

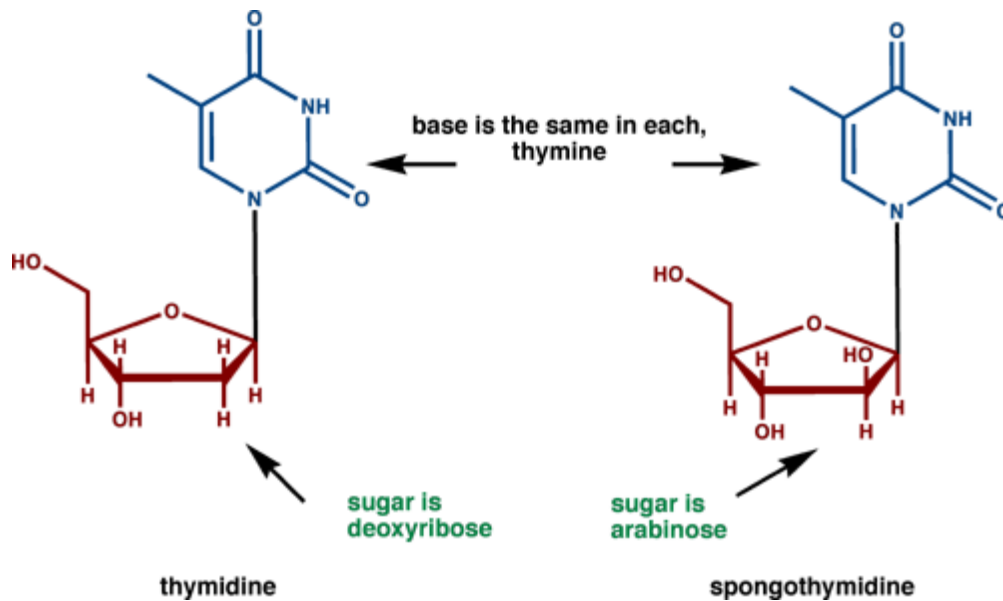
INTRODUZIONE-1

La leucemia mieloide acuta (LAM) è una malattia clonale caratterizzata dalla proliferazione e dall'accumulo di cellule progenitrici mieloidi nel midollo osseo, che in ultima analisi conduce al fallimento della proliferazione ematopoietica fisiologica. L'incidenza di LAM aumenta con l'età, ed i pazienti più anziani hanno in genere dei risultati peggiori in termini di risposta al trattamento rispetto ai pazienti più giovani.¹

La molecola Citarabina (Ara-C) è la pietra angolare della terapia di induzione e di consolidamento per la LAM.¹ Si tratta di un agente antimetabolita con il nome chimico di 1β-arabinofuranosylcitosina. La modalità d'azione è dovuta alla sua rapida trasformazione in citosina arabinoside trifosfato, che danneggia il DNA quando il ciclo cellulare si trova nella fase S (sintesi del DNA). Era il 1945 quando un giovane chimico organico di nome Werner Bergmann raccolse delle spugne in acque poco profonde al largo di Elliot Key, in Florida, e, ad un attento esame, rilevò che esse appartenevano ad una specie fino ad allora non identificata^{2,3}. Pochi anni dopo, Bergmann e il Dr. MW de Laubenfels trovarono la stessa specie di spugna nelle acque al largo delle Isole Bimini, nelle Bahamas. Il dottor de Laubenfels chiamò le spugne *Cryptotethia Crypta*. Esse furono messe in acetone bollente all'interno di un apparecchio chiamato [Estrattore Soxhlet](#). Bergmann trovò nelle spugne una "piuttosto copiosa quantità di un materiale perfettamente cristallino"^{2,3}. Le analisi dimostrarono che il nuovo composto conteneva azoto, era otticamente attivo, ed all'analisi spettrofotometrica mostrava uno spettro di assorbimento simile a quello della timidina, un nucleotide. Bergmann chiamò questo nuovo composto spongothymidina, in omaggio alle spugne dalle quali è stata isolata. In quel periodo fervido di attività scientifica le due aree di ricerca in progressione erano: 1. lo studio della replicazione del DNA e la mitosi cellulare (Watson e Crick); 2. la progettazione di prodotti chimici da utilizzare come agenti

antitumorali, ovvero di composti che interferiscono con la replicazione del DNA stesso.

Tra i primi lavori su ARA-C e spongionucleosidi si ricorda un interessante articolo scritto da Seymour Cohen nel 1963 ⁴ . Cohen già nel 1950 aveva notato una grande crescita di interesse nella chimica degli acidi nucleici, compresa la possibilità che questi composti - o analoghi di essi - potessero avere un'attività antitumorale ⁵ . Infatti, alla fine del 1950, erano stati creati vari nucleosidi sintetici che successivamente erano risultati essere potenti inibitori di vie principali della biosintesi degli acidi nucleici. Il laboratorio di Cohen studiò il metabolismo del D-nucleoside sintetico arabinoside nell' *Escherichia Coli*. Egli scriveva ⁶: "Tra i nucleosidi sintetici che sono stati creati, la citosina arabinoside sembra essere uno dei più interessanti... La sostanza è ragionevolmente potente contro i tumori come il sarcoma 180, il carcinoma di Ehrlich, e la leucemia murina L-1210 ". La sostanza venne approvata dalla FDA (United States Food and Drug Administration) nel giugno del 1969 e fu inizialmente commercializzata negli Stati Uniti dalla ditta Upjohn con il nome di Cytosar-U®.



INTRODUZIONE-2

Con questo studio abbiamo voluto dimostrare come l'utilizzo in induzione di schemi di trattamento contenenti dosi standard di citarabina (SDAC) sia associato ad una migliore qualità della risposta rispetto all'utilizzo di schemi di trattamento contenenti alte dosi di citarabina (HDAC).

Abbiamo preso come spunto il lavoro di Kern ed Estey pubblicato nel 2006 su Cancer.⁷

In questo studio sono stati coinvolti i Centri australiano (Australian Leukemia Study Group -ALSG), tedesco (German AML Cooperative Group -AMLCG) ed americano (Southwest Oncology Group -SWOG).

Nella tabella 1 è rappresentata una descrizione dello studio.

I risultati di questo lavoro hanno portato a tre conclusioni principali:

1. non si è evidenziato un incremento nella percentuale di Remissioni complete (RC) nei pazienti di età inferiore ai 60 anni
2. nell'esperienza dei centri ALSG e SWOG un incremento della Sopravvivenza libera da malattia (DFS) e della Sopravvivenza globale (OS) è stato dimostrato nei pazienti di età uguale o inferiore ai 50 anni

3. si è osservato un'aumento della tossicità soprattutto a livello del SNC e per quanto riguarda le complicanze infettive.

Come dichiarato da Buchner et al.⁸: “un regime terapeutico intensivo in fase di induzione nella LAM è una strategia fondamentalmente differente dal trattamento post-remissionale. Gli approcci terapeutici come il consolidamento, il mantenimento ed il trapianto autologo o allogenico in prima RC sono fondamentalmente diretti contro la MRD, mentre la terapia di induzione deve contrastare cellule tumorali naive diverse dalla controparte in remissione sia biologicamente che dal punto di vista di chemiosensibilità. Pertanto l'introduzione di regimi chemioterapici intensivi in fase di induzione rappresenta di fatto un nuovo step, in aggiunta all'intensificazione della terapia in fase post-remissionale.”. Con il loro lavoro i colleghi tedeschi hanno voluto dimostrare che nei pazienti giovani ed anziani con una prognosi sfavorevole (intesa come cariotipo sfavorevole, LDH elevato o una risposta tardiva) si potevano ottenere dei risultati migliori intensificando la terapia di induzione. Tuttavia l'uso di HDAC in induzione è legato ad una tossicità cumulativa nei successivi cicli post-remissionali contenenti ancora HDAC, causando periodi di aplasia prolungata anche di 6 settimane. Pertanto la strategia di intensificazione non è la strada da percorrere in senso assoluto.

Già nel 1996 su Blood, Weick et al.⁹ pubblicarono un lavoro su uno studio randomizzato del gruppo americano SWOG, nel quale venivano messi a confronto il trattamento con HDAC versus (vs) SDAC in induzione nei pazienti affetti da LAM de novo, nonché l'utilizzo di HDAC versus le dosi convenzionali di ARA-C in consolidamento. Furono arruolati 665 pazienti di età inferiore ai 65 anni affetti da LAM de novo o secondaria, e randomizzati come segue: SDAC 200mg/mq/die per 7 giorni in infusione continua endovenosa/24h vs HDAC 2g/mq/12h per 12 dosi; entrambi i gruppi hanno ricevuto Daunorubicina (DNR) al dosaggio di 45mg/mq/die per 3 gg. I pazienti che avevano ottenuto una RC

dopo SDAC in induzione venivano poi randomizzati per ricevere in consolidamento o due cicli di aggiuntivi di SDAC /DNR o un ciclo di HDAC /DNR. I pazienti che avevano ottenuto una RC dopo HDAC ricevevano direttamente un ulteriore ciclo di consolidamento con HDAC/DNR. Dei 665 pazienti randomizzati tra SDAC (n=493) e HDAC(n= 171) in induzione, 361 hanno ottenuto una RC. Il tasso di RC è risultato leggermente più basso nel gruppo HDAC vs SDAC (55% vs 58%) per i pazienti di età inferiore ai 50 anni; nei pazienti di età compresa tra 50 e 64 anni il tasso è stato rispettivamente 45% vs 53%. Con un follow up mediano a 51 mesi, la sopravvivenza non è risultata significativamente più alta nel gruppo HDAC. Tuttavia, la RFS è risultata migliore a seguito di HDAC in induzione (33% HDAC vs 21% SDAC), a 4 anni nei pazienti di età inferiore ai 50 anni; nei pazienti di età compresa tra 50 e 64 anni il tasso è stato rispettivamente di 21% vs 9%.

E' da sottolineare che il regime terapeutico di induzione con HDAC/DNR è stato associato ad un incremento notevole della tossicità rispetto alla combinazione SDAC/DNR, senza un miglioramento del tasso di RC o di sopravvivenza.

Nell'esperienza europea EORTC/GIMEMA ,nell'ambito del Protocollo AML12, tre punti importanti vanno sottolineati:

1. il tasso di RC nel braccio HDAC è significativamente più alto rispetto al braccio SDAC.
2. Non si è evidenziato un miglioramento nella DFS (con un follow up mediano di circa 3 anni)
3. il profilo di tossicità è risultato simile

Attualmente il grado di raccomandazione per il trattamento con HDAC e SDAC nei pazienti di età inferiore ai 60 anni è il seguente: SIE,NCCN e British Society danno il grado A/category 1 per le SDAC.

MATERIALI E METODI

Il nostro lavoro si pone come scopo di verificare l'impatto sulla qualità della risposta di uno schema di trattamento con SDAC versus uno contenente HDAC, quantificando la malattia minima residua (MRD), una volta ottenuta la RC.

Il disegno dello studio prevedeva di effettuare al momento della diagnosi l'analisi immunofenotipica impiegando tecniche standard. Una volta determinato l'assetto immunofenotipico dei campioni in esame, quelli esprimenti un fenotipo aberrante sono stati selezionati e ri-analizzati in tripla-quadrupla fluorescenza, impiegando quegli anticorpi la cui combinazione era funzionale all'identificazione del fenotipo aberrante medesimo.

In questo modo è stato possibile costruire per ciascun paziente un profilo fenotipico specifico ("leukemia immunophenotypic fingerprint"), utilizzato durante il follow up per evidenziare le cellule leucemiche residue.

Gli studi randomizzati EORTC/GIMEMA presi in considerazione sono stati i ben noti AML10 ed AML12, ed i pazienti valutati sono stati 110.

La determinazione della MRD è stata eseguita a dei time-points ben precisi: dopo il ciclo di induzione e dopo quello di consolidamento, avendo ottenuto una RC. (Tabella 2).

Le diverse schedule sono riassunte nella tabella 3.

Nel protocollo AML10 il ciclo di induzione prevedeva ARA-C 100mg/mq/die per 10 giorni, Etoposide 50mg/mq/die nei giorni 1-->5 ed il random tra 3 diverse antracicline (Daunorubicina DNR , Mitoxantrone, Idarubicina); nel protocollo AML12 il ciclo di induzione prevedeva DNR 50mg/mq/die nei giorni1-2-3, Etoposide 50mg/mq/die nei giorni 1-->5 ed il random tra SDAC (100mg/mq/die per 10 giorni) e HDAC (3gr/mq/12h nei giorni1-3-5-7).

Nel ciclo di consolidamento la schedula era identica,ne consegue che il time-point determinante è il Post-Induzione, in quanto risente principalmente dei diversi dosaggi della citarabina.

Nelle Tabelle 4 e 5 sono riassunte le caratteristiche dei 110 pazienti inseriti nello studio:i parametri valutati sono stati età, sesso, conta leucocitaria, classe FAB, tipo di terapia post-consolidamento, categoria di rischio citogenetico secondo i criteri SWOG (valutabile in 103 pazienti), presenza o meno di FLT3-ITD, NPM e PgP 170. Tuttavia nessuno di questi elementi ha avuto un peso statisticamente significativo ai fini dell'analisi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella figura 1 si dimostra come un livello di MRD pari o inferiore a $3,5 \times 10^{-4}$ cellule alla fine del ciclo di consolidamento abbia un valore predittivo statisticamente significativo sulla RFS e sulla OS.

I pazienti MRD negativi dopo induzione e dopo consolidamento mostrano infatti una RFS ed una OS nettamente migliori rispetto ai pazienti MRD positivi sia dopo induzione che dopo consolidamento, ed a quelli MRD negativi dopo induzione ma positivi dopo consolidamento.

I pazienti MRD positivi dopo induzione ma che diventino negativi dopo consolidamento mostrano un out-come intermedio, ma sicuramente peggiore rispetto ai pazienti stabilmente negativi come MRD.

Nella figura 2 si vuole mostrare l'impatto della determinazione della MRD dopo il ciclo di induzione nei 2 gruppi SDAC ed HDAC: la differenza è risultata statisticamente significativa, nella misura in cui nel gruppo SDAC la percentuale di pazienti MRD positivi è stata pari al 62% vs quella dei pazienti negativi pari al 38%, mentre ed nel gruppo HDAC i valori erano rispettivamente 83% vs 17%.

Nella figura 3 la stessa valutazione è stata effettuata dopo il ciclo di consolidamento: il dato si conferma nel gruppo SDAC con una percentuale pari al 58% di pazienti MRD positivi vs 42% di pazienti negativi (3 pazienti MRD positivi dopo induzione sono diventati negativi dopo consolidamento); nel gruppo HDAC i valori erano sovrapponibili alla fase post-induzione (1 paziente è deceduto).

La determinazione della MRD dopo il ciclo di induzione mostra valori significativamente a favore delle SDAC pari a $1,1 \times 10^{-2}$ cellule vs 6×10^{-2} cellule nel gruppo HDAC. ($p: 0.015$) (Figura 4).

Dopo il ciclo di consolidamento la differenza tra i due gruppi nella determinazione della MRD è ancor di più statisticamente significativa ed è di ben un logaritmo (7×10^{-3} cellule nel gruppo SDAC vs $2,9 \times 10^{-2}$ cellule nel gruppo HDAC)($p: 0.012$). (Figura 5).

Nella figura 6 sono illustrati i valori di DFS ed OS in relazione alla dose di Citarabina somministrata. Si evidenzia come nel gruppo SDAC l'andamento sia migliore rispetto al gruppo HDAC, in termini statisticamente significativi soprattutto per quanto riguarda la OS.

Conseguentemente all'importanza dell'ottenimento di una cosiddetta "remissione citofluorimetrica", abbiamo valutato la DFS in relazione alla dose di citarabina ed allo stato di MRD dopo il ciclo di consolidamento: si evidenzia che i pazienti MRD negativi che abbiano ricevuto SDAC hanno una DFS significativamente migliore rispetto ai pazienti MRD positivi ed a quelli MRD negativi che abbiano ricevuto HDAC. ($p: 0.0001$)

Una valutazione analoga è stata ovviamente effettuata anche per la OS: il risultato è sovrapponibile al precedente e nettamente a favore dei pazienti MRD negativi che abbiano ricevuto SDAC ($p:0.0014$)

CONCLUSIONI

Infine, possiamo trarre le seguenti conclusioni:

1. Sebbene sia stato identificato un certo numero di fattori prognostici basali, la prognosi dei pazienti all'interno dei sottogruppi definiti da questi parametri è ancora molto eterogenea. Le anomalie clonali cromosomiche acquisite sono considerate gli elementi prognostici più rilevanti nei pazienti con LAM, i quali vengono stratificati in base al rischio citogenetico (good, intermediate e high risk).¹⁰⁻¹¹ Utilizzando le convenzionali tecniche di analisi citogenetica, circa il 40-50% dei pazienti mostra un cariotipo normale alla diagnosi rientrando così nella categoria di rischio intermedio, laddove si osserva una variabilità sia nella risposta alla terapia sia nella sopravvivenza. Il ruolo attuale dell'intensificazione della terapia in questo gruppo di pazienti, includendo le strategie trapiantologiche, è ancora in discussione.¹²⁻¹³ È stato già dimostrato precedentemente come la determinazione della MRD impatti indipendentemente sulla prognosi dei pazienti con LAM e risulti utile nella modulazione dell'intensità della terapia post-remissionale.¹⁴⁻¹⁵

2. L'ottenimento di una "remissione citofluorimetrica" (intesa come MRD negativa) dopo il trattamento front-line di induzione e consolidamento è fondamentale per l'outcome del paziente affetto da LAM.
3. La schedula di trattamento contenente SDAC somministrate per 10 giorni risulta più efficace nella clearance della massa leucemica e conferisce una migliore qualità della risposta, se confrontata con una schedula simile contenente HDAC, non trascurando l'importanza di un profilo di tossicità sicuramente inferiore.

BIBLIOGRAFIA

1. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. [Robak T, Wierzbowska A. Clin Ther. 2009.](#)
2. Contributions to the Study of Marine Products. XXXII. The Nucleosides of Sponges. I. Werner Bergmann and Robert J. Feeney. *J. Org. Chem.* 16:981, 1951
3. The Isolation of a New Thymine Pentoside from Sponges. Bergmann and Feeney. *J Am Chem Soc*, 72, 2809, 1950
4. Sponges, Cancer, Cellular Aging. Seymour S. Cohen. *Perspectives in Biology and Medicine*, Winter 1963
5. Antitumor Activity of 1-beta-D-Arabinofuranosylcytosine Hydrochloride. John s. Evans, Elizabeth A. Musser, Gordon D. Mengel, Karin R. Forsblad and James H. Hunter. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 106, No. 2: 350-353, 1961
6. The induction of thymine deficiency and the effects of thymine and thymidine analogs in *E. coli*. Cohen, Seymour S.; Barner, Hazel D. *Journal of Bacteriology*, 1956, 71, 588-97.
7. High-Dose Cytosine Arabinoside in the Treatment of Acute Myeloid

Leukemia. Review of Three Randomized Trials. Wolfgang Kern, MD, Elihu H. Estey, MD. *CANCER* July 1, 2006

8. Remission induction therapy: the more intensive the better? Thomas Buchner et al. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001.
9. A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. JK Weick et al. *Blood* 1996
10. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial—The Medical Research Council Adult and Children's Leukemia Working Parties. *Blood* 1998.
11. Suciú S, Mandelli F, deWitte T, et al: Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia in first complete remission: An intention to treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial. *Blood* 2003
12. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: A Southwest Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000

13. Farag SS, Ruppert AS, Mrozek K, et al: Outcome of induction and postremission therapy in younger adults with acute myeloid leukemia with normal karyotype: A Cancer and Leukemia Group B Study. J Clin Oncol 2005
14. Lo Coco F, Diverio D, et al: Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. Blood 1999
15. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, et al Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. Blood 2000

INDICE

<i>1. Introduzione-1</i>	<i>pg 1-2</i>
<i>2. Introduzione-2</i>	<i>pg 3-5</i>
<i>3. Materiali e metodi</i>	<i>pg 6-7</i>
<i>4. Risultati e discussione</i>	<i>pg 8-9</i>
<i>5. Conclusioni</i>	<i>pg 10</i>
<i>6. Bibliografia</i>	<i>pg 11-12</i>