



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
EMATOLOGIA**

**CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO
XX°**

**Titolo della tesi
Utilizzo di sangue periferico come fonte alternativa al sangue midollare per il
monitoraggio della Malattia Minima Residua
nella Leucemia Mieloide Acuta**

**Nome e Cognome del Dottorando
Carla Mazzone**

Docente Guida/Tutor: Prof. Adriano Venditti

Coordinatore: Prof. Sergio Amadori

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
2. PAZIENTI E METODI	6
3. RISULTATI	11
4. DISCUSSIONE	14
5. CONCLUSIONI	18
6. BIBLIOGRAFIA	20

INTRODUZIONE

Le attuali strategie terapeutiche per il trattamento di pazienti adulti con leucemia mieloide acuta (LMA) permettono di ottenere la remissione completa (RC) morfologica nel 50-80% dei casi.

Tuttavia, la maggior parte di questi pazienti sono destinati a recidivare a causa della persistenza di cellule leucemiche residue che sopravvivono all'effetto citotossico della chemioterapia e che non sono identificabili mediante microscopia convenzionale. (7,8)

Sebbene, nei pazienti con LMA, la dimostrazione morfologica della RC dopo terapia di induzione rimanga un momento fondamentale per il proseguo della terapia post-remissionale, recenti studi hanno dimostrato come la determinazione della malattia minima residua (MMR) sia utile per una più appropriata modulazione della stessa. (9-11) Vi è quindi, un generale accordo sul fatto che, una volta ottenuta la RC, sia necessario utilizzare strumenti diagnostici più sofisticati ed affidabili al fine di poter individuare pazienti ad “alto rischio” di recidiva rispetto a coloro a “basso rischio” e di adattare la terapia post-remissionale al tipo di rischio stesso. Un'accurata determinazione quantitativa della entità della MMR al momento del raggiungimento della RC consentirebbe quindi una più adeguata modulazione della intensità della terapia post-remissionale, evitando situazioni di eccesso o al contrario di difetto di trattamento.

I metodi più comunemente impiegati per la valutazione della MMR sono basati sulla identificazione, ad elevata sensibilità, di “markers” molecolari o immunofenotipici espressi dal clone leucemico grazie, rispettivamente, alle tecniche di “polymerase chain reaction” (PCR) e citometria a flusso multiparametrica (CFMP). A dispetto della sua sensibilità l'approccio mediante PCR è limitato a quei casi di LAM (circa il 20-40%) caratterizzati dalla presenza di specifici riarrangiamenti genici. (8.9). La CFMP può consentire una sensibilità altrettanto efficiente (una cellula bersaglio per 104-105 cellule totali), rappresentando un test estensibile al più del 90% delle LAM. L'impiego di tale tecnica richiede che, per poter essere identificata in condizioni di MMR, la cellula leucemica esprima un fenotipo aberrante o “leucemia-associato (FLA). I FLA consistono in combinazioni di antigeni cellulari di membrana, citoplasmatici e nucleari che in condizioni fisiologiche sono assenti od espressi a bassa frequenza (< 0.01%) dalle cellule ematopoietiche normali e che quindi possono essere utilizzati per la valutazione della MMR. (8.12)

Sebbene l'identificazione della MMR mediante CFMP utilizzando sangue midollare abbia fornito utili indicazioni prognostiche in pazienti adulti affetti da LAM, (13-16) l'attuale interesse è volto a verificare l'impiego di sangue periferico (SP) come possibile fonte alternativa al midollo osseo (MO). Ciò fonda sul presupposto che la presenza in circolo di cellule leucemiche al momento della RC morfologica, può essere correlata con la persistenza

midollare di cellule leucemiche, oppure con la precoce immissione in circolo delle stesse, espressione quest'ultima di maggiore aggressività di malattia.

Gli studi iniziali di monitoraggio della MMR su SP sono stati eseguiti mediante metodiche di PCR in pazienti affetti da leucemia linfoide acuta B.⁽¹⁷⁻¹⁸⁾. Tali studi hanno dimostrato che nel SP la MMR è presente e misurabile e che i livelli quantizzabili sono generalmente inferiori a quelli osservabili nel MO. Utilizzando la CFMP, Coustan-Coustan-Smith *et al*, hanno confermato tale osservazione nelle leucemie linfoide acute B, dimostrando invece nelle forme T, una sostanziale sovrapposizione tra livelli di MMR nel SP e MO. ⁽¹⁹⁾.

Sebbene tali dati identifichino il SP come valida fonte alternativa al MO, pochi sono gli studi pubblicati in tal merito riguardo a pazienti con LAM. In un recente studio, ⁽²⁰⁾, gli autori hanno dimostrato mediante PCR quantitativa che, in pazienti affetti da LAM con t(8;21) e riarrangiamento AML1/ETO, la MMR era misurabile alla medesima sensibilità tanto nel SP che nel MO.

Sulla base di tali premesse, abbiamo determinato mediante CFMP i livelli di MMR nel SP e nel MO di 50 pazienti adulti affetti da LAM.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la fattibilità della valutazione della MMR nel SP ed il suo significato prognostico.

PAZIENTI E METODI

Nello studio sono stati inclusi 50 pazienti affetti da LAM *de novo*, diagnosticati presso il Dipartimento di Ematologia dell' Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".

I criteri di inclusione nello studio erano:

1. diagnosi di LAM ad eccezione del sottotipo FAB M3
2. espressione di un FLA
3. eleggibilità del paziente ad una chemioterapia intensiva
4. ottenimento della RC dopo la terapia d'induzione

La valutazione della MMR è stata effettuata al termine della terapia d'induzione in 50 campioni di SP e 50 di MO. Due pazienti di 50 sono recidivati precocemente prime della terapia di consolidamento, pertanto, al termine della terapia di consolidamento sono state analizzate 48 coppie di SP e MO.

PROTOCOLLI DI TERAPIA

Il protocollo AML-10 EORTC/GIMEMA includeva pazienti di età 18-60 anni. ⁽²¹⁾ La terapia d'induzione comprendeva citosina arabinoside (100 mg/m² giorni 1-10), etoposide (100 mg/m² giorni 1-5) e daunorubicina (50 mg/m²), mitoxantrone (12 mg/m²) o idarubicina (10 mg/m²), sulla base del random assegnato, nei giorni 1,3 e 5. Come consolidamento i pazienti ricevevano citosina arabinoside (500 e mg/m², ogni 12 ore, g 1-6) e la stessa

antraciclina ricevuta in induzione (giorni 4-6). I pazienti con donatore HLA compatibile erano avviati ad trapianto allogenico di cellule staminali, mentre gli altri, dopo ulteriore randomizzazione, ricevevano trapianto autologo di cellule staminali ottenute da SP o da MO.

I pazienti arruolati al protocollo AML-12 EORTC/GIMEMA, ricevevano come induzione citosina arabinoside (100 mg/m^2 giorni 1-10), etoposide (100 mg/m^2 giorni 1-5) e daunorubicina (50 mg/m^2 giorni 1, 3, 5); come consolidamento citosina arabinoside (500 mg/m^2 ogni 12 ore, giorni 1-6) e daunorubicina (50 mg/m^2 g 4-6). I pazienti con donatore HLA compatibile erano avviati ad trapianto allogenico di cellule staminali, periferiche, coloro senza un donatore ricevevano trapianto autologo di cellule staminali seguito da nessuna terapia o interleukina 2 per via sottocutanea, sulla base del random assegnato.

I pazienti di età > 60 anni venivano trattati secondo il protocollo AML-13 EORTC/GIMEMA. ⁽²²⁾ La terapia di induzione consisteva in mitoxantrone (7 mg/m^2 g 1, 3 e 5), citosina arabinoside (100 mg/m^2 g 1-7) ed etoposide (100 mg/m^2 g 1-3), come terapia di induzione. Pazienti che ottenevano la RC venivano randomizzati per una terapia di consolidamento (due cicli) endovenosa oppure orale. Il trattamento di consolidamento endovenoso era costituito da idarubicina (8 mg/m^2 giorni 1, 3 e 5), citosina arabinoside (100 mg/m^2 g 1-5) ed etoposide (100 mg/m^2 g 1-3). Il consolidamento orale prevedeva idarubicina (20 mg/m^2 g 1,3,5), etoposide (50 mg/m^2 due volte al

giorno, giorni 1-3) e citosina arabinoside sottocutanea (50 mg/m² due volte a giorno, giorni 1-5).

ANALISI IMMUNOFENOTIPICA E DETERMINAZIONE DELLA MMR

I FLA sono stati determinati marcando le cellule leucemiche con anticorpi monoclonali fluorocromo-coniugati. Una volta identificato il FLA, i campioni, sono stati nuovamente marcati in tripla/quadrupla fluorescenza utilizzando le combinazioni di anticorpi rilevanti; sono stati presi in considerazione quei FLA espressi in almeno il 50% dei blasti leucemici. In questo modo è stato possibile costruire per ciascun paziente un profilo fenotipico specifico è stato poi utilizzato nel “follow-up” successivo alla RC per quantizzare la MMR. Infine, per ciascun caso sono state utilizzate almeno due combinazioni aberranti per ovviare a possibili false negatività dovute a “switch fenotipici”. (25-27). Sono stati inoltre impiegati come controlli campioni di MO e SP di donatori sani oppure di pazienti affetti da linfoma senza infiltrazione midollare. (13,23,24)

I campioni sono stati acquisiti impiegando il software Cell-Quest (Becton Dickinson) e disegnando dei “live gates” sulla regione blastica (light/orthogonal scatter) e sui rispettivi plots di fluorescenza. L’analisi dei campioni acquisiti è stata poi eseguita con il software Paint-a-Gate (Becton Dickinson); tale programma mediante analisi multidimensionale consente di identificare e misurare con precisione il numero di cellule leucemiche rispetto

alla popolazione midollare e periferica globale. Inoltre il programma Paint-a-Gate possiede un'opzione (Mouse Trax Control) che consente di ripetere automaticamente le procedure di analisi. Quando questa opzione è attivata, ogni passaggio eseguito durante l'analisi viene registrato e memorizzato in un file, tal per cui la medesima analisi è ripetibile successivamente su altri "file" relativi ai campioni del medesimo paziente, processati durante il "follow-up" seguente l'ottenimento della RC. Quindi, per ogni paziente è stato possibile costruire e memorizzare un "profilo fenotipico" individuale, da utilizzare nei controlli successivi. (13.23.24). Una volta identificato un determinato FLA, i successivi campioni di MO e SP sono stati prelevati, alla ripresa ematologia dopo induzione e consolidamento.

ANALISI STATISTICA

Per l'analisi della correlazione dei livelli di MMR nel SP e MO dopo induzione e consolidamento è stato utilizzato il test di Spearman(r).

I valori dei livelli di MMR, osservati dopo le terapie d'induzione e di consolidamento, sono stati analizzati mediante il "maximally selected long rank statistics" per stabilire il "cut-off" prognosticamente rilevante. (28)

La relazione tra i livelli di MMR, le caratteristiche dei pazienti e la risposta al trattamento è stata valutata mediante il test χ^2 o Fisher (nel caso in cui il gruppo in esame comprendesse < di 20 casi). Un valore di p uguale o

inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. La RC e la recidiva sono state definite in base ai criteri standard internazionali. ⁽³⁰⁾

La sopravvivenza globale (SG) è stata calcolata dalla data della diagnosi alla data della morte o dell'ultimo follow-up. La sopravvivenza libera da malattia (SLM) è stata misurata dall'ottenimento della RC sino alla recidiva. La SG e la SLM sono state analizzate mediante il test di Kaplan-Meier, mentre per il confronto di SG e SLM tra i due gruppi è stato impiegato il log-rank test.

Per valutare l'effetto indipendente di singole variabili sulla SG e SLM è stato impiegato il modello di analisi multivariata di Cox secondo la "proportional hazards regression". In tale modello sono state considerate solo quelle variabili significative in analisi univariata. Un valore di p uguale o inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo in tutti i casi.

RISULTATI

Le caratteristiche cliniche dei pazienti inclusi nello studio sono riportate nella Tabella 1.

Il 77% dei pazienti pari a 33 è andato incontro a recidiva dopo un tempo mediano di 10 mesi (range, 2-24); il follow-up mediano è stato 18 mesi (range, 3-85).

In primo luogo abbiamo confrontato i livelli di MMR in 50 campioni di sangue periferico e midollare prelevati contemporaneamente, dopo terapia di induzione.

Il valore della MMR era costantemente valutabile in entrambi i campioni.

Il valore mediano di cellule leucemiche residue (RLC) nel midollo e nel sangue periferico erano rispettivamente 5.2×10^{-3} (range 1×10^{-4} - 1.64×10^{-1}) e di 2.85×10^{-3} (range 1×10^{-5} - 1.25×10^{-1}) ; tra le due fonti è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa ($r=0.86$, $p < 0.0001$) (figura 1A).

In 12 su 50 dei campioni esaminati (24%), il livello di RLC era 10 volte maggiore rispetto al sangue periferico ; di contro, in 3 casi (6%), il livello di RLC era 10 volte minore rispetto ai campioni di sangue midollare. Da osservare che si tratta di tre casi di leucemia monoblastica con localizzazione

extramidollare all'esordio (un caso con ipertrofia gengivale, un caso con localizzazione nell'anello del Waldeyer, un caso di marcata splenomegalia).

Dal momento che due pazienti hanno presentato una recidiva precoce dopo ciclo di induzione, 48 sono stati i campioni disponibili per la valutazione dopo ciclo di consolidamento; in questa fase, il valore mediano di cellule leucemiche residue nel sangue periferico e midollare era rispettivamente 4.1×10^{-3} (range 2×10^{-5} - 6.3×10^{-2}) e 3.7×10^{-3} (range 1×10^{-5} - 1.34×10^{-2}), ed è stata trovata una correlazione significativa tra le due fonti ($r=0.82$, $p < 0.0001$) (figura 1B).

In 12 campioni (25%), i livelli di MMR nel sangue midollare sono risultati 10 volte superiori rispetto al sangue periferico, mentre in 3 campioni (6%) si è verificato l'evento opposto.

Il valore di cut-off di cellule leucemiche residue nel sangue periferico con una correlazione statisticamente significativa è stato posto a 1.5×10^{-4} ; infatti, 33 pazienti su 44 (75%) con livelli di MMR post-induzione superiori a 1.5×10^{-4} (gruppo MMRInd+) sono andati incontro a recidiva di malattia, rispetto a 6 pazienti con livelli di MMR inferiori a 1.5×10^{-4} (gruppo MMRInd-) ($p=0.00078$).

Non sono state osservate differenze statisticamente significative nella SG tra i due gruppi di pazienti, tuttavia il gruppo MMRInd+ ha presentato una sopravvivenza libera da recidiva di durata inferiore ($p=0.001$). Dopo terapia di consolidamento, utilizzando lo stesso valore di cut-off di 1.5×10^{-4} , 38 pazienti sono stati considerati MMRCons+, e 31 di loro (82%) sono andati incontro a

recidiva; 9 dei restanti 10 pazienti MMRCons- mantengono la RC ($p=0.00006$). Anche in questa fase dello studio non state riscontrate differenze statisticamente significative nella sopravvivenza globale tra i due gruppi di pazienti, il valore mediano di SML, non è stato raggiunto nei pazienti MMRCons-, mentre è stato pari a 11 mesi nei pazienti MMRCons+.

Abbiamo quindi valutato mediante il modello di regressione, l'impatto prognostico delle seguenti variabili clinico-biologiche sulla SML, come la leucocitosi (WBC), la glicoproteina P170 (PgP), la citogenetica, il livello di MMR nel SP dopo induzione e consolidamento. (Tabella 2A)

Abbiamo riscontrato che solamente la condizione di MMRCons+ nel sangue periferico è risultata una variabile indipendente associata in maniera significativa ad una ridotta SLM ($p=0.0026$) (Figura 3).

Sebbene la condizione di MMRInd+ non sia stata considerata un elemento di impatto sulla SLM, abbiamo tuttavia osservato che il numero di cellule leucemiche residue nel SP dopo terapia di induzione influenza significativamente la citoriduzione ottenuta con la terapia di consolidamento.

DISCUSSIONE

Sebbene nei pazienti affetti da LAM l'analisi morfologica del midollo sia fondamentale per stabilire la RC dopo la terapia d'induzione, tale esame , tuttavia non fornisce informazioni sufficienti sulla qualità della RC.

Infatti è ormai ampiamente dimostrato che al di sotto della soglia di remissione morfologica vi sono livelli variabili di cellule leucemiche residue.

Nel corso degli anni, l'analisi per la determinazione della MMR in CFMP è notevolmente migliorata tramite miglioramenti nella qualità e nella varietà degli anticorpi usati e dal perfezionamento della medesima tecnica.

La CFMP è attualmente la metodica più semplice e facilmente utilizzabile nella valutazione MMR in pazienti affetti da LMA.

La validità di questo approccio è stata confermata da numerosi studi che hanno dimostrato come esista una significativa correlazione tra outcome clinico e livelli di MMR valutati con questa metodica. (13-15,31).

Recentemente, è stato proposto di considerare il sangue periferico come un materiale alternativo per monitorare la MMR nei pazienti affetti da LAM. (19.20.32).

Ciò è basato sul presupposto, che la presenza in circolo di cellule leucemiche al momento della remissione completa morfologica, può essere correlata con persistenza di cellule leucemiche nel midollo, oppure precoce

immissione in circolo delle stesse, comunque espressione di maggiore aggressività, e quindi potrebbe rappresentare un indice precoce di recidiva.

Nel nostro studio, siamo stati in grado di valutare la MMR nel sangue periferico di tutti i pazienti inclusi; il livello di cellule leucemiche residue nel sangue periferico rifletteva significativamente quello osservato nel midollo osseo ad ogni time-point.

Infatti, è stata osservata una correlazione statisticamente significativa tra le due misurazioni non solo dopo terapia di induzione e di consolidamento, ma anche durante il follow-up.

I nostri risultati sono concordanti con gli studi recenti basati sulle tecniche di PCR per monitorare la MMR nel sangue periferico e midollare di pazienti affetti da LMA con geni di fusione specifici. (20,32)

Inoltre, abbiamo indagato sul possibile ruolo prognostico della MMR nel sangue periferico e su quale sia il time-point più predittivo dell'andamento clinico della patologia. Abbiamo così riscontrato che un valore di cellule leucemiche residue nel sangue periferico superiore a 1.5×10^{-4} dopo terapia di consolidamento (MMRCons+), è significativamente correlato a recidiva di malattia ed a una SLM di minore durata. Per contro, i sei pazienti MMRCons- mantengono la RC con un follow-up mediano di 14 mesi. Negli studi precedenti, svolti su campioni di sangue midollare , abbiamo trovato più utile da un punto di vista prognostico il valore di MMR dopo consolidamento; (13,23-24);

Difatto nel presente studio abbiamo dimostrato come la determinazione dello stato di MMR su sangue periferico dopo il consolidamento può essere ugualmente informativa senza alcuna differenza statisticamente significativa con quella da sangue midollare. (13.22).

Possiamo confermare quanto già osservato in precedenza sull'alto valore predittivo dei livelli di MMR dopo consolidamento. Inoltre, abbiamo osservato che tale valore non è influenzato dai livelli di MMR dopo induzione; infatti, tre dei sei pazienti MMRCns- erano positivi dopo induzione, e tuttavia hanno avuto lo stesso andamento clinico favorevole dei tre pazienti MMRIInd-.

Ad ogni modo, la qualità della citoriduzione ottenuta con il consolidamento sembra risente dei livelli di MMR dopo induzione. Infatti, i pazienti divenuti MMRCns-, dopo induzione, presentavano nel sangue periferico un numero di cellule residue di 2 logaritmi inferiore rispetto ai pazienti MMRCns+ (Figura 4). Ciò ci suggerisce che la condizione di MMRIInd- predisponga ad una prognosi favorevole, sebbene il reale fattore prognostico favorevole sia la citoriduzione ottenuta dopo consolidamento. A confermare il dato è l'osservazione statistica che i livelli di MMR nel sangue periferico dopo induzione hanno un impatto significativo in analisi univariata, ma non in analisi multivariata. Di contro, i livelli di MMR dopo consolidamento rappresentano una variabile di impatto significativo sia in analisi univariata che multivariata.

Nel nostro studio, le caratteristiche cliniche elencate nella tabella 1 non hanno influenzato l'andamento clinico della malattia; in particolare, la citogenetica non ha avuto un impatto sulla SG e sulla SLM. Questo dato è in parte attribuibile al relativamente basso numero dei pazienti inclusi, ed in parte alla prevalenza di cariotipi normali (35 su 44 valutabili). Infine, sei pazienti sono in RC continua, nonostante la presenza di MMR dopo consolidamento: tre di essi sono stati sottoposti ad allo trapianto, e si può ipotizzare che la MMR sia tenuta sotto controllo dall'effetto Graft Versus Leukemia. E' verosimile che la malattia sia ancora presente nei restanti tre pazienti, ma il breve periodo di follow-up potrebbe spiegare perché non si sia ancora osservata una recidiva.

CONCLUSIONI

I risultati del nostro studio dimostrano che la valutazione della MMR su sangue periferico mediante la CFMP ha un importante impatto prognostico sulla terapia dei pazienti affetti da LAM. In particolare, la quantificazione della MMR a differenti tappe del trattamento potrebbe aiutare, in futuro prossimo, alla definizione di programmi terapeutici personalizzati, stratificando i pazienti in differenti categorie di rischio. Inoltre il monitoraggio della MMR su sangue periferico dopo la fine del trattamento permette una sorveglianza adeguata dei pazienti che tendono ad avere una riespansione della MMR e consente, quindi un intervento terapeutico precoce.

In conclusione i nostri risultati se confermati su un numero più ampio di pazienti, dimostrano che:

1. La CFMP è attualmente la metodica più semplice e facilmente utilizzabile nella valutazione della MMR in pazienti affetti da LMA. La validità di questo approccio è stata confermata da numerosi studi che hanno dimostrato come esista una significativa correlazione tra outcome clinico e i livelli di MMR valutati con questa metodica.
2. I livelli di MMR nel sangue periferico sono correlati a quelli osservati nel midollo osseo, permettendo così di considerare il sangue periferico come fonte alternativa.

3. La determinazione della MMR nel sangue periferico dopo il ciclo di consolidamento fornisce utili indicazioni ai fini prognostici.
4. Infine la valutazione dinamico/quantitativa della MMR su sangue periferico e midollare, potrebbe in maniera significativa stratificare ulteriormente i pazienti per programmi terapeutici il più possibile personalizzati.
5. Il ruolo di una terapia di prevenzione nei pazienti che mostrano un progressivo incremento della MMR dopo aver completato il programma terapeutico.

Considerando il numero relativamente basso dei nostri pazienti, i prossimi studi su larga scala potranno confermare questi risultati preliminari e standardizzare le procedure di monitoraggio della MMR.

BIBLIOGRAFIA

1. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, Hann IM, Rees JK, Gray RG, et al. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC 10 trial. *Lancet* 1998; 351:700-8.
2. Harousseau JL, Cahn JY, Pignon B, Witz F, Milpied N, Delain M, et al. Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 1997;90:2978-86.
3. Bishop JF, Matthews JP, Young GA, Szer J, Gillett A, Joshua D, et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 87:1710-7.
4. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1995;332:217-23.
5. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994;331:896-903.
6. Heil G, Hoelzer D, Sanz MA, Lechner K, Liu Yin JA, Papa G, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of filgrastim in remission induction and consolidation therapy for adults with de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1997;90:4710-8.
7. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2003; 121:823-38.
8. Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Bailliere's Clin Hematol* 2003;16:599-612.
9. Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 1998;28:1731-8.

10. Lo Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;94:12-22.
11. Diverio D, Rossi V, Avvisati G, De Santis S, Pistilli A, Pane F, et al. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RAR α fusion gene in patients with acute promyelocytic leukaemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. *Blood* 1998;92:784-9.
12. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukaemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999;38:139-52.
13. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C, et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3948-52.
14. Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, Del Poeta G, Del Principe ML, Cox MC, et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006;20:1783-9.
15. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez Berges C, Diaz-Mediavilla J, Gutierrez N, Canizo C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001;98:1746-51.
16. Kern W, Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute leukaemia patients. *Haematologica* 2004; 89:528-40.
17. Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Dolman G, Neoh SH, Peng LM, et al. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 1997;99:314-9.
18. van Rhee F, Marks DI, Lin F, Szydlo RM, Hochhaus A, Treleaven J, et al. Quantification of residual disease in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia: comparison of blood and bone marrow. *Leucemia* 1995;9:329-35.
19. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro

RC, Rivera GK, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2002;100:2399-402.

20. Leroy H, de Botton S, Grardel-Duflos N, Darre S, Leleu X, Roumier C, et al. Prognostic value of realtime quantitative PCR (RQ-PCR) in AML with t(8;21). *Leukemia* 2005; 19:367-72.

21. Vignetti M, De Witte TM, Suci S. Daunorubicin (DNR) vs mitoxantrone (MTZ) vs idarubicin (IDA) administered during induction and consolidation in acute myelogenous leukemia (AML) followed by autologous or allogeneic stem cell transplantation (SCT): results of the EORTC-GIMEMA. *Blood* 2003;102 Suppl 1:611a[abstract].

22. Amadori S, Suci S, Jehn U, Stasi R, Thomas X, Marie JP, et al. Use of glycosylated recombinant human G-CSF (lenograstim) during and/or after induction chemotherapy in patients 61 years of age and older with acute myeloid leukemia: final results of AML-13, a randomized phase 3 study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (EORTC/GIMEMA) Leukemia Groups. *Blood* 2005; 106: 27-34.

23. Venditti A, Tamburini A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Panetta P, et al. Clinical relevance of minimal residual disease detection in adult acute myeloid leukemia. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11:349-57.

24. Venditti A, Maurillo L, Buccisano F, Del Poeta G, Mazzone C, Tamburini A, et al. Pretransplant minimal residual disease level predicts clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia receiving high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 2003; 17:2178-82.

25. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sule N, Mrozek K, et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implication for residual disease detection. *Blood* 2001;97:3574-80.

26. Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. Stability of leukemia associated aberrant immunophenotypes in patients with acute leukaemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;62:25-38.

27. Gaipa G, Basso G, Maglia O, Leoni V, Faini A, Cazzaniga G, et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implication for minimal residual disease detection. *Leukemia* 2005;19:49-56.
28. Horton T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Statist Data Anal* 2003;43:121-37.
29. Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-61.
30. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey E, et al. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardizations of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4642-9.
31. Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, Gerbing RB, Bernstein ID, Smith FO, et al. Immunophenotyping evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2003; 101:3398-408.
32. Stentoft J, Hokland P, Ostergaard M, Hasle H, Nyvold CG. Minimal residual core binding factor AMLs by real time quantitative PCR-initial response to chemotherapy predicts event free survival and close monitoring of peripheral blood unravels the kinetics of relapse. *Leuk Res* 2006; 30:389-95.

Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow.

BACKGROUND AND OBJECTIVES:

To date, bone marrow (BM) is the most common source of cells to use in order to assess minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML). In the present study, we investigated whether peripheral blood (PB) could be an alternative source of cells for monitoring MRD in AML.

DESIGN AND METHODS:

Fifty patients with AML were monitored for MRD after the achievement of complete remission. Using multiparametric flow cytometry we compared the levels of MRD in 50 and 48 pairs of BM and PB after induction and consolidation, respectively.

RESULTS:

After induction and consolidation therapy, the findings in BM and PB were significantly concordant ($r=0.86$ and 0.82 , respectively, $p<0.001$ for both comparisons). The cut-off value of residual leukemic cells in PB which correlated with outcome was 1.5×10^{-4} . Thirty-three of 43 (77%) patients with $>1.5 \times 10^{-4}$ residual leukemic cells in PB after induction had a relapse, whereas the seven patients with lower levels did not ($p=0.0002$). After consolidation, 38 patients had a level of MRD $>1.5 \times 10^{-4}$ and 31 (82%) had a relapse; nine out of the remaining ten patients, whose levels of MRD were below 1.5×10^{-4} , are still relapse-free ($p=0.00006$). In multivariate analysis, PB MRD status at the end of consolidation was found to have a significant effect on relapse-free survival ($p=0.036$).

INTERPRETATION AND CONCLUSIONS:

These preliminary results indicate that: (i) PB evaluation can integrate BM assessment for MRD detection in patients with AML; (ii) PB MRD status at the end of consolidation therapy may provide useful prognostic information.

Utilizzo di sangue periferico come fonte alternativa al sangue midollare per il monitoraggio della Malattia Minima Residua nella Leucemia Mieloide Acuta

INTRODUZIONE:

L'identificazione della MMR mediante CFMP utilizzando sangue midollare ha fornito utili indicazioni prognostiche in pazienti adulti affetti da LAM.

L'attuale interesse è volto a verificare l'impiego di sangue periferico (SP) come possibile fonte alternativa al midollo osseo. Recenti studi hanno dimostrato come la determinazione della malattia minima residua (MMR) sia utile per una più appropriata modulazione della stessa. Ciò fonda sul presupposto che la presenza in circolo di cellule leucemiche al momento della RC morfologica, può essere correlata con la persistenza midollare di cellule leucemiche, oppure con la precoce immissione in circolo delle stesse, espressione quest'ultima di maggiore aggressività di malattia.

PAZIENTI E METODI:

Nello studio sono stati inclusi 50 pazienti affetti da LAM *de novo*. La valutazione della MMR è stata effettuata al termine della terapia d'induzione in 50 campioni di SP e 50 di MO. Due pazienti di 50 sono recidivati precocemente prima della terapia di consolidamento, pertanto, al termine della terapia di consolidamento sono state analizzate 48 coppie di SP e MO.

In primo luogo abbiamo confrontato i livelli di MMR in 50 campioni di sangue periferico e midollare prelevati contemporaneamente, dopo terapia di induzione.

RISULTATI:

Il 77% dei pazienti pari a 33 è andato incontro a recidiva dopo un tempo mediano di 10 mesi (range, 2-24); il follow-up mediano è stato 18 mesi (range, 3-85).

Il valore mediano di cellule leucemiche residue nel midollo e nel sangue periferico erano rispettivamente 5.2×10^{-3} (range 1×10^{-4} - 1.64×10^{-1}) e di 2.85×10^{-3} (range 1×10^{-5} - 1.25×10^{-1}); tra le due fonti è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa ($r=0.86$, $p < 0.0001$). Il valore di cut-off di cellule leucemiche residue nel sangue periferico con una correlazione statisticamente significativa è stato posto a 1.5×10^{-4} ; infatti, 33 pazienti su 44 (75%) con livelli di MMR post-induzione superiori a

1.5×10^{-4} (gruppo MMRIInd+) sono andati incontro a recidiva di malattia, rispetto a 6 pazienti con livelli di MMR inferiori a 1.5×10^{-4} (gruppo MMRIInd-) ($p=0.00078$). Non sono state osservate differenze statisticamente significative nella sopravvivenza globale tra i due gruppi di pazienti, tuttavia il gruppo MMRIInd+ ha presentato una sopravvivenza libera da recidiva di durata inferiore ($p=0.001$). Dopo terapia di consolidamento, utilizzando lo stesso valore di cut-off di 1.5×10^{-4} , 38 pazienti sono stati considerati MMRIInd+, e 31 di loro (82%) sono andati incontro a recidiva; 9 dei restanti 10 pazienti MMRIInd- mantengono la RC ($p=0.00006$). La condizione di MMRIInd+ nel sangue periferico è risultata una variabile indipendente associata in maniera significativa ad una ridotta sopravvivenza libera da malattia ($p=0.0026$).

CONCLUSIONI:

I risultati del nostro studio dimostrano che la valutazione della MMR su sangue periferico mediante la CFMP ha un importante impatto prognostico sulla terapia dei pazienti affetti da LAM. In particolare, la quantificazione della MMR a differenti tappe del trattamento potrebbe aiutare, in futuro prossimo, alla definizione di programmi terapeutici personalizzati, stratificando i pazienti in differenti categorie di rischio. Inoltre il monitoraggio della MMR su sangue periferico dopo la fine del trattamento permette una sorveglianza adeguata dei pazienti che tendono ad avere una riesplorazione della MMR e consente, quindi un intervento terapeutico precoce.

Table 1. Clinical characteristics of the patients (n=50).

Age (yrs)	
Median (range)	49 (21-73)
< 60 yrs	34 patients
> 60 yrs	16 patients
Sex	
Male	33
Female	17
FAB subtype	
M0/M1/M2	8/13/9
M4/M5/M6	8/11/1
Cytogenetic risk group*	
Favorable	4
Intermediate	35
Unfavorable	5

* Dato disponibile in 44 pazienti su 50. In base alla classificazione MRC, i pazienti sono stati suddivisi in tre categorie di rischio: "**favorevole**" [i casi con t (8;21), t(15,17) o inv(16)/del (16q), indipendentemente dalla presenza di anomalie citogenetiche aggiuntive]; "**sfavorevole**" [in assenza delle alterazioni favorevoli, con mutazioni citogenetiche complesse (in numero di 5 o più), -5,del(5q-),-7, o anomalie del cr.3]; "**intermedio**" [casi con cariotipo normale, alterazioni di 11q23, +8, del(7q), del(9q), cariotipo complesso (> 3 anomalie ma <5), o tutte le aberrazioni cromosomiche dal significato prognostico sconosciuto].

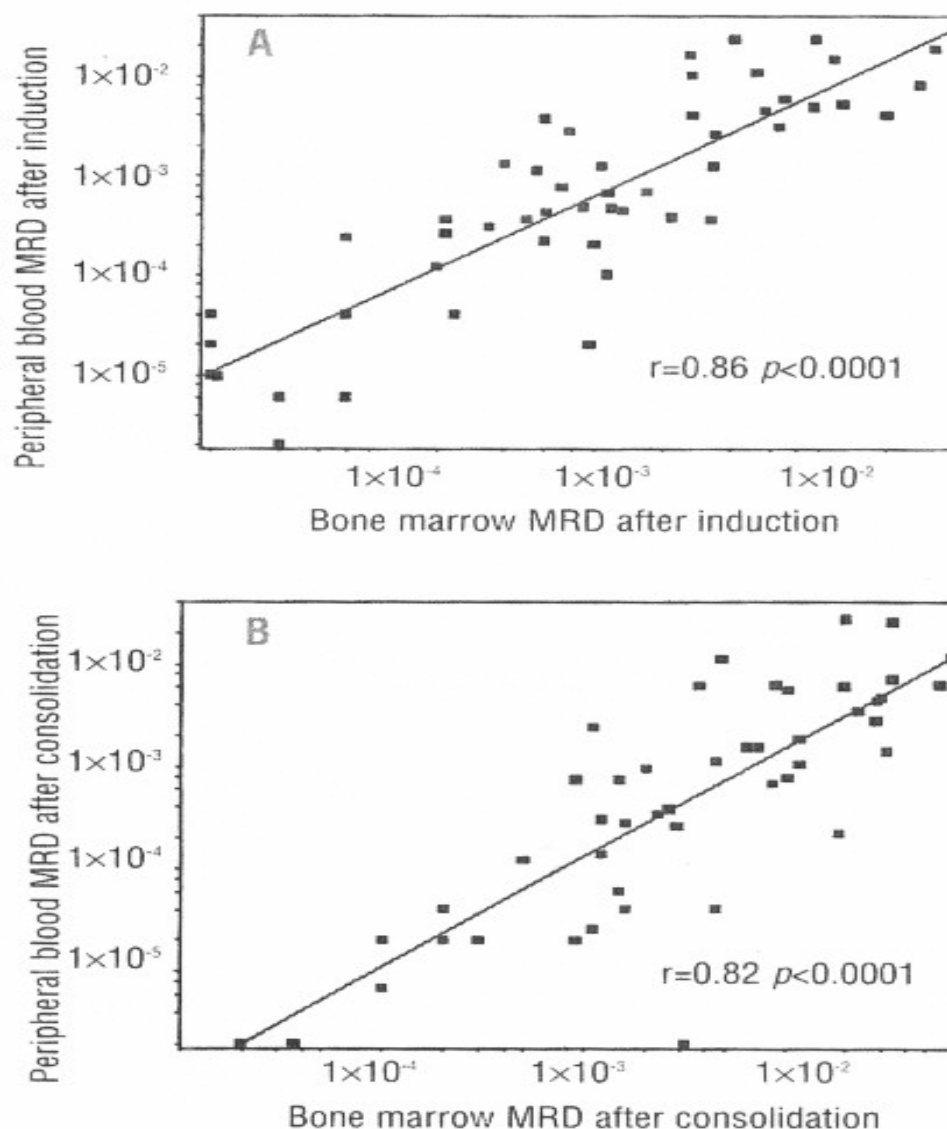


Figura (1A) e (1B).

Confronto tra i livelli di MMR nel sangue periferico e midollare.

Sono illustrate le curve di regressione dei 50 campioni raccolti contemporaneamente dopo terapia di induzione (1A) e dei 40 campioni raccolti dopo consolidamento (1B): è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa.

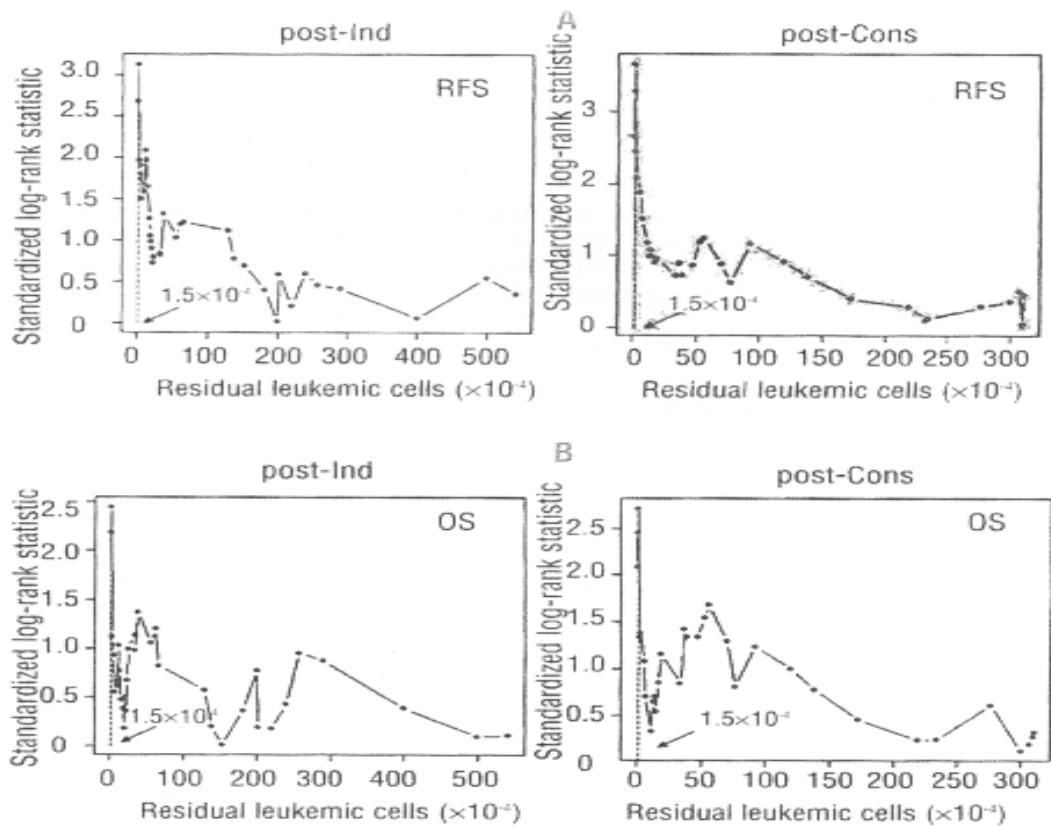


Figura 2. Detereminazione del cut-off di cellule leucemiche residue

Il valore di cut-off di cellule leucemiche residue nel sangue periferico con una correlazione statisticamente significativa è stato posto a 1.5×10^{-4} attraverso Maximally selected log-rank statistic, con conseguente identificazione di due gruppi differenti in termini di RFS e SG.

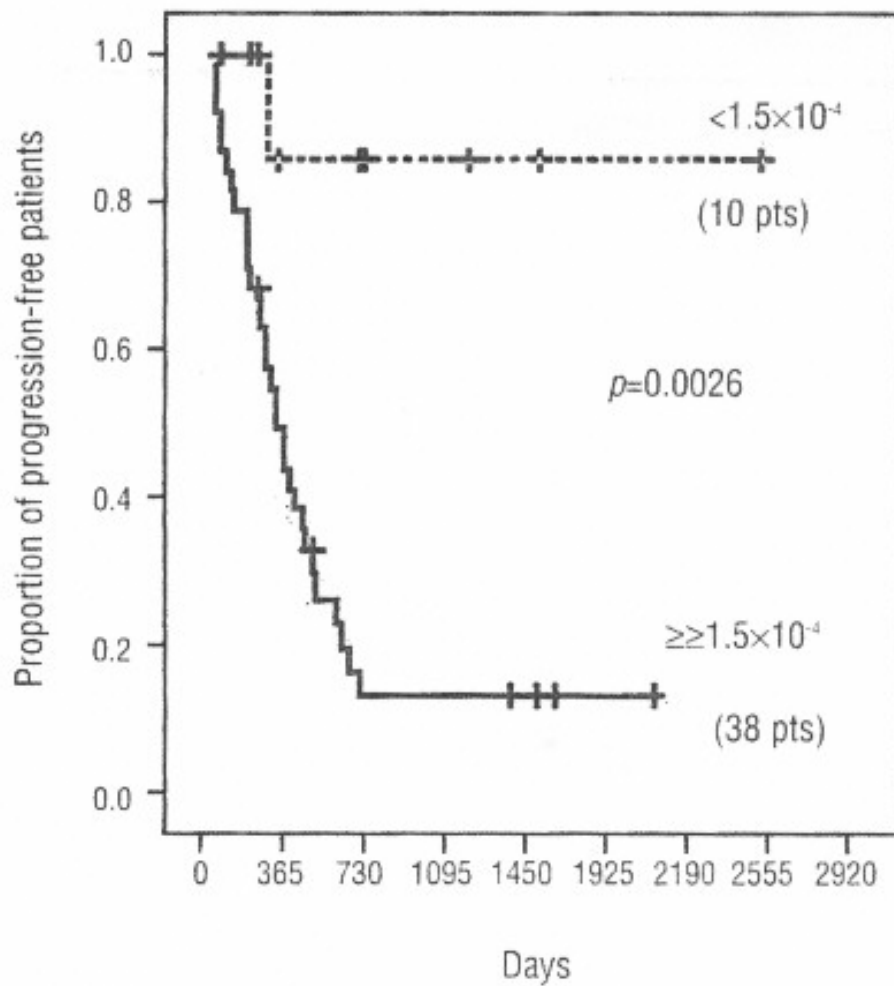


Figura 3. Sopravvivenza libera da malattia (SLM) e MMR nel sangue periferico dopo terapia di consolidamento.

Nei pazienti MRDCons+ (cellule leucemiche residue $> 1.5 \times 10^{-4}$) è stato osservato un valore mediano di SLR di 11 mesi, non raggiunto al contrario dai pazienti MRDCons- (cellule leucemiche residue $< 1.5 \times 10^{-4}$).

<i>Variable</i>	<i>p value</i>
A	
MDR1 phenotype	0.02
White blood cell count	0.05
Post-cons PB MRD status	0.002
Post-cons BM MRD status	0.02
<i>Variable</i>	<i>p value</i>
B	
MDR1 phenotype	NS
White blood cell count	NS
Post-cons PB MRD status	0.036
<i>Variable</i>	<i>p value</i>
C	
MDR1 phenotype	NS
White blood cell count	NS
Post-cons BM MRD status	0.04

MRD: minimal residual disease; Post-Cons: post consolidation, PB: peripheral blood; BM: bone marrow; MDR1: multidrug resistance; NS: not significant.

Tabella 2 A

Variabili significative in analisi univariata e multivariata in termini di SG e SLM.

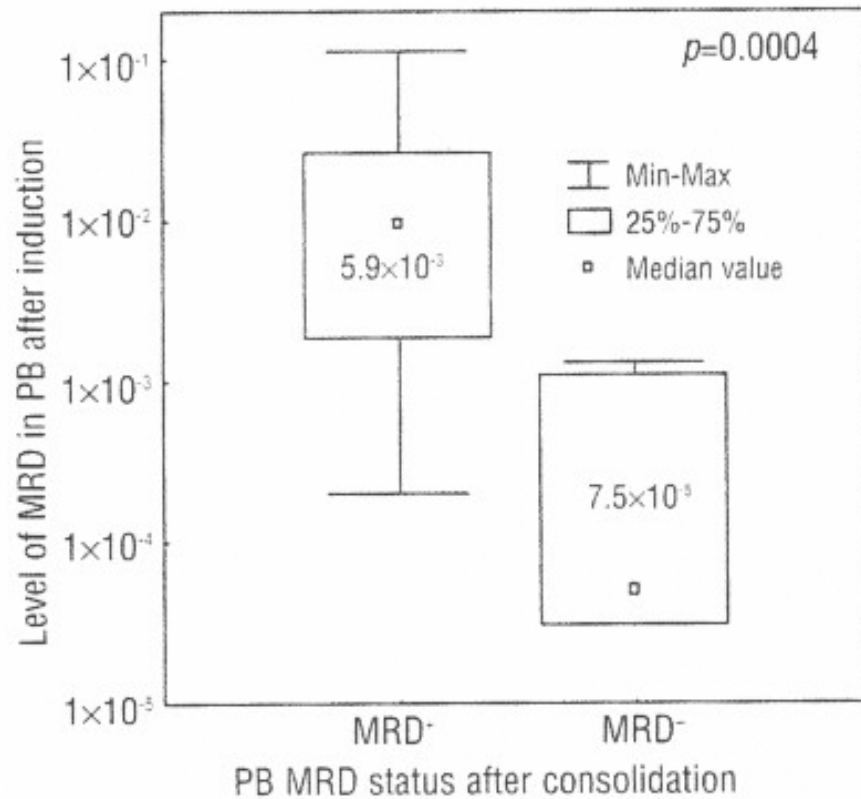


Figura 4. Correlazione tra i livelli di MMR nel sangue periferico dopo terapia di induzione e lo stato di MMR dopo consolidamento.

I pazienti con un'alta probabilità di diventare MRDCons- presentavano 2 logaritmi in meno di cellule leucemiche residue dopo terapia di induzione, rispetto ai pazienti MRDCons+.