresie crescută numai la pacienții cu LLC cu status IgVH nonmutant, nu și în alte hemopatii maligne.

Expresia crescută a *AID (activation-induced cytidine deaminase) mARN* se asociază cu statusul nonmutant IgVH și aberații citogenetice nefavorabile.

Lipoproteinlipaza (LPL) și ADAM 29 se pot analiza prin RT-PCR cantitativ. *Lipoproteinlipaza* joacă un rol major în cadrul metabolismului lipidic, reflectând consumul energetic crescut din celulele tumorale. Astfel, un nivel ridicat LPL se corelează cu o rată scăzută de supraviețuire globală. Studiile au arătat că LPL are o concordanță de ~75-85% cu statusul mutațional IgVH. *ADAM 29* este o proteină membranară din familia integrinelor, cu expresie crescută în formele de leucemie cu IgVH mutantă. Se poate utiliza, de asemenea, raportul LPL/ADAM 29 pentru estimarea statusului IgVH. Alte studii încearcă să găsească corelații ale genelor microARN cu ZAP-70 și statusul mutațional IgVH.

Toți acești markeri sunt de fapt, markeri surrogat pentru statusul mutațional IgVH sau ZAP-70, necesită laboratoare specializate și au aplicabilitate clinică redusă. În consecință, multe încercări au fost făcute pentru a identifica markeri cu valoare prognostică ușor de evaluat în practica clinică de zi cu zi.

CONCLUZII

Cei mai folosiți 4 biomarkeri pentru aprecierea prognosticului în LLC rămân statusul mutațional IgVH, anomaliile citogenetice identificate prin tehnica FISH, expresia ZAP-70 și expresia CD38. Fiecare dintre ei și-a dovedit utilitatea în estimarea supraviețurii globale și a timpului până la inițierea tratamentului. ZAP-70 și mutațiile IgVH furnizează, în esență informații prognostice similare și, prin urmare, ele se pot substitui reciproc. Studiarea ZAP-70 prin citometrie în flux poate fi mai ușoară decât determinarea mutațiilor IgVH, mai ales în cadrul laboratoarelor obișnuite. Stadializarea clinică rămâne

baza pentru evaluarea prognosticului, dar managementul optim al pacientului cu LLC necesită cunoașterea statusului funcțional individual al

pacientului, precum și evaluarea riscului bolii, cu ajutorul biomarkerilor.

BIBLIOGRAFIE

- Dores G.M., Anderson W.F., Curtis R.E., et al.** CLL: Overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 2007; 139:809-819.
- Zent C.S., Kyassa M.J., Evans R., et al.** Chronic lymphocytic leukemia incidence is substantially higher than estimated from tumor registry data. *Cancer*, 2001; 92:1325-1330
- Zent C.S., Ding W., Schwager S.M., et al.** The prognostic significance of cytopenia in CLL. *Br J Haematol*, 2008; 141:615-621.
- Zent C.S., Call T.G., Shanafelt T.D., et al.** Early treatment of high risk CLL with alemtuzumab and rituximab. *Cancer*, 2008; 113:2110-2118.
- Shanafelt T.D., Rabe K., Kay N.E., et al.** Influence of age at diagnosis on utility of prognostic testing in patients with CLL. *Blood* 2009; 114:2342.
- Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N., Pasternack B.S.** Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975; 46:219-234.
- Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., et al.** A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48:198-206.
- Dearden C., Wade R., Else M., et al.** The prognostic significance of a positive direct antiglobulin test in CLL: a beneficial effect of the combination of fludarabine and cyclophosphamide on the incidence of hemolytic anemia. *Blood*, 111:1820-6, 2008.
- Hamblin T.J.** Autoimmune complications of CLL. *Semin Oncol*, 33:230-9, 2006.
- Jaksic B., Vitale B.** Total tumour mass score (TTM): a new parameter in CLL. *Br J Haematol*, 49:405-13, 1981.
- Jaksic O., Vrhovac R., Kusec R., et al.** Clinical tumour cell distribution pattern is a prognostically relevant parameter in patients with B-cell CLL. *Haematologica*, 86:827-36, 2001.
- Aaronson N.K., Ahmendazai S., Bergman B., et al.** The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *J Natl Cancer Inst*, 85:365-76, 1993.
- Extermann M., Overcash J., Lyman G.H., et al.** Comorbidity and functional status are independent in older cancer patients. *J Clin Oncol*, 16:1582-7, 1998.
- Montserrat E., Sanchez-Bisono J., Vinolas N., Rozman C.** Lymphocyte doubling time in CLL: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol*, 62: 567-75, 1986.
- Bergmann M.A., Busch R., et al.** Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage CLL: Results of the CLL1-Protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood*, 110:625a, 2007.
- Cheson B.D., Bennet J.M., Grever M., et al.** National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for CLL: revised guidelines for diagnostic and treatment. *Blood*, 87: 4990-7, 1996.
- Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., et al.** Guidelines for diagnostic and treatment of CLL: a report from the International Workshop on CLL updating the National Cancer Institute Working Group 1996 Guidelines. *Blood*, 111: 5446-56, 2008.
- Shanafelt, Tait D, et al.** Predicting clinical outcome in CLL: How and Why. *Hematology* 2009; 421-429.
- Wierda W.G., O'Brien S., et al.** Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with CLL. *Blood*, 109: 4679-85, 2007.
- Lee J.S., Dixon D.O., Kantarjian H.M., et al.** Prognosis of CLL: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*, 69:929-36, 1987.
- Tam C.S., O'Brien S., Wierda W., et al.** Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide and rituximab regimen as initial therapy of CLL. *Blood*, 112:975-80, 2008.
- Keating M.J., Lerner S., Kantarjian H., Freireich E.J., O'Brien S.** The serum b2 microglobulin (b2M) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 1998;86:606a[Abstract 2412].
- Hallek L., Langenmayer I., Nerl C., Knauf W., Dietzfelbinger H.M., Adorf D., et al.** Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early non-smoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93:1732-7.
- Hallek M., Wanders L., Ostwald M., et al.** Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in CLL and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*, 22: 439-47, 1996.
- Wierda W.G., O'Brien S., Wang X., et al.** Characteristics associated with important clinical end points in patients with CLL at initial treatment. *J Clin Oncol*, 27: 1637-43, 2009.
- Shanafelt T.D., Jenkins G., Call T.G., et al.** Validation of a new prognostic index for patients with CLL. *Cancer*, 115: 363-72, 2009.
- Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenbauer S., et al.** Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 20: 399-407, 1997.
- Schwaenen C., Nessling M., Wessendorf S., et al.** Automated array-based genomic profiling in CLL: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 1039-44, 2004.
- Pfeifer D., Pantic M., Skatulla I., et al.** Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP-arrays. *Blood*, 109: 1202-10, 2007.
- Ouillette P., Erba H., Kujawski L., et al.** Integrated genomic profiling of CLL identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res*, 68: 1012-21, 2008.
- Kujawski L., Ouillette P., Erba H., et al.** Genomic complexity identifies patients with aggressive CLL. *Blood*, 112: 1993-2003, 2008.
- Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al.** Genomic aberrations and survival in CLL. *N Engl J Med*, 343: 1910-6, 2000
- Stilgenbauer S., Leibisch P., James M.R., et al.** Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-q23.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 11837-41, 1996.
- Austen B., Powell J.E., Alvi A., et al.** Mutations in ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IgVH mutation status in

- patients with B-CLL. *Blood*, 106; 3175-82; 2005.
35. Austen B., Skowronka A., Baker C., et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with CLL containing an 11q deletion. *J Clin Oncol*, 25; 5448-57, 2007.
 36. Pettitt A.R., Sherrington P.D., Stewart G., et al. P53 dysfunction in B-CLL: inactivation of ATM is an alternative to TP53 mutation. *Blood*, 98:814-22, 2001.
 37. Shanafelt T.D., Witzig T.E., Fink S.R., et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage CLL. *J Clin Oncol*, 24: 4634-41, 2006.
 38. Stilgenbauer S., Sander S., Bullinger L., et al. Clonal evolution in CLL: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy and short survival. *Haematologica*, 92: 1242-5, 2007.
 39. Catovsky D., Richards S., Matutes E., et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with CLL (the LRFCLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*, 370: 230-9, 2007.
 40. Dohner H., Fischer K., Bentz M., et al. P53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in CLL. *Blood*, 85:1580-9, 1995.
 41. Dicker F., Herholtz J., Schnittger S., et al. The detection of TP53 mutations in CLL independently predicts disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 23:117-24, 2009.
 42. Gonzalez D., Martinez P., Wade R., et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in CLL patients with or without 17p deletion. *Blood*, 112: 784a. 2008.
 43. Rossi D., Cerri M., Deambrogi C., et al. The prognostic value of TP53 mutations in CLL is independent of del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*, 15:995-1004, 2009.
 44. Zenz T., Krober A., Scherer K., et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in CLL: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*, 112: 3322-9, 2008.
 45. Byrd J.C., Lin T.S., Dalton J.T., et al. Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk CLL. *Blood*, 109: 399-404, 2007.
 46. Chanan-Khan A., Miller K.C., Musial L., et al. Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory CLL: results of a phase II study. *J Clin Oncol*, 24: 5343-9, 2006.
 47. Ferrajoli A., Lee B.N., Schlette E.J., et al. Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory CLL. *Blood*, 111: 5291-7, 2008.
 48. Hilmen P., Skotnicki A.B., Robak T., et al. Alectuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for CLL. *J Clin Oncol*, 25: 5616-23, 2007.
 49. Pettitt A.R., Matutes E., Oscier D. Alectuzumab in combination with high-dose methylprednisolone is a logical, feasible and highly active therapeutic regimen in CLL patients with p53 defects. *Leukemia*, 20:1441-5, 2006.
 50. Stilgenbauer S., Zenz T., Winkler D., et al. Subcutaneous alectuzumab in fludarabine-refractory CLL: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German CLL Study Group. *J Clin Oncol*, 27: 3994-4001, 2009.
 51. Schetelig J., van Biezen A., Brand R., et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for CLL with 17p deletion: a retrospective European Group for Blood and Marrow Transplantation analysis. *J Clin Oncol*, 26: 5094-100, 2008.
 52. Catovsky D., Richards S., Matutes E., et al. Response to therapy and survival in CLL is influenced by genetic markers. Preliminary analysis from the LRF CLL4 trial [abstract]. *Blood*. 2004; 104:8a.
 53. Keating M.J., O'Brien S., Albitar M., et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Oncol*. 2005; 23:18.
 54. Wierda W., O'Brien S., Wen S., et al. Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005; 23:40-47.
 55. Mayr C., Speicher M.R., Kofler D.M., et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 742-751.
 56. Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D.G., Stevenson F.K. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94:1848-1854.
 57. Dame R.N., Wasil T., Fais F., et al. Ig VH gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94:1840-1847.
 58. Tobin G., Rosenquist R. Prognostic usage of V(H) gene mutation status and its surrogates markers and the role of antigen selection in chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*. 2005; 22: 217-228
 59. Lichtmann M., Beutler E., Selingsohn U., Kaushansky K., Kipps T. Williams Hematology 7th edition, chapter 92, *Mc Graw Hill Medical* 2007
 60. Domingo-Domenech E., Domingo-Claros A., Gonzalez-Barca E. et al. CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 2002; 87:1021-1027
 61. Chevallier P., Penther D., Avet-Loiseau H., et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 116:142-150
 62. Jelinek D.F., Tschumper R.C., Geyer S.M., et al. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001; 115:854-861.
 63. Ghia P., Guida G., Stella S., et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*. 2003; 101: 1262-1269.
 64. Lin K., Sherrington P.D., Dennis M., Matrai Z., Cawley J.C., Pettitt A.R. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100:1404-1409.
 65. Chevallier P., Penther D., Avet-Loiseau H., et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002; 116:142-150.
 66. Ibrahim S., Keating M., Do K.A., et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 98:181-186.
 67. Gattei V., Bulian P., Del Principe M.I., Zucchetto A., Maurillo L., Buccisano F., Bomben R., Dal-Bo M., Luciano F., Rossi F.M., Degan M., Amadori S., Del Poeta G. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):865-73. Epub 2007 Oct 24
 68. Zanotti R., Frattini F., Ghia P., Visco C., Zamò A., Perbellini O., Stella S., Facco M., Giaretta I., Chilosi M., Pizzolo G., Ambrosetti A. ZAP-70 expression is associated with increased risk of autoimmune cytopenias in LLC patients. *Am J Hematol*. 2010 Jul; 85(7):494-8.
 69. Rosenwald A., Alizadeh A.A., Widhopf G., et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194:1639-1647.
 70. Crespo M., Bosch F., Villamor N., et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348:1764-1775.
 71. Wiestner A., Rosenwald A., Barry T.S., et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003; 101:4944- 4951.
 72. Carreras J., Villamor N., Colomo L., et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol*. 2005; 205:507-513.

73. **Catherwood M.A., Matthews C., Niblock R., Dobbin E., Morris T.C., Denis Alexander H.** ZAP-70 mRNA quantification in Bcell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 2006; 76:294-298.
74. **Rassenti L.Z., Huynh L., Toy T.L., et al.** ZA-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2004; 351:893-901.
75. **Del Principe M.I., Del Poeta G., Buccisano F., et al.** Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006; 108:853-861.
76. **Bosch F., Muntañola A., Giné E., et al.** Clinical implications of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006; 70B:214-217.
77. **Del Giudice I., Morilla A., Osuji N., et al.** Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2005; 104:2124-2132.
78. **Schroers R., Griesinger F., Trümper L., et al.** Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2005; 19:750-758.
79. **Hus I., Podhorecka M., Bojarska-Junak A., et al.** The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol.* 2006; 17:683-690.
80. **Damle R.N., Temburni S., Calissano C., et al.** CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood.* 2007; 110:3352-3359.
81. **Burger J.A., Burger M., Kipps T.J.** Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood.* 1999; 94:3658-3667.
82. **Burger J.A., Burkle A.** The CXCR4 chemokine receptor in acute and chronic leukaemia: a marrow homing receptor and potential therapeutic target. *Br J Haematol.* 2007; 137: 288-296.
83. **Rassenti L.Z., Jain S, Keating M.J., et al.** Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008; 112:1923-1930.
84. **Letestu R., Rawstron A., Ghia P., et al.** Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: a multicentric international harmonization process. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006; 70:309-314.
85. **Richardson J.S. et al.** ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood,* 2006; Vol 107, No 9: 3584-3592

Vizitați site-ul

SOCIETĂȚII ACADEMICE DE MEDICINĂ A FAMILIEI

www.samf.ro