

XXI Corso di Dottorato in Ematologia

Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”

Anno Accademico 2008-2009

Direttore: Prof. Sergio Amadori

**“Impiego del Triossido di Arsenico nella
Leucemia acuta promielocitica in recidiva
molecolare”**

Relatore: Prof. Francesco Lo Coco

Dottoranda: Laura Gianni

Introduzione

La leucemia acuta promielocitica(LAP) è un sottotipo di leucemia mieloide acuta che ha caratteristiche molecolari e cliniche peculiari. Nella maggior parte di casi di LAP,circa il 98%, le cellule leucemiche sono caratterizzate dalla presenza della traslocazione t(15;17), che determina la fusione del gene RARa al gene PML. In conseguenza di questa traslocazione si ha il blocco maturativo delle cellule leucemiche allo stadio di promielocita nella differenziazione granulocitaria.

Il quadro fisiopatologico della malattia è costituito principalmente dalla soppressione dell'emopoiesi normale con conseguenti anemia, granulocitopenia e piastrinopenia (Sindrome da insufficienza midollare). Sintomi e segni di rapida anemizzazione, infezioni,febbre e sindrome emorragica (porpora, ecchimosi, epistassi, gengivorragia) costituiscono il quadro clinico più comune d'esordio. Infatti, la presentazione della LAP è prevalentemente di tipo emorragico, talvolta anche con gravi ed estese emorragie che costituiscono una vera e propria emergenza ematologica e che possono portare il paziente ad exitus in poche ore o giorni se non viene rapidamente iniziata un'adeguata terapia antileucemica, che si basa sull'utilizzo di antraciclinici in associazione all'acido trans-retinoico (ATRA), insieme ad una adeguata e tempestiva terapia di supporto trasfusionale.

Diagnosi

L'aspetto morfologico della leucemia mieloide acuta promielocitica è tipico nella maggior parte dei casi. In accordo alla classificazione FAB (French-American-British), sono riconosciuti due principali sottotipi:

- a) leucemia promielocitica classica ipergranulare (M3)
- b) leucemia promielocitica variante microgranulare (M3v)

La diagnosi di certezza si basa sulla identificazione, mediante analisi citogenetica, della traslocazione t(15-17) e sulla dimostrazione del gene di fusione PML/RARa da essa risultante, mediante analisi di biologia molecolare (RT-PCR). Inoltre, il quadro immunofenotipico è caratterizzato generalmente dalla negatività dell' HLA-DR, del CD15 e spesso del CD34. Per una rapida diagnosi di LAP può inoltre essere impiegato l'anticorpo anti-PML in immunofluorescenza che evidenzia in caso di LAP una distribuzione nucleare della proteina PML in fini granuli diffusi.

Terapia di prima linea e della recidiva

Il trattamento attuale della LAP di solito include una fase di induzione con acido trans retinoico(ATRA) e chemioterapia con antracicline, seguita da una

fase di consolidamento che si basa su tre cicli di chemioterapia con antracicline e ATRA e poi una fase di mantenimento con ATRA con o senza basse dosi di chemioterapia per 1-2 anni. Questa strategia terapeutica determina un alto tasso di remissione completa (CR) di circa il 90% e una sopravvivenza globale a 5 anni di circa l' 80%.

I pazienti affetti da leucemia acuta promielocitica trattati con protocollo AIDA (gruppi cooperativi GIMEMA e PETHEMA) possono essere suddivisi in differenti gruppi di rischio di recidiva:

a) basso rischio (RFS circa 95%): leucociti <10000 e piastrine >40000. Questo gruppo rappresenta circa il 20% dei casi diagnosticati.

b) rischio intermedio (RFS circa 80%): leucociti <10000 e piastrine <40000. Questo gruppo rappresenta circa il 60% dei casi.

c) alto rischio (RFS circa il 60%): leucociti >10000. Questo gruppo rappresenta circa il 20% dei casi.

Circa il 5%-30% dei pazienti va incontro a recidiva di malattia, principalmente i pazienti con LAP ad alto rischio. Infatti, la recidiva non è comune nei pazienti affetti da forme a rischio basso-intermedio (<10%), mentre il tasso di recidiva nei pazienti ad alto rischio è di circa il 20% (1-2).

La recidiva in sedi extramidollari si verifica approssimativamente in circa il 3% -5% dei pazienti (3). I trattamenti della recidiva di LAP includono l'utilizzo del triossido di arsenico (ATO), dell'anticorpo monoclonale anti-

CD33 (gemtuzumab o Mylotarg), e il trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

Tra i vari farmaci disponibili per la terapia della recidiva il triossido di arsenico è l'agente più efficace nel trattamento della leucemia acuta promielocitica poiché è in grado di indurre la seconda remissione molecolare in circa l'80% dei casi.

Diversi fattori prognostici oltre la conta dei globuli bianchi, sono stati analizzati come fattori prognostici per determinare quali pazienti sono maggiormente a rischio di recidiva. Questi sono l'età superiore a 55 aa, l'espressione della molecola di adesione CD56, la presenza di mutazioni di FLT3, la presenza di anomalie citogenetiche aggiuntive e infine le varie isoforme del gene di fusione PML/RARa. Sebbene tutte queste variabili siano state associate ad una prognosi più sfavorevole (5), questa associazione non è stata confermata in pazienti trattati con protocolli AIDA.

Per quanto riguarda la recidiva extramidollare, questa è stata correlata alla comparsa della sindrome da ATRA (6), alla presenza all'esordio di una conta di globuli bianchi elevata, ed alla isoforma PML/RARa bcr3.

Le sedi extramidollari prevalentemente coinvolte sono l'orecchio interno, il sistema nervoso centrale e la cute (3-7).

E' comune trovare malattia a livello midollare nei pazienti che sviluppano una localizzazione di malattia extramidollare, evidenziando perciò una

ricidiva ematologica o molecolare. Pertanto, la ricidiva extramidollare va sempre trattata con terapia sistemica.

Il triossido di arsenico ha dimostrato efficacia terapeutica anche in pazienti affetti da leucemia acuta promielocitica con malattia avanzata, es. in seconda ricidiva dopo più cicli di chemioterapia e /o trapianto autologo o allogenico.

Il meccanismo di azione del triossido di arsenico non è completamente noto.

In vitro, nelle cellule della leucemia acuta promielocitica umana, il triossido di arsenico provoca cambiamenti morfologici e la frammentazione dell'acido desossiribonucleico(DNA) caratteristica dell'apoptosi. Il triossido di arsenico inoltre provoca danno o degradazione della proteina di fusione PML/RARa.

Il triossido di arsenico viene somministrato endovena alla dose di 0.15mg/Kg/die ad una velocità di circa due ore, per 4-5 settimane o fino a quando non si ottiene la remissione completa di malattia (blasti<5% nel midollo) per un massimo di sessanta giorni. Ha un'emivita ($t_{1/2}$) media di eliminazione di 92 ore e viene escreto per via urinaria.

Le complicanze possibili durante la terapia con ATO possono essere:

- a) La sindrome da attivazione leucocitaria (APL Differentiation Syndrome)
- b) Le anomalie elettrocardiografiche
- c) L'iperleucocitosi

La sindrome da attivazione leucocitaria (o s. da differenziazione):

Il 25% dei pazienti affetti da LAP e trattati con triossido di arsenico hanno presentato sintomi simili ad una sindrome da ATRA o sindrome da attivazione leucocitaria, caratterizzata da:

- febbre
- dispnea
- incremento ponderale
- infiltrati polmonari e versamento pleurico o pericardico
- con o senza leucocitosi

Questa sindrome può essere fatale per il paziente qualora al manifestarsi dei primi segni clinici non si sospende la terapia con triossido e non si inizia immediatamente una terapia con dosi elevate di steroidi (desametasone 10mg/die ev) ed eventuale terapia diuretica. Tale trattamento deve essere continuato per almeno tre giorni, fino alla remissione dei sintomi.

Le anomalie elettrocardiografiche:

Il triossido di arsenico può causare prolungamento del tratto QT e blocco atrioventricolare completo. Il prolungamento del tratto QT può determinare un'aritmia ventricolare del tipo torsione di punta, che può essere fatale.

Un precedente trattamento con antracicline può aumentare il rischio del prolungamento QT.

Il rischio della torsione di punta è correlato all'entità del prolungamento di QT, alla concomitante somministrazione di farmaci che allungano il QT, ad una insufficienza cardiaca congestizia, alla somministrazione di diuretici potassio disperdenti, e ad altre condizioni che determinano ipokaliemia ed ipomagnesemia.

Iperleucocitosi:

In alcuni pazienti, il trattamento con triossido di arsenico è stato associato allo sviluppo di iperleucocitosi (>10000/u1). L'iperleucocitosi può essere trattata con blandi chemioterapici (idrossiurea).

Pazienti in studio

Sono stati presi in esami i tre pazienti trattati presso il nostro Centro. Due pazienti maschi, uno di 46aa ed uno di 16aa ed una paziente femmina di 38aa.

Il paziente di 46aa e la paziente di 38aa erano all'esordio a rischio intermedio, mentre il paziente di 16aa era ad alto rischio. I precedenti trattamenti effettuati sono stati basati in tutti e 3 i casi nel protocollo AIDA.

La fase di malattia era per il paziente di 46aa una prima recidiva molecolare a sette anni dalla 1a RC, per la paziente di 38aa era una prima recidiva

molecolare a quattro anni e per il paziente di 16aa una prima recidiva molecolare a 10 mesi.(Tab.1)

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti in studio

Pt	Età/S	Rischio	Terapia di 1 linea	Durata 1 RC	Tipo di recidiva
1	46/M	Intermedio	AIDA	84 m	molecolare +extramid.*
2	38/F	Intermedio	AIDA2000	48 m	molecolare
3	16/M	Alto**	AIDA2000	10 m	molecolare

*Sarcoma mieloide paravertebrale tra D6 e D8.

**WBC 113.000/mmc

Al momento della recidiva, il paziente numero uno ha presentato una localizzazione paravertebrale di sarcoma mieloide come unica sede di recidiva di leucemia promielocitica. Alla risonanza magnetica della colonna effettuata, si è evidenziata la comparsa di una massa solida extramidollare localizzata tra la sesta e l'ottava vertebra. Gli esami ematochimici effettuati comprendenti emocromo e coagulazione completa sono risultati nella norma. Inoltre non sono stati riscontrati promielociti atipici nè all'esame morfologico del sangue periferico nè a livello midollare, confermando pertanto una remissione completa di malattia a livello morfologico, mentre la PCR documentava la presenza di malattia a livello molecolare nel midollo. Pertanto il paziente è stato sottoposto a laminectomia decompressiva, con escissione della massa che all'esame istopatologico mostrava un diffuso infiltrato di elementi monomorfi di taglia media, con nuclei indentati o bilobati, cromatina dispersa, numerosi nucleoli e citoplasma basofilo. Le caratteristiche immunofenotipiche delle cellule neoplastiche erano le seguenti: mieloperossidasi e CD117(c-KIT) fortemente positivi; CD45 debolmente e focalmente espresso, mentre CD34, CD31, CD20, CD79a, CD3, CD56 e CD15 erano negativi. Gli studi di citogenetica sono risultati positivi per la traslocazione t(15;17).

Terapia della recidiva

I tre pazienti in recidiva di LAP sono stati trattati con Triossido di Arsenico ed ATRA in associazione. (Tab.2)

Tabella 2. Terapia della recidiva

Pt	Induzione	Consolidamento
1	ATO 0.15mg/Kg x 28g ATRA 45mg/m2/die	ATO 5 gg/sett x 4 sett q 4 sett e ATRA q 2 sett (4 cicli tot)
2	ATO 0.15mg/Kg x 28g ATRA 45mg/m2/die	ATO 5gg/sett x 4 sett q 4 sett e ATRA q 2 sett (4 cicli tot)
3	ATO 0.15mg/Kg x 28g ATRA 25mg/m2/die	1 ciclo+ TMO allogenico

Inoltre i pazienti hanno eseguito terapia intratecale in profilassi con methotrexate e cortisonici. Durante l'intera durata del trattamento nessuno dei pazienti ha presentato complicanze degne di nota.

Risposta alla terapia

I tre pazienti in studio hanno ottenuto una seconda remissione molecolare senza complicanze e sono attualmente rispettivamente in RCm rispettivamente da 13, 22 e 27 mesi. (Tab.3)

Tabella 3. Outcome

Pt	Remissione Molecolare	Follow-up (m. in 2RC)	Osservazioni
1	Post 1 cons.	13	
2	Post 1 cons.	22	Gravidanza a termine dopo 9 mesi dal cons.
3	Post 1 cons.	27	

Discussione

Il paziente che ha recidivato dopo sette anni ha presentato un sarcoma mieloide (SM) o sarcoma granulocitico. Il sarcoma mieloide è un raro tumore extramidollare che origina dalle cellule mieloidi immature. Si può verificare

in associazione con leucemia mieloide acuta, disordini mieloproliferativi e mielodisplasia. Il SM può presentarsi in diversi modi e colpire qualsiasi organo. Si può verificare in individui in perfetta salute che successivamente sviluppano una leucemia mieloide tipica, o può anche svilupparsi contemporaneamente alla comparsa della leucemia, o dopo la diagnosi od essere una manifestazione della recidiva di malattia dopo il raggiungimento della remissione completa.

Secondo la WHO esistono tre varianti di sarcoma mieloide che si basano sulla predominanza del tipo cellulare e sul loro grado di maturazione:

- 1) variante mieloblastica
- 2) variante mieloblasti e promielociti
- 3) variante promielociti e granulociti neutrofili

Il caso da noi riportato è di un paziente con LAP che dopo sette anni di completa remissione ha presentato un deficit neurologico ed in particolare una paraparesi destra.

La malattia extra midollare alla diagnosi o alla recidiva si sa che si sviluppa nel 3%-8% dei casi di leucemia mieloide acuta, più frequentemente nel tipo mielomonocitica e monoblastica, invece è relativamente rara nella forma promielocitica, ma si è visto un incremento al tempo della recidiva dopo l'avvento del' ATRA.

I siti extramidollari maggiormente coinvolti sono il sistema nervoso centrale e la cute. Sono state fatte due possibili ipotesi sulla relazione tra la malattia extramidollare al momento della recidiva in pazienti affetti da LAP e la terapia con ATRA. La prima suggerisce che il rischio di sviluppare una malattia extramidollare dopo il trattamento con ATRA è dovuto al diretto effetto di questo agente sulle molecole di adesione che determina una maggiore capacità di infiltrazione dei blasti della LAP. La seconda ipotesi e la più accettata è che il verificarsi del sarcoma mieloide alla recidiva è da considerarsi una conseguenza della più lunga sopravvivenza di tali pazienti grazie al successo dei trattamenti.

Da segnalare inoltre il caso della paziente numero due che ha portato a termine una gravidanza e dato alla luce un neonato sano dopo aver ricevuto per la recidiva un trattamento a base di triossido di arsenico (5 cicli).

Riguardo gli effetti collaterali dell'arsenico sul sistema riproduttivo, è noto che elevate esposizioni all'arsenico inorganico determinano nella donna aborti ed infertilità; tuttavia ci sono pochi dati che sono stati ricavati da studi su soggetti esposti ad acqua contenente arsenico o su soggetti che lavorano o vivono vicino a smaltitori. L'interpretazione di questi studi per valutare il reale impatto dell'arsenico sulla fertilità è tuttavia complicata dal fatto che questa popolazione di studio è esposta a molteplici sostanze chimiche (Golub et al,1998). Inoltre, studi su modelli animali hanno mostrato che l'arsenico è teratogeno, determinando malformazioni fetali e difetti di nascita quando

somministrato durante la gravidanza. Diversamente dall'arsenico gli effetti della chemioterapia convenzionale sulla fertilità sono stati estesamente studiati e la loro tossicità è stata stabilita (Nakayaama et al,2008).

La nostra paziente era stata trattata all'esordio della malattia in accordo al protocollo AIDA 2000 con induzione e tre consolidamenti ottenendo la remissione molecolare. A giugno del 2006, quattro anni dopo la fine dell'ultimo consolidamento la paziente aveva presentato la sua prima gravidanza che era però esitata in un aborto spontaneo al 3 mese di gestazione. Subito dopo veniva documentata una recidiva molecolare.

Il trattamento con triossido di arsenico è stato ben tollerato senza gravi tossicità e al termine del consolidamento è stata dimostrata una remissione molecolare completa.

Mentre il danno indotto dalla citotossicità è reversibile in altri tessuti a rapida divisione cellulare, quali il midollo osseo, il tratto gastroenterico e il timo, sembra invece essere progressivo ed irreversibile nell'ovaio, dove il numero di cellule germinali è limitato e non può essere rigenerato.

Prima dell'avvento del triossido di arsenico il trattamento delle recidive di LAP si basava su ulteriore chemioterapia seguita da una fase di intensificazione che consisteva nel trapianto di cellule staminali autologhe o nel trapianto allogenico (Castagnola et al,1998; Lo Coco et al,1999; Thomas X et al, 2000).

Queste ultime procedure sono associate con un'elevata incidenza di fallimenti ovulatori ed infertilità.

Alla luce della moderna tendenza di utilizzare in prima linea di terapia nella leucemia acuta promielocitica il triossido di arsenico, ci si aspetta che un numero sempre maggiore di pazienti con LAP saranno trattati con ATO in futuro.

Questo permetterà una valutazione su un più esteso numero di pazienti se l'ATO rappresenterà una sicura terapia antileucemica con il rispetto della fertilità umana.

Conclusioni

Benché la nostra casistica sia molto limitata, i casi illustrati confermano la efficacia del triossido di arsenico nella LAP recidivata.

La somministrazione di ATO precedentemente alla gravidanza non ha determinato sterilità né anomalie fetali.

Lo stesso schema ATO + ATRA è attualmente in fase di sperimentazione clinica in 1 linea. (gruppo GIMEMA)

Bibliografia

- 1) Tallman MS, Nabhan C, et al. Acute Promyelocytic leukemia:envolving therapeutic strategies. Blood 2002;99:759-767
- 2) Fujisawa S,Kanamori H et al. Relapse of acute promielocytic leukaemia after 10 years long-term remission. Leukemia&Lymphoma 2002;43:679-680
- 3) Specchia G.,Lo CF,Vignetti M et al. Extramedullary invovement at relapse in acute promyelocytic leukemia patients treated or not with all-trans retinoic acid: a report by Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell' Adulto. Journal of Clinical Oncology 2001;19:4023-4028
- 4) Latagliata R, Breccia M,Carmosino I et al. Late relapse in acute promyelocytic leukaemia. Haematologica Reports 2005; I:53(abstract P39)
- 5) Slack JL,Willman CL et al. Molecular analysis and clinical outcome of adult APL patients with the type V PML/RARa isoform: results from intergroup protocol 0129. Blood 2000; 95:398-403

- 6) Ko BS, Tang JL, Chen YC et al. Extramedullary relapse after all-trans retinoic acid treatment in acute promyelocytic leukaemia- the occurrence of retinoic acid syndrome is a risk factor. *Leukemia* 1999;13:1406-1408
- 7) Breccia M, Petti MC, Testi AM et al. Ear involvement in acute promyelocytic leukemia at relapse: a disease-associated 'sanctuary'? *Leukemia* 2002;16:1127-1130
- 8) Lo Coco F, Diviero D, Avvisati G, et al. Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukaemia. *Blood*.1999;94:2225-2229
- 9) Esteve J, Escoda L, martin G,etal. Outcome of patients with acute promyelocytic leukaemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy(PETHEMA protocols LPA96 and LPA99):benefit of an early intervention. *Leukemia*.2007;21:446-452
- 10) Estey EH. Treatment options for relapsed acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*.2003;16:521-534
- 11) Chen Z,Zhao WL,Shen ZX,et al.Arsenic trioxide and acute promyelocytic leukaemia: clinical and biological. *Curr Top Microbiol Immunol*.2007;313:129-144

- 12) Shen Z-X, chen G-Q, et al. Use of arsenic trioxide(As₂O₃) in the treatment of acute of promyelocytic leukaemia. *Blood* 1997;89:3354-3360
- 13) Soignet SI, Frankel SR, Douer D, et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol.*2001;19:3852-3860
- 14) Au WY, Lie AK, Chim Cs, et al. Arsenic trioxide in comparison with chemotherapy and bone marrow transplantation for the treatment of relapsed acute promyelocytic leukemia. *Ann Oncol.*2003;14:752-757
- 15) Lazo G, Kantarjian H, Estey E, et al. Use of arsenic trioxide in the treatment of patients with acute promyelocytic leukaemia: The M.D. Anderson experience. *Cancer.*2003;97:2218-2224
- 16) Raffoux E, Rousselot P, Poupon J, et al. Combined treatment with arsenic trioxide and all-trans retinoic acid in patients with relapsed acute promyelocytic leukaemia. *J Clin Oncol.*2003;21:2326-2334
- 17) Shigeno K, Naito K, Sahara N, et al. Arsenic trioxide therapy in relapsed or refractory Japanese patients with acute promyelocytic leukaemia: up-dated

outcomes of the phase II study and postremission therapies. *Int J Hematol.*2005;82:224-229

18) Tallaman MS. Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20:57-65

19) Sanz MA, Fenaux P, Lo Coco F, European APL Group of Experts. (2005). Arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukaemia. *Haematologica* 90:1231-1235

20) Castagnola C, Lunghi M, Corso A, Tayana M, Zappasodi P, Dabusti M, et al. Management of acute promyelocytic leukemia relapse in the ATRA era. *Haematologica.*1998;83:714-7

21) Lo Coco F, Divierio D, Avvisati G, Petti MC, Meloni G, Pogliani EM, Biondi A, Rossi G, Carlo-Stella c, Selleri C, Martino B, Specchia G, Mandelli F. Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukemia. *Blood.*1999;94:2225-9

22) Golub Ms, Macintosh Ms, Baumrind N (1998). Developmental and reproductive toxicity of inorganic arsenic: animal studies and human concerns. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 1:199-241.

- 23) Seldom M, Enno A: Central nervous system relapse in acute promyelocytic leukaemia treated with all-trans retinoic acid. Aust N Z J Med 28:462,1998 (letter)
- 24) Ko B-S, Tang G-L, Chen Y-C, et al: Extramedullary relapse after all-trans retinoic acid treatment in acute promyelocytic leukaemia: The occurrence of retinoic acid syndrome is a risk factor. Leukemia 13:1406-1408,1999
- 25) Nakayama K, Milbourne A, Schover LR, Chaplin RE, Ueno Nt. (2008) Gonadal failure after treatment of hematologic malignancies: from recognition to management for health-care providers, Nat Clin Pract Oncol. 5:78-89
- 26) Thomas X, Dombret H, cordonnier C, Pigneux A, Gardin C, Guerci A et al. Treatment of relapsing acute promyelocytic leukemia by all-trans retinoic acid therapy followed by timed sequential chemotherapy and stem cell transplantation. APL Study Group. Acute promyelocytic leukaemia. Leukemia.2000; 14:1006-13
- 27) Liso V, Specchia G, Pogliani EM, et al: Extramedullary involvement in patient with acute promyelocytic leukemia: A report of seven cases. Cancer 83:1522-1528,1998

