Anno 6 - Numero 2 - 2019

Ematologia Oncologica.it

Malattia Minima Residua nelle Leucemie

Organo Ufficiale
della **Fondazione Matarelli** - Milano

Con il supporto non condizionante di

Celgene

Ematologia Oncologica.it

www.ematologiaoncologica.it

Malattia Minima Residua nelle Leucemie

Leucemia mieloide acuta

Maria Teresa Voso, Tiziana Ottone, Raffaele Palmieri, Serena Lavorgna, Adriano Venditti, Eleonora De Bellis, Luca Maurillo, Francesco Buccisano 7

Leucemia linfatica cronica

Lydia Scarfò, Silvia Heltai, Paolo Ghia 15

Leucemia linfoblastica acuta dell'età pediatrica

Giovanni Cazzaniga 29

Leucemia linfoblastica acuta dell'adulto

Irene Della Starza, Sabina Chiaretti, Robin Foà 39

Uno sguardo al futuro: la biopsia liquida

Elena Saccenti, Massimo Negrini 53

Ematologia Oncologica.it
Vol 6 - n.2 - 2019

Direttore Responsabile
Giorgio Maggiani

Direttore Scientifico
Giorgio Lambertenghi Deliliers
Fondazione Matarelli, Milano

Comitato Editoriale
Sergio Amadori
Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccadoro
Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi
Università degli Studi, Firenze

Michele Cavo
Università degli Studi, Bologna

Paolo Corradini
Università degli Studi, Milano

Antonio Cuneo
Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi
Università degli Studi, Genova

Cristina Mecucci
Università degli Studi, Perugia

Fabrizio Pane
Università degli Studi, Napoli

Francesco Passamonti
Università degli Studi, Varese

Gianni Pizzolo
Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia
Università degli Studi, Bari

Ematologia Oncologica.it
è una rivista quadrimestrale monotematica, di aggiornamento in lingua italiana, che ha essenzialmente lo scopo educativo di rendere disponibili le informazioni più aggiornate su argomenti pertinenti le malattie del sangue, in particolare quelle neoplastiche. Per raggiungere questo obiettivo la rivista desidera coinvolgere gli specialisti italiani più qualificati e informare il lettore sui più recenti progressi nel campo della ricerca di base, della clinica e della terapia.

La rivista si attiene alle raccomandazioni indicate dal World Association of Medical Editors (WAME) riguardante l'etica delle pubblicazioni in ambito sanitario.

Registrazione Tribunale di Milano
n. 348 del 19/11/2013

Progetto grafico
Dynamicom srl

Sito Internet
www.ematologiaoncologica.it

Coordinamento editoriale
Dynamicom - Milano
Tél. (+39)0289693750 - Fax (+39)02201176

Editore
Fondazione Matarelli

Periodicità
Quadrimestrale

Avvertenze ai lettori
L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni eventualmente citati negli articoli, ed invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

Norme per gli Autori
- L'accettazione dei testi inviati è comunque subordinata al parere del Comitato Editoriale che deve verificare la loro compatibilità con le norme redazionali.
- Gli Autori dei testi sono gli unici responsabili del loro contenuto, e della riproduzione delle immagini allegate.
- Il primo Autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora utilizzi figure e/o tabelle già pubblicate altrove.
- La proprietà dell'articolo, una volta pubblicato, appartiene alla Fondazione Matarelli, (Largo Crocetta, 2 - 20122 MI) che ha depositato il nome della rivista presso il Tribunale di Milano in data 19/11/2013
- Il manoscritto deve essere inviato a Dynamicom Edizioni (segreteria@ematologiaoncologica.it) che, dopo averlo controllato ed impaginato, lo invierà al Direttore Scientifico (giorgio.lambertenghi@unimi.it) per la revisione e il controllo della stesura secondo le norme redazionali. Le bozze di stampa verranno quindi rinviate all'Autore per le opportune correzioni, che dovrà provvedere entro cinque giorni lavorativi a rinviarle a: segreteria@ematologiaoncologica.it

Norme redazionali
Il contenuto dell'articolo, redatto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh, non deve superare le 30-35 cartelle dattiloscritte (2000 battute cad.) compresa la bibliografia, e corredato delle illustrazioni (tabelle, grafici, figure) nel numero che l'Autore ritiene necessario, in file ad alta risoluzione (salvate in formato pdf, jpg o eps).

Lo stile del manoscritto, le citazioni bibliografiche e il loro riferimento nel testo del manoscritto devono seguire le raccomandazioni dell'International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Per le relative informazioni, gli Autori sono pregati di consultare il sito http://www.icmje.org.

L'articolo deve essere così strutturato:
- **Titolo conciso** e pertinente con il tema della rivista;
- **Prima pagina** con nome e cognome degli Autori, istituzione di appartenenza, foto tessera a colori del primo Autore;
- **Introduzione iniziale** che esponga in maniera chiara lo scopo dell'articolo;
- **Corpo del testo** suddiviso in sottocapitoli a contenuto omogeneo;

Pagina finale:
1) nome e cognome del primo autore, con telefono, fax, e-mail al quale andrà indirizzata la corrispondenza;
2) eventuali **ringraziamenti** a persone e/o associazioni;
3) 3-5 parole chiave.

Bibliografia
Per lo stile nella stesura seguire le seguenti indicazioni o consultare il sito "lnternational Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements far Manuscripts Submitted to Biomedical Journals Sample References".
Le **voci bibliografiche** non devono superare il numero massimo di 150, numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo, citate tra parentesi con il testo in apice e con i numeri arabi, tenendo presente gli esempi sottostanti.

Articoli con 1-3 autori
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Articoli con più di 3 autori
Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

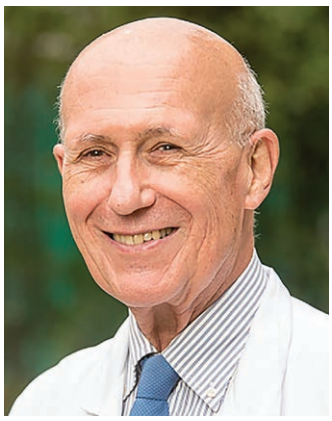
Abstract e Congressi
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts. 2000;100(10):1000.

Capitoli di libri
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. The Hemoglobin, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 1980:10-15.

Editoriale

Giorgio Lambertenghi Deliliers
Fondazione Matarelli - Milano



Ematologia Oncologica.it dedica questo numero ai recenti sviluppi tecnologici per la valutazione della malattia minima residua, cioè della quantità di cellule neoplastiche che persistono nelle fasi di remissione clinica, al di sotto del limite di rilevamento dei metodi convenzionali disponibili. Si tratta di un monitoraggio indispensabile per identificare in fase diagnostica i pazienti con diversa prognosi, indirizzare modi e tempi degli interventi pre e post-trapianto di cellule staminali, valutare più accuratamente l'efficacia di un trattamento e il rischio di recidiva, disegnare algoritmi terapeutici basati su una medicina di precisione. Le metodiche standard, come la morfologia e la citogenetica, vengono oggi affiancate da tecnologie emergenti in grado di rilevare e quantificare nelle leucemie il residuo di malattia con un alto livello di precisione e specificità, secondo criteri riproducibili e standardizzati da linee guida internazionali. La citometria a flusso multiparametrica e i vari metodi basati sull'amplificazione a catena della polimerasi permettono di identificare gli immunofenotipi associati alla leucemia e quindi differenziare il clone patologico dalle cellule midollari normali presenti nella fase di remissione completa. Un'analisi più approfondita per velocità e maggiore applicabilità viene offerta dalle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione, che consentono di monitorare contemporaneamente tutti i riarrangiamenti genici. Interessante prospettiva è la biopsia liquida, cioè l'analisi del DNA, RNA o microRNA presenti nel sangue circolante o altri fluidi biologici. La maggior parte degli studi riguarda il DNA estratto da siero o da plasma di pazienti affetti da tumori solidi, e solo recentemente si sono concentrati sulle emopatie neoplastiche. Nei linfomi non-Hodgkin l'utilizzo del DNA circolante non è sostitutivo alla biopsia tissutale, ma complementare allo studio della malattia minima residua nei pazienti senza coinvolgimento midollare o con masse cerebrali difficilmente accessibili da un punto di vista chirurgico. Altre possibili applicazioni stanno emergendo in ambito oncoematologico, in attesa di una migliore definizione degli standard metodologici e degli obiettivi clinici.

La valutazione della malattia minima residua è oggi indispensabile in tutte le neoplasie del sistema emopoietico. Nella leucemia linfatica cronica è uno strumento che non ha solo la funzione di definire la prognosi del paziente, ma l'obiettivo di decidere le modalità e la durata dei trattamenti. Da qui trial clinici che utilizzano la combinazione di nuovi farmaci, ma che prevedono di definire la profondità della risposta e nello stesso tempo ridurre il rischio di tossicità a lungo termine. Nella leucemia linfoblastica acuta dei bambini e degli adulti, la malattia minima residua è il principale fattore prognostico, utilizzato per guidare scelte terapeutiche, per identificare sottogruppi di pazienti a rischio clinico differente e per guidare lo sviluppo di nuovi farmaci. Nella leucemia mieloide acuta, la persistenza o meno di un residuo di malattia serve per definire lo stato di remissione ematologica e il rischio di recidiva. La combinazione delle nuove tecnologie molecolari consente di individuare anche le cellule staminali leucemiche in stato di quiescenza, che sfuggono alle analisi convenzionali.

In conclusione la malattia minima residua è una misura obiettiva dello stato di una neoplasia ematologica definita dal numero di cellule patologiche che rimangono dopo un determinato trattamento nel sangue periferico o nel midollo osseo. I progressi fatti in campo terapeutico, grazie all'introduzione di nuovi farmaci mirati, hanno creato l'esigenza di misurare livelli sempre più bassi di malattia, e quindi la necessità di sviluppare procedure standardizzate che consentano di confrontare i risultati dei vari trial clinici. Pertanto è opportuno che la valutazione della malattia minima residua venga di regola effettuata in Centri o Laboratori selezionati, qualificati e controllati.

Leucemia mieloide acuta



Maria Teresa Voso, Tiziana Ottone, Raffaele Palmieri, Serena Lavorgna, Adriano Venditti, Eleonora De Bellis, Luca Maurillo, Francesco Buccisano

Department of Biomedicine and Prevention, Tor Vergata University, Rome, Italy

La leucemia mieloide acuta (LMA) è una neoplasia del tessuto emopoietico eterogenea dal punto di vista genetico e biologico. In aggiunta a quanto già conosciuto del profilo genetico-molecolare, l'evoluzione degli studi di *whole genome sequencing* ha portato alla luce numerose alterazioni genetiche che definiscono in modo più dettagliato le caratteristiche biologiche e la prognosi del paziente con LMA. Tuttavia, sebbene i protocolli clinici attualmente in uso inducano la remissione completa in circa l'80% dei casi, più della metà dei pazienti ricade a causa della persistenza e dell'espansione di cloni neoplastici resistenti ai trattamenti convenzionali. Pertanto, l'analisi della malattia minima residua (MMR), cioè della quantità di cellule leucemiche che persistono nella fase di remissione completa morfologica, è indispensabile al fine di valutare in maniera più accurata l'efficacia del trattamento ed il rischio di recidiva. La citometria a flusso multiparametrica (CFM) e la PCR quantitativa (RT-qPCR) sono le due metodiche di studio che, con caratteristiche e campo di applicazione diversi, vengono maggiormente impiegate e suggerite dalle raccomandazioni degli esperti. Nuove metodiche, quali la *next-generation sequencing* (NGS) e la *droplet digital PCR* (ddPCR), sono destinate a integrare le possibilità di studio della MMR in un prossimo futuro. In questa sezione illustreremo le evidenze a supporto del ruolo della MMR come biomarcatore indicativo della qualità della risposta al trattamento e parametro prognostico, su cui disegnare programmi di trattamento post-remissionali che siano basati sul rischio individuale di recidiva.

Introduzione

Le LMA rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie ematologiche caratterizzate da un'elevata eterogeneità sul piano genetico-molecolare che determina una grande variabilità individuale nella risposta al trattamento farmacologico [1]. L'analisi genetica e molecolare consente di stratificare le LMA in sottogruppi prognostici associati a tassi di remissione completa (RC), rischio di recidiva (EFS) e sopravvivenza globale (OS) significativamente diversi tra loro, ed è diventata negli ultimi anni la premessa fondamentale per la diagnosi e l'identificazione di bersagli terapeutici [2-5]. La diagnostica moderna, che integra tecniche immunofenotipiche, citogenetiche e molecolari, può identificare pazienti ad alto rischio di recidiva, candidati al trapianto allogenico di cellule staminali (ASCT) in prima RC,[6,7] e pazienti a rischio prognostico favorevole, per i quali non vi è indicazione alla terapia intensificata precoce [4]. Sulla base di questi concetti, nel 2010 il gruppo di esperti che afferisce all'*European Leukemia Net* (ELN), ha ridefinito il sistema di stratificazione genetico-molecolare delle LMA e ne ha recentemente pubblicato una versione aggiornata, perfezionando la definizione di 3 sottogruppi prognostici (favorevole, intermedio, avverso), in luogo dei 4 precedenti [4,8].Tra i principali cambiamenti apportati vi è la quantificazione della carica allelica di FLT3-ITD che influenza significativamente il rischio di recidiva in presenza della mutazione di NPM1 [9]. Nell'immediato futuro queste raccomandazioni potranno ulteriormente cambiare a seguito dei nuovi traguardi raggiunti dalla medicina di precisione nel trattamento dei pazienti leucemici con terapie mirate [10,11].

Alla diagnosi, i recenti progressi tecnologici, come l'avvento del NGS, hanno permesso di scoprire nuove aberrazioni genetiche nella LMA con un ruolo importante nella patogenesi e prognosi della malattia. Alcune di queste rappresentano anche potenziali bersagli terapeutici. Tali alterazioni sono state pertanto incorporate nella classificazione delle leucemie da parte della Organizzazione Mondiale della Sanità, la cui versione aggiornata è stata pubblicata nel 2016 [4,12,13]. Nonostante l'analisi del profilo genetico abbia permesso di migliorare la stratificazione prognostica delle LMA, e la terapia di induzione determini la remissione morfologica completa (RCm) nell'80% dei casi, circa la metà di questi pazienti perde la risposta a causa della persistenza di cellule leucemiche resistenti alla terapia convenzionale che possono espandersi e dare origine alla recidiva [14-16]. Una valutazione più sensibile e specifica della quota di MMR è quindi molto importante nella valutazione prognostica e nel trattamento post-remissione della LMA. In questo contesto, la citometria a flusso multiparametrica (CFM) e la RT-qPCR rappresentano le tecniche più diffuse ed utilizzate per lo studio della MMR. Il vantaggio di identificare mediante saggi molecolari i livelli di MMR predittivi di recidiva clinica di malattia, è stato ampiamente dimostrato nel caso della leucemia acuta promielocitica (LAP), in cui la presenza del trascritto PML/RARA dopo

il termine della terapia di consolidamento correla con un'elevata probabilità di recidiva ematologica [17-18]. Le raccomandazioni aggiornate dal gruppo ELN hanno introdotto anche nelle LMA non-LAP il concetto di RC associata a MMR negativa (RC^{MMR-}) come nuovo obiettivo terapeutico, nei casi in cui l'aberrazione molecolare o fenotipica presente alla diagnosi non sia più rilevabile in remissione mediante tecniche di CFM o RT-qPCR. Affinché tali dati siano riproducibili in tutti i laboratori oncoematologici, il gruppo ELN ha definito un consenso sulla standardizzazione delle varie piattaforme d'analisi per la valutazione della MMR, al fine di armonizzare i risultati fra i vari laboratori [18]. Mentre per i casi di LMA caratterizzati dai trascritti di fusione PML/RARA, RUNX1-RUNX1T1 e CBFB-MYH11 o dalle mutazioni di NPM1, il gold standard per l'analisi della MMR è l'analisi quantitativa mediante RT-qPCR, l'indagine citofluorimetrica è raccomandata per tutti gli altri sottogruppi leucemici [18].

Geni di fusione e mutazioni *hot-spot* come biomarcatori

Nella diagnostica molecolare, l'introduzione della RT-qPCR ha permesso di ampliare le conoscenze sul significato clinico della MMR grazie alla possibilità di stabilire con precisione il numero di copie o la percentuale di un trascritto leucemico. Le linee guida internazionali nella LMA [18] prevedono la valutazione della cinetica di espressione di alcuni trascritti di fusione specifici, come PML/RARA [19,20], RUNX1/RUNX1T1 [21], CBFB/MYH11 [22], e delle mutazioni a carico del gene NPM1 [23,24], mediante saggi di RT-qPCR. La metodologia più ampiamente utilizzata è quella elaborata e standardizzata da un consorzio europeo di esperti nel 2003 (EAC)[25]. La LAP è un paradigma in questo settore [26,27]. In particolare, diversi lavori hanno dimostrato come la mancata negativizzazione del trascritto PML/RARA al termine della terapia di consolidamento o la sua ricomparsa nei pazienti precedentemente negativi, confermata in due consecutive determinazioni, preceda la recidiva ematologica [28-30]. Appare quindi evidente, e la LAP ne rappresenta l'esempio, come sia fondamentale individuare il *time-point* migliore in termini di predittività del rischio di recidiva affinché la valutazione della MMR sia utile ai fini prognostici e terapeutici. Nel caso di pazienti caratterizzati dalla presenza dei riarrangiamenti CBF (RUNX1/RUNX1T1 e CBFB/MYH11), diversi studi hanno dimostrato come i valori della MMR abbiano un valore prognostico significativo già dopo la terapia di induzione [2,31], tenendo tuttavia sempre presente che tali trascritti possono persistere in pazienti in RC a lungo termine [7]. Per ovviare a questa problematica si utilizza la valutazione comparativa della entità della riduzione dei trascritti dopo il trattamento. Jourdan et al. [21], hanno infatti dimostrato come la riduzione dell'espressione almeno di 3 logaritmi di RUNX1/RUNX1T1 e CBFB/MYH11 dopo la terapia di consolidamento, identifichi i pazienti a basso rischio di recidiva. In questi tipi di LMA, anche la quantizzazione assoluta del numero di copie dei geni di fusione CBF nel sangue midollare e periferico appare una variabile prognostica importante [32]. Infatti, la persistenza nel sangue midollare di più di 500 o 50 copie di RUNX1/RUNX1T1 o CBFB/MYH11, rispettivamente, e di 100 o 10 copie nel sangue periferico, rappresenta il valore soglia della MMR molecolare che correla con un rischio di recidiva pari al 100%. Questi dati evidenziano anche come il sangue periferico possa essere considerato come sorgente alternativa per gli studi di MMR.

Nel caso delle mutazioni a carico del gene NPM1 [33], che caratterizzano il 40-50% delle LMA a cariotipo normale, la presenza di una MMR positiva, determinata mediante valutazione quantitativa, rappresenta un'indicazione al trapianto di cellule staminali ematopoietiche [23,34,35]. Dopo la prima pubblicazione da parte del gruppo di Gorello et al.,[36] la cinetica di espressione dei trascritti NPM1 mutati e la relativa correlazione con la risposta alla terapia, sono state studiate e valutate in numerosi lavori [23,24]. In particolare, in un ampio studio prospettico, Ivey et al. [23] hanno osservato che la persistenza dopo il secondo ciclo di consolidamento di MMR molecolare NPM1-positiva, abbia un'importante valenza clinica [23]. La presenza di trascritti NPM1 mutati in questo specifico *time-point* correla infatti significativamente con un elevato rischio di recidiva e con una bassa sopravvivenza per i pazienti, indipendentemente dagli altri fattori prognostici.

Sulla base di tali osservazioni, il gruppo di esperti dell'ELN ha stilato le linee guida per la valutazione della MMR [18] per l'analisi della cinetica dei trascritti RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11 e PML-RARA e la mutazione di NPM1, che devono essere analizzati alla diagnosi ed almeno dopo due cicli di terapia di induzione e consolidamento, e poi ogni 3 mesi, per 24 mesi dopo la fine del trattamento. Per quanto riguarda il monitoraggio di NPM1, le linee guida ELN suggeriscono tuttora di effettuare la valutazione della MMR sia a livello del sangue periferico che sull'aspirato midollare, per confermare la predittività di recidiva del sangue periferico rispetto al sangue midollare [23].

L'analisi dei livelli di espressione del gene WT1 nel contesto del monitoraggio della MMR rimane ad oggi controversa, soprattutto per quanto riguarda l'accuratezza nel definire un valore soglia quantitativo, capace di discriminare specificatamente l'espressione di WT1 da parte delle cellule leucemiche, rispetto alla controparte normale [37]. Sebbene la valutazione della MMR per WT1 richieda validazioni aggiuntive, il gruppo di esperti del ELN suggerisce che, nel caso di pazienti leucemici privi di un marcatore molecolare o di un fenotipo specifico, possa essere importante tenere in considerazione l'andamento cinetico di questo trascritto, in accordo con le specifiche linee guida internazionali [18].

Mutazioni somatiche e *Next-Generation Sequencing*

Negli ultimi decenni, abbiamo assistito ad un notevole miglioramento della caratterizzazione molecolare della LMA, grazie all'avvento della tecnologia del NGS. Questa, a differenza del sequenziamento mediante il metodo Sanger, sequenzia in parallelo moltissimi frammenti di DNA, garantendo risultati rapidi e l'analisi di geni che presentano

mutazioni in regioni variabili. L'utilizzo del NGS ha permesso di rivelare l'alto livello di eterogeneità genetica delle LMA [38], in cui diversi cloni, caratterizzati da specifiche mutazioni, possono rispondere in maniera eterogenea alle terapie convenzionali. Questo ha anche modificato il concetto di evoluzione in selezione clonale, in quei casi in cui è possibile evidenziare alla diagnosi sub-cloni che si espanderanno alla recidiva [36,41,42]. I saggi molecolari di nuova generazione hanno anche permesso di identificare nuovi bersagli farmacologici.

Ad oggi sono disponibili tre tipi principali di NGS per il sequenziamento del DNA:

- sequenziamento dell'intero genoma (*Whole Genome Sequencing*, WGS);
- sequenziamento dell'intero esoma (*Whole Exome Sequencing*, WES);
- sequenziamenti mirati, che comprendono pannelli di geni più frequentemente mutati nelle diverse patologie, corrispondenti ad almeno 30 geni nelle neoplasie mieloidi.

Utilizzando un approccio di WES su campioni di 71 LMA, trattate con un protocollo d'induzione standard, Klco et al. [39] hanno osservato come le mutazioni riscontrate alla diagnosi della malattia possano persistere dopo il trentesimo giorno dalla terapia. Benché alcuni di questi pazienti fossero in RCm, questo studio ha dimostrato come la presenza di mutazioni correli con una ridotta OS e un aumentato rischio di recidiva. Simili osservazioni sono state riportate da Jongen-Lavrencic et al. [40], che ha segnalato la persistenza nel campione in RCm di alcune alterazioni genetiche in un ampio gruppo di pazienti comprendente 482 LMA, associato ad un alto rischio di recidiva. Tuttavia fanno eccezione le mutazioni a carico dei geni DNMT3A, TET2 e ASXL1 (DTA), associate al fenomeno dell'ematopoiesi clonale a potenziale indeterminato (CHIP) [41,42]. In questo contesto, diversi gruppi di ricerca hanno confermato come i livelli di espressione dei trascritti mutati del gene DNMT3A non abbiano alcuna correlazione con un'eventuale progressione della malattia nelle LMA e che, a differenza di quanto accade per NPM1, sono rilevabili in cellule pre-leucemiche, presenti nel sangue midollare dei pazienti in RCm (Figura 1) [43]. Risultati simili sono stati riportati dal gruppo di Debarri [44] che, mediante la valutazione della MMR in NGS, ha dimostrato come le mutazioni di DNMT3A non abbiano alcuna correlazione con il rischio di recidiva. Tutte queste osservazioni hanno confermato l'ipotesi che le mutazioni a carico di alcuni geni non siano sufficienti ad indurre un fenotipo leucemico, ma possano costituire il background genetico per lo sviluppo di disordini mieloidi, soprattutto nei pazienti anziani [45]. L'importanza che l'analisi genomica in NGS riveste nella valutazione della MMR, trova il massimo dell'espressione nel contesto dell'evoluzione clonale delle LMA. È ad oggi ben stabilito come FLT3-ITD non rappresenti un marcatore stabile di malattia poiché circa il 25% dei pazienti positivi alla diagnosi può recidivare con una malattia FLT3 non mu-

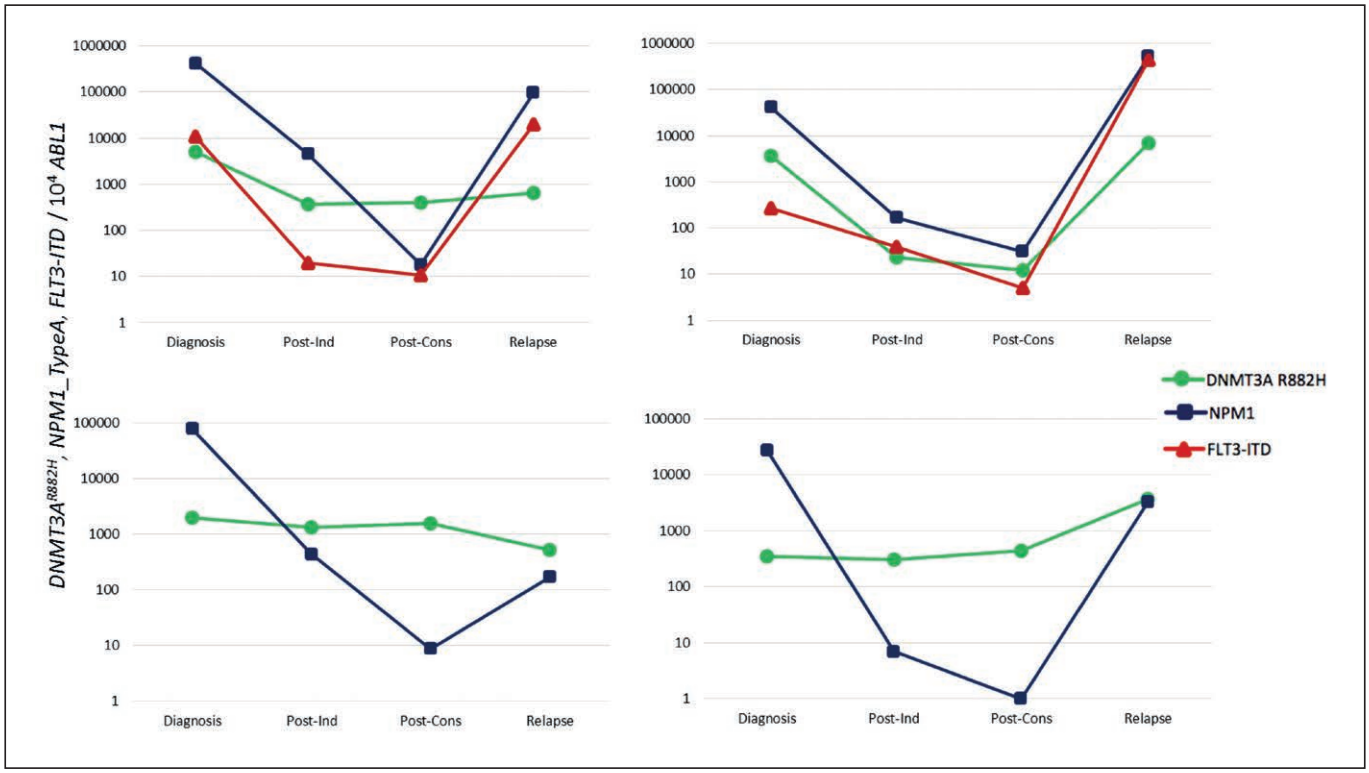


***Figura 1** - Espressione di DNMT3A^{R882H}, NPM1 e FLT3-ITD in 4 pazienti con LAM. I grafici mostrano la cinetica dei trascritti di NPM1 e FLT3-ITD, che segue il decorso della malattia. I livelli di DNMT3A^{R882H} rimangono invece sostanzialmente stabili al momento della remissione e della recidiva in 3 dei 4 pazienti. Come noto, DNMT3A è uno dei geni più frequentemente mutati nell'ematopoiesi clonale, ed è un marcatore indipendente dal clone leucemico.*
La quantizzazione di FLT3-ITD è stata eseguita mediante una metodica paziente-specifica. Ad oggi, FLT3-ITD non rappresenta comunque un buon marcatore di malattia perché può essere acquisito o perso alla recidiva, rispettivamente nel 10% e 25% dei casi circa.

tata [46-48]. Al contrario, sub-cloni FLT3-ITD positivi, non identificabili alla diagnosi con metodiche convenzionali, ma resistenti alle terapie standard, possono progredire molto velocemente e portare alla recidiva della malattia soprattutto nei pazienti non sottoposti ad ASCT [18,23,34]. Questo rende le mutazioni di FLT3-ITD un marcatore inaffidabile di MMR, anche in ragione del fatto che non è disponibile un approccio sensibile e specifico che permetta di determinare i livelli di FLT3-ITD durante il follow up, a causa della diversa sequenza nucleotidica che tale alterazione assume in ciascun paziente. Molto recentemente, è stato proposto [49] un approccio in NGS molto sensibile e affidabile per l'analisi molecolare di FLT3-ITD. Sebbene questi primi dati debbano essere validati e rianalizzati nel contesto controllato dei trial clinici, la piattaforma sviluppata e descritta in questo lavoro potrà essere utilizzata per confermare il ruolo dello studio in NGS della MMR per FLT3-ITD. Inoltre, alla luce dell'elevata sensibilità, questa metodica consentirà di identificare precocemente la comparsa di subcloni FLT3-ITD mutati, spesso non identificabili in tempo reale perché associati ad uno *shift* immunofenotipico durante la progressione della malattia [47].

Se le tecnologie di NGS sono utili per l'analisi della MMR potenzialmente di ogni paziente, va ricordato che ad oggi il tasso di errore e la sensibilità delle varie metodiche rimangono ancora superiori all'1% [50] e bisogna tenere conto di questo limite nella valutazione della metodica più idonea nel singolo paziente.

Digital droplet PCR

Nel contesto delle nuove tecnologie molecolari, l'applicazione della ddPCR per la valutazione della MMR sta cambiando la stratificazione prognostica e quindi il trattamento del paziente leucemico. La ddPCR rappresenta un saggio molecolare estremamente sensibile e specifico che permette di effettuare una quantificazione assoluta degli acidi nucleici. Ogni campione analizzato viene infatti diluito e suddiviso in centinaia di *droplets* contenenti una sola copia della sequenza di DNA di interesse [51,52]. Sebbene le applicazioni della ddPCR nel contesto della MMR necessitino di un processo di standardizzazione, tale tecnologia viene ad oggi proposta per la valutazione ad esempio della cinetica di espressione di NPM1. Come noto, le mutazioni di NPM1 sono variabili, e benché le alterazioni più frequenti siano tre, tale diversità genetica non permette di valutare la MMR in tutti i pazienti NPM1-mutati.

Nella pratica diagnostico/clinica suggerita dalle linee guida del ELN, i pazienti NPM1-mutati che possono essere monitorizzati con un saggio di RT-qPCR standardizzato sono quelli caratterizzati dalle mutazioni di tipo A, B e D [36], per le quali esistono in commercio dei saggi che si avvalgono di curve standard mutazione-specifiche. Per la quantificazione assoluta del trascritto, la ddPCR non necessita di curve plasmidiche mutazione-specifiche, e nel caso di NPM1 ha mostrato un'elevata concordanza con i valori ottenuti mediante RT-qPCR [53].

Il valore di alcune mutazioni si impone maggiormente quando sono disponibili farmaci mirati. Per le mutazioni di IDH2, che si verificano a livello dei residui R140 e R172, è disponibile l'enasidenib, un un farmaco somministrato per via orale, che inibisce l'attività della proteina mutata. Anche in questo caso, è stato recentemente dimostrato il valore della MMR, in quanto la scomparsa del clone IDH2-mutato, dimostrata mediante una metodica di ddPCR, risultava associata all'ottenimento della RC [55]. In particolare, la remissione molecolare, definita dalla riduzione della VAF di IDH2-mut al di sotto dei limiti della metodica (0,02- 0,04%) confermata in più di un'analisi, risultava significativamente associata al miglioramento ematologico. Un ulteriore esempio è rappresentato dalla LAP, in cui l'analisi mediante ddPCR ha permesso di identificare i pazienti ad alto rischio di recidiva, pur rimanendo ad oggi la RT-qPCR il saggio standardizzato per l'analisi della cinetica di PML/RARA [54]. In questa patologia, il nostro gruppo ha recentemente pubblicato un test in ddPCR per identificare e quantizzare la mutazione A216V del gene PML, nota per essere alla base della resistenza farmacologica al triossido di arsenico (ATO) [55]. Questa metodica ha permesso di individuare la mutazione A216V nei casi in cui il sequenziamento Sanger aveva prodotto risultati negativi, ed in pazienti caratterizzati da una quota del trascritto PML/RARA molto bassa. La precoce individuazione della mutazione A216V mediante ddPCR permette di identificare i pazienti resistenti all'ATO, indirizzandoli verso trattamenti alternativi, prima della comparsa di una recidiva franca.

Citometria a flusso multiparametrica

La citometria a flusso multiparametrica (CFM), con un'applicabilità nel 90% dei casi, rappresenta una metodica largamente utilizzata nella LMA. Alla sensibilità, che con i moderni strumenti può essere stimata tra 10^{-3} e 10^{-5}, si associa una maggiore rapidità dell'analisi rispetto alle tecniche precedentemente descritte [58]. Il principio di base della CFM consiste nell'identificazione di alterazioni dei parametri fisici e di espressione antigenica a carico delle cellule leucemiche che vengono definiti immunofenotipi leucemia-associati (*Leukemia Associated Immunophenotypes*, LAIPs). Tali alterazioni (infedeltà di linea, asincronismo maturativo, mancanza di espressione o sovra-espressione di antigeni) permettono di differenziare il clone leucemico dalle cellule midollari normali presenti nella fase di remissione completa. Una tecnica di analisi complementare, definita diverso dal normale (*Different from Normal*, DfN), si basa invece sull'identificazione di elementi cellulari con caratteristiche fenotipiche al di fuori del normale modello di maturazione midollare. L'integrazione dei due approcci, recentemente raccomandata dal consenso dell'*European Leukemia Net* (ELN), offre la possibilità di una valutazione accurata della MMR [18].

L'affidabilità dello studio citofluorimetrico si basa sull'utilizzo di pannelli che comprendano almeno 8 fluorocromi e sull'analisi di un numero rilevante di eventi (almeno 500.000-1.000.000 cellule), escludendo dall'analisi i detriti cellulari e le cellule CD45-negative [18]. L'utilizzo di pannelli policromatici e l'ausilio di funzioni avanzate di analisi come l'*Automated Population Separator* (APS) consente di monitorare in maniera efficace anche popolazioni blastiche eterogenee (Figura 2). La soglia identificata come significativa

e correlata con una significativa riduzione del rischio di recidiva di malattia è stata stabilita come inferiore allo 0,1% del campione analizzato [18]. In centri con particolare esperienza possono essere applicate soglie di riferimento inferiori (es. 0,035%) che, validate nell'ambito di specifici protocolli di trattamento, possono risultare anche maggiormente predittive [59-61]. Inoltre, nonostante i sostanziali progressi nell'armonizzazione della MMR mediante CFM, se ne sconsiglia la determinazione ad uso clinico in centri che analizzano casi sporadici [18].

Sul piano clinico, l'utilizzo come marcatore prognostico della CFM è stato validato in numerosi studi clinici retrospettivi e, in tempi più recenti, prospettici [59-63]. Nel protocollo pediatrico AML02, la misurazione della malattia residua dopo la terapia di induzione consentiva di intensificare il trattamento con l'aggiunta di gemtuzumab ozogamicin nei pazienti con elevati livelli di CFM-MMR, personalizzando così la terapia sulla base di una valutazione dinamica del rischio di malattia ed ottenendo un sostanziale miglioramento dell'outcome clinico. La MMR-CFM veniva inoltre utilizzata come fattore di rischio per avviare i pazienti a trapianto allogenico [64]. Nello studio GIMEMA AML1310 pazienti adulti con AML di nuova diagnosi a rischio intermedio [8] venivano sottoposti a trapianto autologo o allogenico di cellule staminali ematopoietiche,

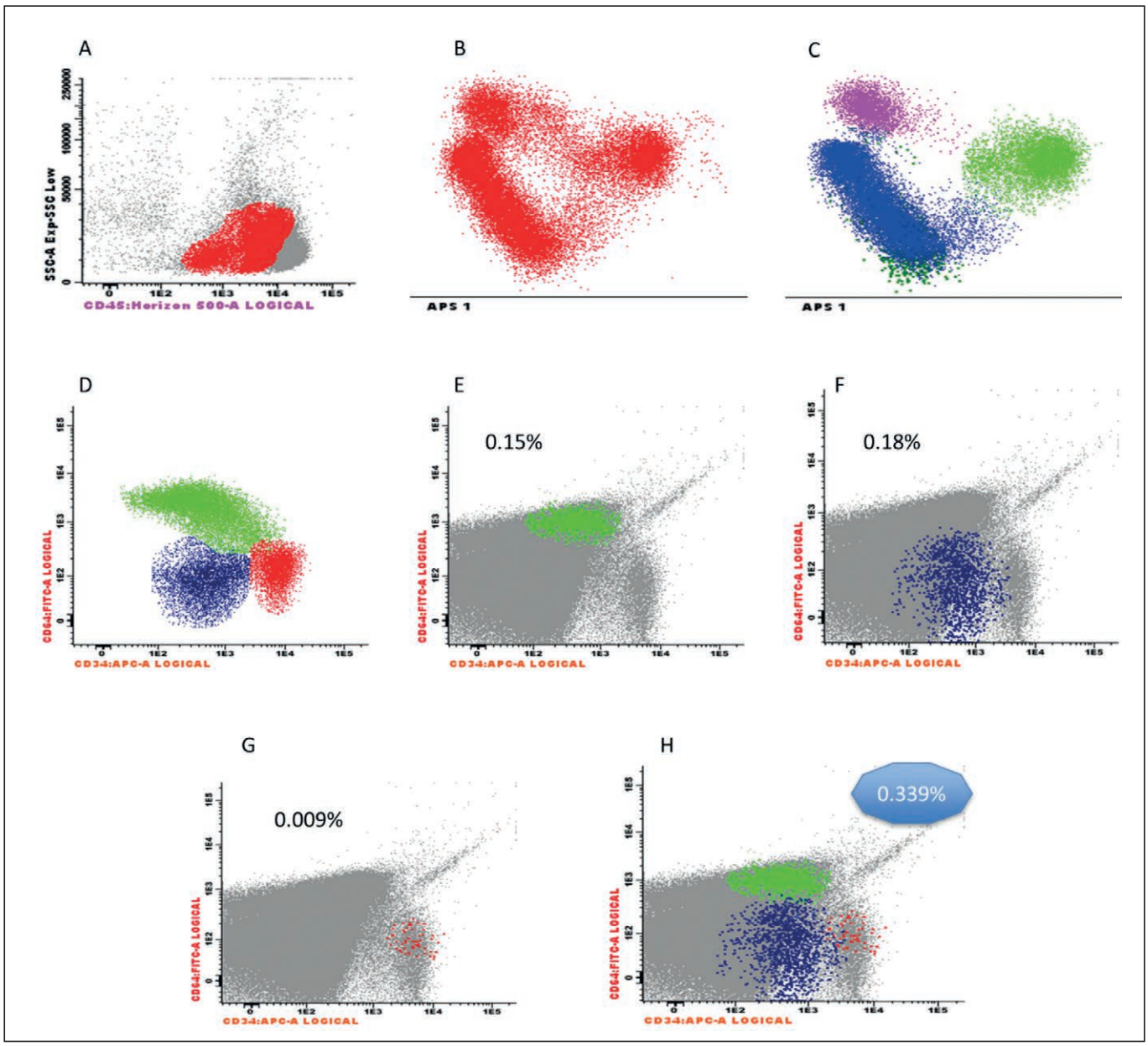


Figura 2 - Analisi di una popolazione blastica eterogenea mediante l'Automated Population Separator (APS): Partendo da una popolazione blastica (in rosso) apparentemente omogenea (A), la funzione APS consente di rivelare l'eterogeneità all'interno della popolazione identificando almeno 4 sottopopolazioni distinte (B) in base ai parametri fisici ed immunofenotipici che possono essere colorate differentemente (C). Scelte le popolazioni di riferimento (rossa-blu-verde) alla diagnosi (D), esse possono essere monitorizzate singolarmente nel follow up (E-F-G). La somma delle popolazioni residue ad un determinato timepoint dà il valore finale di MMR (H).

rispettivamente, a seconda dello stato di negatività o positività della MMR-CFM (con una soglia impostata allo 0,035%), misurato mediante CFM dopo il secondo ciclo di chemioterapia. L'analisi dei risultati ha mostrato una OS e una sopravvivenza libera da malattia (DFS) a 24 mesi rispettivamente di 78,6% e 61,4% nei pazienti MMR-positivi e di 69,8% e 66,6% nei pazienti MMR-negativi [65]. Questi risultati suggeriscono che l'intensificazione del trattamento, mediante il ricorso ad ASCT nella categoria degli MMR-CFM positivi, fornisce risultati di OS e DFS simili a quelli dei pazienti MMR negativi non sottoposti alla medesima procedura, suggerendo che l'intensificazione del trattamento può compensare il peso prognostico sfavorevole determinato dallo stato di MMR-positività. Quindi, nonostante la presenza di MMR prima del trapianto si associ a un rischio significativamente più elevato di recidiva di malattia [66,67], tale condizione non controindica la procedura trapiantologica [68,69].

Come nel caso di altre metodiche, anche tra i pazienti CFM-MMR negativi è presente un non trascurabile tasso di recidiva (20-25%) [70]. Questa mancanza di predittività può basarsi su presupposti sia tecnici che biologici: un campione di scarsa qualità (e.g. ipocellulare, diluito da sangue periferico) o la presenza di un LAIP poco specifico (e.g. fenotipo immaturo o monocitario maturo) possono diminuire sensibilmente la specificità e la sensibilità della metodica [71]. Inoltre, sul piano biologico la persistenza in stato di quiescenza di cellule staminali leucemiche (LSC) dopo trattamento, che sfuggono all'esame citometrico convenzionale, rappresenta un residuo occulto di malattia che può generare la recidiva [72] La CFM consente di distinguere le cellule staminali sane dalle LSC (entrambe CD34+/CD38-) mediante l'utilizzo di pannelli specifici [73]. In studi retrospettivi e prospettici la persistenza di LSC è stata associata a prognosi sfavorevole anche nel gruppo di pazienti che risultano negativi per la determinazione della MMR convenzionale [74]. Sulla base di queste premesse il gruppo di esperti ELN ha definito la necessità di una valutazione della presenza delle LSC mediante l'applicazione di combinazioni fenotipiche dedicate [18].

Possibili sviluppi futuri nel monitoraggio della MMR, in grado di superare i limiti di sensibilità e specificità delle tecniche attualmente disponibili, sono rappresentati dalla messa a punto di metodiche *high-throughput* (*next-generation flow cytometry*, NGF) in grado di analizzare contemporaneamente volumi maggiori di cellule ($>10^7$) [75,76]. L'utilizzo di queste nuove tecniche potrebbe rappresentare in futuro uno strumento affidabile nel monitoraggio della MMR nelle LMA, consentendo valutazioni dinamiche accurate, in grado di adattarsi all'evoluzione intra-clonale che contraddistingue queste patologie.

Conclusioni

L'introduzione di metodologie innovative caratterizzate da elevata sensibilità e specificità ha migliorato profondamente la valutazione della risposta alla terapia nella LMA e ha definito più rigorosamente lo stato di remissione ematologica, basato oggi sulla persistenza o meno della MMR. L'identificazione dei pazienti ad alto rischio di recidiva per la persistenza della MMR consentirà di migliorare sensibilmente la stratificazione prognostica e l'outcome clinico dei pazienti affetti da LMA. In particolare, la combinazione delle nuove tecnologie molecolari, come l'NGS e ddPCR, con le metodiche avanzate di CFM (NGF) consentiranno ai clinici di disegnare per ogni gruppo di pazienti un percorso terapeutico proporzionato all'aggressività biologica della malattia, nell'ottica di un processo decisionale moderno basato sulla medicina di precisione.

Bibliografia

1. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2016;374(23):2209-2221.
2. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, et al. Acute myeloid leukemia, version 2.2013. J Natl Compr Canc Netw. 2013;11(9):1047-1055.
3. Grimwade D, Hills RK, Moorman A V, et al. Acute myeloid leukemia, version 2.2013. J Natl Compr Canc Netw. 2010;11(3):354-365.
4. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424-447.
5. Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. Hematol. Am Soc Hematol Educ Progr. 2009;385-395.
6. Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. Nat Rev Clin Oncol. 2012;9(10):579-590.
7. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. JAMA. 2009;301(22):2349-2361.
8. Döhner H, Estey EHE, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net Blood. 2010;115(3):453-474.
9. Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2008;111(5):2776-2784.
10. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. N Engl J Med. 2017;377(5):454-464.
11. Altman JK, Foran JM, Pratz KW, et al. Phase 1 study of quizartinib in combination with induction and consolidation chemotherapy in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. Am J Hematol. 2018;93(2):213-221.
12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-2406.
13. Hussaini MO, Mirza A-S, Komrokji R, et al. Genetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia Interrogated by Next-generation Sequencing: A Large Cancer Center Experience. Cancer Genomics Proteomics. 2018;15(2):121-126.

14. Burnett AK, Goldstone A, Hills RK, et al. Curability of patients with acute myeloid leukemia who did not undergo transplantation in first remission. J Clin Oncol. 2013;31(10):1293-1301.
15. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2015;373(12):1136-1152.
16. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, et al. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. Leukemia. 2017;31(7):1482-1490.
17. Grimwade D, Jovanovic J V., Hills RK, et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. J Clin Oncol. 2009;27(22):3650-3658.
18. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: consensus document from ELN MRD Working Party. Blood. 2018;131(12):1275-1291.
19. Cicconi L, Lo-Coco F. Current management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2016;27(8):1474-1481.
20. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2009;113(9):1875-1891.
21. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. Blood. 2013;121(12):2213-2223.
22. Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, et al. Prognostic impact of minimal residual disease in CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2010;28(23):3724-3729.
23. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. N Engl J Med. 2016;374(5):422-433.
24. Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. Blood. 2005;106(12):3733-3739.
25. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, et al. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003;17(12):2318-2357.
26. Cazzaniga G, Gaipa G, Rossi V, et al. Monitoring of minimal residual disease in leukemia, advantages and pitfalls. Ann Med. 2006;38(7):512-521.
27. Freeman SD, Jovanovic J V, Grimwade D. Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. Semin Oncol. 2008;35(4):388-400.
28. Grimwade D, Mistry AR, Solomon E, et al. Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for differentiation therapy. Cancer Treat Res. 2010;145:219-235.
29. Mi J-Q, Li J-M, Shen Z-X, et al. How to manage acute promyelocytic leukemia. Leukemia. 2012;26(8):1743-1751.
30. Lo-Coco F, Ammatuna E. Front line clinical trials and minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia. Curr Top Microbiol Immunol. 2007;313:145-156.
31. Grimwade D, Hills RK, Moorman A V, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. Blood. 2010;116(3):354-365.
32. Yin JAL, O'Brien MA, Hills RK, et al. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. Blood. 2012;120(14):2826-2835.
33. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. N Engl J Med. 2005;352(3):254-266.
34. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. Blood. 2013;122(1):100-108.
35. Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? Hematol Am Soc Hematol Educ.Progr. 2016;2016(1):356-365.
36. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund. 2006;20(6):1103-1108.
37. Hokland P, Ommen HB. Towards individualized follow-up in adult acute myeloid leukemia in remission. Blood. 2011;117(9):2577-2584.
38. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. Nature. 2008;456(7218):66-72.
39. Klco JM, Miller CA, Griffith M, et al. Association Between Mutation Clearance After Induction Therapy and Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. JAMA. 2015;314(8):811-822.
40. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2018;378(13):1189-1199.
41. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. N Engl J Med. 2014;371(26):2477-2487.
42. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. Blood. 2017;130(6):742-752.
43. Ottone T, Alfonso V, Iaccarino L, et al. Longitudinal detection of DNMT3AR882H transcripts in patients with acute myeloid leukemia. Am J Hematol. 2018;93(5):E120-E123.
44. Debarri H, Lebon D, Roumier C, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the acute leukemia french association. Oncotarget. 2015;6(39):42345-42353.
45. McKerrell T, Park N, Moreno T, et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. Cell Rep. 2015;10(8):1239-1245.
46. Ottone T, Zaza S, Divona M, et al. Identification of emerging FLT3 ITD-positive clones during clinical remission and kinetics of disease relapse in acute myeloid leukaemia with mutated nucleophosmin. Br. J. Haematol. 2013;161(4): 533-40.
47. Angelini DF, Ottone T, Guerrera G, et al. A leukemia-associated CD34/CD123/CD25/CD99+ immunophenotype identifies FLT3-mutated clones in acute myeloid Leukemia. Clin Cancer Res. 2015;21(17):3977-85.
48. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma. 2003;44(6):905-913.
49. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. Blood. 2018;131(12):1275-1291.
50. Levis MJ, Perl AE, Altman JK, et al. A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with FLT3-ITD mutations. Blood Adv. 2018;2(8):825-831.
51. Kohlmann A, Grossmann V, Nadarajah N, et al. Next-generation sequencing - feasibility and practicality in haematology. Br J Haematol. 2013;160(6):736-753.
52. Ravandi F, Walter RB, Freeman SD. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. Blood Adv. 2018;2(11):1356-1366.
53. Coltoff A, Houldsworth J, Keyzner A, et al. Role of minimal residual disease in the management of acute myeloid leukemia - a case-based discussion. Ann Hematol. 2018;97(7):1155-1167.
54. Mencia-Trinchant N, Hu Y, Alas MA, et al. Minimal Residual Disease Monitoring of Acute Myeloid Leukemia by Massively Multiplex Digital PCR in Patients with NPM1 Mutations. J Mol Diagn. 2017;19(4):537-548.

55. Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. Blood. 2019;133(7):676-687.

56. Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, et al. Droplet Digital PCR Is a Reliable Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukemia. J Mol Diagn. 2017;19(3):437-444.

57. Alfonso V, Iaccarino L, Ottone T, et al. Early and sensitive detection of PML-A216V mutation by droplet digital PCR in ATO-resistant acute promyelocytic leukemia. Leukemia. 2019;33(6):1527-1530.

58. Ilaria M, Principe D, Buccisano F, et al. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia of Adults: Determination, Prognostic Impact and Clinical Applications. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2016;8:1-13.

59. Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. Leukemia. 2006;20(10):1783-1789.

60. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. Survival. 2010;116(13):2295-2303.

61. Maurillo L, Buccisano F, Del Principe MI, et al. Toward optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2008;26(30):4944-4951.

62. Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, et al. High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leu-kemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A Study. J Clin Oncol. 2013;31(31):3889-3897.

63. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2013;31(32):4123-4131.

64. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. Lancet Oncol. 2010;11(6):543-552.

65. Venditti A, Piciocchi A, Candoni A, et al. MRD-directed therapy for young adults with newly diagnosed acute myeloid leukemia: results of the AML1310 trial of the GIMEMA group. 22Th EHA Congr. 2017;S111.

66. Araki D, Wood BL, Othus M, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia: Time to move toward a minimal residual disease-based definition of complete remission? J Clin Oncol. 2016;34(4):329-336.

67. Walter RB, Buckley SA, Pagel JM, et al. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission. Blood. 2013;122(10):1813-1821.

68. Wayne AS, Radich JP. Pretransplant MRD: The light is yellow, not red. Blood. 2012;120(2):244-246.

69. Leung W, Pui C-H, Coustan-Smith E, et al. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. Blood. 2012;120(2):468-472.

70. Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. Blood. 2012;19(2):332-41.

71. Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor heterogeneity makes AML a "moving target" for detection of residual disease. Cytom Part B - Clin Cytom. 2014;86(1):3-14.

72. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, et al. Leukemic stem cell frequency: A strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. PLoS One. 2014;9(9):e107587.

73. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJM, et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2016;30(2):439-446.

74. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, et al. CD34+CD38– leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2019;33(5):1102-1112.

75. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2017;129(3):347-357.

76. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. Leukemia. 2017;31(10):2094-2103.

Questo lavoro è dedicato alla memoria del Professor Francesco Lo-Coco, nostro caro mentore e amico.

Parole Chiave

Malattia minima residua, RT-qPCR, NGS, ddPCR,
citometria a flusso multiparametrica, leucemia mieloide acuta

Indirizzi per la corrispondenza

Maria Teresa Voso
Department of Biomedicine and Prevention
Tor Vergata University, Viale Oxford, 81
00133 Roma (Italia)
Tel: 39-0620903210; E-mail: voso@med.uniroma2.it

Leucemia linfatica cronica



Lydia Scarfò, Silvia Heltai, Paolo Ghia

Divisione di Oncologia Sperimentale, Università Vita-Salute e IRCCS Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 58, 20132 Milano, Italia

Introduzione

La valutazione della malattia minima residua (MMR) nella leucemia linfatica cronica (LLC) è una storia di successo della ricerca scientifica degli ultimi anni e lo specchio degli enormi progressi compiuti da un lato in campo terapeutico nell'individuare trattamenti in grado di ottenerla e dall'altro in campo tecnologico nell'applicare tecniche all'avanguardia per rilevarla.

Mentre per altre patologie oncoematologiche (*in primis* la leucemia mieloide cronica e la leucemia linfoblastica acuta) l'utilizzo della MMR non solo in ambito di ricerca ma anche nella pratica clinica quotidiana è consolidato da diversi anni, la storia della MMR nella LLC è ancora giovane. Dalle prime pubblicazioni [1,2] che proponevano una valutazione della malattia residua (all'epoca non proprio minima) con metodica citofluorimetrica a 2-3 colori, il concetto di MMR, la sua applicabilità e le modalità per rilevarla sono andate incontro a profondi cambiamenti.

La MMR è una misura sensibile del carico di malattia residuo dopo la terapia ed in quanto tale è un indicatore della profondità di risposta al trattamento. Ad oggi le linee guida internazionali (IwCLL) [3,4] ed europee (EMA) [5], definiscono la MMR sulla base del numero di cellule leucemiche residue rilevabili in un campione di sangue periferico (PB) e/o midollo osseo (BM) rispetto al totale dei globuli bianchi. Se la quota residua è <1 cellula con caratteristiche della LLC tra 10.000 globuli bianchi (10^{-4} o 0,01%) la MMR viene definita come negativa o, più correttamente, come non rilevabile, definizione quest'ultima che tiene in considerazione il fatto che qualsiasi test utilizzato per determinarla è caratterizzato da una soglia di rilevabilità [4].

Uno dei motivi del diffuso interesse per la MMR nella LLC negli ultimi anni è legato alla decisione dell'Agenzia del Farmaco Europea (EMA) che dal luglio 2016, dopo una consultazione pubblica con gli esperti del settore, ha impresso una svolta storica, includendo la valutazione della MMR come endpoint intermedio di studi clinici di fase 3 per l'approvazione di nuovi farmaci [5]. La non rilevabilità della malattia minima residua (*undetectable* MMR, uMMR) al termine della terapia ha infatti dimostrato di predire in maniera affidabile la sopravvivenza libera da progressione (*progression-free survival*, PFS) e globale (*overall survival*, OS) [6, 7]. Il miglioramento della durata e della qualità delle risposte nei pazienti con LLC ha infatti una ricaduta non trascurabile nell'ambito della ricerca clinica: poiché infatti con i nuovi farmaci e con le nuove combinazioni è atteso che la PFS mediana si estenda al di là dei 5 anni, si allunga sempre di più anche il follow up necessario per identificare un potenziale beneficio nei pazienti trattati con terapie sperimentali. Questo prolungamento dell'osservazione, di per sé desiderabile, ha almeno due conseguenze deleterie:

- alla conclusione dello studio il trattamento sperimentale risulta essere stato confrontato con una terapia datata, con le relative limitazioni da applicare per interpretare i dati nello scenario nel frattempo divenuto attuale;
- comporta un potenziale ritardo nell'accesso a nuovi trattamenti eventualmente più efficaci e meglio tollerati da parte dei pazienti.

La possibilità di misurare la MMR ed abbreviare il follow up necessario per una valutazione preliminare dell'efficacia del trattamento rappresenta quindi un valido mezzo per sanare questi conflitti. Da qui alcune domande chiave la cui risposta è oggetto di questo articolo di revisione:

- Come possiamo valutare in maniera affidabile e riproducibile la MMR?
- Quali sono i risultati degli studi che supportano il suo utilizzo nella LLC?
- Quali le evidenze per la sua applicazione nei pazienti trattati con i nuovi farmaci recentemente approvati?
- Ed infine: qual è il futuro della MMR?

Valutazione della MMR

Come già evidenziato, la MMR è una misura obiettiva dello stato di malattia definita dal numero di cellule leucemiche che rimangono dopo il trattamento nel sangue periferico o nel midollo osseo. I sostanziali miglioramenti nella risposta al trattamento in seguito all'adozione di nuovi approcci terapeutici hanno creato l'esigenza di misurare livelli sempre più bassi di MMR, con la necessità di sviluppare e convalidare una procedura standardizzata per il suo rilevamento che consenta di confrontare i risultati sia tra studi clinici diversi sia tra diversi tipi di trattamento. In accordo con le attuali

definizioni internazionali la uMMR equivale a un rilevamento quantitativo di meno di 1 cellula LLC in 10.000 leucociti (MMR $<10^{-4}$ o MMR<0,01% ovvero MMR4). Lo stato di MMR deve essere misurato con un metodo standardizzato con un limite inferiore quantitativo di almeno $<10^{-4}$ seguendo linee guida che definiscono specificità, sensibilità e riproducibilità. Se fino alla soglia di 10^{-4} il livello di MMR ha un impatto sulla sopravvivenza con significativi miglioramenti in PFS e OS per logaritmo di riduzione nel carico tumorale, al momento non sono disponibili dati prospettici a supporto del fatto che un'ulteriore riduzione del livello di MMR al di sotto della soglia 10^{-4} possa fornire un ulteriore beneficio clinico.
I metodi analitici in grado di valutare lo stato della MMR alla soglia richiesta sono la citometria a flusso multiparametrica (CFM) [8-10], la PCR quantitativa in tempo reale (*Real-time Quantitative* PCR, RQ-PCR) [11, 12] e, più recentemente, il sequenziamento *High-Throughput* (*High Throughput Sequencing*, HTS) [10]. Non esiste una raccomandazione specifica sul metodo da utilizzare in quanto sia la citofluorimetria sia le tecniche di biologia molecolare sono considerate adeguate (Tabella 1), anche se tra queste, grazie anche ad un sforzo condiviso di validazione ed armonizzazione condotto nell'ambito dello *European Research Initiative on CLL* (ERIC), la metodica citofluorimetrica è senz'altro quella più diffusamente applicata, annoverando tra i suoi indiscutibili vantaggi la rapidità di esecuzione, la recente standardizzazione e la possibilità di essere applicata universalmente in tutti i pazienti [6]. Indipendentemente dalla metodica utilizzata, per garantire l'affidabilità del test è raccomandabile valutare la MMR adottando le norme di buona pratica di laboratorio (*Good Laboratory Practice*, GLP) oppure operando con un sistema di gestione della qualità equivalente in cui il metodo analitico dovrebbe essere validato adeguatamente. Tutti i laboratori che partecipano ad una sperimentazione clinica dovrebbero essere sottoposti a confronti inter-laboratorio al fine di normalizzare i risultati e renderli quindi paragonabili tra laboratori diversi e tra sperimentazioni cliniche diverse; se questo non fosse possibile è da valutare la necessità di centralizzare le analisi in un unico laboratorio.

	Citofluorimetria multiparametrica ≥6 colori	**Biologia molecolare**	
		RQ-PCR	**HTS**
Marcatori utilizzati	CD5, CD19, CD20, CD43, CD79b, CD81 (ERIC Core Panel)	IGH	IGH
Numero di cellule necessario per il test	Almeno 3 x10^6 cellule nel campione per acquisire almeno 2 x 10^6 di eventi o almeno 500.000 leucociti	Almeno 1 x 10^6 cellule (500 ng di DNA in triplicato)	Almeno 2 x 10^6 cellule (14 µg di DNA)
Necessità di un campione pre-trattamento	Preferibile	Necessario	Necessario
Risultato quantitativo	Sì, viene riportata la percentuale di cellule LLC/leucociti	No, il numero di copie IGH specifico per il paziente viene calibrato su una curva standard	No, il numero di copie IGH specifico per il paziente viene calibrato su una sequenza IGH di riferimento
Test paziente-specifico	No	Sì, richiede la definizione e la validazione di primer specifici del paziente	No, ma bisogna stabilire per ogni paziente il LOQ
Intervallo massimo consentito tra prelievo ed analisi	48 ore, l'analisi si effettua sul campione fresco	48 ore per l'estrazione del DNA. Il DNA estratto si può conservare per un tempo indefinito prima dell'analisi	
Disponibilità di linee guida per armonizzare il test	Sì (ERIC)	Sì	In corso (*EuroClonality Consortium, EuroMRD*, ERIC)
Correlazione con la PFS e la OS	Sì	Sì	In fase di valutazione
Verifica della qualità del campione	No. La tipologia del test consente anche l'identificazione dei vari elementi cellulari	Sì. È necessario valutare la qualità del campione e identificare gli elementi ematopoietici tramite analisi morfologica o citometrica	
LOD: Limite inferiore di rilevamento (sensibilità)	Riportato 0,001% (10^{-5})	Confermato 0,001% (10^{-5})	Riportato 0,0001% (10^{-6})
LOQ: Limite inferiore di quantificazione	Riportato 0,001% (10^{-5})	Confermato 0,01% (10^{-4})	Riportato 0,0001% (10^{-6})

***Tabella 1** - Confronto tra le tecniche di analisi dell'MMR.*

Citometria a flusso multiparametrica

Poiché le cellule LLC mostrano un fenotipo caratteristico e unico, è possibile rilevare anche un numero molto esiguo di cellule leucemiche utilizzando la CFM raggiungendo così il livello di sensibilità richiesto di 10^{-4}. L'analisi MMR si basa sul fenotipo specifico della malattia ed è stata ampiamente validata nella LLC. In questo senso, il protocollo di citometria a flusso multicolore sviluppato dall'ERIC in collaborazione con centri statunitensi e australiani è diventato uno dei test standard riconosciuti anche dalle agenzie regolatorie [8-10]. Il test prevede la marcatura delle cellule con un pannello principale (*core panel*) di sei anticorpi monoclonali: CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b e CD81 che è sufficiente per raggiungere la soglia di 0,01% (10^{-4}) ed è attuabile nella maggior parte dei laboratori [10]. Altri marcatori possono essere eventualmente implementati nel pannello principale previa verifica che questa aggiunta non comprometta la separazione delle cellule LLC dalle normali cellule B. Sarebbe preferibile poter valutare un campione prima del trattamento (basale) o perlomeno un campione con malattia rilevabile, per verificare che questo pannello di anticorpi sia sufficiente, ovvero che più del 95% delle cellule LLC possa essere separato dalle cellule B normali mediante due o più marker del pannello principale (Figura 1). Le cellule neoplastiche nella LLC hanno un'espressione di CD19 simile a quella delle normali cellule B mature, ma si differenziano da queste per la presenza del CD5 e del CD43 e dall'espressione più debole di CD20, CD79b e CD81. Nell'analisi, inizialmente, viene identificata la frazione di cellule B in base all'espressione di CD19 e alle caratteristiche fisiche (dispersione della luce) tipiche dei linfociti; successivamente le cellule LLC vengono differenziate dalle normali cellule B in base al loro profilo di espressione dei marcatori sopra descritti. Eventuali eventi contaminanti che potrebbero essere conteggiati come cellule LLC vengono esclusi: nel core panel ERIC a sei colori ci si basa principalmente sull'espressione di CD81 che deve essere debole, mentre in pannelli più estesi che comprendono ad esempio il CD3 si escludono le cellule che co-esprimono il CD19 e il CD3. I leucociti vengono calcolati come numero di eventi totali a cui va sottratto il numero di eventi "non-leucociti" (essenzialmente globuli rossi e detriti identificati come CD19-CD43-). Con questo pannello di anticorpi e l'appropriata combinazione delle regioni (*gate*) di interesse è possibile avere sufficienti controlli interni da consentire una valida analisi indipendentemente dagli anticorpi monoclonali, dai fluorocromi coniugati e dai citofluorimetri e software di analisi utilizzati. Nell'analisi si paragona l'intensità della fluorescenza mediana di CD20 e CD79b sulle cellule B normali rispetto ai linfociti T normali che sono negativi per tali marcatori e di CD5, CD43 e CD81 sulle cellule T normali, rispetto all'intensità di fluorescenza mediana rilevata sulle cellule B normali negative per CD5 e CD43 e sui granulociti negativi per CD81. Con debole espressione del marcatore si intende una riduzione di almeno il 20% della intensità di fluorescenza rispetto all'espressione mediana osservata usando lo stesso anticorpo in una popolazione di cellule policlonali B di riferimento. Nell'applicazione della CFM per l'analisi MMR alcuni aspetti richiedono particolare attenzione:

Il limite di rilevamento / quantificazione / bianco

Il limite di rilevamento e il range quantitativo possono essere facilmente calcolati dal numero totale di leucociti analizzati. Per quanto riguarda il limite inferiore di rilevamento (LOD, *Lower Limit Of Detection*) è stato dimostrato che la dimensione minima della popolazione per il rilevamento riproducibile di cellule di LLC in un'analisi multiparametrica è di 20 eventi. Il LOD può essere definito come 20 / leucociti totali, cioè un LOD dello 0,01% richiede l'acquisizione di almeno 200.000 leucociti.

Questo parametro rappresenta la sensibilità del test. Il limite inferiore di quantificazione (LOQ, *Lower Limit Of Quantitation*) è la dimensione minima della popolazione per una quantificazione riproducibile delle cellule di LLC nell'analisi multiparametrica e corrisponde a 50 eventi. Il LOQ può essere definito come 50 / leucociti totali, cioè un LOQ dello 0,01% richiede l'acquisizione di 500.000 leucociti. Il limite inferiore di bianco (LOB, *Lower Limit Of Blank*) è il segnale apparente più alto misurato in assenza del misurando. Il 95% dei valori negativi è al di sotto di questo limite. È stato dimostrato sperimentalmente che in campioni normali è di 10 eventi.

Il referto con i risultati della MMR

Il numero di cellule LLC identificate deve essere riportato come percentuale dei leucociti se sono $>10^{-4}$ altrimenti è preferibile usare la dicitura cellule LLC $<10^{-4}$ rispetto al termine MMR negativa. In ciascun referto dovrebbe essere sempre specificato l'intervallo quantitativo, ovvero il LOD e il LOQ specifici per il totale di leucociti acquisiti.

I vantaggi e gli svantaggi della CFM

Il vantaggio principale della CFM consiste nell'utilizzo di una tecnologia ampiamente disponibile e quindi largamente applicabile, più semplice e veloce rispetto alla RQ-PCR in quanto non richiede la progettazione di *primer* clone-specifici, anche se nel contesto di studi clinici, è atteso che l'analisi della sequenza del gene IGH sia già disponibile baseline perché lo stato mutazionale IGHV è considerato un fattore predittivo.

Al contrario, uno svantaggio della CFM è che i campioni devono essere analizzati entro 48 ore dalla raccolta. Infatti, nei campioni analizzati entro questo intervallo di tempo i livelli di espressione dei marcatori di superficie hanno mostrato una variazione < 20% rispetto al basale (come richiesto in base alle linee guida pratiche dell'*International Council for Standardization of Haematology and International Clinical Cytometry Society*, ICSH/ICCS). Per molti marcatori i risultati restano stabili fino a 96 ore, mentre per altri, come ad esempio il CD79b PE, si ottengono risultati falsamente elevati già dopo 72 ore dovuti al legame non specifico con cellule apoptotiche.

Dato che nelle sperimentazioni cliniche multicentriche e/o multinazionali la preparazione e il trasporto ai laboratori centrali dei campioni freschi può essere un problema per motivi logistici, l'implementazione di laboratori in loco può offrire una soluzione accettabile a condizione che la gestione e l'analisi dei dati siano omogenee in tutti i centri.

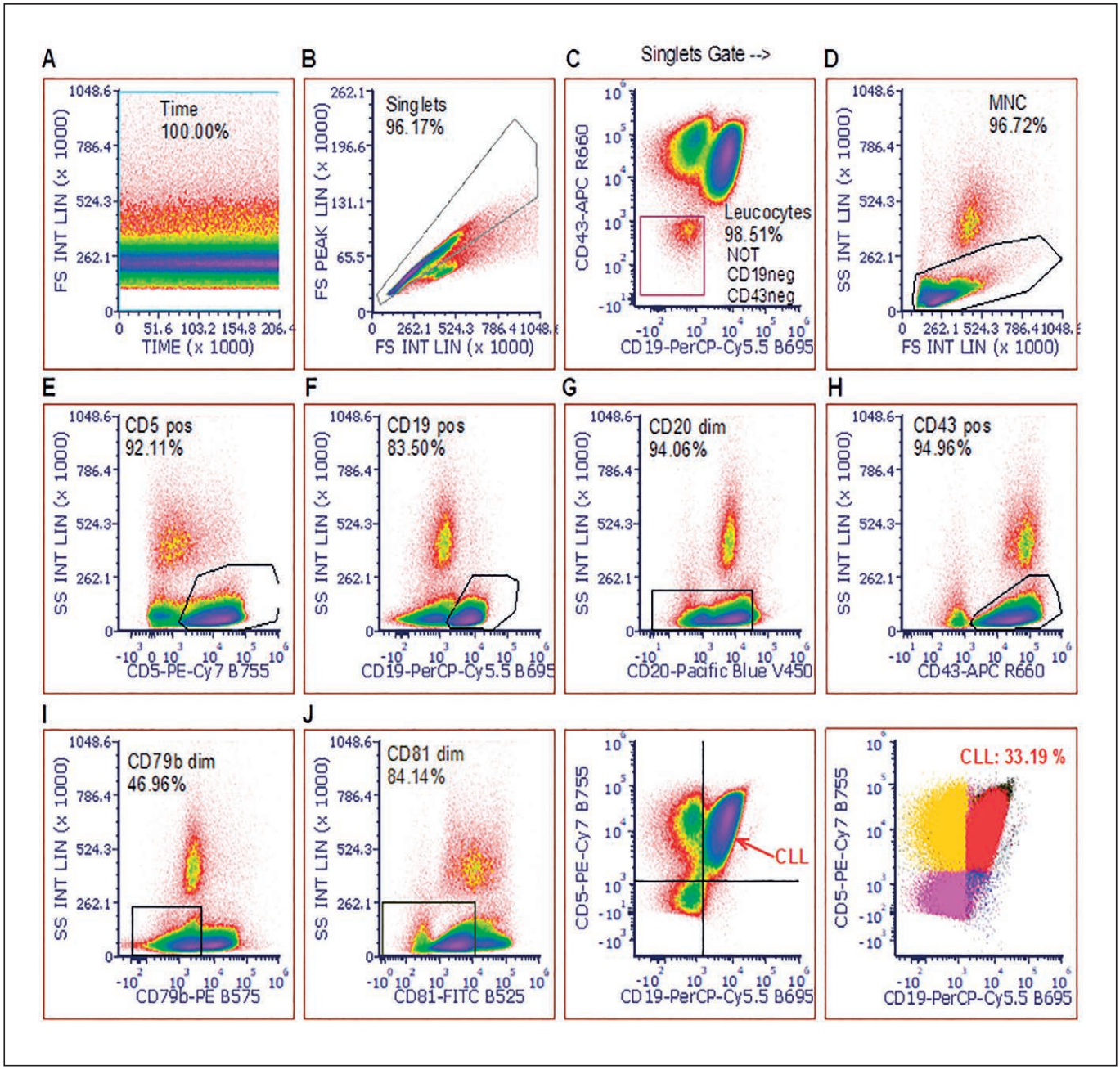


Figura 1 *- Analisi citofluorimetrica della MMR col pannello a sei colori (ERIC) del sangue periferico di un paziente LLC prima dell'inizio della terapia.*
Per identificare ed enumerare le cellule LLC presenti nel campione si creano le seguenti regioni (Gate):

A. TEMPO (Time Gate): la regione su questo parametro derivato permette di escludere le parti dell'acquisizione che non sono uniformi

B. SINGOLETTI (Singlets Gate): l'esclusione degli aggregati si ottiene tramite la regione sui parametri fisici di dispersione in avanti (Forward Scatter, FS) FS INT vs FS PEAK. Si escludono gli eventi con alto FS INT a parità di FS PEAK

C. LEUCOCITI: si escludono le cellule che sono CD19-CD43- (globuli rossi e detriti)

D. CELLULE MONONUCLEATE (MNC): per identificarle si crea una regione sui parametri fisici (FS vs dispersione laterale/Side Scatter, SS) escludendo le cellule con alto SS (granulociti)

E. Regione sulle cellule CD5+ identifica i linfociti T e le cellule LLC

F. Regione sulle cellule CD19+ identifica i linfociti B normali e le cellule LLC

G. Regione sulle cellule con espressione del CD20 debole caratteristica delle cellule LLC

H. Regione sulle cellule CD43+ identifica i linfociti T e le cellule LLC

I. Regione sulle cellule con espressione del CD79 debole caratteristica delle cellule LLC

J. Regione sulle cellule con espressione del CD81 debole caratteristica delle cellule LLC

Le cellule che rientrano nella regione Time e nella regione Singlets e nella regione Leucocytes e nella regione MNC vengono poi ulteriormente selezionate combinando le restanti regioni tramite le regole dell'algebra booleana. Queste combinazioni consentono l'identificazione e l'enumerazione delle cellule LLC (CD19+ AND CD5+ AND CD20 debole AND 43+ AND CD79 debole AND CD81 debole), delle cellule B normali (CD19+ AND NOT CD5+ AND NOT CD20 debole AND NOT CD43+ AND NOT CD79 debole), dei linfociti T (CD5+ AND NOT CD19+ AND CD20 debole AND 43+ AND CD79 debole) e di tutte le altre popolazioni presenti come ad esempio granulociti, ematogoni.

PCR quantitativa *Real-time* (*Real-time Quantitative PCR*, RQ-PCR)

Questo approccio è stato standardizzato dal Gruppo di studio europeo sulla rilevazione MMR nella leucemia linfoblastica acuta (*European Study Group on MMR detection in ALL, ESG-MMRALL*) [12]. Ogni clone di leucemia presenta un riarrangiamento IGHV-IGHD-IGHJ unico che può essere amplificato mediante PCR utilizzando *primer*. La RQ-PCR dell'oligonucleotide allele specifico (ASO, *allele specific oligonucleotide*) della catena pesante delle immunoglobuline (ASO IGH RQ-PCR) è una procedura laboriosa perché richiede il sequenziamento del riarrangiamento clone-specifico in ogni paziente prima della terapia di induzione, anche se presenta il vantaggio di avere una sensibilità superiore compresa tra 10^{-4} e 10^{-5} [12]. Poiché i *primer* sono specifici per una singola sequenza di IGH riarrangiata, esiste un certo rischio di perdita del gene bersaglio a causa di riarrangiamenti/mutazioni somatiche nella regione IGH che avrebbe come risultato una ridotta sensibilità, ad esempio nel caso di variazioni tra gli accertamenti effettuati al tempo zero (basale) e quelli al follow up anche se questa eventualità sembra essere molto più rara che in altre patologie. Se si riscontra una malattia biclonale nel campione basale, è necessario utilizzare due target PCR IG per quantificare accuratamente la MMR.

Alcuni segmenti del gene dell'immunoglobulina e le combinazioni di *primer* producono un'amplificazione sub-ottimale e quindi è fondamentale identificare il limite di rilevamento (la sensibilità) e l'intervallo quantitativo per ogni specifico *primer* del paziente. Diventa quindi cruciale disporre di una curva standard ottenuta mediante la diluizione seriale del DNA del paziente con il DNA estratto da 5-10 donatori sani, con valori che vanno da 10^{-1} (calcolato utilizzando la percentuale di cellule neoplastiche nel DNA del paziente) ad almeno 10^{-5}, preferibilmente includendo anche la diluizione 5×10^{-4}. La curva standard risultante deve includere almeno tre punti di diluizione, un intervallo minimo di due logaritmi, una pendenza (*slope*) tra -3,1 e -3,9; e un coefficiente di correlazione ≥ 0,98 altrimenti la RQ-PCR non dovrebbe essere eseguita a causa delle scarse prestazioni [10].

Per la definizione dell'intervallo quantitativo si calcola la diluizione più bassa che permette un'amplificazione specifica e riproducibile in tutti i replicati con una soglia di ciclo ≥ 3,0 inferiore al valore più basso del fondo (amplificazione osservata nel DNA normale). La sensibilità è quindi la diluizione più bassa che dà un'amplificazione specifica con almeno un replicato positivo con una soglia di ciclo ≥1,0 inferiore al valore più basso del fondo e <20 cicli dal campione non diluito. L'intervallo quantitativo e la sensibilità stabiliti come descritto consentono quindi di determinare lo stato della MMR che si può definire come positiva quantificabile, positiva fuori dall'intervallo quantitativo, o non rilevabile.

Un importante vantaggio di questa metodica è che i campioni non devono essere freschi e possono essere spediti in un unico centro per l'analisi. I campioni conservati hanno anche l'indubbio vantaggio di poter consentire analisi retrospettive negli studi clinici.

Infine, la ASO RQ-PCR offre una sensibilità qualitativa più elevata, al di sotto della soglia di 10^{-4}, che potrebbe essere rilevante nelle sperimentazioni cliniche che esplorano l'eradicazione della malattia.

Sequenziamento *High Throughput* (*High Throughput Sequencing*, HTS) o metodi di *Next Generation Sequencing* (NGS)

Con l'avvento delle tecnologie NGS (*high-throughput sequencing*), è stata raggiunta un'analisi più approfondita del riarrangiamento del gene IG/TR, che in linea di principio potrebbe avere un profondo impatto sulle tre principali applicazioni dello studio dei geni IG/TR clonalmente riarrangiati (ovvero l'analisi immunogenetica), cioè valutazione della clonalità, rilevamento e monitoraggio MMR e analisi del repertorio. Sebbene l'analisi immunogenetica basata su NGS possa essere considerata un approccio metodologico altamente sensibile, altamente specifico, ma anche affidabile e riproducibile per applicazioni sia di ricerca sia di diagnostica, esiste la necessità di confrontarla con metodologie alternative come la spettroscopia di clonalità (*clonality spectratyping*), il sequenziamento secondo Sanger, la RQ-PCR e la CFM, oltre a una meticolosa pianificazione e standardizzazione dei protocolli sperimentali. Un ulteriore fattore di confusione, almeno per le applicazioni diagnostiche di IG/TR NGS, è la possibile mancanza di adeguate linee guida per l'implementazione, la valutazione e la traslazione clinica dei risultati. A questo proposito è stato istituito il consorzio *Euroclonality* NGS, il cui obiettivo principale è lo sviluppo e la standardizzazione dei test NGS per la valutazione della clonalità, l'analisi MMR e l'analisi del repertorio a livello pre-analitico e post-analitico (analisi bioinformatica) [13]. È da segnalare che uno di questi approcci, il saggio *Adaptive Biotechnologies clonoSEQ®* - è stato recentemente approvato dalla FDA [14].

Punti controversi

Nonostante gli impressionanti progressi tecnologici degli ultimi anni, ad oggi restano ancora alcuni punti controversi nella valutazione della MMR:

Campioni

Lo stato di MMR può essere valutato in campioni di PB o BM. Tutti i pazienti con risposta clinica (RC o RP) devono prima essere valutati per MMR in PB. Se la MMR non è rilevabile nel PB, è necessario confermare lo stato MMR nel BM. La valutazione della MMR nel BM non è informativa per i pazienti con MMR $>10^{-2}$ nel PB.

Sensibilità

Si deve comunque sempre considerare che per raggiungere il livello di sensibilità di 10^{-5}, sono necessarie almeno 1×10^{6} cellule per l'analisi RQ-PCR e 2×10^{6} per l'analisi in HTS. Analogamente anche la sensibilità dell'analisi della MMR in CFM dipende principalmente dalla disponibilità di un numero sufficiente di leucociti nel campione, infatti è necessario acquisire almeno 2×10^{6} eventi, che in termini pratici si traduce nella necessità di utilizzare almeno 3×10^{6} cellule per la marcatura. La combinazione di tutti i sei marcatori richiesti (CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b e CD81) in un singolo tubo rende più fattibile l'analisi su un maggior numero di

leucociti consentendo di raggiungere anche con questa metodica il limite di rilevamento del 10^{-5}/0,001% /MMR5. Gli esiti degli studi a lungo termine suggeriscono che un chiaro aumento della sopravvivenza rispetto a una soglia 10^{-4} diventerà evidente solo con 5-10 anni di follow up.

Il tasso di risposta

Il tasso di risposta MMR è definito come la proporzione di pazienti nella popolazione ITT (*Intention To Treat*) in cui una risposta clinica completa (RC) e lo stato di MMR non rilevabile nel midollo osseo sono raggiunti dopo il trattamento nella LLC. I pazienti che raggiungono la RC e lo stato di MMR non rilevabile alla fine del trattamento verranno considerati come MMR *responders*. I pazienti senza una valutazione MMR (per qualsiasi causa), i pazienti con stato MMR rilevabile e i pazienti in RP con MMR non rilevabile saranno considerati come MMR *non-responders*. È stato suggerito che la cinetica della MMR piuttosto che un'unica valutazione MMR possa essere più significativa perché è l'aumento della MMR nel tempo e non semplicemente la sua presenza che alla fine è seguita da ricaduta clinica.

Quale tipo di valutazione utilizzare, cellulare vs molecolare (RQ-PCR vs HTS)?

Si tratta di impiegare il metodo convalidato più conveniente, vista l'elevata concordanza qualitativa e quantitativa con soglia dello 0,01% tra CFM e RQ-ASO IGHV-PCR. La valutazione di un livello molto basso di MMR richiederà probabilmente una conferma con due metodi diversi, sia per una precisa richiesta delle agenzie di controllo (EMA) sia per una validazione clinica.

L'esperienza degli studi clinici: la chemioimmunoterapia

La storia della valutazione della MMR evolve in parallelo con gli enormi progressi terapeutici nella gestione dei pazienti con LLC. Il requisito indispensabile per poter applicare tecniche più sensibili e sofisticate rispetto all'esame morfologico, all'istopatologia e/o alle metodiche citofluorimetriche standard è chiaramente condizionato dalla possibilità di ottenere risposte più profonde e durature. A partire dagli anni novanta si è assistito ad un progressivo cambiamento del paradigma di trattamento dei pazienti con LLC, passando da strategie di puro contenimento, mirate essenzialmente a controllare sintomi e segni associati alla malattia, all'avvento di nuove terapie più intensive potenzialmente in grado di ottenere un controllo profondo e prolungato [15]. Dapprima con l'utilizzo di anticorpi monoclonali in monoterapia (alemtuzumab) [16, 17], e poi con l'introduzione di schemi di combinazione basati sull'associazione di analoghi purinici (i.e. fludarabina, pentostatina, cladribina), agenti alchilanti (ciclofosfamide, mitoxantrone, bendamustina) e/o anticorpi monoclonali (rituximab, alemtuzumab) sono divenute necessarie nuove tecniche che consentissero di vedere ad un livello di profondità maggiore e identificare così le cellule LLC residue [18-25] (Tabella 2). L'apoteosi della MMR viene infatti raggiunta con i dati derivati dallo studio CLL8 che consolidano il primato della combinazione di fludarabina, ciclofosfamide e rituximab (FCR) nella terapia di prima linea dei pazienti giovani e senza comorbidità con LLC [18]. I risultati di questo studio di fase 3 randomizzato docu-

Riferimento [Studio]	Terapia standard	Terapia sperimentale	Tecnica utilizzata per valutare MMR	MMR braccio standard	MMR braccio sperimentale	PFS mediana (MMR rilevabile)	PFS mediana (MMR non rilevabile)
Bottcher, JCO 2012 [CLL8]	FC	FCR	4-FC, PCR	35% (PB); 28% (BM)	63% (PB); 44% (BM)	15,4 mesi	68,7 mesi
Eichhorst, Lancet Onc 2016 [CLL10]	FCR	BR	4-FC	49% (PB); 27% (BM)	38% (PB); 11% (BM)	ND	ND
Langerak, Blood 2019 [CLL11]	R-Chl	G-Chl	PCR	3,3% (PB)	35,8% (PB)	13,9 mesi	56,4 mesi
Bosch, JCO 2009	-	FCM-R	4-FC	-	47,8% (BM)	ND	ND
Moreton, JCO 2005	-	A	4-FC	-	20% (BM)	20 mesi	NR
Pettit, JCO 2012	-	HDMP + A	4-FC	-	36% (BM)	9,9 mesi	23,5 mesi
Strati, Blood 2014	-	FCR	4-FC	-	43% (BM)	HR 0,1 (95% CI 0,01-0,8) uMRD	
Hillmen, JCO 2014	-	R-Chl	4-FC	-	0% (BM)	-	-

PFS: sopravvivenza libera da progressione; FC: fludarabina + ciclofosfamide; FCR: fludarabina + ciclofosfamide + rituximab; 4-FC: citofluorimetria a 4 colori; BR: bendamustina + rituximab; R-Chl: clorambucil + rituximab; G-Chl: clorambucil + obinutuzumab; PCR: polymerase chain reaction; PB: sangue periferico; FCM-R: fludarabina + ciclofosfamide + mitoxantrone + rituximab; ND: non disponibile; BM: midollo osseo; A: alemtuzumab; NR: non raggiunta; HDMP: metilprednisolone ad alte dosi.

***Tabella 2** - Studi clinici selezionati basati sulla chemioimmunoterapia con valutazione della MMR.*

mentano infatti per la prima volta nella storia della LLC la possibilità di prolungare la sopravvivenza dei pazienti grazie alla scelta del trattamento. Non solo FCR è in grado di ottenere una risposta nella quasi totalità dei pazienti, ma è in grado di eradicare la malattia in maniera così profonda che la MMR risulta non rilevabile nel sangue periferico nel 63% dei pazienti e nel 44% dei casi nel midollo, a confronto con il 35% e 28% dei pazienti, rispettivamente, trattati nel braccio standard, ovvero FC [26]. Il dato più interessante in relazione alla MMR che emerge dallo studio è che, sebbene sia più probabile ottenere una MMR non rilevabile con FCR che con FC, nei pazienti con MMR non rilevabile non c'è differenza di PFS in base al trattamento ricevuto. In altre parole, il valore predittivo della MMR, una volta ottenuto, è indipendente dal tipo di terapia.

Come accennato, a seguito di questi ed altri risultati, l'Agenzia Europea del Farmaco (*European Medicine Agency*, EMA) nel luglio 2016 ha approvato l'uso della uMMR nei pazienti con LLC come endpoint intermedio per l'autorizzazione dei farmaci nell'ambito di studi clinici controllati di fase 3 [5].

Per garantire l'utilizzo di questo parametro *cum grano salis* le linee guida proposte dall'EMA includono alcune raccomandazioni di rilievo tra le quali soprattutto:

- la non rilevabilità della MMR valutata dapprima su sangue periferico deve essere poi confermata su aspirato midollare;
- l'indicazione a valutare la MMR in tutti in pazienti in risposta (completa e parziale) almeno nel sangue periferico.

Il secondo punto risulta particolarmente interessante in considerazione degli studi pubblicati dal *German CLL Study Group* (GCLLSG) partendo dall'analisi cumulativa di pazienti arruolati in studi clinici di fase 3 randomizzati per la terapia di prima linea (in particolare CLL8, dove la terapia con FC veniva confrontata con FCR e CLL10, dove FCR veniva confrontato con la combinazione di bendamustina e rituximab, BR) [27]. In base a queste analisi, infatti la valutazione MMR aveva un valore predittivo indipendente anche rispetto ai tradizionali criteri di risposta. In particolare, pazienti con risposta parziale (RP) e MMR non rilevabile mostravano una PFS e OS sostanzialmente sovrapponibili ai pazienti con RC e malattia minima residua rilevabile. Un sottogruppo di pazienti con RP e MMR non rilevabile, caratterizzato dalla persistenza di splenomegalia isolata che impediva di soddisfare i criteri per una RC, addirittura mostrava una PFS sovrapponibile ai pazienti con RC e MMR non rilevabile [27]. Più sfortunate erano invece le sorti dei pazienti considerati in RP, seppure con MMR non rilevabile, a causa della persistenza di linfoadenopatie, la cui PFS mediana risultava circa la metà di quella dei pazienti in RC con MMR non rilevabile (31 vs 61 mesi). L'idea della MMR come parametro di sensibilità al trattamento e potenziale strumento per ridurre il carico di terapia somministrato è stato di conseguenza studiato nell'ambito di studi retrospettivi e prospettici. In particolare, il gruppo dell'MD Anderson, che per primo ha utilizzato la combinazione di fludarabina, ciclofosfamide e rituximab [28, 29], ha valutato l'outcome dei pazienti trattati con FCR nell'ambito di uno studio clinico prospettico [30, 31]. La MMR su sangue midollare veniva valutata dopo 3 cicli di terapia ed al termine dei 6 cicli previsti. Un certo numero di pazienti che otteneva una MMR non rilevabile su midollo dopo 3 cicli, interrompeva il programma di trattamento previsto soprattutto a causa di tossicità. A fare la differenza in termini di PFS era non tanto il numero di cicli somministrati (3 vs 6) ma l'ottenimento della non rilevabilità della MMR, suggerendo così che nei pazienti più sensibili alla chemioimmunoterapia, il numero di cicli necessari possa essere modulato in base all'ottenimento di una MMR non rilevabile, anche se al momento non esistono conferme a questo approccio in studi prospettici randomizzati. È facile obiettare che la maggior parte degli studi su MMR fa riferimento a schemi di trattamento, come FCR, che possono di fatto essere somministrati in una minoranza dei pazienti con LLC che si incontrano nella pratica clinica ambulatoriale e che quindi non siano particolarmente rilevanti se non per i pochi pazienti giovani senza comorbidità. A questo proposito, un'analisi prospettica della MMR valutata con metodica di PCR allele-specifica e citofluorimetrica in una popolazione di pazienti anziani con comorbidità che necessitavano di terapia di prima linea per la LLC ha confermato il valore prognostico della MMR anche in questa categoria di pazienti. In particolare, nell'analisi sono stati considerati più di 450 pazienti arruolati nello studio CLL11 e randomizzati a terapia con clorambucile + rituximab (R-Clb) o clorambucile + obinutuzumab (G-Clb) per i quali era disponibile una valutazione della MMR su sangue periferico al termine del trattamento [32-34]. In maniera non inattesa l'ottenimento di una MMR non rilevabile era molto più frequente nei pazienti trattati con G-Clb rispetto a R-Clb (35,8% vs 3,3%) ed una MMR non rilevabile correlava significativamente con un prolungamento non solo in termini di PFS (con un hazard ratio, HR, di 6,53 a confronto con i pazienti con MMR rilevabile) ma anche di OS (HR 2,24 rispetto ai pazienti con MMR rilevabile) [34].

In linea con l'universalità del significato prognostico della valutazione MMR, Kwok et al. [35] hanno condotto uno studio retrospettivo su una casistica monocentrica costituita da tutti i pazienti con LLC sottoposti a terapia nel periodo compreso tra il 1996 ed il 2007 che avevano ottenuto almeno una risposta parziale alla terapia e per i quali era disponibile una valutazione MMR su sangue midollare al termine del trattamento [35]. Elemento di particolare pregio dello studio, il fatto di disporre di un follow up prolungato (mediana 10,1 anni, fino ad un massimo 18 anni) in grado perciò di definire la valenza prognostica della MMR a lungo termine.

Lo studio ha confermato la relazione tra ottenimento della MMR non rilevabile e sopravvivenza, in maniera indipendente dal tipo e dalla linea di terapia. La PFS si è confermata significativamente più lunga nei pazienti con MMR non rilevabile (7,6 vs 3,3 anni per livelli di positività di 0,01%-1% e 2 anni per positività >1%), così come l'OS (10,6 vs 5,3 vs 3,6 anni nei pazienti con MMR non rilevabile, positività 0,01-1% e >1%, rispettivamente). L'impatto più rilevante della MMR non rilevabile è stato documentato nei pazienti sottoposti a terapia di prima linea, dove la PFS a 10 anni risultava pari al 65% (vs 10% nei pazienti con MMR rilevabile) e la OS a 10 anni al 70% (vs 30% nei pazienti con MMR rilevabile).

Proprio perché per il suo ottenimento è richiesta l'applicazione di regimi intensivi, la valutazione della MMR è stata largamente applicata nel contesto del trapianto di cellule staminali. Il trapianto autologo non è più utilizzato nella LLC a fronte dell'evidenza che non migliori il controllo di malattia rispetto alla chemioimmunoterapia standard, esponendo i pazienti ad un aumentato rischio di tossicità. Al contrario, il trapianto allogenico resta un'opzione praticabile, seppure in una ridotta percentuale di pazienti in considerazione dell'età e del profilo di tossicità. Il razionale del monitoraggio continuo della MMR nel setting del trapianto è almeno duplice: da un lato, a differenza delle chemioimmunoterapie standard, che concludono il loro effetto terapeutico al termine della somministrazione, il trapianto continua ad agire nel tempo attraverso la cosiddetta *graft-versus-leukemia* (GvL). Dall'altro, nei pazienti sottoposti a trapianto in cui si evidenzia una ripresa di malattia possono essere implementate ulteriori procedure ad azione immunomodulatoria (modificazione di dosaggio e tipo della terapia immunosoppressiva, infusione di linfociti del donatore) [36]. La valutazione prospettica della MMR in pazienti con LLC sottoposti a procedura di trapianto di midollo allogenico ha dimostrato che, anche in questo contesto, lo stato della MMR dopo il trapianto correla con la durata della risposta [37]. In particolare, lo stato della MMR a 12 mesi dal trapianto sembra essere un punto cruciale per definire il controllo a lungo termine della malattia: diversi gruppi hanno infatti dimostrato che la probabilità di ricaduta clinica in pazienti con MMR non rilevabile a 1 anno dal trapianto è estremamente bassa [38-40]. In una delle casistiche più numerose pubblicate, solo 2/32 pazienti con MMR non rilevabile sono andati incontro ad una ricaduta clinica, in confronto a 6 su 11 pazienti con MMR rilevabile [40].

Nuove modalità terapeutiche

La rilevanza clinica dell'ottenimento della MMR è stata messa in discussione negli ultimi anni con l'avvento dei nuovi inibitori delle chinasi (*kinase inhibitors*, KI), in particolare di BTK (ibrutinib) [41, 42] e di PI3Kδ (idelalisib) [43, 44]. Il dato per certi versi sorprendente nell'utilizzo di queste nuove terapie è stato che, nonostante la loro comprovata efficacia e la capacità di ottenere un controllo a lungo termine della LLC, la quota di pazienti che ottiene una MMR non rilevabile è assolutamente trascurabile. La sempre più larga introduzione di questi farmaci nell'ambito della pratica clinica ha generato ampie discussioni relativamente alla modalità di somministrazione (che è continuativa), e che comporta dubbi sull'aderenza a lungo termine alla terapia, sulla sostenibilità dal punto di vista economico e sul possibile effetto a lungo termine sulle cellule leucemiche con la possibile selezione di sub-cloni caratterizzati da particolare aggressività [45-47]. L'obiettivo di ottenere risposte più profonde con i nuovi KI con il fine ultimo di prevedere l'interruzione del trattamento, è stato valutato in studi clinici essenzialmente attraverso due strategie: 1) combinando KI e chemioimmunoterapia; 2) combinando farmaci non chemioterapici tra loro (Tabella 3).

In maniera particolarmente interessante dal punto di vista concettuale, anche se con scarsa applicabilità nella pratica clinica, i risultati dello studio HELIOS hanno documentato la possibilità di ottenere una uMMR grazie all'utilizzo di ibrutinib in associazione a bendamustina e rituximab. Se la quota di pazienti con uMMR al termine dei cicli BR risulta nel complesso bassa sia nei pazienti che ricevono BR + placebo che in quelli trattati con BR + ibrutinib, è importante notare che nel gruppo di trattamento randomizzato a ibrutinib, che quindi prosegue con il farmaco fino a progressione o tossicità, la quota di pazienti con uMMR incrementa progressivamente fino a superare il 25% nel corso del follow up [48, 49]. Nello sforzo di eliminare la chemioterapia dallo schema portante del trattamento dei pazienti con LLC, studi più recenti hanno proposto l'ottenimento della uMMR sfruttando anticorpi monoclonali anti-CD20 più potenti in particolare combinando ibrutinib ad obinutuzumab. Nello studio ILLUMINATE® recentemente pubblicato, la quota di pazienti LLC con malattia ad alto rischio che raggiungevano una uMMR nel PB o nel BM con l'utilizzo dei due farmaci in associazione arrivava al 35% [50]. Gli stessi farmaci sono stati inoltre valutati con una strategia meno convenzionale, in cui, alla riduzione del carico di malattia con ibrutinib, seguiva la somministrazione di obinutuzumab che permetteva di raggiungere una uMMR midollare addirittura nel 50% dei pazienti ed una riduzione del carico di malattia pari a 3,1 logaritmi [51]. Se il trattamento con KI (almeno in monoterapia) e MMR non sembrano andare di pari passo, la recente introduzione nell'armamentario terapeutico dei pazienti con LLC del primo inibitore selettivo di BCL-2, venetoclax, ha permesso di dimostrare che l'ottenimento di una MMR non rilevabile è un obiettivo alla portata anche delle nuove *targeted therapies*. La percentuale di pazienti con LLC recidivata/refrattaria che ottiene una MMR non rilevabile nel sangue è pari al 27% quando venetoclax è utilizzato in monoterapia [52], ma incrementa notevolmente nella stessa categoria di pazienti se trattati con la combinazione di venetoclax e rituximab (Ven+R) [53]. Lo studio di fase 1b che valutava l'efficacia di venetoclax in combinazione con rituximab nei pazienti con LLC recidivata/refrattaria, prevedeva la possibilità di interrompere il trattamento nei pazienti in RC e/o con MMR non rilevabile nel midollo in base al giudizio del medico e/o richiesta del paziente. Diciotto pazienti hanno interrotto la terapia, e tra questi solo 2 pazienti con RC e MMR rilevabile e 1 con MMR $<10^{-4}$ sono recidivati con necessità di trattamento. Tutti e 3 hanno risposto nuovamente alla somministrazione di venetoclax con un solo paziente progredito a distanza di 18 mesi dalla ripresa della terapia [54]. In base a questi risultati preliminari, la possibilità di utilizzare uno schema di trattamento a durata fissa basato sulla combinazione di venetoclax e rituximab è stata indagata in uno studio randomizzato di fase 3 (MURANO) [55]. Lo studio prevedeva che i pazienti trattati nel braccio sperimentale, con la combinazione di Ven+R, proseguissero per un massimo di ulteriori 18 mesi la terapia con venetoclax dopo il termine della fase di combinazione (6 mesi), per un totale di 24 mesi di trattamento. I risultati aggiornati dello studio [56], oltre a confermare un vantaggio di sopravvivenza nei pazienti trattati con Ven+R rispetto alla terapia standard BR, hanno documentato elevatissime percentuali di non rilevabilità della MMR nel gruppo di pa-

zienti trattato con Ven+R rispetto a BR, essendo la valutazione della MMR su sangue periferico a 2-3 mesi dal termine della terapia uno degli endpoints secondari dello studio. Al termine del trattamento combinato il 62% dei pazienti trattati con Ven+R aveva una MMR non rilevabile nel sangue periferico (a fronte di un 13% nel gruppo di trattamento con BR) e tale risultato si manteneva invariato al termine dei 24 mesi di terapia con venetoclax (uMMR 64%). La non rilevabilità della MMR al termine della terapia combinata risultava predittiva di una più prolungata PFS, tanto che ad un follow up mediano di 9,9 mesi *off-therapy* solo 2 tra 83 pazienti (2,4%) con uMMR al termine di Ven+R avevano sviluppato una progressione di malattia e il 30% (25/83) di pazienti che aveva cambiato il proprio stato di MMR da non rilevabile a rilevabile non ha manifestato franchi segni di progressione clinica. L'hazard ratio nei confronti dei pazienti con MMR $>10^{-2}$ al termine della terapia di combinazione risultava pari a 0,24 (95% CI 0,08-0,72) nei pazienti trattati con Ven+R, ma la stessa valenza veniva mantenuta anche nel braccio di trattamento BR, dove i pochi pazienti che ottenevano una uMMR

Studio	Terapia standard	Terapia sperimentale	Tecnica utilizzata per valutare MMR	MMR braccio standard	MMR braccio sperimentale	PFS mediana (MMR rilevabile)	PFS mediana (MMR non rilevabile)
Chanan-Khan, Lancet Oncol 2016; Fraser, Leukemia 2019 [HELIOS]	BR	BR + ibr	8-FC	6,2% (PB o BM)	26,3% (PB o BM)	36-m PFS 60,1% (BR + ibrutinib) 36-m PFS 11,2% (BR + placebo)	36-m PFS 88,6% (BR + ibrutinib) 36-m PFS 54,5% (BR + placebo)
Roberts, NEJM 2016	-	Ven	Almeno 4-FC	-	5% (BM)	ND	ND
Seymour, Lancet Onc 2017	-	Ven + R	Almeno 4-FC	-	57% (BM)	2 anni PFS 71%	2 anni PFS 100%
Rawstron, ASH 2018	-	Ibr + G	6-FC	-	Precedente ibrutinib: 50% (BM) Ibrutinib-naïve: 6% (BM)	ND	ND
Fink, Lancet Haematol 2017 [CLLM1]	Placebo	Lenalidomide	4-FC	Al ciclo 7: 0% Al ciclo 12: 0%	Al ciclo 7: 8% Al ciclo 12: 7%	ND	ND
Seymour, NEJM 2018; Kater, JCO 2019 [MURANO]	BR	Ven + R	ASO-PCR e/o 6-FC	13,3% (PB)	62,4% (PB)	MMR non rilevabile vs rilevabile Ven + R: HR 0,15 (0,06-0,40) BR: HR 0,08 (0,03-0,18)	23,5 mesi
Fischer, Blood 2017 [CLL14]	G-Chl	Ven + G	4-FC	ND	Safety run-in (n =12) 11/12 (PB) 5/12 (BM)	ND	ND
Ghia, EHA 2018 [CAPTIVATE]	-	Ibr + Ven	8-FC	-	86% (BM)	ND	ND
Hillmen, ASH 2018 [CLARITY]	-	Ibr + Ven	FC	-	39% (PB) 24% (BM)	ND	ND
Moreno, Lancet Oncol 2019 [iLLUMINATE]	G-Chl	Ibr + G	FC	25% (PB o BM)	35% (PB o BM)	ND	ND
Porter, Sci Tran Med 2015	-	CAR T	IGH deep sequencing	-	4/14 (PB o BM)	7 mesi (5-13 mesi) in 4 pazienti in PR	NR (28-53 mesi)

PFS: sopravvivenza libera da progressione; BR: bendamustina + rituximab; ibr: ibrutinib; PB: sangue periferico; BM: midollo osseo; ven: venetoclax; 4-FC: citofluorimetria a 4 colori; ND: non disponibile; R: rituximab; G: obinutuzumab; 6-FC: citofluorimetria a 6 colori; ASO-PCR: allele-specific oligonucleotide-polymerase chain reaction; G-Chl: chlorambucil + obinutuzumab; 8-FC: citofluorimetria a 8 colori; FC: citofluorimetria; CAR T: chimeric antigene receptor T; IGH: catena pesante delle immunoglobuline; NR: non raggiunta

***Tabella 3** - Studi clinici selezionati basati sull'utilizzo di nuovi farmaci con valutazione della MMR.*

avevano un netto vantaggio di PFS (HR, 0,22; 95%; CI 0,13-0,38) rispetto ai pazienti con MMR $>10^{-2}$. In questo caso, la persistenza di piccoli linfonodi residui alla valutazione TC al termine del trattamento non differenziava in maniera rilevante la prognosi dei pazienti a fronte di una MMR non rilevabile, rendendo le curve di PFS dei pazienti con RP e uMMR sostanzialmente sovrapponibili a quelle dei pazienti con RC e uMMR.

L'idea di un trattamento di durata limitata ma potente al punto da eradicare la MMR è alla base anche dello studio di fase 3 CLL14 condotto dal GCLLSG e del quale sono ad oggi disponibili solo i risultati della fase di *safety run-in*. Lo schema di trattamento prevedeva infatti la somministrazione di obinutuzumab secondo le specifiche riportate in scheda tecnica per 6 cicli in associazione a venetoclax per un massimo di 12 mesi [57]. La rivalutazione a 3 mesi dal termine del trattamento nei 12 pazienti arruolati nel *safety run-in* ha consentito di dimostrare una risposta del 100% con 7 RC (58%) e 5 PR; 11/12 pazienti avevano una MMR non rilevabile nel sangue periferico e 5/7 pazienti in cui l'analisi era stata effettuata anche su aspirato midollare avevano una MMR non rilevabile. I risultati della coorte completa (432 pazienti randomizzati 1:1 a venetoclax + obinutuzumab vs clorambucile + obinutuzumab) saranno necessari per definire in maniera chiara l'efficacia di questo schema di trattamento.

Tra i nuovi agenti in fase di studio nell'ambito della terapia della LLC c'è un posto a parte per la MMR anche negli studi che prevedono l'utilizzo dei linfociti T portatori di un recettore chimerico (*chimeric antigen receptor*, CAR). I linfociti T CAR, approvati da EMA per l'utilizzo nei pazienti con linfomi B aggressivi o leucemia linfoblastica acuta B, sono stati sperimentati e sono attualmente in fase di studio in numerose malattie oncoematologiche, inclusa la LLC. I primi risultati pubblicati riportano la possibilità di ottenere una RC con MMR non rilevabile (determinata tramite metodiche di *next-generation sequencing* del locus dei geni IGH) in circa il 29% dei pazienti (4/14). Anche in questo contesto l'ottenimento di una risposta profonda correla con la persistenza della remissione clinica di malattia (nessuno dei 4 pazienti risulta recidivato con una mediana di 40 mesi di follow up) [58, 59]. Studi analoghi che utilizzano un composto differente (JCAR017) hanno documentato una percentuale di risposta in pazienti affetti da LLC recidivata/refrattaria del 75% con RC pari al 50%. Da notare che nello studio erano inclusi pazienti particolarmente difficili, in quanto refrattari anche ad ibrutinib e/o venetoclax. Sei dei 7 pazienti valutati risultavano avere una MMR non rilevabile tramite CFM su sangue periferico a 30 giorni dall'infusione [60]. Nel tentativo di migliorare la profondità della risposta ed il controllo a lungo termine della malattia, sono in corso studi volti ad associare ai linfociti T CAR altri composti in grado di favorire l'attivazione dei linfociti T. Tra questi, l'associazione con ibrutinib, che è in grado di modulare l'attività dei linfociti T verosimilmente attraverso l'inibizione di ITK, ha mostrato i risultati più promettenti, con percentuali di risposta che arrivano al 71% a 3 mesi dall'infusione, 43% di RC, la scomparsa dell'infiltrato midollare in 17/18 pazienti e la non rilevabilità della MMR con metodiche di citofluorimetria ad alta risoluzione in 15/17 pazienti.

Approccio terapeutico guidato dalla MMR

I risultati relativi alla MMR negli studi disponibili forniscono un importante razionale per l'utilizzo di questo parametro nel disegno degli studi clinici. In particolare, negli ultimi anni si è assistito al fiorire di trial clinici in cui la valutazione della MMR non ha solo la funzione di definire la prognosi del paziente, ma guida le modalità di trattamento (Tabella 3). In uno studio di importanza cruciale per i futuri sviluppi applicativi della MMR, il CLLM1, il GCLLSG si è proposto di studiare l'efficacia di una terapia di mantenimento con lenalidomide nei pazienti in risposta dopo chemioimmunoterapia di prima linea secondo schema FCR o BR, ma con MMR rilevabile. L'innovatività e la lungimiranza dello studio, al di là dello schema terapeutico applicato, consistevano soprattutto nel monitoraggio continuo della MMR con la possibilità di intensificare il trattamento aumentando la dose di lenalidomide in caso di persistenza di MMR rilevabile ed in assenza di effetti collaterali di rilievo nei pazienti ad alto rischio di ricaduta. A causa del ridotto arruolamento (lo studio divenne attivo proprio nell'epoca in cui i nuovi KI conquistavano il palcoscenico della ricerca e poi della pratica clinica) lo studio non ha permesso di trarre conclusioni solide sull'utilizzo della terapia di mantenimento con lenalidomide in questo setting, ma ha costituito una *proof of concept* della possibilità di utilizzare la valutazione MMR per intensificare e/o modificare la gestione terapeutica dei pazienti con LLC [61].

Più recentemente, con la disponibilità dei nuovi KI e inibitori di BCL-2 la valutazione della MMR ha trovato ampio spazio in studi clinici volti a ottimizzare la durata del trattamento. Mentre gli studi clinici iniziali basati su schemi di terapia limitati nel tempo prevedevano una durata fissa di terapia indipendente dalla risposta raggiunta, ha iniziato a farsi strada l'idea che non esista una "taglia unica" che consenta un controllo ottimale di malattia in tutti i pazienti con LLC che ricevono nuove terapie. In questo senso, quale strumento migliore per definire la profondità della risposta che l'utilizzo della MMR? Da qui i primi studi che utilizzano la combinazione di nuovi farmaci ma che prevedono una differenziazione della durata del trattamento in base alla rilevabilità della MMR. Ad oggi sono stati presentati solo in maniera preliminare i risultati dello studio CAPTIVATE® che prevede la somministrazione di ibrutinib e venetoclax nei pazienti con LLC che necessitano di terapia di prima linea. Al termine dei 12 mesi del trattamento di combinazione lo studio prevede due possibili randomizzazioni: per i pazienti con MMR non rilevabile è prevista una randomizzazione 1:1 tra ibrutinib e placebo, mentre i pazienti con MMR rilevabile proseguono la terapia con ibrutinib e vengono randomizzati nel 50% dei casi all'aggiunta di venetoclax. I risultati iniziali sono estremamente incoraggianti, considerato che il 77% dei pazienti risulta avere una MMR non rilevabile nel sangue periferico dopo 6 mesi di terapia di combinazione, percentuale che incrementa fino al 93% nei 14 pazienti che hanno completato un anno di terapia di combinazione. Nell'86% dei casi la MMR dopo 12 mesi di ibrutinib + venetoclax risulta non rilevabile

anche a livello midollare [62]. In maniera analoga lo studio CLARITY® si propone di valutare l'effetto della combinazione di ibrutinib e venetoclax in 50 pazienti affetti da LLC recidivata/refrattaria. L'obiettivo primario dello studio è proprio quello di raggiungere l'eradicazione della MMR (intesa come <1 cellula LLC su 10^4 leucociti e perciò definita MMR4) dopo 12 mesi di terapia combinata. Dopo 6 mesi di trattamento combinato di ibrutinib e venetoclax, la MMR risultava non rilevabile nel sangue periferico di 19/49 (39%) e nel midollo osseo di 12/49 (24%). Dopo 12 mesi di terapia combinata la percentuale di risposta era del 100% con 58% RC o RCi: la MMR documentava un continuo miglioramento nella profondità della risposta, risultando non rilevabile in PB in 23/40 (58%) e nel BM in 17/41 (41%). Il 29% dei pazienti risultava addirittura avere malattia non rilevabile alla citofluorimetria al di sotto della soglia di <1 cellula LLC su 10^5 leucociti (perciò definita MMR5) [63].

Conclusioni

Al 28 aprile 2019, 143 studi clinici registrati sul sito di *clinicaltrials.gov* dedicati ai pazienti con LLC riportano tra i termini chiave MMR, di questi 42 risultano aperti all'arruolamento o in procinto di aprire, 31 hanno concluso l'arruolamento ma sono tuttora in corso e 49 risultano essere stati completati.

Questi numeri supportano l'interesse per l'utilizzo della MMR in nuove sperimentazioni principalmente allo scopo di studiare strategie terapeutiche che prevedano una durata limitata di trattamento. Questo aspetto è considerato cruciale sia dai pazienti che dalle autorità regolatorie al fine di ridurre in maniera radicale il rischio di tossicità a lungo termine (inclusa quella finanziaria) di questo tipo di terapie. In questo senso la promessa per il futuro è che la MMR possa un giorno diventare lo strumento per personalizzare il trattamento dei pazienti e in particolare per interrompere la terapia.

È importante notare che l'EMA considera accettabile la MMR come endpoint intermedio e non come endpoint surrogato sulla base delle evidenze derivate attualmente dagli studi clinici. Per essere definito un endpoint surrogato oltre alla correlazione con l'endpoint a lungo termine (in questo caso la PFS), è necessario che l'effetto del trattamento sull'endpoint surrogato predica in maniera affidabile l'effetto del trattamento sull'endpoint a lungo termine e che quindi si possa definire una proporzionalità tra questi due parametri. Evidenze preliminari in questo senso derivano dalla metanalisi di 3 studi multicentrici randomizzati (CLL8, CLL10 e CLL11) condotti dal GCLLSG e supportano l'uso della MMR come endpoint primario in studi che prevedono la somministrazione di chemioimmunoterapia. Sebbene la valutazione della MMR si confermi proporzionale alla PFS, in questa metanalisi il risultato della MMR è in grado di spiegare solo in parte l'andamento della PFS, suggerendo la necessità di ulteriori studi il più possibile omnicomprensivi in termini di caratterizzazione biologica e clinica dei pazienti al fine di definire in maniera più precisa e possibilmente quantitativa la correlazione tra MMR e PFS [64].

La disponibilità di tecniche di analisi MMR ben standardizzate è inoltre lo strumento fondamentale per abbreviare la durata degli studi clinici e accelerare l'approvazione di nuovi trattamenti efficaci per i nostri pazienti con LLC, nonché il presupposto indispensabile per l'uso della MMR in un prossimo futuro anche nella pratica clinica standard. In prospettiva un approccio guidato dalla MMR consentirebbe infatti di definire in maniera personalizzata il trattamento modulando l'intensità e la durata di tutte le terapie sulla base di fattori predittivi di efficacia precoci ed affidabili come la non rilevabilità della MMR.Oggigiorno, la valutazione della MMR nella LLC è diventata rapidamente uno strumento indispensabile per la ricerca clinica ed il suo sviluppo promette di cambiare la gestione dei nostri pazienti in un futuro per nulla lontano.

Bibliografia

1. Robertson LE, Huh YO, Butler JJ, et al. Response assessment in chronic lymphocytic leukemia after fludarabine plus prednisone: clinical, pathologic, immunophenotypic, and molecular analysis. Blood. 1992;80(1):29-36.
2. Vuillier F, Claisse JF, Vandenvelde C, et al. Evaluation of residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients in clinical and bone-marrow remission using CD5-CD19 markers and PCR study of gene rearrangements. Leuk Lymphoma. 1992;7(3):195-204.
3. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood. 2008;111(12):5446-56.
4. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment and supportive management of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2018;131(25):2745-2760
5. Agency EM. Appendix 4 to the guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man - condition specific guidance. EMA/CHMP/703715/2012 Rev. 2. 2016. www.ema.europa.eu.
6. Ghia P, Rawstron A. Minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia: a way for achieving more personalized treatments. Leukemia. 2018;32(6):1307-1316.
7. Thompson M, Brander D, Nabhan C, et al. Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Novel Agents: A Review. JAMA Oncol. 2018;4(3):394-400.
8. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia. 2007;21(5):956-64.
9. Rawstron AC, Bottcher S, Letestu R, et al. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. Leukemia. 2013;27(1):142-9.
10. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. Leukemia. 2016;30(4):929-36.

11. Bottcher S, Ritgen M, Pott C, et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection using four-color flow cytometry, consensus IgH-PCR, and quantitative IgH PCR in CLL after allogeneic and autologous stem cell transplantation. Leukemia. 2004;18(10):1637-45.
12. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17(6):1013-34.
13. Rodriguez-Vicente AE, Bikos V, Hernandez-Sanchez M, et al. Next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: recent findings and new horizons. Oncotarget. 2017;8(41):71234-71248.
14. Fries C and Burack WR A clinical perspective on immunoglobulin heavy chain clonal heterogeneity in B cell acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res. 2018;75:15-22.
15. Ghia P A look into the future: can minimal residual disease guide therapy and predict prognosis in chronic lymphocytic leukemia? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012;2012:97-104.
16. Moreton P, Kennedy B, Lucas G, et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. J Clin Oncol. 2005;23(13):2971-9.
17. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, et al. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2007;25(35):5616-23.
18. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet. 2010;376(9747):1164-74.
19. Bosch F, Ferrer A, Villamor N, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. Clin Cancer Res. 2008;14(1):155-61.
20. Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N, et al. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2009;27(27):4578-84.
21. Pettitt AR, Jackson R, Carruthers S, et al. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. J Clin Oncol. 2012;30(14):1647-55.
22. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. J Clin Oncol. 2012;30(26):3209-16.
23. O'Brien SM, Kantarjian HM, Cortes J, et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2001;19(5):1414-20.
24. Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, et al. Cladribine combined with cyclophosphamide is highly effective in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Hematol J. 2002;3(5):244-50.
25. Kay NE, Geyer SM, Call TG, et al. Combination chemoimmunotherapy with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab shows significant clinical activity with low accompanying toxicity in previously untreated B chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2007;109(2):405-11.
26. Bottcher S, Ritgen M, Fischer K, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. J Clin Oncol. 2012;30(9):980-8.
27. Kovacs G, Robrecht S, Fink AM, et al. Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. J Clin Oncol. 2016;34(31):3758-3765.
28. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2005;23(18):4079-88.
29. 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(18):4070-8.
30. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, et al. Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. Blood. 2014;123(24):3727-32.
31. Thompson PA, Peterson CB, Strati P, et al. Serial minimal residual disease (MMR) monitoring during first-line FCR treatment for CLL may direct individualized therapeutic strategies. Leukemia. 2018;32(11):2388-2398.
32. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Chemoimmunotherapy with GA101 plus chlorambucil in patients with chronic lymphocytic leukemia and comorbidity: results of the CLL11 (BO21004) safety run-in. Leukemia. 2013;27(5):1172-4.
33. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. N Engl J Med. 2014;370(12):1101-10.
34. Langerak AW, Ritgen M, Goede V, et al. Prognostic value of MMR in CLL patients with comorbidities receiving chlorambucil plus obinutuzumab or rituximab. Blood. 2019;133(5):494-497.
35. Kwok M, Rawstron AC, Varghese A, et al. Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. Blood. 2016;128(24):2770-2773.
36. Bottcher S, Ritgen M, and Dreger P. Allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: lessons to be learned from minimal residual disease studies. Blood Rev. 2011;25(2):91-6.
37. Ritgen M, Bottcher S, Stilgenbauer S, et al. Quantitative MMR monitoring identifies distinct GVL response patterns after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: results from the GCLLSG CLL3X trial. Leukemia. 2008;22(7):1377-86.
38. Moreno C, Villamor N, Colomer D, et al. Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2006;107(11):4563-9.
39. Farina L, Carniti C, Dodero A, et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction monitoring of minimal residual disease in relapsed chronic lymphocytic leukemia: early assessment can predict long-term outcome after reduced intensity allogeneic transplantation. Haematologica. 2009;94(5):654-62.
40. Dreger P, Dohner H, Ritgen M, et al. Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MMR results of the German CLL Study Group CLL3X trial. Blood. 2010;116(14):2438-47.
41. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N Eng J Med. 2013;369(1):32-42.
42. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. N Eng J Med. 2015;373(25):2425-37.
43. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, 2014;370(11):997-1007.
44. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2014;123(22):3390-7.
45. O'Brien S, Furman RR, Coutre S, et al. Single-agent ibrutinib in treatment-naive and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. Blood. 2018;131(17):1910-1919.
46. Byrd JC, Hillmen P, O'Brien S, et al. Long-term follow-up of the RESONATE phase 3 trial of ibrutinib versus ofatumumab. Blood. 2019;133(19):2031-42.
47. Sharman JP, Coutre SE, Furman RR, et al. Final Results of a Randomized, Phase III Study of Rituximab With or Without Idelalisib Followed by Open-

Label Idelalisib in Patients With Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. J Clin Oncol. 2019;37(16):1391-1402.

48. Chanan-Khan A, Cramer P, Demirkan F, et al. Ibrutinib combined with bendamustine and rituximab compared with placebo, bendamustine, and rituximab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma (HELIOS): a randomised, double-blind, phase 3 study. Lancet Oncol. 2016;17(2):200-211.

49. Fraser G, Cramer P, Demirkan F, et al. Updated results from the phase 3 HELIOS study of ibrutinib, bendamustine, and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. Leukemia. 2019;33(4):969-980.

50. Moreno C, Greil R, Demirkan F, et al. Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2019;20(1):43-56.

51. Rawstron A, Munir T, Brock K, et al. Ibrutinib and Obinutuzumab in CLL: Improved MMR Response Rates with Substantially Enhanced MMR Depletion for Patients with >1 Year Prior Ibrutinib Exposure. Blood. 2018;132(Suppl 1):181.

52. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med. 2016;374(4):311-22.

53. Seymour JF, Ma S, Brander DM, et al. Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. Lancet Oncol. 2017;18(2):230-240.

54. Brander D, Seymour JF, Ma S, et al. Durability of Responses on Continuous Therapy and Following Drug Cessation in Deep Responders with Venetoclax and Rituximab. Blood. 2018;132(Suppl 1):183.

55. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, et al. Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med. 2018;378(12):1107-1120.

56. Kater AP, Seymour JF, Hillmen P, et al. Fixed Duration of Venetoclax-Rituximab in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Eradicates Minimal Residual Disease and Prolongs Survival: Post-Treatment Follow-Up of the MURANO Phase III Study. J Clin Oncol. 2019;37(4):269-277.

57. Fischer K, Al-Sawaf O, Fink AM, et al. Venetoclax and obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2017;129(19):2702-2705.

58. Bair SM and Porter DL Accelerating chimeric antigen receptor therapy in chronic lymphocytic leukemia: The development and challenges of chimeric antigen receptor T-cell therapy for chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol. 2019;94(S1):S10-S17.

59. Porter DL, Hwang WT, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. Sci Transl Med. 2015;7(303):303ra139.

60. Siddiqi T, Soumerai JD, Wierda W, et al. Rapid MMR-Negative Responses in Patients with Relapsed/Refractory CLL Treated with Liso-Cel, a CD19-Directed CAR T-Cell Product: Preliminary Results from Transcend CLL 004, a Phase 1/2 Study Including Patients with High-Risk Disease Previously Treated with Ibrutinib. Blood. 2018;132(Suppl 1):300.

61. Fink AM, Bahlo J, Robrecht S, et al. Lenalidomide maintenance after first-line therapy for high-risk chronic lymphocytic leukaemia (CLLM1): final results from a randomised, double-blind, phase 3 study. Lancet Haematol. 2017;4(10):e475-e486.

62. Ghia P, Tam C, Siddiqi T, et al. Ibrutinib Lead-in Followed by Venetoclax in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia: Phase 2 CAPTIVATE Early Safety and Efficacy Results. HemaSphere. 2018;2(S1):351; S806.

63. Hillmen P, Rawstron A, Brock K, et al. Ibrutinib Plus Venetoclax in Relapsed/Refractory CLL: Results of the Bloodwise TAP Clarity Study. Blood, 2018;132(Suppl 1):132.

64. Dimier N, Delmar P, Ward C, et al. A model for predicting effect of treatment on progression-free survival using MMR as a surrogate end point in CLL. Blood. 2018;131(9):955-962.

Parole Chiave

Malattia minima residua, MMR, leucemia linfatica cronica, medicina personalizzata.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare tutti i membri del Laboratorio di Neoplasie Linfoidi B e del Programma di Ricerca Strategica sulla LLC per il prezioso e continuo supporto.

Indirizzi per la corrispondenza

Paolo Ghia
Telefono: +39-0226434797
Fax: +39-0226432611
Email: ghia.paolo@hsr.it

Leucemia linfoblastica acuta dell'età pediatrica



Giovanni Cazzaniga

Clinica Pediatrica e Genetica Medica; Università di Milano Bicocca; Centro Ricerca Tettamanti; Centro Maria Letizia Verga

Introduzione

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) in età pediatrica è una malattia molto eterogenea ed è difficile predire all'esordio di malattia la probabilità di cura [1]. Infatti, molti sono i fattori che determinano la risposta al trattamento nei bambini. Tra questi, la linea cellulare coinvolta (precursori B o T), lo stadio di maturazione, il cariotipo e le anomalie molecolari, così come sono fattori importanti il tipo e dosaggio dei farmaci e la loro interazione, le variabili farmacocinetiche e farmacogenetiche, le caratteristiche complessive, seppur ancora poco decifrate, dell'ospite. I fattori prognostici più utilizzati per la stratificazione dei pazienti nei protocolli clinici orientati dal rischio di recidiva si sono modificati progressivamente negli anni e le caratteristiche generali del paziente all'esordio di malattia (età, genere, numero di globuli bianchi, etc.) sono state progressivamente sostituite dalle caratteristiche biologiche/molecolari e dalla risposta alla terapia.

Il termine malattia minima residua (MMR) è utilizzato per definire il residuo di malattia rilevabile nei pazienti in remissione clinica, al di sotto del limite di rilevamento dei metodi convenzionali disponibili [2]. La possibilità di misurare in vivo la risposta complessiva alle prime fasi di terapia, quale effetto combinato di variabili cliniche e biologiche, fornisce un'informazione diretta sull'efficacia del trattamento in ogni paziente, che può potenzialmente essere usata per ottimizzare il trattamento e sempre più personalizzare la cura. I protocolli pediatrici della leucemia sono stati pionieri nell'utilizzo della MMR, che ha assunto il ruolo più rilevante per la definizione del rischio di ricaduta nelle prime fasi terapeutiche e la conseguente scelta terapeutica.

La metodologia, i tempi e la sensibilità richiesti per il monitoraggio della MMR dipendono principalmente dalla domanda clinica, ma anche dall'esperienza dei laboratori e dalle strutture disponibili [3,4]. Sebbene numerose e nuove tecnologie siano disponibili per il monitoraggio della MMR nella leucemia pediatrica, la standardizzazione e il controllo di qualità sono sempre più necessari per l'applicazione di queste procedure, soprattutto per assicurare risultati riproducibili all'interno di studi internazionali multicentrici e per poter confrontare i risultati di studi clinici diversi [5-9].

Diversi parametri sono fondamentali per l'interpretazione degli studi sulla MMR, compreso il contesto terapeutico, i tempi di campionamento, il gene bersaglio e la sensibilità del saggio PCR, la standardizzazione inter-laboratorio (particolarmente rilevante negli studi multicentrici), la selezione dei pazienti e la natura retrospettiva o prospettica di studio. Il monitoraggio della MMR trova pertanto un impiego clinico in diversi contesti:

- nelle fasi precoci all'esordio di malattia o post-ricaduta, per identificare dalla cinetica di riduzione della malattia i pazienti cui offrire più o meno terapia;
- per identificare in corso di terapia i pazienti con imminente recidiva;
- pre- e post-trapianto per indirizzare modi e tempi degli interventi terapeutici;
- per identificare pazienti con diversa prognosi all'interno di sottogruppi geneticamente omogenei [3,4].

Metodologie e usi clinici della MMR saranno affrontati in questo articolo, con uno sguardo verso le prospettive future, già indirizzate verso la personalizzazione delle terapie.

Metodologie per lo studio della MMR

Per essere efficace nel contesto di protocolli terapeutici e clinicamente rilevante, un saggio MMR deve essere in grado di rilevare e quantificare le cellule leucemiche residue con un alto livello di sensibilità e specificità nella maggior parte dei pazienti, deve essere riproducibile, standardizzato, utilizzare marcatori stabili nel corso della malattia, essere compatibile con i tempi delle decisioni cliniche e possibilmente economico.

La scelta della metodica di MMR dipende pertanto dalla domanda clinica (per tempistica e sensibilità necessaria), dalla disponibilità della metodologia, dalla competenza specifica degli operatori, ma anche dalla logistica dello studio e dei laboratori coinvolti (soprattutto per studi multicentrici).

Attualmente, i metodi più affidabili per studiare la MMR nella LLA sono la citofluorimetria (CFM), cioè l'analisi degli immunofenotipi associati alla leucemia (es. fenotipi aberranti) e il monitoraggio molecolare dei riarrangiamenti dei geni del recettore degli antigeni o dei geni di fusione generati da traslocazioni cro-

mosomiche. Le caratteristiche principali di queste tecniche sono delineate nella Tabella 1.

Monitoraggio molecolare

Il rilevamento molecolare della MMR può essere eseguito mediante amplificazione di geni di fusione derivati da traslocazioni cromosomiche e/o del riarrangiamento dei geni del recettore delle cellule T (TR) e delle immunoglobuline (IG).

PCR quantitativa per monitorare geni di fusione ricorrenti

Mentre i punti di rottura genomici di traslocazioni sono generalmente distribuiti su grandi distanze nel relativo gene, il numero di possibili tipi di trascritti chimerici è solitamente limitato. Pertanto, l'RNA è in generale il materiale di partenza preferito per rilevare queste anomalie genetiche perché consente una semplificazione nei saggi di rilevazione mediante PCR quantitativa (RT-PCR, *reverse transcriptase-PCR*) [5].

I geni di fusione derivati da traslocazioni cromosomiche ricorrenti nella LLA, quali BCR-ABL1, TCF3-PBX1, ETV6-RUNX1, KMT2A-AFF e SIL-TAL1, sono potenzialmente ideali per la valutazione MMR poiché in quanto eventi primari sono specifici delle cellule leucemiche ed estremamente stabili nel corso della malattia [5,10]. Inoltre, avendo per la maggior parte un importante ruolo prognostico, questi eventi vengono necessariamente ricercati alla diagnosi in tutti i pazienti LLA, rendendosi disponibili anche per il monitoraggio nel corso della malattia. Il monitoraggio MMR mediante RT-PCR è più rilevante per l'adulto, nel quale la prevalenza della traslocazione t(9;22) e il conseguente trascritto BCR-ABL1 è molto più elevata [11]. Per questo motivo, il Consorzio Europeo EuroMRD ha predisposto linee guida specifiche per la corretta interpretazione dei dati di RT-PCR quantitativa [12].

Ci sono tuttavia molte limitazioni all'uso di questi trascritti come marcatori di MMR. Infatti, tali anomalie sono distribuite in modo eterogeneo in adulti e bambini con LLA e comunque presenti in una percentuale limitata di pazienti [3,4]. Inoltre, non in tutti i protocolli vengono rilevati con tecniche molecolari che consentano sufficiente sensibilità. Anche l'isolamento e la conservazione dell'RNA sono in alcuni contesti problematici e possono ostacolare la riproducibilità dei risultati MMR tra diversi laboratori. Di maggiore rilievo è il rischio di interpretare erroneamente i livelli di positività in quanto la variabilità dell'espressione genica non consente che ci sia un rapporto lineare tra numero di cellule e livelli di trascrizione; non è possibile pertanto distinguere tra la presenza di poche cellule con elevati livelli di trascrizione verso un numero maggiore di cellule che esprimono meno lo stesso trascritto [13]. Per finire, questi trascritti di fusione relativi ad eventi primari non sono solo presenti e stabili in tutte le cellule leucemiche, ma anche nelle popolazioni cellulari pre-leucemiche, o addirittura in linee cellulari più immature, con significato prognostico non ancora definito [14]. Tutto ciò costituisce un'importante limitazione della valutazione MMR basata sui trascritti di geni di fusione, che richiede particolare attenzione nelle rilevazioni di laboratorio e nell'utilizzo clinico e di fatto ha visto ridurre il suo utilizzo nella pratica clinica. In alternativa, nei pazienti che presentano traslocazioni cromosomiche, il test MMR può essere eseguito su DNA dopo aver determinato la sequenza del punto di rottura genomico da utilizzare come marcatore molecolare [15-17].

Tale approccio è utilizzato da tempo nel contesto pediatrico, per i bambini di età inferiore a un anno al momento della diagnosi di LLA (*Infant*), con riarrangiamento del gene KMT2A [18]. In questi casi viene identificata la sequenza di DNA del punto di rottura specifico per ogni paziente in un laboratorio specializzato [17,19]. Questo approccio è particolarmente importante in questa popolazione perché la cellula di origine è immatura e i riarrangiamenti

Metodo	Marcatore	Applicabilità	Sensibilità	Vantaggi	Svantaggi
Citofluorimetria	Immunofenotipi leucemia-associati	≥95%	10^{-4}	Universale, rapida, quantificazione accurata e diretta	Operatore-dipendente, richiede ulteriore standardizzazione
PCR Quantitativa (RQ-PCR)	Trascritti di fusione (RNA)	40%	10^{-4}	Rapida; identifica il clone leucemico	Quantificazione incerta, non del tutto standardizzata, potenziali falsi-positivi dovuti ai cloni pre-leucemici o di *lineage* non patologico
	Breakpoint genomici di geni di fusione (DNA)	40%	$10^{-4}/10^{-5}$	Stabile; identifica il clone leucemico	Laboriosa, potenziali falsi-positivi dovuti ai cloni pre-leucemici o di *lineage* non patologico
	Riarrangiamenti somatici di IG/TR	90–95%	10^{-5}	Universale e standardizzata, molto sensibile, quantificazione relativa accurata	Laboriosa, richiede personale esperto e centri specializzati, rischio di falsi-negativi per oligoclonalità ed evoluzione clonale

***Tabella 1** - Principali caratteristiche e applicabilità delle tecniche principali per il monitoraggio della MMR nella LLA pediatrica*

dei geni IG/TR sono in molti casi oligoclonali e non abbastanza stabili per la valutazione della MMR. Questa metodologia può essere utilizzata anche in altri contesti, ad esempio in circa il 20% di pazienti con T-LLA con delezione SCL/TAL1, generata da punti di rottura ricorrenti e di facile rilevazione [20].

Di maggiore interesse la possibilità di monitorare i pazienti t(9;22) positivi con questo approccio, che potrebbe ovviare ai problemi elencati relativi al monitoraggio dell'RNA e meglio discriminare la rilevanza clinica del monitoraggio MMR con BCR/ABL1 [17]. Tuttavia, l'approccio sperimentale per determinare con successo la sequenza del punto di rottura genomico, paziente-specifico, richiede un'elevata competenza che ad oggi pochi laboratori specializzati possono garantire.

Monitoraggio del riarrangiamento dei geni del recettore delle cellule T e delle immunoglobuline

A differenza dei geni di fusione generati da traslocazioni cromosomiche, i riarrangiamenti dei geni IG/TR sono eventi fisiologici, non direttamente collegati alla patogenesi della leucemia. I geni IG e TR sono composti da diversi segmenti, vale a dire le regioni V (*variable*), D (*diversity*) e J (*junction*), che subiscono riarrangiamento somatico durante le prime fasi della maturazione dei linfociti B e T [2,21] (Figura 1A). Durante questo processo, la delezione e l'inserzione casuali di nucleotidi nelle giunzioni dei segmenti, note come *inserzioni di regioni N*, rendono la sequenza di DNA dei geni IG e TR riarrangiati univoca per ciascun linfocita maturo di ogni paziente [30].

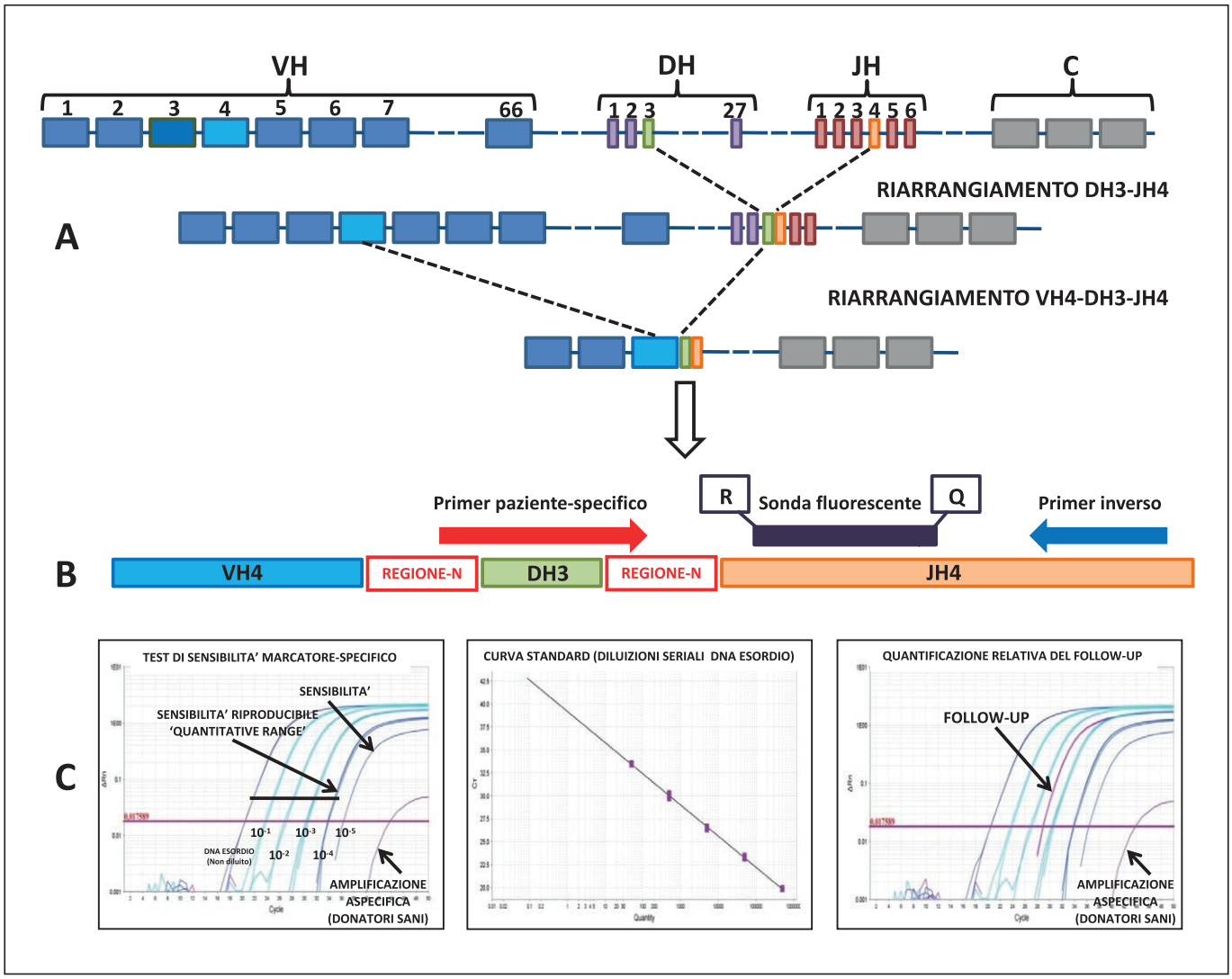


***Figura 1** - **A.** Schema di un esempio di riarrangiamento del gene IGH, che avviene in due tempi: prima riarrangiano le regioni D e J, poi la regione V riarrangia con DJ. La sequenza VDJ avrà regioni giunzionali altamente diversificate, dovute ad inserzioni di nucleotidi (REGIONE N) e delezioni. **B.** La specificità della reazione di PCR quantitativa (RQ-PCR) è conferita da un oligonucleotide primer paziente- e marcatore-specifico disegnato in modo da essere complementare alla regione di giunzione. La combinazione con una sonda fluorescente e un oligonucleotide primer inverso, disegnati sulle regioni germinali costanti, permette di rilevare poche cellule leucemiche anche in un numero elevato di cellule linfoidi normali, in remissione di malattia. **C.** L'amplificazione dal DNA di un aspirato midollare che si vuole valutare viene confrontata con diluizioni seriali del campione di DNA dell'esordio, utilizzato per una quantificazione relativa. Le linee guida EuroMRD vengono applicate in modo standardizzato in 60 laboratori di tutto il mondo, per ottenere risultati di MMR riproducibili e standardizzati.*

Poiché le cellule di LLA provengono da un singolo precursore linfoide trasformato, tutte le cellule leucemiche contengono lo stesso gene clonale IG e/o TR riarrangiato, che può essere pertanto utilizzato per l'analisi di clonalità, indicativa di proliferazione clonale in malattie linfoproliferative.

Lo stesso riarrangiamento IG/TR può essere utilizzato per il monitoraggio MMR, poiché la sua specificità consente un'elevata sensibilità, cioè permette di rilevare la presenza di poche cellule LLA in un gran numero di cellule linfoidi normali che esprimono riarrangiamenti genici con sequenze diverse. Coerentemente, i riarrangiamenti IG (cioè IGH completo e incompleto, IGK e IGL) sono più frequentemente rilevati e utilizzati come marcatori MMR in LLA con precursori delle cellule B (BCP-LLA), mentre i riarrangiamenti TR (cioè TRA, TRB, TRG e TRD) si trovano generalmente in T-LLA. Ciononostante, sia la cellula leucemica che la linea leucemica di linea T possono avere i riarrangiamenti reciproci [22,23].

La procedura di analisi prevede l'amplificazione di queste regioni di riarrangiamento somatico altamente variabili, la verifica di clonalità mediante analisi di omo-eteroduplex o genescan [24,25], la sequenza per definire le regioni giunzionali e disegnare oligonucleotidi primer allele specifici (*allele specific oligonucleotides*, ASO) complementari [21] (Figura 1B). La conseguente analisi di PCR quantitativa (Q-PCR) con sonde fluorescenti consente di rilevare fino a una cellula leucemica in 100.000 cellule linfoidi normali in condizioni ottimali [26]. Nel complesso, questo approccio MMR è certamente più complesso di altri e richiede una vasta conoscenza molecolare e di immunogenetica e una lunga esperienza [3,4,27]. Tuttavia, grazie alla lunga attività del Consorzio EuroMRD (www.euromrd.org), nato e mantenuto dall'attività volontaria di laboratori esperti, questo approccio è diventato il più controllato e standardizzato [7]. L'attività educazionale, la standardizzazione e il controllo di qualità, la produzione di linee guida per l'interpretazione dei dati di Q-PCR (Figura 1C), prodotte e mantenute dal Consorzio assicurano la riproducibilità degli esperimenti MMR in tutti i laboratori affiliati, requisito essenziale per consentire la possibilità di confronto di dati MMR anche generati da protocolli clinici diversi.

Fra le limitazioni associate a questa metodologia MMR è necessario indicare la piccola percentuale di pazienti con LLA per i quali non è possibile identificare riarrangiamenti di IG/TR (circa 5%). Il motivo di questo insuccesso può essere dovuto alla natura molto poco differenziata della leucemia (prima del riarrangiamento di IG/TR), oppure a possibili limiti tecnici che impediscono il monitoraggio MMR. Un altro limite di questo approccio è rappresentato dai possibili risultati MMR falsi negativi dovuti all'evoluzione clonale dei pattern di riarrangiamento IG/TR nel corso della malattia e alla recidiva, soprattutto in tempi lontani dalla diagnosi [28,29]. La quantità di DNA diagnostico è un altro fattore potenzialmente limitante per questo tipo di valutazione MMR, poiché il DNA dalla diagnosi iniziale è necessario per la quantificazione relativa (tramite curve di diluizione) in ogni esperimento MMR.

Monitoraggio mediante citofluorimetria

Le cellule di LLA hanno caratteristiche immunofenotipiche che le distinguono da cellule di midollo osseo normale e di sangue periferico [30]. Il potenziale della citofluorimetria (CFM) risiede nella sua capacità di rilevare contemporaneamente più parametri di espressione antigenica e in un numero elevato di celle, rendendolo particolarmente adatto per monitorare la MMR. Nella leucemia a cellule T, il compito principale della CFM consiste nell'identificare cellule con caratteristiche immunofenotipiche di cellule T immature, solitamente non presenti nei campioni normali. Invece, nelle LLA a precursori B è necessario riconoscere marcatori cellulari espressi in modo aberrante durante la leucemogenesi [31-34], sulla base dello specifico fenotipo identificato alla diagnosi. È altresì possibile monitorare la MMR anche in campioni di follow up senza previa conoscenza dell'immunofenotipo iniziale delle cellule leucemiche, ma è necessario utilizzare un pannello molto più ampio di combinazioni di anticorpi [35].

Immunofenotipi aberranti possono essere identificati nella quasi totalità dei pazienti [36]; tuttavia, le differenze tra cellule normali e di leucemia sono spesso poco evidenti e la loro distinzione richiede molta esperienza da parte dell'operatore. Per aumentare la differenza immunofenotipica tra i due tipi di cellula e quindi la probabilità di riconoscerle, è necessario espandere l'approccio multidimensionale all'analisi dei dati MMR, sfruttando le capacità continuamente in evoluzione degli strumenti. Le tecniche di CFM per la MMR utilizzano prevalentemente 6-8 colori per la caratterizzazione immunofenotipica della leucemia; i continui avanzamenti dell'algoritmo e dei metodi per analizzare dati complessi dovrebbero ulteriormente facilitare l'analisi dei dati MMR e favorire approcci standardizzati [37]. Infatti, anche per la CFM è necessario procedere verso la standardizzazione dei protocolli per il rilevamento della MMR in LLA, ad oggi ancora non ottimale. Diverse iniziative sono state intraprese in questa direzione, soprattutto da parte di Consorzi Europei. I laboratori di riferimento per lo studio clinico AIEOP-BFM ALL2000 hanno affrontato diversi problemi tecnici, tra cui l'armonizzazione metodologica nella preparazione del campione, la selezione dei reagenti e l'impostazione degli strumenti, il monitoraggio della qualità intra- e inter-laboratorio, oltre che la formazione specifica del personale rispetto all'interpretazione dei dati [38], ottenendo risultati altamente concordanti. Una simile ottimizzazione è stata perseguita ed ottenuta da altri gruppi [39,40]. I risultati recentemente riportati dal gruppo EuroFlow dovrebbero contribuire in modo importante alla standardizzazione della CFM e avere un impatto positivo sui protocolli di MMR [41].

Citofluorimetria e/o analisi molecolare?

Diversi studi hanno confrontato le stime di MMR ottenute da CFM e PCR applicati sugli stessi casi [vedi commenti in ref.42]. In generale, considerando il limite di sensibilità di 1/10.000 la concordanza è stata superiore al 90%. La maggior parte delle discrepanze sono dovute a casi negativi per CFM e positivi per PCR che si verificano ai livelli più bassi di MMR e possono es-

sere spiegati da diversi fattori, quali un'amplificazione non specifica di DNA (falsi positivi per PCR), variazioni nella raccolta del campione, oligoclonalità e/o evoluzione clonale, rigenerazione dei precursori delle cellule B del midollo osseo (falsi positivi per CFM) soprattutto in tempi precoci dopo le terapie di induzione, cambiamenti immunofenotipici tra diagnosi e recidiva o modulazione immunofenotipica indotta da farmaci.
Complessivamente, la scelta del metodo MMR da utilizzare dipende principalmente dall'esperienza e dalle risorse disponibili e dal tipo di progettazione dello studio clinico. Ad esempio, se la strategia di assegnazione del rischio deve essere basata su valutazioni precoci di risposta al trattamento, ad esempio al giorno +15 [43], la CFM è preferibile alla PCR che richiede un tempo tecnico maggiore; al contrario, se si vogliono identificare pazienti con ottima risposta precoce cui offrire una riduzione di terapia [44], il monitoraggio IG/TR per PCR, eseguito in un centro esperto, garantisce una maggiore sensibilità.

Impatto clinico della MMR

Nel considerare l'impatto clinico della MMR è necessario puntualizzare alcuni principi. In primo luogo, l'interpretazione della MMR è strettamente dipendente sia dal tipo di protocollo terapeutico che dai tempi di valutazione. Inoltre, il significato della MMR non può essere estrapolato da un protocollo all'altro, ma piuttosto il suo impatto clinico dovrebbe essere valutato in un'analisi retrospettiva nelle stesse condizioni terapeutiche. In terzo luogo, deve essere considerata la domanda clinica specifica e di conseguenza la sensibilità metodologica necessaria, ad esempio è necessaria un'elevata sensibilità per evitare risultati falsi negativi quando lo scopo è la riduzione della terapia. Anche l'interpretazione dei risultati deve essere ponderata, per evitare ad esempio di eseguire interventi clinici, potenzialmente tossici, sulla base di risultati MMR falsi positivi o di incerto significato clinico. Infine, l'intero processo, compresa la logistica, deve essere convalidato e standardizzato, in particolare quando più centri eseguono le analisi per uno studio multicentrico.

Valutazione della MMR in terapie di prima linea

La valutazione MMR durante e dopo la terapia di induzione è il principale fattore prognostico nella LLA di nuova diagnosi, che ridimensiona l'impatto di altri parametri clinici e biologici precedentemente considerati [45-50]. La MMR infatti corrisponde alla valutazione effettiva della risposta specifica del paziente alla chemioterapia, quale risultante comprensiva di tutte le possibili variabili (genetiche, epigenetiche, farmacologiche e farmacogenetiche, …).
Sia l'impatto prognostico sfavorevole di livelli elevati di MMR (≥1E-03) alla fine della fase di induzione che l'esito favorevole per pazienti con una risposta rapida alla terapia sono stati inizialmente dimostrati nei pazienti pediatrici con BCP-LLA arruolati nel protocollo AIEOP-BFM-ALL2000 [48] così come in pazienti T-LLA, sebbene con cinetiche diverse [49]. I risultati di questo studio sono stati fondamentali per procedere al continuo affinamento della stratificazione dei pazienti basata su MMR e criteri biologici, per migliorare ulteriormente l'esito complessivo della LLA pediatrica.
In particolare, l'impatto della MMR mantiene il proprio significato anche in sottogruppi di pazienti con caratteristiche prognostiche già note [48,49]. Ciò vale per pazienti con prognosi favorevole, quali i portatori del gene di fusione ETV6-RUNX1 o con elevata iperdiploidia (> 50 cromosomi), per i quali la valutazione MMR negativa molto precoce potrebbe identificare sottogruppi con un rischio cumulativo estremamente basso di recidiva, in cui sia razionale ridurre la terapia per migliorare la qualità della vita [48]. L'impatto prognostico della MMR è però valido anche in sottogruppi generalmente a prognosi sfavorevole, quali i portatori del trascritto di fusione BCR/ABL arruolati al protocollo specifico EsPhALL [51]. Complessivamente, l'informazione combinata della MMR e di altre caratteristiche prognostiche rappresentano un punto di riferimento per la stesura di futuri protocolli clinici.
Un obiettivo diverso è stato perseguito dallo studio ALL10 del gruppo olandese di oncologia pediatrica, nel quale è stata applicata una riduzione significativa della terapia ai soli pazienti a rischio molto basso di ricaduta, con livelli di MMR non rilevabili nonostante l'uso di test molto sensibili [43], con l'obiettivo di evitare ad un maggior numero di pazienti gli effetti collaterali dovuti alla chemioterapia ad alte dosi. In questo contesto, la precisione temporale delle valutazioni e l'appropriatezza metodologica della valutazione MMR mediante PCR sono ancora più rilevanti [44].
Nell'ambito del protocollo clinico concluso AIEOP-BFM ALL2000, il gruppo italiano ha dimostrato che la misurazione della MMR mediante CFM al giorno +15 dalla diagnosi ha un forte impatto prognostico [43]. Anche considerando l'impatto della valutazione molecolare a tempi successivi, alti livelli di MMR misurata per CFM al giorno +15 mantenevano una capacità indipendente di rilevare un rischio significativamente più alto di recidiva. Pertanto, tale parametro, applicabile alla quasi totalità dei pazienti, è stato introdotto nei protocolli clinici successivi ad integrare la stratificazione basata sulla MMR molecolare, consentendo in tal modo una definizione più precisa e personalizzata del rischio.

Valutazione della MMR in pazienti recidivati

La MMR ha un ruolo prognostico rilevante per le scelte terapeutiche successive alla ricaduta di LLA [52], anche se in questo caso i valori soglia significativi ed i tempi di valutazione sono diversi rispetto alla prima linea. Inoltre, in questo contesto la MMR viene utilizzata principalmente per identificare meglio i pazienti più idonei per il trapianto allogenico, sempre con l'obiettivo di riservare tale scelta ad un numero limitato di casi. Inoltre, l'informazione combinata di MMR in base al sito e al tempo di recidiva migliora ulteriormente la classificazione delle ricadute ed il conseguente approccio terapeutico [53].
La maggiore sensibilità della valutazione molecolare della MMR rispetto alla valutazione morfologica ha altresì permesso di assegnare una rilevanza prognostica al coinvolgimento midollare submicroscopico nei casi di ricaduta extramidollare apparentemente isolata [54]. Inoltre, l'analisi della MMR alla ricaduta ha fatto emergere la rilevanza del monitoraggio di più marcatori clonali fin dall'esordio di malattia, per ridurre l'eventualità di falsi negativi dovuti alla perdita

o all'evoluzione clonale dei marcatori identificati [14,55]. Particolare attenzione deve essere riservata a casi con marcata oligoclonalità, poiché la ricaduta di malattia potrebbe rappresentare un'evoluzione del clone pre-leucemico e non il riemergere del clone dell'esordio [14].

Impatto prognostico della MMR pre- e post-trapianto

La MMR pre-HSCT si è dimostrato anche l'unico fattore prognostico indipendente per la predizione di eventi avversi gravi dopo HSCT [56 e commenti in ref. 57]. Tale risultato ha comportato la necessità di perseguire la riduzione terapeutica della MMR prima di sottoporre il paziente a trapianto e il suo conseguente stretto monitoraggio. Anche il livello di MMR a diversi tempi dopo HSCT è correlato con l'incidenza cumulativa di recidiva [58 e commenti in ref. 57], con la conseguenza che la MMR dopo l'HSCT può essere utilizzata per la diagnosi precoce di recidive imminenti e quindi per guidare la terapia preventiva, attraverso ad esempio la riduzione dell'immunosoppressione o l'infusione di linfociti del donatore (DLI). Dal punto di vista metodologico, in questo specifico contesto di elevata rigenerazione del midollo osseo, il principale problema riguarda la possibilità di amplificazioni non specifiche (falsi positivi) mediante valutazione PCR di IG/TR [59,60]. Nuove metodologie sono necessarie per ovviare a questo problema, che al momento richiede la cautela di considerare solo livelli quantificabili di malattia per giustificare terapie aggiuntive quali la sospensione dell'immunosoppressione o DLI, che hanno il rischio associato di possibili complicanze quali la malattia acuta e cronica del trapianto verso l'ospite [57].

Potenziale impatto prognostico della MMR post-induzione

L'elevato valore predittivo del monitoraggio della MMR alla fine dell'induzione e il poco frequente riscontro di positività nei prelievi successivi hanno a lungo sfavorito l'interesse per il monitoraggio sistemico della MMR dopo la terapia di consolidamento dell'induzione, considerato non conveniente. Inoltre, l'esperienza di intensificazione del trattamento nella bassa quota di pazienti MMR positivi a uno e due anni dalla diagnosi, portò ad un risultato non soddisfacente [61,62], sconsigliando pertanto il monitoraggio sistematico della MMR. Tuttavia, lo studio recente del gruppo italiano che ha esplorato l'analisi prospettica della MMR a tempi tardivi ha portato risultati fortemente predittivi, sia in senso positivo che negativo, pur in una casistica limitata, con una soglia significativa a livelli di MMR di $5x10^{-4}$ [63]. Questi risultati sono in linea con i risultati ottenuti nello studio tedesco multicentrico per il trattamento della LLA dell'adulto [64]. Una possibile applicazione potrebbe essere considerata non tanto nei pazienti che hanno raggiunto la negatività MMR entro la fine della terapia di induzione, quanto nei pazienti a rischio intermedio, che contribuiscono in numero assoluto al maggior numero di ricadute e nel caso di persistenza di MMR o di ripositivizzazione potrebbero avere un vantaggio da un intervento precoce. Due terzi dei casi positivi sono stati identificati entro 4 mesi dalla terapia di induzione, suggerendo questa tempistica per il monitoraggio efficace della MMR. È tuttavia necessario considerare diversi aspetti, sia metodologici ed economici (il monitoraggio sistematico della MMR implica un importante investimento di risorse) che un importante carico psicologico su pazienti e famiglie.

Questioni aperte e possibili soluzioni

Nuova definizione di remissione e prevenzione di ricadute imminenti

Il monitoraggio sensibile della MMR e la sua rilevanza clinica mettono in discussione il concetto di remissione, attualmente definito secondo la valutazione morfologica e riferito a meno del 5% di cellule leucemiche. È ormai acquisito il concetto che i pazienti che raggiungono la remissione molecolare (variamente definita a livelli che possono raggiungere lo 0,01% di cellule leucemiche residue alla fine della terapia di induzione) hanno un risultato clinico migliore rispetto ai pazienti la cui remissione è definita esclusivamente da criteri morfologici (<5%) [65]. Pertanto, si è aperta la discussione tra gli specialisti sull'opportunità di ridefinire il concetto di remissione, basandolo sulla valutazione della MMR. Precursori di una possibile modifica sono i protocolli pediatrici al St. Jude Children Hospital (Memphis, USA), guidati dal monitoraggio prospettico della MMR post-induzione [66,67].

Certamente è molto importante concordare una terminologia comune per la descrizione della risposta MMR e del monitoraggio, definendo i corrispettivi in inglese dei concetti di risposta MMR completa, persistenza di MMR e ricomparsa di MMR. Anche la terminologia contribuisce alla valutazione precisa e standardizzata della risposta al trattamento nella LLA dell'adulto e del bambino e fornisce una base solida per il confronto dei risultati della MMR tra diversi protocolli di trattamento [68].

Nuove tecnologie per il monitoraggio della MMR

Certamente la PCR quantitativa rappresenta lo standard per la valutazione della MMR, anche grazie allo sforzo continuo di controllo di qualità e standardizzazione. Tuttavia, nuove tecnologie emergenti possono essere molto utili per risolvere alcune problematiche, quali ad esempio la quantità relativamente elevata di DNA diagnostico necessario e il rischio di amplificazione non specifica a bassi livelli di MMR.

La tecnica di *droplet digital PCR* (ddPCR), che si basa sulla compartimentazione del campione in goccioline di olio dove avvengono reazioni di PCR indipendenti, ha il vantaggio di fornire una quantificazione assoluta, senza la necessità di una curva standard [69,70], quindi riducendo la necessità di DNA, anche con un potenziale di riduzione di costi. Le prime analisi di confronto tra RQ-PCR e ddPCR sono molto promettenti in questo senso. Mancano ancora linee guida concordate per affermare che la ddPCR possa essere un metodo alternativo per il monitoraggio molecolare della MMR.

L'applicazione del sequenziamento di nuova generazione (NGS) è l'altra metodologia emergente basata sul monitoraggio dei riarrangiamenti IG/TR per la valutazione molecolare della MMR. Questo metodologia, se non più sensibile (la sensibilità dipende dalla quantità di DNA testato), può essere più specifica e risolvere i problemi di possibili falsi positivi, soprattutto problematici nelle valutazioni MMR post-trapianto [71-74]. Un altro importante vantaggio della MMR mediante NGS, applicata in modo esteso in ogni campione monitorato [75], è la possibilità di rilevare precocemente l'evoluzione clonale, un evento relativamente frequente nella LLA [29, 55].

Se da una parte anche questa nuova metodologia richiede l'opportuna standardizzazione e linee guida concordate e verificate prima di un appropriato utilizzo clinico, può già essere utilizzata come metodo alternativo, rapido ed efficiente per identificare i marcatori clonali IG/TR all'esordio di malattia, risolvendo in tal modo una procedura lunga e costosa [76,77]. Il Consorzio Euroclonality-NGS (www.euroclonality.org) è impegnato nell'opportuno percorso di qualità per rendere accessibile questa tecnologia alla routine di laboratorio.

Anche la CFM di nuova generazione ha grandi prospettive di utilizzo per il monitoraggio della MMR. Il consorzio EuroFlow (www.euroflow.org) ha introdotto nuovi approcci standardizzati di analisi multivariata (es. analisi di componenti principali) combinati con lo sviluppo di nuove combinazioni di anticorpi e una diversa elaborazione del campione cellulare per avere un maggior numero di cellule analizzate e maggiore sensibilità. Con la diffusione nei laboratori diagnostici di citometri a 8 e 10 colori sarà possibile ampliare i pannelli diagnostici, con una migliore applicabilità e maggiore specificità delle misurazioni [41].

La Tabella 2 riassume le principali caratteristiche delle nuove metodologie per il monitoraggio della MMR.

Valutazione della MMR come endpoint surrogato

Sebbene la MMR sia il fattore prognostico più rilevante per la valutazione della probabilità di sopravvivenza libera da eventi (EFS) in LLA e pertanto usata abitualmente per valutare la risposta al trattamento e stratificare i pazienti, rimane ancora da determinare formalmente se la risposta MMR precoce sia un endpoint surrogato accurato per la sopravvivenza quando si valuta l'efficacia del trattamento. Questo è un aspetto molto rilevante in quanto, se confermato, permetterebbe di facilitare la valutazione dell'efficacia di nuovi farmaci molto più precocemente (fine induzione o stop terapia?) rispetto ad endpoint tradizionali (3-5 anni dopo lo stop terapia). Tuttavia, a titolo esemplificativo, nella metanalisi dei dati individuali di due ampi studi di fase III per bambini con LLA (con una domanda randomizzata sul tipo di steroidi in induzione) [78,79], la MMR è risultata essere uno scarso surrogato dell'EFS, nonostante l'analisi abbia confermato l'associazione altamente significativa tra i livelli di MMR a fine induzione e l'EFS per i singoli pazienti, indipendentemente dal trattamento, confermandone l'effetto prognostico [80]. Questo studio mostra, per la prima volta, la limitazione di un forte fattore prognostico nell'essere anche un surrogato efficace. La complessità e l'intensità della terapia successiva alla valutazione MMR, anche perché in parte adattata in base alla MMR stessa, può diluire il potenziale ruolo di surrogato. Questa valutazione suggerisce che i medici e le agenzie regolative (FDA, EMA) dovrebbero essere cauti nell'approvare la risposta MMR precoce come endpoint surrogato precoce di EFS per valutare l'effetto di un trattamento randomizzato a lungo termine nel contesto di una terapia complessa.

Conclusioni

La valutazione della MMR è il principale fattore prognostico sia per pazienti pediatrici che adulti con LLA e può essere utilizzata per guidare scelte terapeutiche efficaci sia alla diagnosi che alla recidiva di malattia, così come per guidare decisioni terapeutiche prima e dopo trapianto di midollo.

La PCR quantitativa è ancora l'unico riferimento standardizzato per la valutazione di MMR, nonostante nuove tecnologie emergenti e grandi progressi della citofluorimetria possano offrire alternative efficaci o essere complementari per un continuo progresso.

Nei prossimi anni, il monitoraggio della MMR dovrà essere integrato con le informazioni genetiche complesse che vengono continuamente generate, dando luogo a protocolli sempre più personalizzati. Questa tendenza necessariamente definirà sottogruppi

Metodo	Quantificazione	Applicabilità	Sensibilità	Vantaggi	Svantaggi	Network di sviluppo
Citofluorimetria avanzata	Assoluta	>95%	10^{-5}	Molto sensibile, rapida, analisi di sottopopolazioni cellulari	Applicabilità limitata (bassa diffusione), standardizzazione limitata, costosa (in ribasso), analisi bioinformatica complessa	Euroflow
Droplet digital PCR di IG/TR	Assoluta	90-95%	$10^{-4}/10^{-5}$	Molto sensibile, semplice analisi dei dati, basso consumo DNA diagnostico	Applicabilità limitata (bassa diffusione), standardizzazione limitata, paziente specifica (ASO primers)	EuroMRD
Next Generation Sequencing di IG/TR	Assoluta	>95%	10^{-5}	Molto sensibile, altamente specifica, possibile identificare oligoclonalità ed evoluzione clonale, basso consumo DNA diagnostico, non paziente-specifica	Applicabilità limitata (bassa diffusione), standardizzazione limitata, costosa (in ribasso), analisi bioinformatica complessa	Euroclonality-NGS

***Tabella 2** - Caratteristiche delle nuove metodologie di analisi della MMR*

di pazienti multipli, ciascuno con un numero limitato di casi, rendendo necessari nuovi metodi statistici per un'accurata analisi dei risultati, per stabilire se la MMR sia effettivamente un buon marcatore surrogato per lo sviluppo di nuovi farmaci e per valutare l'effettivo progresso verso la cura di questa malattia.
È anche ipotizzabile che la definizione di ricaduta molecolare basata sulla MMR sostituisca le abitudini correnti. In questo scenario, sarà fondamentale accertare se interventi precoci possano effettivamente migliorare i risultati di sopravvivenza dei pazienti. Le valutazioni prospettiche della MMR post-induzione, anche grazie ai nuovi metodi molecolari nel frattempo ottimizzati, aumenteranno ulteriormente la possibilità di prevenire ricadute imminenti e potenzialmente migliorare l'esito generale. A causa delle numerose sfide tecniche, è altamente raccomandato che le valutazioni della MMR con tecniche sempre più sofisticate debbano essere effettuate esclusivamente in centri esperti selezionati, qualificati e controllati.

Bibliografia

1. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. N Engl J Med. 2015;373(16):1541-2.
2. Szczepański T, Orfão A, van der Velden VH, et al. Minimal residual disease in leukaemia patients. Lancet Oncol. 2001;2(7):409-17.
3. Cazzaniga G, Gaipa G, Rossi V, et al. Minimal residual disease as a surrogate marker for risk assignment to ALL patients. Rev Clin Exp Hematol. 2003;7(3):292-323.
4. Nunes V, Cazzaniga G, Biondi A. An update on PCR use for minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia. Expert Rev Mol Diagn. 2017;17(11):953-63.
5. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia 2003;17(12):2318-57.
6. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17(6):1013-34.
7. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al.; European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. Leukemia. 2007;21(4):604-11.
8. van der Velden VH, Panzer-Grümayer ER, Cazzaniga G, et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. Leukemia. 2007;21(4):706-13.
9. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, et al. International BFM Study Group (I-BFM-SG). Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2008;22(4):771-82.
10. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia. 1999;13(12):1901-28.
11. Chiaretti S, Vitale A, Cazzaniga G, et al. Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. Haematologica. 2013;98(11):1702-10.
12. Pfeifer H, Cazzaniga G, van der Velden VHJ, et al. Standardisation and consensus guidelines for minimal residual disease assessment in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+LLA) by real-time quantitative reverse transcriptase PCR of e1a2 BCR-ABL1. Leukemia. 2019 Mar 11. doi: 10.1038/s41375-019-0413-0.
13. Metzler M, Mann G, Monschein U, et al. Minimal residual disease analysis in children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of Ig/TCR rearrangements and the genomic fusion gene. Haematologica. 2006;91(5):683-6.
14. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. Science. 2008;322(5906):1377-80.
15. Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. Leukemia. 2006;20(3):451-7.
16. Score J, Calasanz MJ, Ottman O, et al. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. Leukemia. 2010;24(10):1742-50.
17. Hovorkova L, Zaliova M, Venn NC, et al. Monitoring of childhood ALL using BCR-ABL1 genomic breakpoints identifies a subgroup with CML-like biology. Blood. 2017;129(20):2771-2781.
18. Van der Velden VH, Corral L, Valsecchi MG, et al. Interfant-99 Study Group. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. Leukemia. 2009;23(6):1073-9.
19. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. Leukemia. 2018;32(2):273-84.
20. D'Angiò M, Valsecchi MG, Testi AM, et al. Clinical features and outcome of SIL/TAL1-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: a 10-year experience of the AIEOP group. Haematologica. 2015;100(1):e10-3.
21. Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. Haematologica. 2005;90(3):382-90.
22. Szczepański T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, et al. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. Leukemia. 1999;13(2):196-205.
23. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003;17(12):2257-317.
24. Langerak AW, Szczepański T, van der Burg M, et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. Leukemia. 1997;11(12):2192-9.
25. Germano G, del Giudice L, Palatron S, et al. Clonality profile in relapsed precursor-B-ALL children by GeneScan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease monitoring. Leukemia. 2003;17(8):1573-82.
26. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2000;14(8):1426-35.
27. van der Velden VH, Noordijk R, Brussee M, et al. Minimal residual disease

diagnostics in acute lymphoblastic leukaemia: impact of primer characteristics and size of junctional regions. Br J Haematol. 2014;164(3):451-3.

28. Szczepański T, van der Velden VH, Raff T, et al. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL. Leukemia. 2003;17(11):2149-56.
29. Szczepański T, Willemse MJ, Brinkhof B, et al. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. Blood. 2002;99(7):2315-23.
30. Bradstock KF, Janossy G, Tidman N, et al. Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. Leuk Res. 1981;5(4-5):301-9.
31. Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, et al. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1988;72(1):299–307.
32. Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: A frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B- ALL. Leukemia. 1999;13(3):419-27.
33. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. Cytometry. 1999;38(4):139-52.
34. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol.1998;16(12):3774-81.
35. Wells DA, Sale GE, Shulman HM, et al. Multidimensional flow cytometry of marrow can differentiate leukemic from normal lymphoblasts and myeloblasts after chemotherapy and bone marrow transplantation. Am J Clin Pathol. 1998;110(1):84-94.
36. Pui CH, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. N Engl J Med. 2009;360(26):2730-41.
37. Pierzchalski A, Mittag A, Tarnok A. Methods in cell biology, Introduction A: Recent advances in cytometry instrumentation, probes, and methods-review. Methods Cell Biol. 2011;102:1-21.
38. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. Cytometry B Clin Cytom. 2008;74(6):331-40.
39. Bjorklund E, Matinlauri I, Tierens A, et al. Quality control of flow cytometry data analysis for evaluation of minimal residual disease in bone marrow from acute leukemia patients during treatment. J Pediatr Hematol Oncol. 2009;31(6):406-15.
40. Irving J, Jesson J, Virgo P, et al; UKALL Flow MRD Group; UK MRD steering Group. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. Haematologica. 2009;94(6):870-4.
41. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2017;129(3):347-57.
42. Gaipa G, Basso G, Biondi A, et al. Detection of Minimal Residual Disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. Cytometry B Clin Cytom. 2013;84(6):359-69.
43. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. J Clin Oncol. 2009;27(31):5168-74.
44. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, et al. Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. J Clin Oncol. 2016;34(22):2591-601.
45. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med. 1998;339(9):591-8.
46. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet. 1998;352(9142):1731-8.
47. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. Blood. 2008;111(12):5477-85.
48. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. Blood. 2010;115(16):3206-14.
49. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. Blood. 2011;118(8):2077-84.
50. Roberts KG, Pei D, Campana D, et al. Outcomes of children with BCR-ABL1–like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease. J Clin Oncol. 2014;32(27):3012-20.
51. Cazzaniga G, De Lorenzo P, Alten J, et al. Predictive value of minimal residual disease in Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib in the European intergroup study of post-induction treatment of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, based on immunoglobulin/T-cell receptor and BCR/ABL1 methodologies. Haematologica. 2018;103(1):107-15.
52. Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2001;358(9289):1239-41.
53. Eckert C, Henze G, Seeger K, et al. Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group. J Clin Oncol. 2013;31(21):2736-42.
54. Hagedorn N, Acquaviva C, Fronkova E, et al. Submicroscopic bone marrow involvement in isolated extramedullary relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: a more precise definition of "isolated" and its possible clinical implications, a collaborative study of the Resistant Disease Committee of the International BFM study group. Blood. 2007;110(12):4022-9.
55. Eckert C, Flohr T, Koehler R, et al. Very early/early relapses of acute lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment. Leukemia. 2011;25(8):1305-13.
56. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, et al. Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1998;92(11):4072-79.
57. Balduzzi A, Di Maio L, Silvestri D, et al. Minimal residual disease before and after transplantation for childhood acute lymphoblastic leukaemia: is there any room for intervention? Br J Haematol. 2014;164(3):396-408.
58. Bader P, Kreyenberg H, von Stackelberg A, et al. Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: results of the ALL-BFM-SCT 2003 trial. J Clin Oncol. 2015;33(11):1275-84.
59. van der Velden VH, Wijkhuijs JM, van Dongen JJ. Non-specific amplification of patient-specific Ig/TCR gene rearrangements depends on the time point during therapy: implications for minimal residual disease monitoring. Leukemia. 2008;22(3):641-4.

60. Fronkova E, Muzikova K, Mejstrikova E, et al. B-cell reconstitution after allogeneic SCT impairs minimal residual disease monitoring in children with ALL. Bone Marrow Transplant. 2008;42(3):187-96.

61. Marshall GM, Haber M, Kwan E, et al. Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2003;21(4):704-9.

62. Aricò M, Conter V, Valsecchi MG, et al. Importance of minimal residual disease testing during the second year of disease: Still no answer? J Clin Oncol. 2003;21(23):4463-4464.

63. Paganin M, Fabbri G, Conter V, et al. Postinduction minimal residual disease monitoring by polymerase chain reaction in children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2014;32(31):3553-8.

64. Raff T, Gökbuget N, Lüschen S, et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: Data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. Blood 2007;109(3):910-15.

65. Pui CH, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2000;14(5):783-5.

66. Pui CH, Pei D, Coustan-Smith E, et al. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. Lancet Oncol. 2015;16(4):465-74.

67. Campana D, Pui CD. Minimal residual disease–guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2017;129(14):1913-18.

68. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. Leukemia. 2010;24(3):521-35.

69. Drandi D, Kubiczkova-Besse L, Ferrero S, et al. Minimal Residual Disease Detection by Droplet Digital PCR in Multiple Myeloma, Mantle Cell Lymphoma, and Follicular Lymphoma: A Comparison with Real-Time PCR. J Mol Diagn. 2015;17(6):652-60.

70. Della Starza I, Nunes V, Cavalli M, et al. Comparative analysis between RQ-PCR and digital-droplet-PCR of immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 2016;174(4):541-9.

71. van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. Blood. 2015;125(26):3996-4009.

72. Kotrova M, van der Velden VH, van Dongen JJ, et al. Next-generation sequencing indicates false-positive MRD results and better predicts prognosis after SCT in patients with childhood ALL. Bone Marrow Transplant. 2017;52(7):962-8.

73. Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. Blood. 2015;126(8):1045-7.

74. Kotrova M, Trka J, Kneba M, et al. Is Next-Generation Sequencing the way to go for Residual Disease Monitoring in Acute Lymphoblastic Leukemia? Mol Diagn Ther. 2017;21(5):481-92.

75. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. Leukemia. 2014;28(6):1299-307.

76. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, et al. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukemia; a EuroClonality-NGS validation study. Leukemia. 2019, in press.

77. Knecht H, Reigl T, Kotrova M, et al. Quality control and quantification in IG/TR next-generation sequencing marker identification: protocols and bioinformatic functionalities by EuroClonality-NGS". Leukemia. 2019, in press.

78. Larsen EC, Devidas M, Chen S, et al. Dexamethasone and High-Dose Methotrexate Improve Outcome for Children and Young Adults With High-Risk B-Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From Children's Oncology Group Study AALL0232. J Clin Oncol. 2016;34(20):2380-8.

79. Möricke A, Zimmermann M, Valsecchi MG, et al. Dexamethasone vs prednisone in induction treatment of pediatric ALL: results of the randomized trial AIEOP-BFM ALL 2000. Blood. 2016;127(17):2101-12.

80. Valsecchi MG, Devidas M, Lucenti A, et al. Evaluation of Minimal Residual Disease as a Surrogate Endpoint for Event Free Survival in Childhood B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood. 2016;128:759.

Parole Chiave

Malattia minima residua, leucemia acuta linfoblastica pediatrica, prognosi, remissione.

Ringraziamenti

Questo lavoro descrive il contributo prezioso, tra gli altri, del personale clinico, infermieristico e di laboratorio del Centro Maria Letizia Verga di Monza e dei centri dell'Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP). Ringrazio per il supporto economico agli studi l'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (IG2014-15992, IG2017-20564 di A. Biondi e IG2015-17593 di G Cazzaniga, e finanziamenti precedenti) e il Comitato Maria Letizia Verga.

Indirizzi per la corrispondenza

Giovanni Cazzaniga
Clinica Pediatrica e Genetica Medica
Università di Milano Bicocca
Centro Ricerca Tettamanti
Centro Maria Letizia Verga
Via Pergolesi 33 - 20900 Monza (MB)
Tel. +39 (0)39 2333661
gianni.cazzaniga@asst-monza.it
giovanni.cazzaniga@unimib.it

Leucemia linfoblastica acuta dell'adulto



Irene Della Starza [1,2], *Sabina Chiaretti* [1], *Robin Foà* [1]

[1] *Ematologia, Dipartimento di Medicina Traslazionale e di Precisione, "Sapienza" Università di Roma, Roma*
[2] *Fondazione GIMEMA Franco Mandelli Onlus Roma*

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) è la prima neoplasia in cui la valutazione della risposta precoce alla terapia attraverso il monitoraggio della malattia minima residua (MMR) è risultata fondamentale per guidare le scelte terapeutiche. Come ovvio risultato, la valutazione della MMR è incorporata tanto nei protocolli dei bambini che degli adulti. I metodi standardizzati e maggiormente usati per studiare la MMR nella LLA sono l'analisi citofluorimetrica multiparametrica (CFM) e i metodi basati sull'amplificazione a catena della polimerasi (PCR). Alle metodiche standard si stanno affiancando tecnologie emergenti, come la citometria a flusso di nuova generazione (NGF), la *digital-droplet-PCR* (ddPCR) e il sequenziamento di nuova generazione (NGS), le quali hanno la potenzialità di migliorare la valutazione della MMR, aumentando la sensibilità e la specificità dei risultati ottenuti.
In questo articolo proponiamo attraverso una revisione della letteratura e di dati prodotti dal nostro laboratorio, di analizzare lo stato attuale della valutazione della MMR nella LLA dell'adulto per capire meglio come essa abbia consentito di migliorare significativamente la prognosi dei pazienti affetti da questa patologia e come alcuni dei suoi limiti potrebbero essere superati dalle tecnologie molecolari emergenti. Inoltre, si vuole evidenziare il ruolo futuro del monitoraggio della MMR nel contesto di protocolli personalizzati.

Introduzione

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) è un disordine maligno che origina dai precursori linfoidi emopoietici, e deriva nella maggior parte dei casi dal linfocita B (80-85%); più raramente la cellula di origine è il linfocita T (20-25%). La LLA rappresenta la neoplasia più frequente in età pediatrica e viene altresì diagnosticata anche in età adulta; ha un'incidenza bimodale, con un primo picco tra i 2 e i 5 anni di vita, ed un secondo picco a partire dalla sesta decade di vita [1-3] con il 60% dei casi che si verificano in individui sotto i 20 anni [4].
L'acquisizione di una serie di aberrazioni genetiche conduce a una compromissione del fisiologico processo maturativo, con conseguente arresto del differenziamento cellulare e proliferazione incontrollata ed aberrante di cellule neoplastiche [5].
In età pediatrica, l'applicazione di una terapia intensiva adattata al rischio e di una migliore terapia di supporto ha portato a tassi di sopravvivenza a 5 anni che si aggirano intorno al 90% [6-10]. Nell'adulto, i tassi di sopravvivenza sono inferiori, sia per l'aumentata frequenza di sottogruppi a prognosi sfavorevole (i.e. i casi con il riarrangiamento BCR/ABL1 ed i riarrangiamenti coinvolgenti il gene KMT2A - alias MLL1) che per la presenza di comorbidità che rendono più difficile la somministrazione di terapie intensive. Attualmente, l'introduzione di protocolli clinici ad ispirazione pediatrica e la migliore gestione delle complicanze correlate alla malattia e/o alla terapia stanno portando ad un miglioramento globale della prognosi, con sopravvivenza a lungo termine per pazienti in questa fascia d'età che si aggira ad oggi intorno al 50%.
Tanto nel bambino che nell'adulto, una porzione di pazienti (circa 20% e 50%, rispettivamente) presenta una ricaduta di malattia, che si associa inevitabilmente a una prognosi infausta [11-14].
È pertanto indispensabile disporre di marcatori che possano stratificare al meglio i pazienti. In questo contesto, la LLA è la prima neoplasia in cui la valutazione della risposta alla terapia mediante il monitoraggio della MMR si è dimostrata uno strumento fondamentale per guidare le scelte terapeutiche.
Allo stato attuale, lo studio della MMR viene utilizzato:

- per la valutazione della risposta iniziale al trattamento e la conseguente stratificazione dei pazienti in fasce di rischio;
- per il monitoraggio della malattia prima e dopo le procedure trapiantologiche (SCT);
- come marcatore precoce di recidiva;
- per l'intensificazione della terapia, laddove vi sia una persistenza di MMR, e il potenziale impiego di farmaci immunoterapici.

Metodologie per lo studio della MMR

In passato, è stato discusso se il sangue venoso periferico (SVP), piuttosto che il midollo osseo (MO), potesse essere impiegato per il monitoraggio della MMR. È ormai evidente che lo scenario è diverso tra LLA a derivazione del linfocita B (LLA-B) e LLA-T: infatti, nella LLA-B, i livelli di MMR tendono ad essere da 1 a 3 logaritmi inferiori nel SVP rispetto al MO [15,16] e conseguentemente le valutazioni del midollo osseo non possono essere sostituite da analisi su sangue; al contrario, nella LLA-T, è stato dimostrato - sia nei bambini che negli

adulti - che il SVP è una fonte affidabile per il monitoraggio della MMR poiché non vi sono differenze significative con il MO e quindi potrebbe essere utilizzato come fonte alternativa. Ciononostante, anche nelle LLA-T, le valutazioni della MMR sono normalmente eseguite su campioni di MO, per uniformità.

La MMR è definita come qualsiasi approccio - la citogenetica, la citometria a flusso, la PCR (*polymerase chain reaction*) e i metodi di sequenziamento ad alto *throughput* - volto a rilevare e possibilmente quantificare le cellule tumorali residue oltre il livello di sensibilità della citomorfologia. Per essere informativi, i test per lo studio della MMR nella LLA dovrebbero consentire di rilevare almeno una cellula leucemica tra 10.000 o più cellule normali in quasi tutti i pazienti. Attualmente, i metodi più standardizzati per studiare la MMR sono: la CFM, che consente di identificare degli immunofenotipi associati alla leucemia (LAIP) ed i metodi basati sulla PCR, che usano marcatori molecolari leucemia-specifici (trascritti del gene di fusione) o marcatori molecolari specifici del clone leucemico di ogni singolo paziente (immunoglobuline/recettore di cellule T (IG/TR)) [17-22].

Citofluorimetria multiparametrica

Questo approccio trae vantaggio dalla presenza di epitopi proteici (antigeni) nel nucleo, nel citoplasma o nella superficie della cellula, che sono acquisiti sequenzialmente durante il fisiologico sviluppo cellulare. Gli antigeni sono espressi in modo diverso dai linfoblasti B e T, e la loro espressione viene valutata mediante quantificazione del segnale emesso da anticorpi monoclonali specifici coniugati a fluorocromi (MoAb). Il LAIP deve essere identificato alla diagnosi, prima dell'inizio della terapia in tutti i pazienti affetti da LLA, confrontando il profilo delle cellule leucemiche con campioni di MO di riferimento, attraverso varie combinazioni di MoAb diretti verso antigeni leucocitari di superficie, citoplasmatici o nucleari.

Nel corso degli anni, sono stati sviluppati numerosi fluorocromi coniugati con anticorpi, che hanno permesso di incrementare il numero di combinazioni citofluorimetriche utili alla caratterizzazione della cellula leucemica; ulteriori progressi nel campo hanno aumentato la possibilità di studiare, oltre alle cellule leucemiche, un gran numero di popolazioni linfocitarie funzionalmente distinte nel SVP umano [23-25]. Ad oggi, la CFM è in grado di analizzare fino a 18 colori in una singola cellula [26], sebbene i pannelli più comunemente usati comprendano 6-8 combinazioni di anticorpi coniugati; i pacchetti software più utilizzati sono il FACSDivaTM (Becton Dickinson), KaluzaTM (Beckman Coulter), FlowJoTM, CytobankTM, SPICETM, SamSPECTRAL TM, FLAMETM, SPADETM, FlowTypeTM, FlowCAPTM, GemStoneTM e InfinicyteTM.

La CFM può essere applicata con successo nella maggior parte dei casi (>90%) e può raggiungere una sensibilità di 10^{-3}-10^{-4} (una cellula leucemica su 1000-10.000 cellule normali) (Tabella 1) [27]. La CFM è rapida, con risposte della MMR in poche ore ed è stato dimostrato che può essere utile per valutare la risposta terapeutica dopo le prime due settimane di induzione [28]. Tuttavia, esistono alcune limitazioni tecniche:

- i campioni devono essere analizzati subito dopo il prelievo, per evitare la morte cellulare e la modulazione di alcuni antigeni: questa problematica si può riscontrare quando è richiesta la spedizione in laboratori di riferimento dei campioni per la valutazione centralizzata della MMR;
- l'interpretazione può essere inficiata dalla rigenerazione post-chemioterapia dei cosiddetti ematogoni, che sono di difficile discriminazione rispetto ai blasti leucemici;
- l'ipocellularità del campione del MO post-chemioterapia e, in alcuni pazienti, lo shift fenotipico può indurre ad errore o a difficile interpretazione [29,30].

Al fine di minimizzare questa problematica, l'*EuroFlow Consortium*

	RQ-PCR dei riarrangiamenti IG/TR	RQ-PCR dei geni di fusione	Analisi citofluorimetrica multiparametrica
Applicabilità	>90%	30-40%	>90%
Sensibilità	10^{-4}/10^{-5}	10^{-4}/10^{-5}	10^{-3}/10^{-4}
Vantaggi	Alta sensibilità Applicabile virtualmente a tutti i pazienti Ben standardizzata	Alta sensibilità Stabilità del target durante il corso della malattia Rapida Relativamente semplice	Infomativa su tutta la cellularità del campione Ampiamente applicabile Veloce Semplice stoccaggio dei dati Standardizzata
Svantaggi	Legata al disegno di ASO-Primer Laboriosa e *time consuming* Risente dell'evoluzione clonale Richiede grandi quantità di DNA diagnostico Relativamente costosa	Instabilità dell'RNA Limitata applicabilità (>50% dei pazienti negativi) Rischio di contaminazione Ben standardizzata su DNA, ma parzialmente standardizzata su RNA	Relativamente sensibile Operatore dipendente I campioni devono essere analizzati in breve tempo Relativamente costosa

***Tabella 1** - Comparazione tecnica dei metodi standard per lo studio della MMR.*

ha ottimizzato e standardizzato i protocolli di immunotipizzazione per la diagnosi, la classificazione e la stratificazione prognostica delle neoplasie ematologiche, nonché per lo studio della MMR durante il follow up clinico. Tuttavia, è necessario sottolineare che l'esperienza dell'operatore è una condizione imprescindibile per la corretta valutazione dei risultati di MMR [31,32].

Analisi Molecolare

Riarrangiamenti genici del recettore antigenico

La tecnica più comunemente usata per la MMR è lo studio molecolare basato sui riarrangiamenti genici del recettore antigenico. I riarrangiamenti delle IG/TR sono eventi fisiologici, non collegati alla leucemogenesi. Durante l'ontogenesi dei linfociti B e T, i geni delle IG e del TR vengono assemblati mediante un processo di riarrangiamento somatico. I segmenti genici che codificano le regioni V, D, J vengono ricombinati a formare un singolo esone che codifica la regione variabile. In questo processo, alcuni nucleotidi sono casualmente deleti o inseriti nei siti giunzionali di ciascun segmento, portando a sequenze recettoriali uniche per ciascun linfocita B o T [33]. Nel caso di trasformazione neoplastica, tutte le cellule leucemiche conterranno gli stessi geni delle IG e/o del TR riarrangiati clonalmente; questo fenomeno può anche essere sfruttato per rilevare un esiguo numero di cellule leucemiche presenti in un gran numero di cellule linfoidi normali che esprimono riarrangiamenti genici con sequenze diverse.

Lo studio di questi riarrangiamenti è diventato il metodo più sensibile per valutare la clonalità di un'espansione linfoide. Sebbene i riarrangiamenti IG si trovino principalmente nelle cellule B e i riarrangiamenti TR nei linfociti T, sia le cellule leucemiche B che le cellule leucemiche T possono mostrare riarrangiamenti infedeli - non di linea -, che possono essere usati come marcatori per la valutazione della MMR [34,35]; fino al 90% dei casi di LLA-B possono esprimere riarrangiamenti del gene TR [34], mentre una percentuale inferiore di LLA-T (20%) mostra riarrangiamenti IG [36].

Per identificare questi marcatori molecolari alla diagnosi, il DNA genomico derivato dalle cellule leucemiche deve essere sottoposto a un processo di amplificazione mediante PCR e i prodotti di PCR risultati positivi vengono quindi analizzati attraverso analisi eteroduplex o con metodo Gen scan [37,38] per stabilirne la clonalità. Successivamente, i prodotti clonali vengono sequenziati con metodo Sanger per definire le regioni giunzionali e da queste ottenere oligonucleotidi complementari allele-specifici (ASO) per il monitoraggio della MMR, eseguito con PCR quantitativa (RQ-PCR). Le condizioni di amplificazione e il test di sensibilità per ciascun primer ASO sono stabiliti attraverso diluizioni seriali del DNA diagnostico in DNA derivante da un pool di cellule di donatori sani.

Questo protocollo RQ-PCR combinato con sonde fluorescenti consente di rilevare fino a 1 cellula leucemica in 100.000 (10^{-5}) cellule linfoidi normali e le diluizioni delle cellule leucemiche (curva standard) vengono quindi utilizzate per quantificare la MMR in campioni di MO raccolti durante il trattamento [39] (Tabella 1). Questa tecnologia può generare almeno una sonda molecolare sensibile adatta per l'analisi della MMR in oltre il 90% dei pazienti pediatrici [20] e adulti [40,41].

L'analisi dei riarrangiamenti genici IG/TR è il metodo più applicato per lo studio della MMR ed è stato ampiamente standardizzato all'interno dell'*EuroMRD Consortium* (precedentemente noto come *European Study Group-ESG-MRD-ALL*) che ha stabilito linee guida per l'analisi e l'interpretazione dei dati di RQ-PCR [18]: il fine ultimo è di favorire un'applicazione omogenea della MMR all'interno di protocolli clinici per i bambini e per gli adulti. Una piccola percentuale di casi con LLA, generalmente a fenotipo più immaturo, non presenta i riarrangiamenti IG/TR; inoltre, in alcuni casi problemi tecnici possono compromettere l'identificazione del target molecolare. Complessivamente quindi non è possibile eseguire valutazioni della MMR in circa il 5-10% dei casi. Un altro limite di questo approccio è rappresentato dall'evoluzione clonale dei riarrangiamenti IG/TR nel corso della malattia e alla recidiva, che può verificarsi nei casi con riarrangiamenti oligoclonali, presenti già alla diagnosi e diversi dal clone principale, che possono portare a risultati di MMR falsi negativi [42]. La quantità di DNA diagnostico è un altro fattore limitante, poiché esso è necessario per l'identificazione dei riarrangiamenti clonali IG/TR e per ciascun esperimento di MMR, poiché la quantificazione della MMR è espressa in relazione alla diagnosi. Infine, la RQ-PCR non è in grado di definire con precisione la quantità di malattia residua nei casi con livelli di MMR molto bassi. Questi casi vengono definiti positivi-non quantificabili (PNQ) e la loro quantificazione rappresenta oggi un problema aperto nella pratica clinica, soprattutto quando le decisioni di trattamento sono basate sul monitoraggio della MMR.

Trascritti di fusione

Un altro metodo utilizzato per il monitoraggio molecolare della MMR si basa sull'analisi del trascritto di fusione, se presente. Complessivamente, oltre il 40% dei pazienti con LLA porta traslocazioni cromosomiche che generano riarrangiamenti genici: questi sono target ideali per la valutazione della MMR [43,44] poiché sono eventi *drivers*, sono espressi in tutte le cellule leucemiche e sono estremamente stabili durante il decorso della malattia. Nella LLA-B, la traslocazione più comune negli adulti è la t(9;22), che porta alla formazione del cromosoma Philadelphia ed al riarrangiamento BCR-ABL1, riscontrato nel 25-30% dei casi, la cui frequenza aumenta con l'età (maggiore del 50% dei casi al di sopra dei 50 anni). Il trascritto chimerico più comune nei pazienti pediatrici è rappresentato dal riarrangiamento ETV6-RUNX1, riscontrato nel 25-30% dei casi di LLA dell'infanzia. Altri trascritti di fusione sono rappresentati da TCF3-PBX1 e KMT2A (alias MLL)-AFF1 riscontrati nell'8% dei casi, indipendentemente dall'età; KMT2A-AFF1 prevale inoltre nei cosiddetti *infants* (bambini al di sotto di un anno), dove viene identificato nell'80% dei casi.

Nella LLA-T, le delezioni di TAL1 (SIL/TAL1) si verificano in circa il 20% dei casi [45]. Altre traslocazioni di più raro riscontro nelle LLA-T coinvolgono il gene ABL1 (NUP214/ABL1, EML1/ABL1, ETV6/ABL1). Poiché la maggior parte di queste anomalie cromosomiche ha un valore prognostico, la loro identificazione deve essere eseguita in

tutti i casi alla diagnosi [46] in modo che ogni paziente possa essere monitorato utilizzando un marker predefinito nel corso della malattia.
La quantificazione del gene di fusione usando campioni di RNA è ottenuta confrontando il prodotto amplificato con una curva standard derivata dall'amplificazione di diluizioni seriali di una linea cellulare o DNA plasmidico (esclusivamente per i casi BCR/ABL1+). Questo saggio altamente sensibile è in grado di rilevare fino a 1 cellula leucemica entro 100.000 (10^{-5}) cellule linfoidi normali, non è specifico per il paziente, è relativamente facile da eseguire e non è costoso. Tuttavia, l'accuratezza di questo test è ostacolata dalla variabilità del numero di trascritti di RNA per cellula leucemica da paziente a paziente e tra diverse cellule all'interno dello stesso clone leucemico (Tabella 1). Nei pazienti che presentano traslocazioni cromosomiche ricorrenti (i.e. riarrangiamenti del gene KMT2A e SIL/TAL1), lo studio della MMR è ben standardizzato all'interno del *EuroMRD Consortium* [47,48] e nella LLA BCR/ABL1 p190 positiva, ha solo recentemente redatto le linee guida per l'analisi e l'interpretazione dei dati. [49]

Nuovi metodi per il monitoraggio della MMR

Citometria a flusso di nuova generazione (NGF)

La citometria a flusso di nuova generazione (NGF) si avvale di strumenti e procedure innovative recentemente sviluppate dall'*EuroFlow Consortium* per la preparazione dei campioni, le combinazioni degli anticorpi (compresa la scelta del tipo di anticorpi e fluorocromo) e l'identificazione dei precursori delle cellule B (BCP) nel MO, che consente di definire il grado di deviazione immunofenotipica delle cellule di LLA-BCP da quelle BCP normali (anche nel MO rigenerante). Anche per la LLA-T viene utilizzata una strategia comparabile per ottenere combinazioni anticorpali affidabili (basate sull'evidenza), al fine di discriminare il patologico da vari tipi di cellule T normali e da altre cellule [50,51]. La NGF è più veloce e riproducibile e ha una maggiore applicabilità (>95%) rispetto alla NGS (vedi oltre). Inoltre, si stima che i costi dei reagenti e dei saggi siano inferiori [52]. Infine, le strategie NGF possono fornire una visione globale delle varie popolazioni cellulari normali e aberranti e possono identificare meglio i cambiamenti della popolazione cellulare leucemica, come ad esempio quelli indotti dal trattamento [53,54], nonché l'eterogeneità nella popolazione delle cellule blastiche con differenziazione verso cellule staminali immature. Tuttavia, il metodo richiede materiale fresco analizzato entro 24 ore dal campionamento. In generale, la NGF raggiunge una sensibilità vicina a 10^{-6}, quindi maggiore di 2 logaritmi rispetto alla citometria convenzionale di 10^{-4} -10^{-5} (Tabella 2). La maggiore sensibilità della NGF è dovuta principalmente all'utilizzo di approcci standardizzati, tra cui l'impostazione degli strumenti, l'elaborazione dei campioni con procedura di lisi in massa, l'immunotipizzazione, l'acquisizione dei dati e l'analisi dei dati con strategie di *gating* standardizzate (anche automatizzate) per la definizione delle popolazioni cellulari [56]. Tuttavia, è necessaria l'acquisizione di un gran numero di cellule per raggiungere la sensibilità richiesta. Nel prossimo decennio, le nuove tecnologie di flusso miglioreranno l'applicabilità e la specificità delle misurazioni citofluorimetriche della MMR. Ad oggi, questa metodica ha trovato largo impiego soprattutto nel mieloma multiplo [54].

***Digital droplet-PCR* (ddPCR)** [55]

Si basa sul partizionamento del campione e la statistica di Poisson e ha il potenziale per superare i limiti della RQ-PCR. La ddPCR [56,57] è l'implementazione di terza generazione della PCR convenzionale che consente la quantificazione dei target senza la necessità delle curve di calibrazione [58].

	NGF	ddPCR dei riarrangiamenti IG/TR	NGS dei riarrangiamenti IG/TR
Applicabilità	> 95%	90-95%	>95%
Sensibilità	10^{-4}/10^{-6}	10^{-4}/10^{-5}	10^{-4}/10^{-6} (dipende dalla quantità di DNA analizzato)
Vantaggi	Alta sensibilità Alta applicabilità Più veloce e riproducibile Quantificazione accurata Altamente standardizzata con possibilità di *gating* automatizzato	Alta sensibilità Buona applicabilità Non necessita di una standard curve	Alta sensibilità Alta applicabilità Capacità di identificare l'evoluzione clonale Non legata alla costruzione di ASO-Primer Fornisce informazioni sul repertorio immunologico
Svantaggi	Necessita di training educazionali Necessita di molte cellule per raggiungere la sensibilità richiesta Richiede materiale fresco analizzato entro 24h dal prelievo Costosa	Legata al disegno di ASO-Primer Non ancora standardizzata Relativamente costosa Disponibile in pochi laboratori	Non ancora standardizzata Disponibile in pochi laboratori Necessita di un'analisi bioinformatica Costosa

***Tabella 2** - Comparazione tecnica dei nuovi metodi per lo studio della MMR.*

Come riportato in diversi studi [59,60], basandosi sulla natura dinamica di due metodi, la ddPCR sembra essere più accurata della RQ-PCR poiché:

- ogni campione è suddiviso in goccioline e ciascuna di esse viene analizzata individualmente;
- piccoli cambiamenti nell'intensità della fluorescenza sono più facilmente rilevabili;
- il rapporto tra le molecole di DNA bersaglio e i reagenti PCR è sostanzialmente più alto; questo aumenta la sua efficienza di amplificazione [61];
- la presenza di inibitori influenza negativamente l'efficienza della RQ-PCR, ma non quella di ddPCR [62] (Tabella 2, Figura 1).

Inoltre, la RQ-PCR, come processo esponenziale, è in grado di amplificare notevolmente anche piccole differenze nell'efficienza della reazione, portando a discrepanze nei risultati finali con intervalli di confidenza del 68%. La ddPCR è una misurazione in endpoint con intervalli di confidenza del 95%. La tecnologia ddPCR è stata utilizzata in vari campi della diagnostica medica, in particolare in oncologia molecolare [56,58,59] e nella diagnosi prenatale [63,64]. Ad oggi, sono disponibili in letteratura diverse pubblicazioni sull'uso della ddPCR in campo oncoematologico [65-68]. Tre articoli recenti (di cui due del nostro Centro) hanno confrontato la ddPCR con la RQ-PCR in pazienti adulti affetti da neoplasie linfoidi mature e da LLA Ph- [69-71]. Questi studi hanno stabilito parametri analitici per indagare l'applicabilità della ddPCR per lo studio della MMR ed hanno concluso che la ddPCR ha una sensibilità, un'accuratezza ed una riproducibilità quantomeno comparabili a quelle della RQ-PCR. Per quanto riguarda le valutazioni della MMR, sono state osservate alcune discordanze a livelli molto bassi di malattia; in questo contesto, la ddPCR ha mostrato una buona efficienza analitica per quantificare i campioni PNQ in RQ-PCR o per identificare i casi di MMR falsi positivi. Questi risultati sono stati confermati dal nostro gruppo in un'analisi comparativa più ampia che includeva 175 pazienti con diverse neoplasie linfoidi [72]. Recentemente, il significato clinico della ddPCR è stato riportato in una coorte pediatrica di pazienti con LLA [73]: è stato messo in evidenza che tra i pazienti definiti *Slow Early Responders*, la maggior parte delle recidive si verificava nei casi con MMR quantificabile in ddPCR al giorno +78, mentre i pazienti con MMR negativa o PNQ al giorno +78 avevano una prognosi migliore, suggerendo che trattamenti più aggressivi potrebbero essere riservati solo ai casi quantificabili in ddPCR. Infine, anche nell'ambito delle LLA Ph+ è stata dimostrato un buon recupero della quantificabilità della ddPCR nei campioni con livelli molto bassi di malattia, il cui significato clinico è attualmente in corso di analisi [74].

Finora non sono state definite linee guida per l'analisi e l'interpretazione della MMR in ddPCR. Un importante sforzo di standardizzazione in tal senso è in corso all'interno dell'*EuroMRD Consortium*.

Sequenziamento di nuova generazione (NGS)

Diversi gruppi hanno mostrato il valore delle tecnologie di NGS per lo studio della MMR nei tumori a cellule B immaturi e maturi [75-77]. L'analisi in NGS può essere utilizzata per identificare le

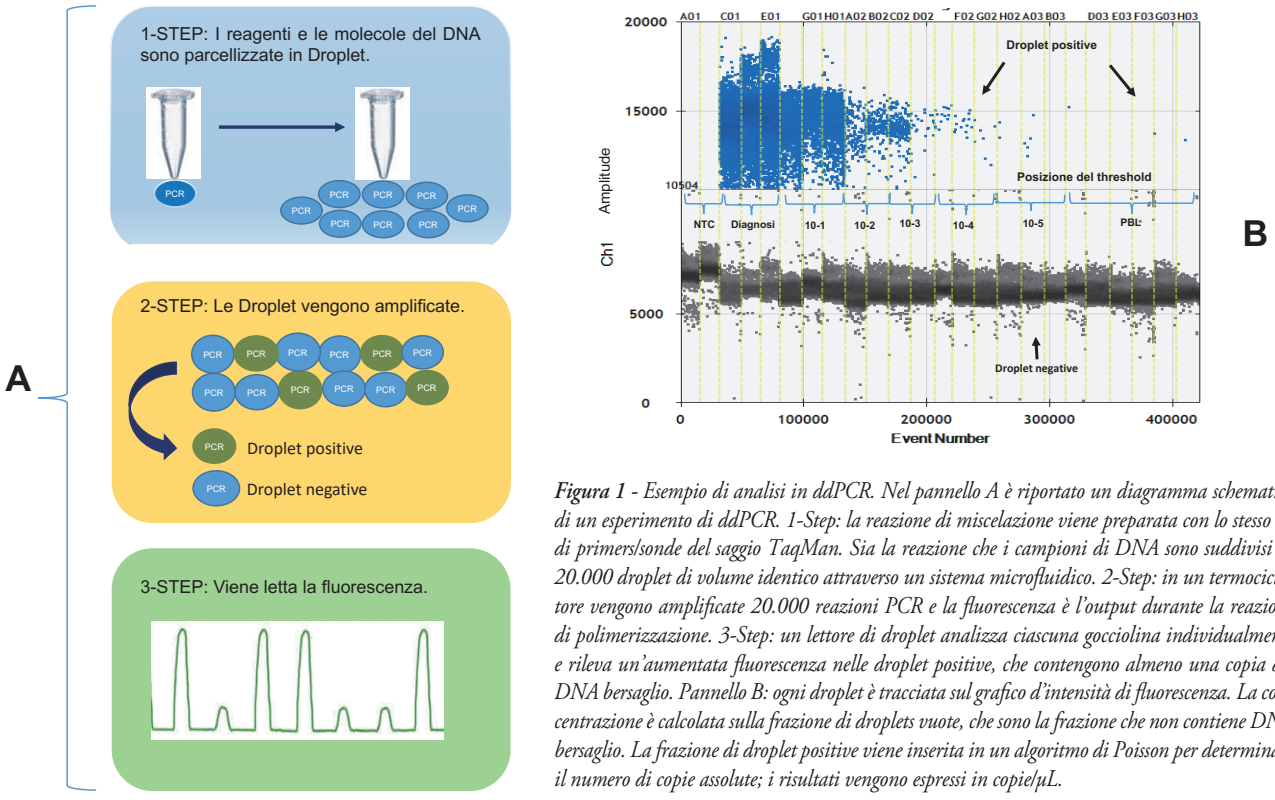


Figura 1 - Esempio di analisi in ddPCR. Nel pannello A è riportato un diagramma schematico di un esperimento di ddPCR. 1-Step: la reazione di miscelazione viene preparata con lo stesso set di primers/sonde del saggio TaqMan. Sia la reazione che i campioni di DNA sono suddivisi in 20.000 droplet di volume identico attraverso un sistema microfluidico. 2-Step: in un termociclatore vengono amplificate 20.000 reazioni PCR e la fluorescenza è l'output durante la reazione di polimerizzazione. 3-Step: un lettore di droplet analizza ciascuna gocciolina individualmente e rileva un'aumentata fluorescenza nelle droplet positive, che contengono almeno una copia del DNA bersaglio. Pannello B: ogni droplet è tracciata sul grafico d'intensità di fluorescenza. La concentrazione è calcolata sulla frazione di droplets vuote, che sono la frazione che non contiene DNA bersaglio. La frazione di droplet positive viene inserita in un algoritmo di Poisson per determinare il numero di copie assolute; i risultati vengono espressi in copie/µL.

sequenze index IG/TR clone-specifiche; le sequenze clonali rilevate alla diagnosi possono essere nuovamente rilevate e quantificate in ciascun campione di follow up. Utilizzando primer universali, questo metodo consente di monitorare contemporaneamente tutti i riarrangiamenti genici IG/TR, fornendo un quadro completo non solo delle cellule leucemiche residue ma anche del normale repertorio immunologico [77].

La sensibilità è un aspetto critico nelle analisi di MMR. Metodi che consentono una sensibilità superiore a 10^{-5} (ottenuti con RQ-PCR) potrebbero essere utili per identificare livelli di malattia molto bassi. Studi che hanno utilizzato l'analisi NGS nella LLA e nella leucemia linfatica cronica hanno dimostrato che un livello di sensibilità di 10^{-6} [76,78] è ottenibile quando si utilizzano quantità maggiori di DNA (Tabella 2, Figura 2). Ciò si riflette nella possibilità di rilevare l'evoluzione clonale precoce, un evento relativamente frequente nella recidiva di LLA [79].

Molti autori hanno riportato che la NGS sembra essere più specifica della RQ-PCR nel predire la recidiva in pazienti con LLA dopo induzione [77] e dopo SCT allogenico [80]. Un'analisi comparativa tra RQ-PCR e NGS ha mostrato, all'interno di protocolli pediatrici europei (*Berlin Frankfurt Münster-BFM group*), uno *shift* nella stratificazione del rischio, principalmente dovuto a diverse interpretazioni delle due tecniche nei campioni a bassa positività [77]. La discriminazione quantitativa di NGS è sempre sovrapponibile alla sensibilità, mentre l'intervallo quantitativo della RQ-PCR è solitamente inferiore alla soglia di sensibilità, portando a casi definiti PNQ, come precedentemente descritto [76]. Un'altra analisi comparativa, eseguita presso il nostro Centro, tra RQ-PCR, ddPCR e NGS ha documentato una migliore predittività della recidiva dei nuovi metodi rispetto alla tecnica standard (RQ-PCR) e un cambiamento nella stratificazione del rischio nei casi adulti [81,82]. Tuttavia, la NGS ha una sostanziale complessità intrinseca e comporta costi maggiori. Inoltre, al momento protocolli standardizzati di MMR basati su NGS e ampiamente applicabili non sono ancora disponibili nei laboratori accademici. Il consorzio *Euroclonality-NGS* sta lavorando per standardizzare le linee guida per l'analisi e l'interpretazione dei dati.

Attraverso l'integrazione di queste innovazioni tecnologiche, nel futuro saremo in grado di integrare rapidamente tutte le informazioni necessarie per una valutazione più precisa della risposta al trattamento nei pazienti con LLA. La ddPCR e la NGS sembrano essere metodi promettenti per la valutazione della MMR che possono aiutare a classificare i casi in cui la RQ-PCR non è in grado di rilevare o quantificare la malattia.

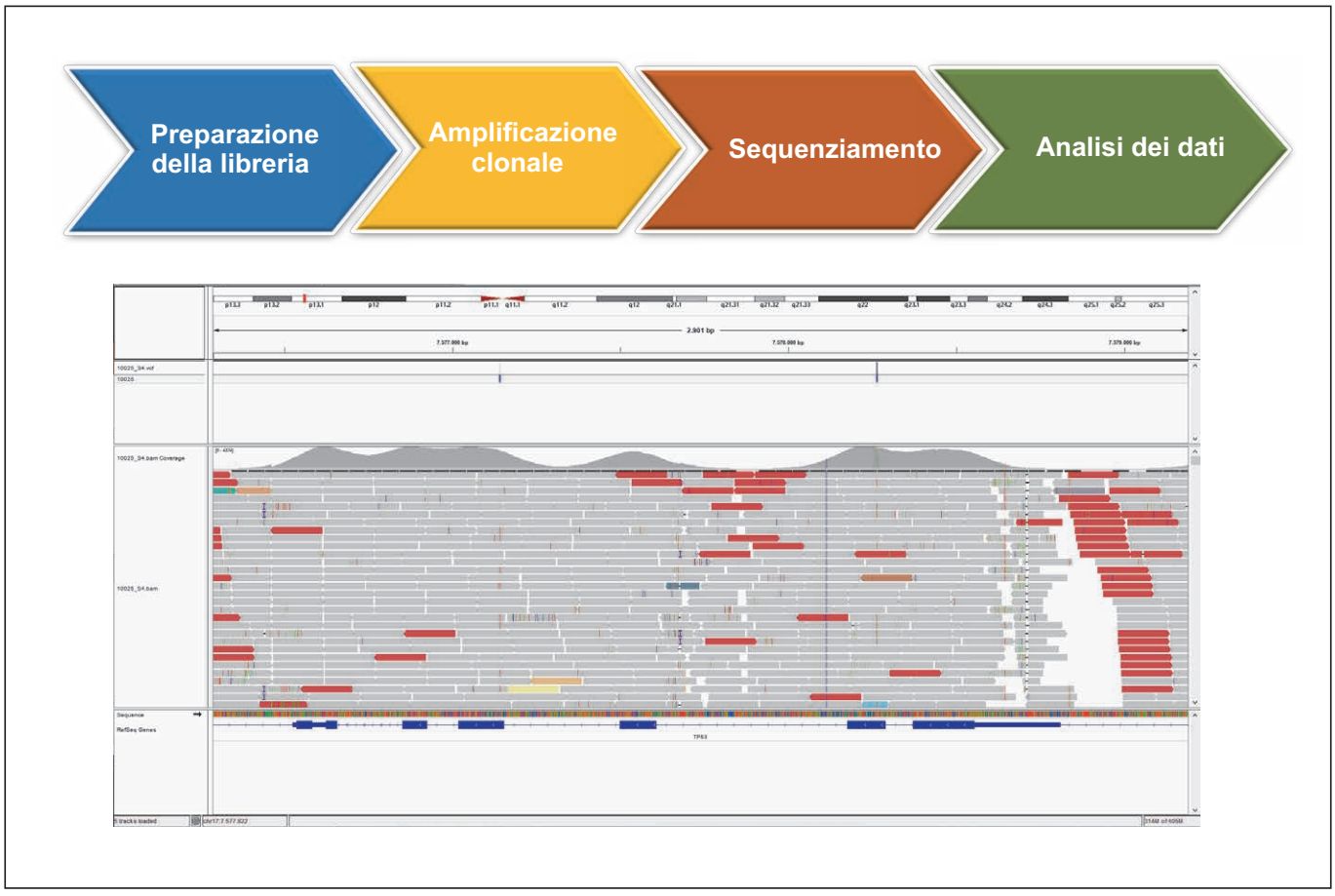


***Figura 2** - Un esempio di analisi in NGS. Partendo dal DNA genomico, viene preparata una libreria attraverso frammentazione e coniugazione con sequenze adattatrici, composte da pochi nucleotidi. La libreria viene successivamente amplificata e sequenziata, con la conseguente produzione delle cosiddette reads. L'allineamento e l'analisi dei dati viene eseguito attraverso l'uso di sistemi bioinformatici rispetto ad un genoma di riferimento.*

Significato clinico della MMR

LLA senza trascritti molecolari

L'impatto clinico della MMR è ampiamente accettato ed è considerato oggi il più importante fattore prognostico nella gestione dei pazienti con LLA. La MMR può fornire informazioni diverse, in base al momento in cui viene eseguita (molto precocemente durante il trattamento, dopo l'induzione/consolidamento, prima e dopo il SCT) e, più recentemente, può essere raffinata mediante la valutazione di ulteriori marcatori genomici.

È ormai ampiamente riconosciuto che la valutazione della MMR dovrebbe essere effettuata con metodi molecolari, come avviene nei paesi europei; al contrario, negli Stati Uniti, con poche eccezioni, l'analisi citofluorimetrica è più comunemente utilizzata, anche per la mancanza di linee guida standardizzate per l'analisi molecolare e l'interpretazione dei dati.

Nell'era moderna, i trattamenti comprendono la chemioterapia di induzione basata su 4-5 farmaci (steroidi, vincristina, antracicline, aspariginasi e ciclofosfomide) per il conseguimento di una remissione ematologica e clinica completa (RC), seguita da una terapia di consolidamento post-remissione con o senza SCT, oltre a un'efficace profilassi del sistema nervoso centrale. Diversi gruppi di studio su pazienti pediatrici e adulti hanno stabilito punti di controllo informativi nei rispettivi protocolli di trattamento. Tra questi, la risposta iniziale della MMR alla terapia è un fattore prognostico rilevante sia per i bambini che per gli adulti [83,84]: la negatività della MMR a punti estremamente precoci durante la terapia di induzione è correlata con una prognosi particolarmente favorevole sia nei bambini che negli adulti ed è indicativa di un'alta sensibilità alla chemioterapia. Nei bambini, è stato dimostrato che la negatività della MMR raggiunta già al giorno +15 correla con una prognosi eccellente [28]; negli adulti, la valutazione precoce della MMR viene di solito effettuata in un secondo momento (cioè alla fine dell'induzione, alla 4a settimana) e di nuovo correla con tassi di sopravvivenza migliori. Anche nell'adulto, Salek et al. [85] hanno riportato che i pazienti con una *clearance* tumorale molto rapida - dopo 2 settimane di terapia - hanno una prognosi molto buona. In maniera simile, i colleghi dell'MD *Anderson Cancer Center* hanno dimostrato che alti livelli di MMR, valutata mediante citofluorimetria, al giorno +14 del trattamento, si associano ad una prognosi particolarmente sfavorevole e ad una sopravvivenza libera da eventi (EFS) e sopravvivenza globale (OS) di soli 9 e 21 mesi. È importante sottolineare tuttavia che la valutazione della MMR ad un tempo così precoce perde di valore statistico se valutata contestualmente alla MMR al momento della RC [86]. Va nuovamente rimarcato che nei protocolli europei l'uso della CFM per la valutazione MMR viene normalmente sostituito con tecniche molecolari.

Gli altri punti temporali che hanno un significato prognostico sono la fine dell'induzione/consolidamento precoce. Infatti, il primo studio chiave sull'analisi della MMR molecolare è stato condotto dal gruppo di studio multicentrico tedesco sugli adulti (GMALL) su un'ampia coorte di pazienti con LLA Ph- con caratteristiche di rischio standard e ad alto rischio (n = 580 in RC) che ha mostrato come la risposta molecolare al trattamento standard di induzione e consolidamento era l'unico fattore prognostico significativo per la durata e la sopravvivenza della remissione in entrambi i gruppi di rischio [87]. Questi dati sono stati confermati da altri gruppi, indipendentemente dai valori limite, dalla tecnica usata per lo studio della MMR, dalla tempistica dell'analisi e dalla popolazione di pazienti prescelta [88-90]. Il gruppo PETHEMA ha valutato il ruolo della MMR (mediante CFM, cut-off: $5x10^{-4}$) in 326 pazienti adulti ad alto rischio e ha confermato che l'unico fattore prognostico era rappresentato dalla persistenza della MMR dopo induzione e consolidamento precoce [88]. Il GRAAL ha condotto un'analisi su 955 pazienti per valutare il ruolo del SCT, tenendo conto anche della MMR dopo l'induzione (settimana 6, cut-off: 10^{-3}), e di nuovo ha dimostrato che la persistenza della MMR non è abrogata dalle procedure di trapianto e che i pazienti negativi alla MMR potrebbero essere risparmiati da questo approccio [89]. Il *Northern Italian Study Group* (NILG) ha effettuato valutazioni di MMR a partire dalla fine dell'induzione (4ª settimana) e poi alle settimane 10, 16 e 22 in una popolazione di pazienti adulti per valutare la fattibilità e l'efficacia della citarabina incapsulata con liposoma per la profilassi del sistema nervoso centrale insieme all'uso di blocchi sistemici di methotrexate linea mirati (rispettivamente 2,5 g/m^2 e 5 g/m^2 nella LLA B e T) e altri elementi intensivi di tipo pediatrico [90]. L'iniziale risposta della MMR alle settimane 4 (fine dell'induzione) e 10 è risultata estremamente predittiva di prognosi: infatti, il rischio di recidiva era molto basso (17% a 5 anni) nel gruppo dei *responders* della settimana 4 e significativamente più basso (28%) rispetto ai *non-responders* (57%) quando sono stati esaminati i risultati della MMR della settimana 10. Risultati simili sono stati preliminarmente confermati nel successivo protocollo GIMEMA LLA 1913 [91] ed è in corso l'analisi finale dello studio.

LLA Ph+

La presenza del cromosoma Ph, dovuta al riarrangiamento di BCR/ABL1, definisce il sottogruppo di LLA ad alto rischio più frequente negli adulti. Si trova nel 25-30% dei pazienti e la sua incidenza aumenta con il progredire dell'età [4,92]. La LLA Ph+ è stata per anni considerata come il sottogruppo a prognosi peggiore: l'introduzione degli inibitori delle tirosin chinasi (TKI) come imatinib, dasatinib [93-99] e, più recentemente, ponatinib [100], ha portato all'ottenimento di una RC in quasi tutti i pazienti e ad un miglioramento della sopravvivenza libera da malattia (DFS) e OS. Un approccio terapeutico comune per i pazienti adulti con LLA Ph+ si basa sull'uso di un TKI, con o senza chemioterapia sistemica per l'induzione della RC, seguita dal consolidamento e, quando possibile, da SCT [101]. Come nella LLA Ph-, la MMR ha un ruolo importante nella gestione di questa malattia. Il GIMEMA ha chiaramente dimostrato che il grado di riduzione della MMR è correlato ad una migliore DFS, indipendentemente dall'inibitore utilizzato [98]. Lee et al. [99] hanno dimostrato che anche la tempistica della *clearance* della MMR è importante per la stratificazione dei pazienti: infatti, i

pazienti che presentano una *clearance* molto precoce hanno una prognosi significativamente migliore [99].

Nella LLA Ph+, la MMR può anche guidare decisioni terapeutiche: infatti, una persistente positività e/o la sua ricomparsa può essere alla base della presenza di mutazioni resistenti (in particolare la T315I e le cosiddette *compound mutations*). Infatti, l'aumento della MMR deve essere seguito obbligatoriamente dalla ricerca di cloni mutati, mediante *Sanger sequencing* - che ad oggi rappresenta la metodica standard- o in alternativa mediante metodiche di NGS [102]. A tal riguardo, va ricordato che la NGS non è ancora completamente standardizzata e di conseguenza i risultati devono essere interpretati con cautela, come suggerito da Schmitt et al. [103], che hanno recentemente sottolineato come la NGS possa dare un'alta percentuale di falsi positivi.

Nel momento in cui vi sia l'insorgenza di una mutazione è indicato cambiare TKI; in questo senso l'inibitore più efficace è senza dubbio il ponatinib. Un altro approccio può essere basato sulla combinazione di TKI con strategie immunoterapeutiche, in particolare il blinatumomab [104,105].

Clinicamente, una domanda ancora irrisolta è rappresentata dai casi che sono persistentemente MMR negativi; infatti, mentre in passato il SCT era considerato obbligatorio in tutti i pazienti con LLA Ph+, è attualmente in discussione se per questi pazienti potrebbe essere risparmiata la procedura allotrapiantologica, in linea con la politica clinica applicata alle LLA Ph- [93-100,106,107].

Infine, c'è un interesse crescente nella valutazione della MMR utilizzando più di un marcatore: nella LLA Ph+ pediatrica, Hovorkova et al. [48] hanno mostrato che circa il 20% dei bambini ha livelli significativamente più elevati di BCR/ABL1 (valutando i livelli di fusione sia attraverso DNA genomico che RNA) rispetto ai valori dei riarrangiamenti IG/TR o alle delezioni IKZF1, indicando che il segnale BCR/ABL1 origina da altre cellule emopoietiche. Sulla stessa linea, Cazzaniga et al. [108] hanno dimostrato che la positività della MMR dopo induzione e consolidamento (valutata con riarrangiamenti IG/TR) è fortemente associata alla recidiva. Un confronto formale tra la valutazione con IG/TR e BCR/ABL1 ha mostrato risultati comparabili in termini di rischio di recidiva: tuttavia, la concordanza tra le due tecniche era solo del 69% e, ancora, i livelli di BCR/ABL1 erano significativamente più alti rispetto a quelli dei riarrangiamenti IG/TR. Nell'ambito dell'adulto, Clappier et al. [109] hanno valutato i livelli di IG/TR e BCR/ABL1 (usando DNA genomico e RNA) e hanno dimostrato nuovamente una scarsa concordanza generale tra i risultati del BCR/ABL1 e IG/TR su DNA genomico (coefficiente di correlazione = 0,51), mentre viene rilevata una buona concordanza tra i livelli di RNA e DNA genomico di BCR/ABL1 (coefficiente di correlazione = 0,8). Inoltre, gli autori hanno mostrato che ci sono due sottogruppi di pazienti: il primo gruppo con risultati concordanti di MMR e il secondo con risultati discordanti tra IG/TR e BCR/ABL1, con livelli di BCR/ABL1 più alti. È interessante notare che i casi discordanti presentano più spesso l'isoforma proteica p210 e hanno meno delezioni di IKZF1, suggerendo nuovamente che il segnale BCR/ABL1 possa derivare da altre cellule piuttosto che da linfoblasti e che questi casi potrebbero assomigliare a un sottogruppo definito CML-*like*. Allo stato attuale, tuttavia, non è definito quale marker sia più adatto per le decisioni terapeutiche.

Trapianto di cellule staminali

Come accennato, la MMR dopo induzione/consolidamento precoce è il parametro decisionale più importante per il trapianto di cellule staminali (SCT), una procedura ancora aggravata da mortalità e da tossicità a breve e lungo termine, osservata in circa il 20% dei pazienti [110,111]. Inoltre, diversi studi hanno analizzato l'impatto prognostico sulla sopravvivenza a lungo termine di uno stato di MMR positività al momento del trapianto [112,113] e altri hanno mostrato la rilevanza prognostica della valutazione della MMR pre-SCT negli adulti [92,114,115]. In particolare, Bassan et al. [115] hanno mostrato che i pazienti con livelli di MMR $\geq 10^{-3}$ alla settimana 16 e/o alla settimana 22 (i.e. dopo il consolidamento) presentavano un outcome peggiore post-SCT con un'incidenza di recidive a 6 anni del 64% rispetto al 23% in pazienti con livelli MMR $<10^{-3}$. Una recente metanalisi su 21 lavori pubblicati, includente oltre 2.000 pazienti, conferma che una MMR positiva pre-SCT è un fattore predittivo negativo di EFS e di OS [116]. Complessivamente, questi risultati mostrano che la valutazione della MMR pre-SCT è estremamente utile per decidere una intensificazione del trattamento, poiché possono essere offerte strategie immunoterapiche (ad esempio blinatumomab, inotuzumab e in futuro, probabilmente cellule CAR-T) nel tentativo di ottenere uno stato di negatività della MMR.

Per quanto riguarda le valutazioni post-SCT, il monitoraggio della MMR è stato usato meno frequentemente perché l'analisi del chimerismo dei donatori fornisce un'alternativa per il rilevamento precoce delle recidive; tuttavia, è stato dimostrato che una valutazione della MMR basata sui riarrangiamenti IG/TR può rilevare più precocemente una recidiva imminente rispetto all'analisi del chimerismo, dimostrando che la positività della MMR era un fattore indipendente predittivo di rischio di recidiva [117]. Un altro studio basato su CFM ha mostrato che i pazienti con evidenza di MMR dopo SCT avevano una prognosi significativamente peggiore rispetto ai pazienti senza evidenza di MMR [118]. Nel contesto pediatrico, la MMR pre-SCT è risultata l'unico fattore prognostico indipendente in un'analisi multivariata e la MMR post-SCT è considerata un marker affidabile per la diagnosi precoce di recidive imminenti [119-121].

Nuovi marcatori

L'ampia caratterizzazione delle basi genetiche della LLA sta portando a un tentativo di combinare la MMR con altri marcatori: uno studio chiave è stato condotto dal gruppo francese del GRAAL [122] che ha valutato 423 giovani adulti con LLA Ph- in prima remissione, dimostrando che un rischio più elevato di recidiva era associato alla persistenza della MMR e può essere ulteriormente raffinato dalla presenza di delezioni di IKZF1 nella LLA-B e dall'assenza di mutazioni di NOTCH1/FBXW7 e/o dalla presenza di mutazione N/K-

RAS e/o alterazione del gene PTEN nella LLA-T.
Allo stesso modo, nella LLA pediatrica, la generazione di uno score di rischio basato sulla combinazione della MMR al giorno +33, la presenza di delezione intragenica di IKZF1 e P2RY8-CRLF2, si è rivelato più discriminante sull'outcome della sola valutazione della MMR, come è stato recentemente riportato [123].
Infine, il nostro gruppo, nel contesto del protocollo GIMEMA LLA1913, ha dimostrato come il profilo BCR/ABL1-*like* si associ in maniera fortemente significativa con la persistenza della MMR [124].

Nuovi agenti terapeutici

Nuove terapie, come gli anticorpi monoclonali, gli anticorpi monoclonali bispecifici o le cellule T del recettore dell'antigene chimerico (CAR-T), rappresentano importanti innovazioni nel trattamento immunoterapeutico della LLA B refrattaria/recidivata. Questi nuovi approcci terapeutici rendono la MMR un setting terapeutico ottimale, alla luce del fatto che i pazienti MMR+ hanno un numero di cellule leucemiche significativamente inferiore e quindi un profilo clinico più gestibile rispetto ai casi di recidiva ematologica.
Il blinatumomab è un costrutto anti-CD19 e anti-CD3 bispecifico che recluta cellule T citotossiche contro le cellule blastiche T CD19+. Blinatumomab può collegare le cellule B maligne direttamente alle cellule T CD3+, bypassando la specificità del TCR e le principali molecole di classe I del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) [125,126] e induce l'attivazione delle cellule T, rilascio di produzione di citochine infiammatorie, in particolare IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6 e IL-10 [127]. Il blinatumomab è il primo anticorpo approvato negi Stati Uniti per il trattamento della LLA refrattaria e, più recentemente, per il trattamento dei pazienti MMR+. Nella LLA refrattaria/recidivata, il blinatumomab ha portato a risposte morfologiche che vanno dal 43% al 69% dei pazienti [128,129] con il 76%-88% dei pazienti che rispondono con MMR-. I pazienti che avevano raggiunto uno stato di MMR molecolare negativa avevano una sopravvivenza più lunga rispetto ai pazienti che rimanevano MMR+ [130,131]. Nei pazienti con MMR+, il blinatumomab ha indotto una risposta completa nel 78% dei casi e, come previsto, i pazienti che hanno risposto al trattamento hanno una EFS più lunga rispetto ai casi non rispondenti. Una piccola frazione di pazienti responsivi al trattamento con risposta completa non è stata sottoposta a trapianto ed è ancora in RC [132,133].
L'inotuzumab ozogamicin è un anticorpo coniugato (ADC) costituito da un anticorpo monoclonale diretto contro il CD22, un antigene presente sulle cellule tumorali di quasi tutti i pazienti con LLA-B, coniugato ad un agente citotossico, la calicheamicina. Quando l'inotuzumab si lega all'antigene CD22 sulle cellule B, viene internalizzato nella cellula, e la calicheamicina viene veicolata nel nucleo dove svolge la sua azione citotossica a livello del DNA. Il farmaco è approvato per il trattamento in monoterapia di pazienti adulti affetti da LLA refrattaria/recidivata CD22+. I pazienti trattati con inotuzumab raggiungono tassi di risposta compresi tra il 58% e l'81%, con il 72-78% con MMR inferiore allo 0,01% [134,135] mediante CFM. Sebbene questo composto sembri estremamente efficace nell'indurre una risposta ematologica, è necessario sottolineare che la durata della RC è solitamente breve, e pertanto il SCT deve essere eseguito il prima possibile.
Le cellule CAR-T sono cellule T normali o, meno frequentemente, derivate da donatori, ingegnerizzate per esprimere una citotossicità mediata dai recettori delle cellule T verso anti-CD19 (nella maggior parte dei casi). Dopo essere state infuse in un paziente, le cellule CAR-T agiscono come *living drug* contro le cellule tumorali: si legano al bersaglio, si attivano, proliferano ed esercitano la loro attività citotossica. Diversi gruppi hanno dimostrato che la maggior parte dei pazienti che rispondono (sia bambini che adulti) diventano MMR- (almeno in CFM) [136-138] e mantengono questo stato per diversi mesi o anni [139,140]. I dati sul valore prognostico della MMR in questo contesto sono ancora preliminari e sebbene i pazienti diventino MMR-, sono state osservate recidive, nel 50% delle quali è stata documentata la perdita del CD19 [141-143]. Pertanto, la valutazione della MMR mediante CFM potrebbe rappresentare un criterio non adeguato di risposta. In tal senso, sono quindi necessari ulteriori studi.

Conclusioni

La MMR è un predittore di prognosi potente e indipendente sia nei bambini che negli adulti, durante il trattamento, nelle valutazioni pre e post-SCT, con differenti significati prognostici sulla base del contesto clinico.
I riarrangiamenti molecolari (geni di fusione e riarrangiamenti dei geni IG/TR) sono ampiamente utilizzati come target per rilevare le cellule leucemiche residue in tutti i pazienti, anche se nuovi marcatori molecolari potrebbero essere utilizzati a scopo prognostico e terapeutico, anche per migliorare il numero di pazienti valutabili. Tecnicamente, la CFM e RQ-PCR sono i metodi consolidati più ampiamente applicati per il monitoraggio della MMR, sebbene presentino limitazioni intrinseche che devono necessariamente essere superate. La ddPCR, NGS e NGF, la cui standardizzazione è in corso, hanno dimostrato di essere strumenti importanti per valutare la MMR nel contesto della ricerca e saranno probabilmente presto incorporati nelle sperimentazioni cliniche grazie alla loro capacità di superare le limitazioni degli approcci standard.
Allo stato attuale, l'avvento di nuovi agenti come il ponatinib per le LLA Ph+ ed i nuovi agenti immunoterapeutici per le LLA-B (i.e. blinatumomab e inotuzumab ozogamicina) stanno ulteriormente migliorando i tassi di RC e di negatività della MMR, con potenziali benefici di sopravvivenza a lungo termine. Al contrario, la rilevanza prognostica della MMR nel contesto di terapie cellulari con le CAR-T deve ancora essere valutata.
Il monitoraggio della MMR diventerà sicuramente lo strumento principale per disegnare algoritmi di trattamento sempre più innovativi, comprese strategie immunoterapiche e possibilmente risparmiando la chemioterapia/trapianto con l'obiettivo finale di guarire sempre più pazienti con LLA.

Bibliografia

1. Faderl S, O'Brien S, Pui C-H, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. Cancer. 2010;116(5):1165-76.
2. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, et al. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Eur J Cancer Care. 2005;14(1):53-62.
3. Chiaretti S, Vitale A, Cazzaniga G, et al. Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. Haematologica. 2013;98(11):1702-10.
4. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2006;354(2):166-78.
5. InabaH, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2013;381(9881):1943-55.
6. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin. 2015;65(1):5-29.
7. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. Blood. 2010;115(16): 3206-14.
8. Stary J, Zimmermann M, Campbell M, et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. J Clin Oncol. 2014;32(3):174-84.
9. Vora A, Goulden N, Wade R, et al. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2013;14(3):199-209.
10. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, et al. Successful therapy reduction and intensification for childhood acute lymphoblastic leukemia based on minimal residual disease monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. J Clin Oncol. 2016;34(22):2591-01.
11. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. Nat Med. 2013;19(3):368-71.
12. Einsiedel HG, Von Stackelberg A, Hartmann R, et al. Long-term outcome in NGS for MRD Assessment in ALL 489 children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: Results of trial Acute Lymphoblastic Leukemia-Relapse Study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. J Clin Oncol. 2005;23(31):7942-50.
13. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, et al. Medical Research Council of the United Kingdom Adult ALL Working Party; Eastern Cooperative Oncology Group. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. Blood. 2007;109(3):944-50.
14. Gökbuget N, Stanze D, Beck J, et al. German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. Blood. 2012;120(10):2032-41.
15. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002;100(7):2399-02.
16. Brüggemann M, Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. Blood Adv. 2017;1(25):2456-66.
17. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. 2003;17(6):1013-34.
18. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: Guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. Leukemia. 2007;21(4):604-11.
19. Campana D. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. Br J Haematol. 2008;143(4):481-89.
20. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, et al. International BFM Study Group (I-BFM-SG). Minimal residual disease directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2008;22(4):771-82.
21. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. Cytometry B Clin Cytom. 2008;74(6):331-40.
22. Cazzaniga G, Valsecchi MG, Gaipa G, et al. Defining the correct role of minimal residual disease tests in the management of acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 2011;155(1):45-52.
23. Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. J Immunol Methods. 2000;243(1-2):77-97.
24. De Rosa SC, Brenchley J, Roederer M. Beyond six colors: A new era in flow cytometry. Nature Med. 2003;9(1):112-17.
25. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, et al. A deep profiler's guide to cytometry. Trends Immunol. 2012;33(7):323-32.
26. Chattopadhyay PK, Price DA, Harper TF, et al. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. Nature Med. 2006;12(8):972-77.
27. Denys B, van der Sluijs-Gelling AJ, Homburg C, et al. Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2012;27(3):635-41.
28. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. J Clin Oncol. 2009;27(31):5168-74.
29. Fronkova E, Muzikova K, Mejstrikova E, et al. B-cell reconstitution after allogeneic SCT impairs minimal residual disease monitoring in children with ALL. Bone Marrow Transplant. 2008;42(3):187-96.
30. Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study group. Cytometry B Clin Cytom. 2010;78(3):147-53.
31. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. Leukemia. 2012;26(9):1986-10.
32. Kalina T, Brdickova N, Glier H, et al. Frequent issues and lessons learned from EuroFlow QA. J Immunol Methods. 2018;pii:S0022-1759(17)30140-0.
33. Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. Haematologica. 2005;90(3):382-90.
34. Szczepański T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, et al. Cross lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. Leukemia. 1999;13(2):196-05.
35. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations:

report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003;17(12):2257-17.

36. Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, et al. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. Blood. 1999;93(12):4079-85.
37. Langerak AW, Szczepański T, van der Burg M, et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. Leukemia. 1997;11(12):2192-99.
38. Germano G, del Giudice L, Palatron S, et al. Clonality profile in relapsed precursor-B-ALL children by GeneScan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease monitoring. Leukemia. 2003;17(8):1573-82.
39. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, et al. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2000;14(8):1426-35.
40. Bruggemann M, Raff T, Flohr T, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2006;107(3):1116-23
41. Bruggemann M, Schrauder A, Raff T, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. Leukemia. 2010;24(3):521-35.
42. Szczepański T, van der Velden VH, Raff T, et al. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL. Leukemia. 2003;17(11):2149-56.
43. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia. 1999;13(12):1901-28.
44. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe against cancer program. Leukemia. 2003;17(12):2318-57.
45. D'Angiò M, Valsecchi MG, Testi AM, et al. Clinical features and outcome of SIL/TAL1-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: a 10-year experience of the AIEOP group. Haematologica. 2015;100(1):e10-3.
46. Elia L, Mancini M, Moleti L, et al. A multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2003;88(3):275-79.
47. Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. Leukemia. 2006;20(3):451-57.
48. Hovorkova L, Zaliova M, Venn NC, et al. Monitoring of childhood ALL using BCR-ABL1 genomic breakpoints identifies a subgroup with CML-like biology. Blood. 2017;129(20):2771-81.
49. Pfeifer H, Cazzaniga G, van der Velden VHJ, et al. Standardisation and consensus guidelines for minimal residual disease assessment in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph + ALL) by real-time quantitative reverse transcriptase PCR of e1a2 BCR-ABL1. Leukemia. 2019;doi:10.1038/s41375-019-0413-0.
50. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia. 2012;26(9):1908-75.
51. Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, et al. EuroFlow Consortium. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. Trends Biotechnol. 2013;31(7):415-25.
52. Paiva B, van Dongen JJ, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. Blood. 2015;125(120):3059-68.
53. Gaipa G, Basso G, Maglia O, et al. I-BFM-ALL-FCM-MRD Study Group. Drug induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. Leukemia. 2005;19(1):49-56.
54. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. Leukemia 2017;31(10):2094-03.
55. Huggett JF, Whale A. Digital PCR as a novel technology and its potential implications for molecular diagnostics. Clin Chem. 2013;59(12):1691-93.
56. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Analytical Chemistry 2011;83(22):8604-10.
57. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. Anal Chem. 2012;84(2):1003-11.
58. Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, et al. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. Anal Chem. 2011;83(17):6474-84.
59. Whale AS, Huggett JF, Cowen S, et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. Nucleic Acids Res. 2012;40(11):e82.
60. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real time PCR. Nat Methods. 2013;10(10):1003-05.
61. Vincent ME, Liu W, Haney EB, et al. Microfluidic stochastic confinement enhances analysis of rare cells by isolating cells and creating high density environments for control of diffusible signals. Chemical Society Reviews. 2010;39(3):974-84.
62. Yang R, Paparini A, Monis P, et al. Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of Cryptosporidium oocysts in faecal samples. Internat J Parasitol. 2014;44(14):1105-13.
63. Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, et al. Non invasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. Blood 2011;117(13):3684-91.
64. Pornprasert S, Prasing W. Detection of alpha (0)-thalassemia South-East Asian-type deletion by droplet digital PCR. Eur J Haematol. 2014;92(3):244-48.
65. Stahl T, Böhme MU, Kröger N, et al. Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. Exp Hematol. 2015;43(6):462-68.
66. Zagaria A, Anelli L, Coccaro N, et al. BCR-ABL1 e6a2 transcript in chronic myeloid leukemia: biological features and molecular monitoring by droplet digital PCR. Virchows Archiv. 2015;467(3):357-63.
67. Albano F, Zagaria A, Anelli L, et al. Absolute quantification of the pretreatment PML-RARA transcript defines the relapse risk in acute promyelocytic leukemia. Oncotarget. 2015;6(15):13269-277.
68. Coccaro N, Anelli L, Zagaria A, et al. Droplet digital PCR is a robust tool for monitoring minimal residual disease in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. J Mol Diagn. 2018;20(4):474-82.
69. Drandi D, Kubiczkova-Besse L, Ferrero S, et al. Minimal residual disease detection by droplet digital PCR in multiple myeloma, mantle cell lymphoma, and follicular lymphoma: a comparison with real-time PCR. J Mol Diagn. 2015;17(6):652-60.
70. Della Starza I, Nunes V, Cavalli M, et al. Comparative analysis between RQ-PCR and digital-droplet-PCR of immunoglobulin/Tcell receptor gene rearrangements to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2016;174(4):541-49.

71. Cavalli M, De Novi LA, Della Starza I, et al. Comparative analysis between RQ-PCR and digital droplet PCR of BCL2/IGH gene rearrangement in the peripheral blood and bone marrow of early stage follicular lymphoma. Br J Haematol. 2017;177(4):588-96.

72. Della Starza I, Del Giudice I, Menale L, et al. Minimal residual disease (MRD) detection by digital-droplet-PCR (ddPCR) in lymphoid malignancies. SIES Annual Meeting Abstract. Haematologica. 2018;103(s3) S1-S129.

73. Della Starza I, Nunes V, Lovisa F, et al. Digital-droplet PCR, an Accurate Method for IG/TR PCR-MRD Stratification in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. ASH Annual Meeting Abstract Blood. 2018;132:1544.

74. Chiaretti S, Lauretti A, Della Starza I, et al. Applicability of droplet digital pcr (DDPCR) for minimal residual disease monitoring (MRD) in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. EHA Annual Meeting Abstract. 2019;PS935.

75. Faham M, Zheng J, Moorhead M, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2012;120(26):5173-80.

76. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. Leukemia 2014;28(6);1299-07.

77. Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. Blood. 2015;126(8):1045-47.

78. Logan AC, Zhang B, Narasimhan B, et al. Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2013;27(8):1659-65.

79. Eckert C, Flohr T, Koehler R, et al. Very early/early relapses of acute lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment. Leukemia. 2011;25(8):1305-13.

80. Kotrova M, van der Velden VH, van Dongen JJ, et al. Next-generation sequencing indicates false-positive MRD results and better predicts prognosis after SCT in patients with childhood ALL. Bone Marrow Transplant. 2017;52(7):962-68.

81. Della Starza I, De Novi LA, Santoro A, et al. Comparative analysis between RQ-PCR, digital-droplet-PCR and Next-Generation-Sequencing (NGS) of immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements to monitor minimal residual disease in adult acute lymphoblastic leukemia patients. ASH Annual Meeting Abstract. Blood. 2018;132:2828.

82. Della Starza I, De Novi LA, Santoro A, et al. Digital droplet PCR and Next generation sequencing refine Minimal residual Disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma. 2019;1-3 [Epub ahead of print].

83. Brüggemann M, Gökbuget N, Kneba M. Acute lymphoblastic leukemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. Semin Oncol. 2012;39(1):47-57.

84. Gökbuget N, Dombret H, Giebel S, et al. Minimal residual disease level predicts outcome in adults with Ph-negative B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Hematology. 2019;24(1):337-48.

85. Salek C, Folber F, Fronkova E, et al; Czech Leukemia Study Group - for Life. Early MRD response as a prognostic factor in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. Eur J Haematol. 2016;96(3):276-84.

86. Short NJ, Kantarjian HM, Sasaki K, et al. Prognostic significance of day 14 bone marrow evaluation in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. Cancer. 2016;122(4):3812-20.

87. Gökbuget N, Kneba M, Raff T, et al; German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. Blood. 2012;120(9):1868-76.

88. Ribera JM, Oriol A, Morgades M, et al. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. J Clin Oncol. 2014;32(15):1595-04.

89. Dhédin N, Huynh A, Maury S, et al. GRAALL group. Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2015;125(16):2486-96.

90. Bassan R, Masciulli A, Intermesoli T, et al. Final results of Northern Italy Leukemia Group (NILG) trial 10/07 combining pediatric-type therapy with minimal residual disease study and risk-oriented hematopoietic cell transplantation in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). ASH Annual Meeting Abstract. Blood. 2016;128(22):176.

91. Bassan R, Chiaretti S, Paoloni F, et al. First results of new GIMEMA trial LAL 1913 for adult patients with Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia (Ph-ALL). EHA Annual Meeting Abstract. 2018:PS919.

92. Hoelzer D. Personalized medicine in adult acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2015;100(7):855-58.

93. Chalandon Y, Thomas X, Hayette S, et al. Randomized study of reduced-intensity chemotherapy combined with imatinib in adults with Ph-positive acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2015;125(24):3711-9.

94. Foà R, Vitale A, Vignetti M, et al. Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2011;118(25):6521-28.

95. Yoon JH, Yhim HY, Kwak JY, et al. Minimal residual disease-based effect and long-term outcome of first-line dasatinib combined with chemotherapy for adult Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Ann Oncol. 2016;27(6):1081-8.

96. Maino E, Sancetta R, Viero P, et al. Current and future management of Ph/BCR-ABL positive ALL. Expert Rev Anticancer Ther. 2014;14(6):723- 40.

97. Pfeifer H, Wassmann B, Bethge W, et al. Randomized comparison of prophylactic and minimal residual disease-triggered imatinib after allogeneic stem cell transplantation for BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2013;27(6):1254-62.

98. Chiaretti S, Vitale A, Vignetti M, et al. A sequential approach with imatinib, chemotherapy and transplant for adult Ph+ acute lymphoblastic leukemia: final results of the GIMEMA LAL 0904 study. Haematologica. 2016;101(12):1544-52.

99. Lee S, Kim DW, Cho BS, et al. Impact of minimal residual disease kinetics during imatinib-based treatment on transplantation outcome in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2012;26(11):2367-74.

100. Jabbour E, Short NJ, Ravandi F, K, et al. Combination of hyper-CVAD with ponatinib as first-line therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a single-centre, phase 2 study. Lancet Haematol. 2018;5(12):e618-e627.

101. Berry D, Zhou S, Higley H, et al. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. JAMA Oncol. 2017;13;3(7):e170580.

102. Soverini S, De Benedittis C, Papayannidis C, et al. Clinical impact of low-burden BCR-ABL1 mutations detectable by amplicon deep sequencing in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients. Leukemia. 2016;30(7):1615-9.

103. Schmitt MW, Pritchard JR, Leighow SM, et al. Single-Molecule Sequencing Reveals Patterns of Preexisting Drug Resistance That Suggest Treatment Strategies in Philadelphia-Positive Leukemias. Clin Cancer Res. 2018;24(21):5321-34.

104. Martinelli G, Boissel N, Chevallier P, et al. Complete Hematologic and Molecular Response in Adult Patients with Relapsed/Refractory Philadelphia Chromosome-Positive B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Following Treatment With Blinatumomab: Results From a Phase II, Single-Arm, Multicenter Study. J Clin Oncol. 2017;35(16):1795-02.

105. Chiaretti S, Bassan R, Vitale A, et al. A dasatinib-blinatumomab combination for the front-line treatment of adult Ph+ ALL patients. preliminary results of the GIMEMA LAL2116 D-ALBA trial; on behalf of GIMEMA acute leukemia working party. EHA Annual Meeting Abstract. 2019;S1617.

106. Lussana F, Intermesoli T, Gianni F, et al. Achieving molecular remission before allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: impact on relapse and long-term outcome. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(11):1983-87.

107. Nishiwaki S, Imai K, Mizuta S, et al. Impact of MRD and TKI on allogeneic hematopoietic cell transplantation for Ph+ALL: a study from the adult ALL WG of the JSHCT. Bone Marrow Transplant. 2016;51(1):43-50.

108. Cazzaniga G, De Lorenzo P, Alten J, et al. Predictive value of minimal residual disease in Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib in the European intergroup study of post-induction treatment of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, based on immunoglobulin/T-cell receptor and BCR/ABL1 methodologies. Haematologica. 2018;103(1):107-15.

109. Clappier E, Kim R, Cayuela JM, et al. Persistent BCR-ABL1 clonal hematopoiesis after blast clearance identifies a CML-like subgroup of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) ALL: Interim results from GRAAPH-2014 trial. EHA Annual Meeting Abstract. 2018;S1568.

110. Huguet F, Leguay T, Raffoux E, et al. Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-2003 study. J Clin Oncol. 2009;27(15):911-18.

111. Stock W, Luger SM, Advani AS, et al. Favorable outcomes for older adolescents and young adults (AYA) with acute lymphoblastic leukemia (ALL): early results of U.S. Intergroup Trial C10403. ASH Annual Meeting Abstract. Blood. 2014;124:796.

112. Buckley SA, Appelbaum FR, Walter RB. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease at the time of transplantation in acute leukemia. Bone Marrow Transplant. 2013;48(5):630-41.

113. Campana D, Leung W. Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol. 2013;162(2):147-61.

114. Zhou Y, Slack R, Jorgensen JL, et al. The effect of peritransplant minimal residual disease in adults with acute lymphoblastic leukemia undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2014;14(4):319-26.

115. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, et al. Different molecular levels of post-induction minimal residual disease may predict hematopoietic stem cell transplantation outcome in adult Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia. Blood Cancer J. 2014;4:e225.

116. Shen Z, Gu X, Mao W, et al. Influence of pre-transplant minimal residual disease on prognosis after Allo-SCT for patients with acute lymphoblastic leukemia: systematic review and meta-analysis BMC. Cancer. 2018;18(1):755.

117. Terwey TH, Hemmati PG, Nagy M, et al. Comparison of chimerism and minimal residual disease monitoring for relapse prediction after allogeneic stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20(10):1522-29.

118. Bar M, Wood BL, Radich JP, et al. Impact of minimal residual disease, detected by flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res Treatment. 2014;2014:421723.

119. Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM study group. J Clin Oncol. 2009;27(3):377-84.

120. Bader P, Kreyenberg H, von Stackelberg A, et al. Monitoring of minimal residual disease after allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia allows for the identification of impending relapse: results of the ALL-BFM-SCT 2003 trial. J Clin Oncol. 2015;33(11):1275-84.

121. Szczepanski T, van der Velden VH, Waanders E, et al. Late recurrence of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia frequently represents a second leukemia rather than a relapse: first evidence for genetic predisposition. J Clin Oncol. 2011;29(12):1643-49.

122. Beldjord K, Chevret S, Asnafi V, et al. Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL). Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2014;123(24):3739-49.

123. Sutton R, Venn NC, Law T, et al. A risk score including microdeletions improves relapse prediction for standard and medium risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia in children. Br J Haematol. 2018;180(4):550-62

124. Chiaretti S, Messina M, Lauretti A, et al. Prognostic impact of the BCR/ABL1-like signature in adult B-lineage ALL. First analysis of the GIMEMA LAL1913 protocol. EHA Annual Meeting Abstract. 2018;1874.

125. Loffler A, Gruen M, Wuchter C, et al. Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. Leukemia. 2003;17(5):900-09.

126. Leone P, Shin EC, Perosa F. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. J Natl Cancer Inst. 2013;105(16):1172-87.

127. Brandl C, Haas C, d'Argouges S, et al. The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. Cancer Immunol Immunother. 2007;56(10):1551-63.

128. Topp MS, Gökbuget N, Zugmaier G, et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2014;32(36):4134-40.

129. Topp MS, Gökbuget N, Stein AS, et al Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. Lancet Oncol. 2015;16(1):57-66.

130. Kantarjian H, Stein A, Go kbuget N, et al. Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2017;376(9):836-47.

131. Zugmaier G, Gökbuget N, Klinger M, et al. Long-term survival and T-cell kinetics in relapsed/refractory ALL patients who achieved MRD response after blinatumomab treatment. Blood. 2015;126(24):2578-84.

132. Gökbuget N, Zugmaier G, Klinger M, et al. Long-term relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab for the treatment of patients with minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2017;102(4):e132-35.

133. Gökbuget N, Dombret H, Bonifacio M, et al. Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2018;131(14):1522-31.

134. Kantarjian H, Thomas D, Jorgensen J, et al. Results of inotuzumab ozogamicin, a CD22 monoclonal antibody, in refractory and relapsed acute lymphocytic leukemia. Cancer. 2013;119(15):2728-36.

135. Kantarjian HM, De Angelo DJ, Stelljes M, et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard therapy for acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2016;375(8):740-53.

136. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2014;6(224):224ra25.

137. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet. 2015;385(9967):517-28.

138. Gardner RA, Finney O, Annesley C, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. Blood. 2017;129(25):3322-31.

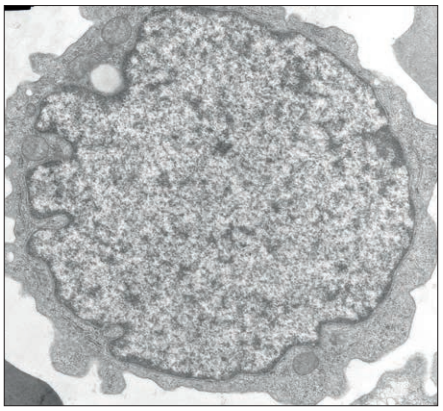
139. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2013;5(177):177ra138.

140. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. N Engl J Med. 2014;371(16):1507-17.

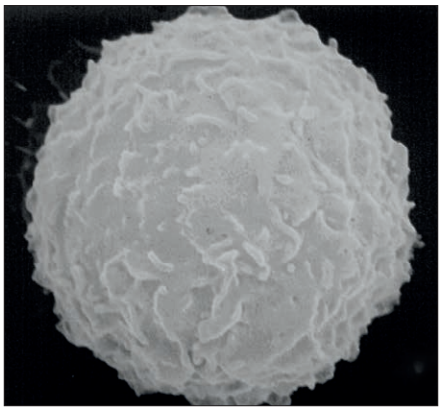
141. Finney OC, Brakke HM, Rawlings-Rhea S, et al. CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. J Clin Invest. 2019;130. pii: 125423

142. Vasu S, Jaglowski SM. Running the tank to empty: how far can the CAR go? Blood. 2019;133(15):1617-1618.

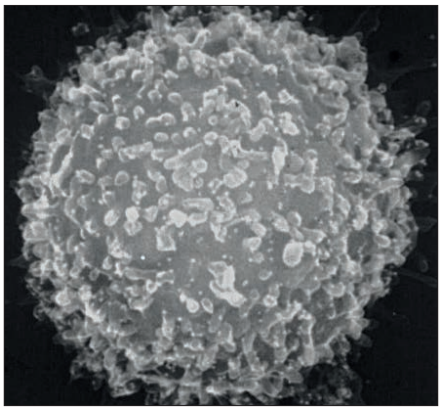
143. Hay KA, Gauthier J, Hirayama AV, et al. Factors associated with durable EFS in adult B-cell ALL patients achieving MRD-negative CR after CD19 CAR T-cell therapy. Blood. 2019;133(15):1652-1663.



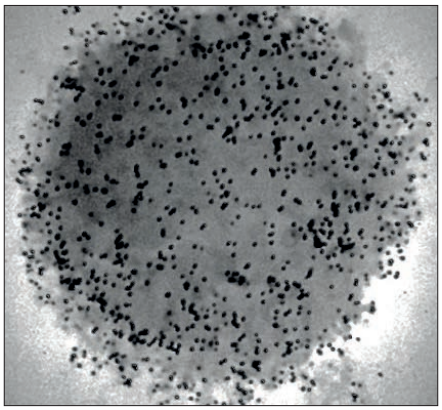
LLA: linfoblasto B al ME a trasmissione
(Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



LLA: linfoblato B al ME a scansione
(Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



LLA: linfoblasto T marcato con anticorpo LEU-1 al ME a scansione
(Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



LLA: linfoblasto T marcato con anticorpo LEU-1 al ME a scansione in modalità back-scattering
(Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Leucemia linfoblastica acuta, malattia minima residua, citofluorimetria di nuova generazione, digital droplet PCR, sequenziamento di nuova generazione.

Ringraziamenti

Si ringrazia l'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), Special Program Metastases (21198) 5x1000, Milan (Italy) and Bio-Rad Droplet Innovetors' Awards Program, Hercules, California.

Indirizzi per la corrispondenza

Irene Della Starza
Ematologia, Dipartimento di Medicina Traslazionale e di Precisione, "Sapienza" Università di Roma, Roma e Fondazione GIMEMA Franco Mandelli Onlus Roma
"Sapienza" Università di Roma
Via Benevento 6 00161, Roma
Tel. +39 06 441639824
Fax. +39 06 85795792
e-mail: dellastarza@bce.uniroma1.it

Uno sguardo al futuro: la biopsia liquida



Elena Saccenti [1], *Massimo Negrini* [2]

[1] *Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara, Ferrara, Italia*
[2] *Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Università di Ferrara, Ferrara, Italia*

Introduzione

Da decenni è noto che piccole quantità di DNA libero non associato a cellule sono presenti nel plasma, nel siero o in altri fluidi biologici. Negli anni recenti, grazie ad importanti miglioramenti tecnologici, è divenuto possibile rilevare e quantificare alterazioni genetiche caratteristiche del tumore stesso, riconoscendo così DNA di origine tumorale in maniera sensibile e specifica direttamente nel circolo ematico dei pazienti affetti da neoplasie. La possibilità di evidenziare tali alterazioni senza necessità di biopsie tissutali, ma attraverso indagini di fluidi biologici, ha portato alla definizione di biopsia liquida [(1)]. Generalmente il campione da analizzare è ottenuto da un prelievo di sangue. In aggiunta ad un piccolo numero di cellule tumorali circolanti presenti insieme alle normali cellule del sangue, il plasma ed il siero sono ricchi di esosomi, DNA tumorale circolante (*circulating tumor* DNA, ctDNA) e RNA tumorale circolante (*circulating tumor* RNA (ctRNA), che costituiscono gli strumenti per evidenziare la presenza di una neoplasia e seguirne l'evoluzione [(2)].

Le caratteristiche che rendono molto interessanti le analisi del ctDNA sono la semplicità delle procedure, la relazione dei livelli di ctDNA con il grado di estensione della patologia tumorale e la presenza a carico del ctDNA delle stesse anomalie genetiche presenti sia nel tumore primitivo che nelle eventuali lesioni metastatiche. Inoltre, la possibilità di monitorare il paziente neoplastico con biopsie liquide multiple nel tempo offre la possibilità di seguire la progressione tumorale e la risposta alla terapia, rendendo più razionali le decisioni terapeutiche. Di conseguenza, la biopsia liquida può rivelarsi un valido strumento per una gestione ottimale delle numerose fasi richieste dal paziente oncologico [(3)].

Le caratteristiche sopra menzionate sono ovviamente di grande utilità per i pazienti colpiti da tumori solidi. Le neoplasie ematologiche sono solitamente *liquide*, originando dal midollo osseo o dal sistema linfoide e, circolando nel sangue periferico, sono direttamente e più facilmente monitorabili. Non è quindi sorprendente che gli ematologi utilizzino la frazione cellulare derivante dal midollo osseo o dal sangue periferico per diagnosi e follow up attraverso tecniche citomorfologiche, citofluorimetriche e analisi genetiche. A volte però può essere difficoltoso effettuare biopsie midollari o la frazione cellulare presente nel sangue periferico non è indicativa dello status della neoplasia. In questi contesti, l'analisi del DNA tumorale circolante, rilasciato direttamente dai cloni cellulari midollari o presenti nei linfonodi, può trovare utile applicazione anche in campo ematologico [(4)].

Cenni storici

La presenza di acidi nucleici extracellulari nel sangue di individui sani fu descritta per la prima volta nel 1948 da Mandel e Métais [(5)]. Questo studio ricevette poca attenzione almeno fino al 1966, quando Tan et al. [(6)] dimostrarono la presenza di DNA nel siero e nel plasma di soggetti affetti da lupus eritematoso sistemico. Visto che il DNA poteva essere rilevato anche in altre patologie associate a danno tissutale (epatite, carcinomi metastatici, tubercolosi miliare), gli autori proposero che il DNA circolante potesse derivare dalla rottura del tessuto stesso. Nel 1977, Leon et al. [(7)] riportarono la presenza di DNA nel siero di pazienti neoplastici. Il 50% dei pazienti tumorali presentava nel siero livelli di DNA più elevati rispetto ai controlli sani. Inoltre, essi osservarono una parziale correlazione tra la persistenza di elevati livelli serici di DNA e la mancanza di risposta alla terapia. Sebbene l'incremento di DNA circolante nei pazienti oncologici rispetto a soggetti sani fu confermato da diversi studi [(8,9)], i livelli di DNA circolante non potevano essere ricondotti a processi propriamente tumore-specifici. Infatti, elevati livelli erano riscontrabili anche in pazienti con patologie infiammatorie e traumi tissutali [(10)].

La prima evidenza della presenza nel plasma dei pazienti neoplastici di DNA di origine tumorale è arrivata alla fine degli anni ottanta [(11)]. Ma la dimostrazione conclusiva che i tumori possono riversare DNA in circolo arrivò da due studi che rilevarono l'uno la presenza di mutazioni nell'oncogene NRAS nel plasma di pazienti affetti da sindrome mielodisplastica e da leucemia mieloide acuta [(12)] e l'altro mutazioni a carico dell'oncogene KRAS nel plasma e nel siero di pazienti con adenocarcinoma pancreatico [(13)]. A partire dalla pubblicazione di questi studi, numerosi gruppi hanno dimostrato la presenza di mutazioni a carico di oncogeni ed oncosoppressori [(14)], variazioni nei microsatelliti [(15)] ed ipermetilazione di promotori genici [(16)] nel plasma e nel siero dei pazienti affetti da tumore, sebbene la specificità e la sensibilità delle varie metodiche mostravano una grande variabilità.

Ad oggi, dati sul DNA tumorale circolante sono molto estesi, ma l'utilizzo di questi marcatori in ambito clinico rimane attualmente limitato all'analisi mutazionale del gene dell'e*pidermal growth factor receptor* (EGFR) in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) in stadio avanzato [17].

Basi biologiche

Con il termine di biopsia liquida si fa riferimento all'utilizzo di fluidi biologici come surrogato del tessuto neoplastico per ottenere informazioni utili a fini diagnostici, prognostici o per predire la risposta a specifici farmaci antitumorali. L'analisi del ctDNA contenuto nel DNA libero circolante (*cell free* DNA, cfDNA) è generalmente isolato dal plasma e rappresenta ad oggi il principale approccio di biopsia liquida impiegato nella pratica clinica. Tuttavia, è possibile che cellule tumorali circolanti, piastrine, esosomi presenti nel sangue, come pure altri fluidi biologici quali le urine ed il liquido cefalo-rachidiano, possano essere utilizzati per analizzare non solo DNA, ma anche RNA o microRNA per avere informazioni addizionali o complementari rispetto a quelle ottenibili mediante l'analisi del ctDNA.

Origine e caratteristiche del ctDNA

Si ritiene che il DNA libero circolante abbia molteplici origini e meccanismi di rilascio. Negli individui sani il DNA è liberato in circolo o tramite processi attivi di esocitosi di microvescicole ed esosomi o da cellule che vanno incontro ad apoptosi [18,19], in particolare da tessuti che vanno incontro a rapido ricambio e da cellule nucleate del sangue. Nei pazienti affetti da neoplasie, al DNA che origina dalle cellule sane si aggiunge DNA derivante da cellule tumorali [20]. Ciò sta alla base della possibilità di evidenziare in circolo alterazioni molecolari presenti nel tessuto tumorale.

Le cellule apoptotiche rilasciano frammenti di DNA con una lunghezza media di 160-170 nucleotidi, corrispondenti alla dimensione del DNA avvolto su un singolo nucleosoma [19,21]. Il DNA rilasciato da tessuti neoplastici è meno uniforme in lunghezza di quello riscontrato nei soggetti sani [19,22]. Ciò deriva dal fatto che la morte delle cellule tumorali avviene non solo attraverso apoptosi ed esocitosi di microvescicole, ma anche per necrosi, portando alla frammentazione del DNA attraverso diversi meccanismi [22]. Fisiologicamente, le cellule morte sono rimosse per fagocitosi dai macrofagi o da altre cellule spazzine [23].

I frammenti di DNA rilasciati da diversi tipi di cellule sono rapidamente degradati, in circa 10-15 minuti, nel fegato o filtrati nei reni. Perciò i livelli di cfDNA sono generalmente bassi, nell'ordine di pochi ng per ml di plasma. In condizioni patologiche, i livelli di cfDNA aumentano a causa della morte cellulare più abbondante o dalla rimozione insufficiente dei frammenti di DNA da parte del fegato [24].

La percentuale di rilascio di DNA nel torrente circolatorio dipende dalla localizzazione, dalla grandezza e dalla vascolarizzazione del tumore, spiegando così la grande variabilità dei livelli nei diversi pazienti [25]. La frazione di DNA circolante derivante da cellule tumorali può variare da meno dello 0,1% ad oltre il 10% fino al 90% [26]. È stato osservato che la quantità e l'eterogeneità della dimensione del cfDNA possano rappresentare biomarcatori in grado di distinguere soggetti sani dai pazienti con carcinoma mammario [27]. Un secondo studio basato sul sequenziamento genico ha dimostrato che, nei pazienti neoplastici, i frammenti di DNA più corti contengono in via preferenziale le anomalie genetiche tumore-correlate [28].

È anche possibile ottenere informazioni importanti analizzando molecole di RNA presenti negli esosomi o nelle piastrine [29,30]. Gli esosomi sono vescicole di dimensione nanometrica rilasciate da numerosi tipi cellulari. Queste vescicole, virtualmente presenti in tutti i fluidi biologici, sono ricche di acidi nucleici e proteine e rappresentano un grande potenziale per la diagnostica molecolare non invasiva [31,32]. In particolare l'analisi di proteine, RNA e DNA contenuti negli esosomi di origine tumorale può fornire informazioni utilissime sulle cellule tumorali stesse. Incoraggianti studi a prova di questo principio sono stati effettuati in pazienti affetti da tumori solidi, come cancro al pancreas o alla mammella [32].

È stata più recentemente proposta una fonte di informazioni tumore-correlate attraverso le piastrine, le cosiddette *Tumor-Educated Platelets* (TEPs). L'analisi del mRNA della frazione piastrinica in pazienti con differenti tipi tumorali localizzati o metastatici ed in controlli sani ha permesso di individuare la presenza di specifici tipi di neoplasia con un'accuratezza del 96% [29]. Le basi biologiche che si ritrovano dietro a questo potenziale ruolo diagnostico sono da riscontrarsi nelle interazioni tra le piastrine e le cellule tumorali che alterano i profili RNA piastrinici anche attraverso il trasferimento di materiale tumorale alle piastrine per via esosomale [33].

Quale fluido biologico contiene il DNA tumorale circolante?

Essendo presente nel sangue periferico, il cfDNA può essere estratto sia da siero che da plasma. Entrambi sono stati utilizzati come fonte di cfDNA. Mentre il plasma (con EDTA come anticoagulante) è la fonte preferita di cfDNA, il siero è spesso usato negli studi retrospettivi. Il siero generalmente contiene dalle 2 alle 24 volte più cfDNA rispetto al plasma; questo sembra essere dovuto alla contaminazione di DNA genomico che origina durante la lisi dei globuli bianchi nella formazione del coagulo [34-36]. Per questo motivo i livelli di cfDNA sono maggiormente variabili nel siero rispetto al plasma, ed il tempo di processamento del campione sembra incidere in maniera determinante nell'isolamento del cfDNA da siero [34].

La maggior parte degli studi presenti in letteratura coinvolge cfDNA rilasciato nel sangue periferico (sia plasma che siero), ma anche altri fluidi biologici, quali urina, liquido cerebro-spinale e saliva, possono essere utilizzati allo scopo [37-39]. Per esempio, alcuni studi hanno dimostrato che il DNA trans-renale può essere utilizzato per rilevare mutazioni puntiformi associate a farmaco-resistenza, e che accurati profili dei tumori cerebrali possono essere ottenuti attraverso l'analisi del liquido cerebro-spinale [37,40].

In alcune circostanze, la biologia del tumore e la sua localizzazione anatomica suggeriscono quale sia il fluido biologico più adatto alla biopsia liquida. Per esempio, mentre il ctDNA può essere rilevato nel sangue della maggior parte dei pazienti me-

tastatici, la quantità di ctDNA in pazienti affetti da tumori cerebrali come gliomi o medulloblastomi, è spesso limitata [41]. Al contrario, il liquido cerebrospinale può essere usato con successo per studiare il ctDNA di pazienti con tumori cerebrali [37,40].

Tecniche per lo studio di mutazioni a carico del DNA tumorale circolante

Poiché la frazione di ctDNA presente nel cfDNA può essere anche solo lo 0,01% [42], sono necessarie tecniche di indagine altamente sensibili e specifiche per poter essere utilizzate in approcci diagnostici.
I primi studi sul ctDNA utilizzavano tecniche di *real-time* PCR allele-specifiche per rilevare le mutazioni di interesse [43]. Tuttavia, siccome la sensibilità e la specificità di questa tecnica non sono elevate, sono state applicate a pazienti con elevato carico tumorale e quindi elevati livelli di ctDNA nel siero o nel plasma [44].
La *digital PCR* (dPCR) ha migliorato la sensibilità e la specificità rispetto alla *real-time PCR*. La dPCR più comunemente utilizzata è la *droplet digital PCR* (ddPCR), in cui il campione di DNA è segregato attraverso delle diluizioni a tal punto che molecole di DNA singole sono intrappolate all'interno di gocce di una emulsione acqua-olio, definite anche camere di reazione [45]. Le molecole di DNA intrappolate nelle gocce possono essere mutate o *wild-type*. Esse vengono amplificate all'interno delle camere o gocce di reazione, determinando la positività o meno di ciascuna goccia per l'allele mutato e/o per quello *wild type*, consentendo così di determinare la frazione degli alleli mutati. Per i campioni di biopsia liquida, la dPCR è capace di rilevare percentuale di mutazioni anche inferiori allo 0,1% [46,47]. Tra le caratteristiche vantaggiose nella dPCR oltre alla sensibilità, ricordiamo anche l'elevata resistenza agli inibitori della PCR [45,47,48]. In aggiunta, la dPCR è capace di quantificazioni assolute, senza necessità di curve standard [45,49,50]. Tuttavia, come altre metodiche basate su PCR, anche la dPCR non è in grado di rilevare alterazioni genomiche multiple in maniera simultanea [51]. Senza conoscere in principio i riarrangiamenti, le traslocazioni o le mutazioni di interesse, l'utilità della dPCR nel diagnosticare la neoplasia e nel monitorare la crescita tumorale è compromessa.

Il sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing*, NGS) supera i limiti della dPCR grazie alla sua capacità di rilevare mutazioni somatiche multiple contemporaneamente [51-53]. Con NGS è possibile sequenziare simultaneamente milioni di differenti molecole di DNA potendo individuare in una singola analisi mutazioni, variazioni del numero di copie geniche, fusioni e espressione genica. Inoltre, la sua flessibilità consente di valutare simultaneamente pannelli di geni (da poche unità a centinaia), l'intero esoma umano (circa 30 Mb), l'intero genoma (circa 3,3 Gb) o l'intero trascrittoma. L'uso della NGS per la biopsia liquida richiede modifiche dei protocolli normalmente usati per analisi su sangue e tessuti. Il tasso di errore del NGS non consente di rilevare una mutazione con una frequenza allelica sotto al 1-2% in quanto non può essere differenziata dal cosiddetto rumore di fondo di mutazioni aspecificamente generate dalla tecnologia [54]. Sono perciò state sviluppate tecniche ultrasensibili di NGS dedicate all'analisi del ctDNA.
Esistono sistemi commerciali NGS basati sull'utilizzo di identificatori molecolari unici (*unique molecular identifiers o molecular barcodes*) in grado di raggiungere una sensibilità analitica fino allo 0,01%, sviluppati al momento per l'analisi del ctDNA dei tumori più comuni, quali polmone, colon e mammella.

Utilizzo del cfDNA nelle neoplasie ematologiche

È del 1994 il primo studio che ha trattato l'analisi del cfDNA nelle neoplasie ematologiche [12], in particolare in pazienti con mielodisplasie e leucemia mieloide acuta. Da allora diversi studi sul DNA circolante nei tumori del sangue hanno mostrato che, derivando dalle stesse cellule tumorali, è un potenziale aiuto nella diagnosi, nella prognosi, nel monitoraggio della malattia minima residua e della risposta alla terapia [55-58]. La maggior parte degli studi in ambito oncoematologico sono incentrati sui linfomi. La Tabella 1 mostra una selezione di studi sull'analisi del DNA circolante con una visione di insieme delle metodiche, dei target studiati e degli obiettivi.

PATOLOGIA	Geni analizzati	Obiettivi clinici	Metodiche	Bibliografia
Linfoma	Mutazioni a carico dei geni XPO1, EZH2, MYD88, TP53, NPM-ALK, CD79; Riarrangiamenti genici IgH e TCR (Regioni VDJ e CDR3)	MMR Diagnosi e progressione di malattia Monitoraggio della risposta al trattamento	qPCR dPCR NGS	(57,59-63)
Mieloma multiplo	Riarrangiamenti genici IgH Mutazioni a carico dei geni KRAS, NRAS, BRAF, TP53	MMR Monitoraggio della risposta al trattamento	qPCR dPCR NGS	(64,65)
Sindrome mielodisplastica	Mutazioni a carico dei geni NRAS, TP53, TET2, IDH2, SETBP1	MMR Diagnosi e progressione di malattia	qPCR dPCR NGS	(66-69)
Leucemia mieloide e linfoide	Mutazioni a carico dei geni NRAS, FLT3, NPM1, BTK Riarrangiamenti genici IgH	Diagnosi e progressione di malattia Monitoraggio della risposta al trattamento	qPCR NGS	(12,58,60,66)

***Tabella 1** - Analisi del DNA circolante nelle neoplasie ematologiche: panoramica dei geni analizzati, degli obiettivi clinici e delle metodiche sperimentali impiegate.*

Biopsia liquida nei linfomi

Sebbene sviluppata ed utilizzata in gran parte per pazienti affetti da tumori solidi, la biopsia liquida può trovare utile applicazione anche in neoplasie ematologiche, in particolare quelle che non presentano cellule in sangue periferico.

I linfomi non-Hodgkin comprendono almeno 40 tipi che differiscono non solo nel comportamento clinico, nella morfologia o nell'immunofenotipo, ma anche nel profilo molecolare e citogenetico. La corretta identificazione della tipologia di linfoma può essere complicata a causa di questa elevata varietà di malattie [70]. Sommata alla mancanza di coinvolgimento leucemico nella maggioranza dei linfomi, l'utilizzo della biopsia liquida nei linfomi assume gli stessi potenziali vantaggi riconosciuti nei tumori solidi [61].

Come per i tumori solidi, l'analisi genotipica dei linfomi è basata sulla biopsia tissutale. Tuttavia, l'analisi molecolare di diverse aree dello stesso campione può portare a risultati discordanti a causa della eterogeneità tumorale, dimostrando che un unico prelievo bioptico potrebbe non essere rappresentativo dell'intero profilo genetico del linfoma [71,72]. La biopsia di una sola parte tumorale potrebbe non rilevare mutazioni a carico di sottocloni, che possono rappresentare marcatori prognostici o di resistenza al trattamento [71]. Inoltre, il prelievo di campioni bioptici a diversi tempi non è in molti casi possibile a causa dell'invasività della metodica. Per tali ragioni, l'utilizzo del ctDNA può essere un utile complemento alla biopsia tissutale al fine di ottenere una panoramica completa della complessità genetica dei linfomi [43].

Come nei tumori solidi, anche nei linfomi il ctDNA può essere riconosciuto dal cfDNA normale per la presenza di mutazioni somatiche in geni cancro o, nel caso specifico dei linfomi anche per il riarrangiamento clonale dei geni immunoglobulinici, che diventano impronte molecolari del linfoma stesso [63,73-76]. Essendo la frazione di ctDNA modesta, è indispensabile che le tecniche siano altamente sensibili e specifiche [77].

Può essere che il tipo di aberrazione genetica guidi la scelta della tecnica da utilizzare. Ad esempio, alcuni tipi di linfomi sono caratterizzati da una singola mutazione somatica clonale, presente nella maggior parte dei pazienti: la mutazione L265P sul gene MYD88 [78]. Questo tipo di anomalie possono essere rilevate facilmente e quantificate con PCR digitale (dPCR). Tuttavia, spesso le aberrazioni molecolari sono molteplici ed eterogenee. In questo caso tecniche NGS possono superare il limite di saggi per varianti somatiche singole, andando a rilevare una grande varietà di alterazioni genetiche tra cui singole varianti nucleotidiche, inserzioni e delezioni, e riarrangiamenti cromosomici [74, 79].

Studi indipendenti hanno valutato la sensibilità e la specificità dell'analisi mutazionale in un gruppo di geni, come MYD88, EZH2, CD79 e il riarrangiamento IgH, attraverso NGS nel ctDNA in confronto alla biopsia tumorale in pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (*diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) non trattati [63,74,80]. Il sequenziamento di ultima generazione dei DNA circolanti nel plasma dei pazienti ha identificato correttamente le mutazioni riscontrate nella biopsia tumorale con una sensibilità maggiore del 90% e una specificità vicina al 100%. Inoltre, l'analisi del cfDNA ha permesso di identificare mutazioni che non erano rilevabili nella biopsia tissutale, presumibilmente perché, a causa dell'eterogeneità del tumore, erano limitate a cloni anatomicamente distanti dal sito della biopsia.

Questi risultati dimostrano che l'analisi del cfDNA nel DLBCL è accurata quanto l'analisi della biopsia tissutale per la rilevazione di mutazioni somatiche a carico del tumore, ed è un approccio non invasivo per monitorare in tempo reale l'evoluzione clonale.

Tra i saggi validati per uso clinico, il saggio clonoSEQ è un test riconosciuto in diagnostica per misurare la malattia minima residua (MMR) in campioni di aspirato midollare derivanti da leucemie e mielomi [81,82]. In questo saggio, il DNA genomico viene amplificato attraverso tecniche di PCR multiplex con l'utilizzo di primers locus-specifici che coprono tutti i possibili riarrangiamenti IgH (DJ), IgK e IgL. Le librerie di ampliconi vengono sequenziate con NGS. In questo modo il riarrangiamento clonale tumore-specifico viene identificato in un campione ricco di DNA tumorale all'esordio, e viene quindi utilizzato per il monitoraggio della MMR in prelievi post-trattamento. Sfruttando il vantaggio che i riarrangiamenti IgH, Igκ e Igλ rimangono costanti nel corso della malattia e sono tumore-specifici, il saggio clonoSEQ può essere utilizzato anche per quantificare il ctDNA nei linfomi, fermo restando la necessità di un prelievo bioptico tissutale al fine di individuare il riarrangiamento in essere in quel dato paziente.

Il monitoraggio della MMR nei linfomi è sempre difficoltoso, a causa della mancanza di coinvolgimento midollare e periferico. A livello ematologico, il monitoraggio della MMR è definito come un approccio in grado di rilevare e quantificare cellule tumorali residue oltre il livello di sensibilità delle tecniche di imaging. Ciò assume particolare importanza in quanto, nonostante la apparente remissione clinica completa, il paziente potrebbe andare incontro a recidiva a causa della persistenza di cellule tumorali residue.

La MMR può essere misurata nei linfomi senza coinvolgimento midollare utilizzando il ctDNA. Rispetto al DNA genomico estratto da cellule mononucleate presenti in sangue periferico, il cfDNA plasmatico, sebbene più scarso, presenta un arricchimento di oltre 150 volte di DNA di origine tumorale, rendendo il cfDNA più adatto del DNA genomico cellulare per il monitoraggio della MMR nel DLBCL [74]. Utilizzando la quantificazione del riarrangiamento dei geni immunoglobulinici nel ctDNA, i pazienti con DLBCL che hanno livelli di riarrangiamento clonale non rilevabili mostrano una sopravvivenza libera da malattia più elevata rispetto ai pazienti con ctDNA positivo [74]. Questi risultati suggeriscono che il ctDNA possa essere complementare al monitoraggio con tecniche radiologiche di PET/TC.

Allo stato attuale, tuttavia, l'utilizzo del ctDNA non è sostitutivo della biopsia tissutale nella prima diagnosi di linfoma. Solo rari casi di linfomi primitivi del sistema nervoso centrale (PCNSL), in pazienti con masse cerebrali difficilmente accessibili dal punto di vista chirurgico, potrebbero trarre un immediato vantaggio dall'utilizzo della biopsia liquida se la biopsia della lesione cerebrale non è eseguibile, sia essa all'esordio o in caso di progressione. La mutazione

L265P a carico del gene MYD88 è stata riscontrata nell'85% delle biopsie cerebrali di PCNSL [83,84]. L'analisi del DNA plasmatico con *digital* PCR in pazienti con PCNSL per la mutazione L265P MYD88 ha evidenziato un tasso di positività del 60%, presentando perciò un problema di falsi negativi in questo specifico caso [78]. Inoltre, il gene MYD88 è mutato nel residuo amminoacidico L265P anche nelle gammopatie monoclonali, nella linfocitosi B monoclonale ed in altri tipi di linfoma, delineando anche un limitato potenziale diagnostico [85,86].

Anche nel linfoma di Hodgkin classico, il ctDNA può rappresentare una fonte alternativa di DNA tumorale quando la rappresentazione delle cellule linfomatose è insufficiente nella biopsia tissutale [62]. Infatti la rarità delle cellule neoplastiche nelle biopsie è un problema nella caratterizzazione genetica del linfoma stesso. Nel ctDNA sono rilevate l'87% delle mutazioni confermate con la biopsia tissutale [63]. Sebbene l'applicazione clinica sia ancora lontana, il sequenziamento del ctDNA offre l'opportunità di genotipizzazione di pazienti con LH per l'identificazione di biomarcatori prognostici genetici e per l'identificazione predittiva di biomarcatori di risposta al trattamento.

Biopsia liquida nelle altre neoplasie ematologiche

Mielodisplasie (SMD)

Le SMD sono un gruppo di disordini a carico della cellula ematopoietica staminale caratterizzati da citopenia, displasia e tendenza a trasformarsi in forme di leucemia mieloide acuta (LMA) [87].

Le anomalie genetiche riscontrate sono numerose e di vario tipo. Si pensa che l'accumulo di questi difetti genici (come ad esempio le mutazioni nei geni ASXL1, STAG2 o SMC3) possa essere critico nello sviluppo della progressione e nell'acquisizione di resistenza ai farmaci [88]. La biopsia midollare è la strategia standard per ottenere cellule patologiche al fine di analizzare le anomalie genetiche ed epigenetiche; tuttavia in alcuni casi non può essere effettuata. L'utilizzo del cfDNA può rappresentare un'alternativa più sicura, facile e meno invasiva per determinare lo stato neoplastico [67].

Nel 1994 è stato pubblicato il primo studio sul cfDNA in pazienti affetti da SMD e LMA. Vasioukhin et al. [12] hanno riscontrato mediante tecniche di PCR mutazioni puntiformi a carico del gene NRAS nel DNA estratto dalle cellule midollari e nel cfDNA di 10 pazienti affetti da SMD e LMA. Mutazioni aggiuntive sono state riscontrate nel cfDNA, rispetto al DNA derivante dalla biopsia midollare. Questo ha fatto supporre che la biopsia midollare non contenga tutto il pool di cloni patologici.

In seguito sono stati pubblicati diversi altri studi sull'argomento. Ad esempio, Iriyama et al. [67] hanno studiato attraverso tecniche di *pyrosequencing* la presenza di mutazioni e metilazione delle isole CpG nel cfDNA di pazienti con SMD. Nel 2016, lo stesso gruppo di ricerca si è focalizzato sullo studio di mutazioni somatiche a carico dei geni IDH2, SETBP1, U2AF1, SRSF2 e NRAS e le ha riscontrate nel cfDNA, oltre che nel DNA derivante da cellule midollari, di 33 pazienti con SMD attraverso tecniche di PCR e sequenziamento. Rilevante il fatto che le mutazioni trovate nel cfDNA prima del trapianto allogenico a cui si erano sottoposti i pazienti, non fossero più rilevabili dopo il trapianto. Questo ha portato quindi alla conclusione che il DNA con mutazioni fosse realmente rilasciato da cloni patologici della SMD e che esso potesse essere impiegato come marcatore dello stato della SMD [68]. In uno studio recente, sono state comparate 89 biopsie midollari e 83 campioni di plasma, raccolti in maniera seriale da 12 pazienti con SMD. I campioni sono stati analizzati con NGS, studiando un pannello di 55 geni frequentemente mutati nella SMD (es. TP53 e U2AF1). I risultati sono stati validati in dPCR ed è stata osservata una correlazione significativa ($p < 0{,}0001$) tra le mutazioni riscontrate nella biopsia midollare e nella biopsia liquida, lasciando suggerire che l'analisi del cfDNA possa essere utilizzata quando non sia possibile effettuare un prelievo di materiale midollare [69].

Leucemie mieloidi (LMA)

La LMA è la forma più comune di neoplasia ematologica a carattere acuto. Essa è caratterizzata dall'accumulo di cellule anomale con un'aumentata capacità proliferativa ed una differenziazione aberrante derivanti da una deregolata ematopoiesi. Anche nel cfDNA dei pazienti affetti da LMA sono stati analizzati e riscontrati degli specifici marcatori come, per esempio, le mutazioni a carico del gene FLT3 [58, 89] o altre anomalie citogenetiche, come LOH o inattivazione del cromosoma X [66]. Recentemente, Quan et al. [58] hanno quantificato le copie mutate del gene NPM1 nel cfDNA di pazienti con leucemia mieloide acuta. NPM1 è il gene maggiormente mutato nella LMA e la presenza della mutazione è associata con particolari sottotipi leucemici, con un elevato livello di globuli bianchi e piastrine e con la percentuale di blasti patologici nel midollo osseo. NPM1 è stato riscontrato mutato in 37 pazienti su 100 utilizzando il cfDNA, ma solamente in 35 pazienti analizzando il sangue periferico, suggerendo che i profili molecolari riscontrati nel cfDNA possano essere impiegati per le indagini diagnostiche di questi pazienti.

Leucemie linfoidi

Le leucemie linfoidi sono un gruppo di neoplasie a carico del linfocita. Le più comuni sono la leucemia linfatica cronica (LLC) e la leucemia linfoblastica acuta (LLA). La prima è un tipo di neoplasia linfoproliferativa principalmente riscontrata nell'adulto, mentre la seconda è la forma più comune in età pediatrica con una grande probabilità di cura. La LLA è diagnosticata anche nell'adulto ma con una incidenza inferiore e con più basse probabilità di sopravvivenza [90]. Schwarz et al. [55] hanno utilizzato il cfDNA di pazienti pediatrici affetti da leucemia linfoblastica acuta per monitorare la MMR con tecniche di qPCR.

La comparazione della quantificazione della MMR attraverso l'analisi del cfDNA e del sangue periferico ha mostrato una corrispondenza nell'87,6% dei casi. Questi dati suggeriscono quindi che il cfDNA possa essere utilizzato nel monitoraggio della risposta al trattamento nei pazienti pediatrici con LLA.

Mieloma multiplo (MM)

Il MM è la seconda neoplasia ematologica più comune. Esso colpisce le cellule B al termine del processo di differenziazione a livello ematopoietico. L'introduzione di nuovi farmaci ha notevolmente migliorato i tassi di risposta e sopravvivenza dei pazienti con MM. Allo stesso tempo il monitoraggio della MMR ha acquistato una notevole importanza [91,92], in quanto la profondità della MMR è predittiva sia di sopravvivenza libera da progressione che di sopravvivenza globale dei pazienti. L'analisi della MMR da sangue midollare è effettuata con tecniche citofluorimetriche o con ASO-PCR (*allele-specific oligonucleotide* PCR), mentre NGS è stato introdotto negli ultimi anni [64].

Il MM è una patologia caratterizzata da depositi (nicchie) tumorali all'interno del midollo osseo. Per questo motivo e per la presenza di lesioni al di fuori del midollo osseo, l'esecuzione di un singolo aspirato midollare potrebbe fornire una visione incompleta dello stato tumorale, anche in termini di risposta diversa alla terapia ed incidendo negativamente sulla sopravvivenza del paziente. Per questo motivo, marcatori tumorali presenti nel cfDNA potrebbero fornire un quadro più completo e predittivo di risposta ai trattamenti. Il ctDNA, essendo rilasciato da tutte le lesioni tumorali, rappresenterebbe per intero il corredo genetico tumorale e potrebbe essere perciò utilizzato per questo tipo di studio. In questo ambito, sono stati pubblicati pochissimi lavori sull'utilizzo del cfDNA nel MM. Tutti sono risultati interessanti dal punto di vista scientifico ma hanno coinvolto piccoli numeri di pazienti, eterogenei dal punto di vista dei trattamenti [64]. È stato tuttavia possibile dimostrare che il ctDNA deriva da tutti i siti coinvolti dal MM, recando mutazioni specifiche e non presenti nel midollo osseo, soprattutto nei pazienti refrattari o recidivati [65]. Ciò porta a pensare quindi che l'analisi del ctDNA, in aggiunta alla biopsia midollare, rappresenti una strategia utile per caratterizzare in maniera globale il tumore e monitorare l'efficacia del trattamento.

Conclusioni

Nonostante gli approcci per l'identificazione e quantificazione del ctDNA stiano diventando più comuni e la potenziale utilità clinica stia emergendo, il loro utilizzo in ambito clinico al momento si limita al monitoraggio di pazienti affetti da carcinomi polmonari in stadio avanzato. In ambito onco-ematologico, sebbene siano emerse delle possibili applicazioni, è invece ancora necessaria una migliore definizione degli standard metodologici e degli obiettivi clinici.

Bibliografia

1. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). Cancer Cell. 2017;31(2):72-179.
2. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer. 2011;11(6):426-37.
3. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, et al. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. Cancer Treat Rev. 2014;40(5):648-55.
4. Hocking J, Mithraprabhu S, Kalff A, et al. Liquid biopsies for liquid tumors: emerging potential of circulating free nucleic acid evaluation for the management of hematologic malignancies. Cancer Biol Med. 2016;13(2):215-25.
5. Mendel P, Mandel L, et al. Sur le comportement comparé, au cours du jeûne protéique prolongé, des deux acides nucléiques des tissus animaux et sur sa signification. C R Hebd Seances Acad Sci. 1948;226(24):2019-21.
6. Tan EM, Schur PH, Carr RI, et al. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest. 1966;45(11):1732-40.
7. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res. 1977;37(3):646-50.
8. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. Cancer. 1983;51(11):2116-20.
9. Stroun M, Anker P, Lyautey J, et al. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. Eur J Cancer Clin Oncol. 1987;23(6):707-12.
10. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-a survey. Biochim Biophys Acta. 2007;1775(1):181-232.
11. Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. Oncology. 1989;46(5):318-22.
12. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. Br J Haematol. 1994;86(4):774-9.
13. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1994;3(1):67-71.
14. Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, et al. Molecular detection of APC, K- ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. World J Surg. 2004;28(7):721-6.
15. Shaw JA, Smith BM, Walsh T, et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. Clin Cancer Res. 2000;6(3):1119-24.
16. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. Clin Cancer Res. 2005;11(3):1219-25.
17. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. J Clin Oncol. 2018;36(16):1631-1641.
18. Mouliere F, Rosenfeld N. Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(11):3178-9.
19. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, et al. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. Pancreas. 1998;17(1):89-97.
20. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. Ann N Y Acad Sci. 2000;906:161-8.
21. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. PLoS One. 2011;6(9):e23418.
22. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. J Clin Oncol. 2006 24(26):4270-6.
23. Choi JJ, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. Immunology. 2005;115(1):55-62.
24. Zeerleder S. The struggle to detect circulating DNA. Crit Care. 2006;10(3):142.

25. Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Cancer Discov. 2014;4(6):650-61.
26. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res. 2001;61(4):1659-65.
27. Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. Breast Cancer Res Treat. 2014;146(1):163-74.
28. Jiang P, Chan CW, Chan KC, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. Proc Natl Acad Sci USA. 2015; 112(11):E1317-25.
29. Best MG, Sol N, Kooi I, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. Cancer Cell. 2015;28(5):666-676.
30. Joosse SA, Pantel K. Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients. Cancer Cell. 2015;28(5):552-554.
31. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nat Cell Biol. 2008;10(12):1470-6.
32. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. Nature. 2015;523(7559):177-82.
33. Kuznetsov HS, Marsh T, Markens BA, et al. Identification of luminal breast cancers that establish a tumor-supportive macroenvironment defined by proangiogenic platelets and bone marrow-derived cells. Cancer Discov. 2012; 2(12):1150-65.
34. Wong FC, Sun K, Jiang P, et al. Cell-free DNA in maternal plasma and serum: A comparison of quantity, quality and tissue origin using genomic and epigenomic approaches. Clin Biochem. 2016;49(18):1379-1386.
35. Thijssen MA, Swinkels DW, Ruers TJ, et al. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. Anticancer Res. 2002;22(1A):421-5.
36. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, et al. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. Transfusion. 2001;41(2):276-82.
37. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CK, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. Nat Commun. 2015;6:8839.
38. Melkonyan HS, Feaver WJ, Meyer E, et al. Transrenal nucleic acids: from proof of principle to clinical tests. Ann N Y Acad Sci. 2008;1137:73-81.
39. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. Sci Transl Med. 2015;7(293):293ra104.
40. Wang Y, Springer S, Zhang M, et al. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(31):9704-9.
41. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med. 2014; 6(224):224ra24.
42. Yong E. Cancer biomarkers: Written in blood. Nature. 2014;511(7511):524-6.
43. Diaz LA, Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. J Clin Oncol. 2014;32(6):579-86.
44. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. N Engl J Med. 2013;368(13):1199-209.
45. Huggett JF, Whale A. Digital PCR as a novel technology and its potential implications for molecular diagnostics. Clin Chem. 2013;59(12):1691-3.
46. Sanmamed MF, Fernandez-Landazuri S, Rodriguez C, et al. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. Clin Chem. 2015;61(1):297-304.
47. Zhu G, Ye X, Dong Z, et al. Highly Sensitive Droplet Digital PCR Method for Detection of EGFR-Activating Mutations in Plasma Cell-Free DNA from Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. J Mol Diagn. 2015;17(3):265-72.
48. Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, et al. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. Anal Chem. 2011;83(17):6474-84.
49. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem. 2011;83(22):8604-10.
50. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, J et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. Anal Chem. 2012;84(2):1003-11.
51. Bratman SV, Newman AM, Alizadeh AA, et al. Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq. Expert Rev Mol Diagn. 2015;15(6):715-9.
52. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature. 2013; 497(7447):108-12.
53. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. Sci Transl Med. 2012;4(162):162ra154.
54. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, et al. Detection of Therapeutically Targetable Driver and Resistance Mutations in Lung Cancer Patients by Next-Generation Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA. Clin Cancer Res. 2016;22(23):5772-5782.
55. Schwarz AK, Stanulla M, Cario G, et al. Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. Ann Hematol. 2009;88(9):897-905.
56. Perkins G, Yap TA, Pope L, et al. Multipurpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. PLoS One. 2012;7(11):e47020.
57. Bohers E, Viailly PJ, Dubois S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. Haematologica. 2015;100(7):e280-4.
58. Quan J, Gao YJ, Yang ZL, et al. Quantitative detection of circulating nucleophosmin mutations DNA in the plasma of patients with acute myeloid leukemia. Int J Med Sci. 2015;12(1):17-22.
59. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. Ann Oncol. 2009;20(8):1408-13.
60. Frickhofen N, Muller E, Sandherr M, et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. Blood. 1997;90(12):4953-60.
61. Camus V, Jardin F, Tilly H. The value of liquid biopsy in diagnosis and monitoring of diffuse large ß-cell lymphoma: recent developments and future potential. Expert Rev Mol Diagn. 2017;17(6):557-566.
62. Camus V, Stamatoullas A, Mareschal S, et al. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. Haematologica. 2016;101(9):1094-101.
63. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. Blood. 2017;129(14):1947-1957.
64. Oberle A, Brandt A, Voigtlaender M, et al. Monitoring multiple myeloma by next-generation sequencing of V(D)J rearrangements from circulating myeloma cells and cell-free myeloma DNA. Haematologica. 2017;102(6):1105-1111.
65. Mithraprabhu S, Khong T, Ramachandran M, et al. Circulating tumour DNA

analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma. Leukemia. 2017;31(8):1695-1705.
66. Rogers A, Joe Y, Manshouri T, et al. Relative increase in leukemia-specific DNA in peripheral blood plasma from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. Blood. 2004;103(7):2799-801.
67. Iriyama C, Tomita A, Hoshino H, et al. Using peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation status and genetic mutations in patients with myelodysplastic syndrome. Biochem Biophys Res Commun. 2012;419(4):662-9.
68. Suzuki Y, Tomita A, Nakamura F, et al. Peripheral blood cell-free DNA is an alternative tumor DNA source reflecting disease status in myelodysplastic syndromes. Cancer Sci. 2016;107(9):1329-37.
69. Yeh P, Dickinson M, Ftouni S, et al. Molecular disease monitoring using circulating tumor DNA in myelodysplastic syndromes. Blood. 2017;129(12):1685-1690.
70. Abramson JS, Shipp MA. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. Blood. 2005;106(4):1164-74.
71. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med. 2012;366(10):883-892.
72. Araf S, Wang J, Korfi K, et al. Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. Leukemia. 2018;32(5):1261-1265.
73. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. Lancet Oncol. 2015;16(5):541-9.
74. Kurtz DM, Green MR, Bratman SV, et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. Blood. 2015;125(24):3679-87.
75. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. Sci Transl Med. 2012;4(136):136ra68.
76. Ladetto M, Bruggemann M, Monitillo L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. Leukemia. 2014;28(6):1299-307.
77. Spina V, Bruscaggin A, Cuccaro A, et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2018;131(22):2413-2425.
78. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Suehara Y, et al. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. Cancer Sci. 2018;109(1):225-230.
79. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. Nat Med. 2014;20(5):548-54.
80. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. Sci Transl Med. 2016;8(364):364ra155.
81. Wood B, Wu D, Crossley B, et al. Measurable residual disease detection by high-throughput sequencing improves risk stratification for pediatric B-ALL. Blood. 2018;131(12):1350-1359.
82. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. Blood. 2014;123(20):3073-9.
83. Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, Boisselier B, et al. Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. Clin Cancer Res. 2012;18(19):5203-11.
84. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. Oncotarget. 2014;5(13):5065-75.
85. Landgren O, Staudt L. MYD88 L265P somatic mutation in IgM MGUS. N Engl J Med. 2012;367(23):2255-6; author reply 2256-7.
86. Kalpadakis C, Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, et al. Detection of L265P MYD-88 mutation in a series of clonal B-cell lymphocytosis of marginal zone origin (CBL-MZ). Hematol Oncol. 2017;35(4):542-547.
87. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. N Engl J Med. 2009; 361(19):1872-85.
88. Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. Blood. 2014;124(18):2793-803.
89. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med. 2005;352(3): 254-66.
90. Ward E, DeSantis C, Robbins A, et al. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin. 2014;64(2):83-103.
91. Watanabe R, Tokuhira M, Kizaki M. Current approaches for the treatment of multiple myeloma. Int J Hematol. 2013;97(3):333-44.
92. Kumar SK, Rajkumar SV. The current status of minimal residual disease assessment in myeloma. Leukemia. 2014;28(2):239-40.

Parole Chiave

Biopsia liquida; DNA tumorale circolante, linfomi maligni, mieloma multiplo

Indirizzi per la corrispondenza

Massimo Negrini
Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale
Università di Ferrara
Via Luigi Borsari 46, 44121, Ferrara, Italy
Email: massimo.negrini@unife.it

Ematologia Oncologica

Titoli pubblicati e disponibili

2014

Sindromi mielodisplastiche
Emergenze in ematologia
Diagnosi difficili e rare

2015

Il mieloma multiplo nell' era dei nuovi farmaci
Farmaci bersaglio (I)
Linfoma follicolare

2016

Farmaci bersaglio (II)
Trapianto Allogenico
Terapia di supporto in oncoematologia

2017

Sindromi rare
Lesioni genetiche ed evoluzione clonale
Nuove strategie di immunoterapia

2018

Linfomi a grandi cellule
Mielofibrosi
Controversie nel Mieloma Multiplo

2019

Anemie: recenti acquisizioni

La rivista è scaricabile dai siti web:

Ematologia oncologica
www.ematologiaoncologica.it

Fondazione Matarelli
www.fondazionematarelli.it

Società Italiana di Ematologia (SIE)
www.siematologia.it

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)
www.siesonline.it

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini
www.beat-leukemia.com

Nel prossimo numero: Anno 6 - Numero 3 - 2019

Disordini linfo-plasmacellulari

MGUS

Waldenstrom

Leucemia plasmacellulare

Amiloidosi

Malattie delle catene pesanti

Sindrome di Poems

Con il supporto non condizionante di

Celgene