

# Dalla morfologia ai microarray: come e perché si sta modificando l'approccio diagnostico alle leucemie

G. Basso, B. Buldini

Laboratorio di Onco Ematologia, Dipartimento di Pediatria, Università di Padova

## Riassunto

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 assieme alla morfologia e alla citometria a flusso, tecniche che al momento non appaiono sostituibili. Questo articolo descrive brevemente lo stato dell'arte e le prospettive future.

## Summary

**From morphology to microarrays: chances in the diagnostic approach to leukaemias**

New and more and more sophisticated laboratory technologies are going to allow a simplification of the diagnostic pathways for acute leukaemias. It will not take long when the expression arrays will be routinely used, together with morphology and flow cytometry, at the moment unavoidable diagnostic procedures. This paper briefly describes the state of art and the next future diagnostic possibilities.

La diagnosi di leucemia acuta è un processo complesso, in continua evoluzione con l'introduzione di nuove tecniche analitiche volte a fornire le informazioni necessarie ad 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 non normali e porre eventualmente la diagnosi di leucemia acuta.

Questo era tutto quello che era allora necessario; non esistevano protocolli terapeutici specifici per i diversi tipi di leucemia acuta, ma solo una monochemioterapia con risultati 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 assolu-

tamente diversa tra leucemie acute di origine linfoide e quelle di origine mieloide<sup>1</sup>.

Da subito era nata l'esigenza di aumentare la capacità discriminante della morfologia, associandola a tecniche più "obbiettive" in grado di dirimere i casi dubbi. A tal fine, in un primo momento si sono introdotte tecniche di citochimica per aumentare la capacità di discriminare della morfologia anche nei casi più difficili.

Sempre 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 identificare quelli di origine B, e successivamente con l'uso di anticorpi poli e monoclonali. L'introduzione nella routine diagnostica di larghi pannelli di anticorpi e di strumenti come i citometri a flusso, in grado di valutare contemporaneamente, in un numero elevato di cellule, molti parametri per ogni singola cellula, ha aperto nuove prospettive alla definizione diagnostica della leucemie.

La successiva introduzione delle tecniche di biologia

molecolare, citogenetica e genetica molecolare hanno enormemente sviluppato la comprensione dell'eterogeneità delle cellule leucemiche e della sua importanza clinica.

La diagnosi oggi si è adeguata al nuovo concetto di qualità, 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, ed a marcatori utili per seguire i risultati della terapia attraverso lo studio di quella che oggi si definisce come malattia residua minima.

I grandi progressi terapeutici ottenuti in oncematologia pediatrica, ed in particolare nelle leucemie acute, sono principalmente dovuti alle conoscenze derivate dal laboratorio. Tali conoscenze hanno permesso un più approfondito approccio diagnostico, una classificazione del rischio basata anche su varianti 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. Tutte queste tecnologie devono essere applicate per ottenere un risultato quanto più informativo possibile per coloro che dovranno alla fine applicare i protocolli clinici di trattamento. Ogni metodologia ha sensibilità e specificità ben conosciute, ma soprattutto deve essere chiaro che il loro uso combinato contribuisce alla diagnosi finale, permette di valutare accuratamente la risposta alla terapia formulando una possibile prognosi. Le nuove tecnologie che valutano contemporaneamente l'espressione di migliaia di geni sono oggi la nuova frontiera nella diagnostica delle leucemie acute: grandi sono le aspettative su una futura applicabilità *routinaria* di queste metodologie. Anche lo studio delle proteine e dei circuiti di attivazione cellulare rappresentano un nuovo approccio per arrivare al disegno e alla produzione di farmaci intelligenti, di cui 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 in classi di rischio gioca

un ruolo fondamentale nel trattamento per selezionare una terapia che sia adeguata e che non sia ingiustificatamente troppo tossica. Sono stati identificati alcuni fattori genetici che danno una maggior resistenza alla chemioterapia rendendola meno efficace, o che danno un'abnorme tossicità. Normalmente si riconoscono 3 diverse classi di rischio nelle leucemie acute pediatriche: Standard, Intermedio e Alto.

### Fattori che predicano 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 principalmente: le caratteristiche genetiche della cellula coinvolta e la sua responsività ai regimi di chemioterapia valutabile mediante lo studio della Malattia Residua Minima (MRD).

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

### Morfologia<sup>2</sup>

L'esame morfologico è ancora un cardine fondamentale nella diagnosi di leucemia<sup>2</sup>; 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 essere in grado di 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 LMA 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<sup>3</sup>

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

Recentemente anche la *World Health Organization* (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 il bisogno 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. Tutti questi motivi hanno stimolato le applicazioni di tecniche molecolari come la *Reverse Transcription transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) per identificare gli anormali prodotti di fusione derivanti dalle più frequenti traslocazioni, e la *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH). I vantaggi sono principalmente l'identificazione rapida e veloce delle traslocazioni cercate, la possibilità di lavorare su RNA o nuclei interfasci e una facile interpretazione dei risultati. Gli svantaggi sono: l'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<sup>4</sup>

E' attualmente la metodica più accurata per identificare e numerare le cellule leucemiche<sup>5</sup>. E' una metodologia molto versatile ed è alla portata di qualsiasi laboratorio di analisi. I vantaggi più rilevanti consistono nella rapidità di analisi, con capacità di dare la risposta in tempi accettabili, senza essere troppo costosa (anche se non propriamente economica, visto il costo iniziale della 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 anche il *follow up* della malattia con lo studio della MRD. I maggiori limiti sono legati alla capacità dell'operatore, basata anche su una esperienza adeguata e ai controlli che il laboratorio è in grado di attivare.

### Gene profiling<sup>5</sup>

La nuova frontiera è basata sulla possibilità di miniaturizzare l'analisi di espressione dei geni; sulla 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, probabilmente in tempi più brevi, con classificazioni più precise, 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 assieme alla morfologia e alla citometria a flusso, tecniche che al momento non appaiono sostituibili.

### Bibliografia

1. Pui CH, Ewans W. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006; 354:166-178.
2. Bain B. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med* 2005; 353: 498-507.
3. Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP, et al. chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG8821. *Blood* 1999; 94:3707-16.
4. 2006 Bethesda international consensus conference on flow cytometry immunophenotyping of hematolymphoid neoplasia. *Clin Cytom*, in press 2007.
5. L Bullinger, P Valk. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23:6296-305.