

Anno 9  
Numero 3  
2012

# *Seminari* *di* **Ematologia** **Oncologica**

## NEL PROSSIMO NUMERO

### BIOMARKERS

- Per una terapia mirata •
- Mielodisplasie •
- Leucemie acute •
- Sindromi mieloproliferative PH- •
- Sindromi linfoproliferative •

## Oncoematologia pediatrica

# Oncoematologia pediatrica

## Sindromi mielodisplastiche

5

MARCO ZECCA, CHIARA CUGNO

## Leucemie acute

31

MOMCILO JANKOVIC

## Sindromi mieloproliferative croniche

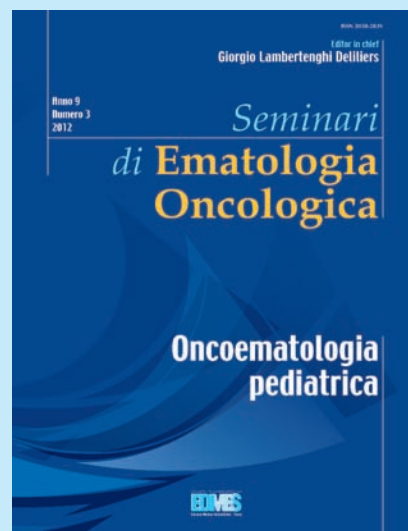
51

FIORINA GIONA

## Trapianto di cellule staminali emopoietiche

79

STEFANO GIARDINO, GIORGIO DINI



Vol. 9 - n. 3 - 2012

Editor in Chief

Giorgio Lambertenghi Deliliers  
Fondazione IRCCS Ca' Granda  
Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

Editorial Board

Sergio Amadori  
Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccardo  
Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi  
Università degli Studi, Firenze

Federico Caligaris Cappio  
Università Vita e Salute, Istituto San Raffaele, Milano

Antonio Cuneo  
Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi  
Università degli Studi, Genova

Fabrizio Pane  
Università degli Studi, Napoli

Giovanni Pizzolo  
Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia  
Università degli Studi, Bari

Direttore Responsabile  
Paolo E. Zoncada

Registrazione Trib. di Milano n. 532  
del 6 settembre 2007

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl  
**EDIMES**  
Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

Edizioni Internazionali srl  
Divisione EDIMES

Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia  
Tel. +39 0382 526253 r.a. - Fax +39 0382 423120  
E-mail: edint.edimes@tin.it

**Periodicità**

Quadrimestrale

**Scopi**

*Seminari di Ematologia Oncologica* è un periodico di aggiornamento che nasce come servizio per i medici con l'intenzione di rendere più facilmente e rapidamente disponibili informazioni su argomenti pertinenti l'ematologia oncologica.

Lo scopo della rivista è quello di assistere il lettore fornendogli in maniera esaustiva:

- opinioni di esperti qualificati sui più recenti progressi in forma chiara, aggiornata e concisa;
- revisioni critiche di argomenti di grande rilevanza pertinenti gli interessi culturali degli specialisti interessati;

**NORME REDAZIONALI**

- Il testo dell'articolo deve essere editato utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh.  
Agli AA. è riservata la correzione ed il rinvio (entro e non oltre 5 gg. dal ricevimento) delle sole prime bozze del lavoro.
- L'Autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di «Copyright» qualora riproduca nel testo tabelle, figure, microfotografie od altro materiale iconografico già pubblicato altrove. Tale materiale illustrativo dovrà essere riprodotto con la dicitura «per concessione di ...» seguito dalla citazione della fonte di provenienza.
- Il manoscritto dovrebbe seguire nelle linee generali la seguente traccia:

**Titolo**

Conciso, ma informativo ed esauriente.

Nome, Cognome degli AA., Istituzione di appartenenza senza abbreviazioni.

Nome, Cognome, Foto a colori, Indirizzo, Telefono, Fax, E-mail del 1° Autore cui andrà indirizzata la corrispondenza.

**Introduzione**

Concisa ed essenziale, comunque tale da rendere in maniera chiara ed esaustiva lo scopo dell'articolo.

**Parole chiave**

Si richiedono 3/5 parole.

**Corpo dell'articolo**

Il contenuto non deve essere inferiore alle 30 cartelle dattiloscritte (2.000 battute cad.) compresa la bibliografia e dovrà rendere lo stato dell'arte aggiornato dell'argomento trattato. L'articolo deve essere corredato di illustrazioni/fotografie, possibilmente a colori, in file ad alta risoluzione (salvati in formato .tif, .eps, .jpg).

Le citazioni bibliografiche nel testo devono essere essenziali, ma aggiornate (non con i nomi degli AA. ma con la numerazione corrispondente alle voci della bibliografia), dovranno essere numerate con il numero arabo (1) secondo l'ordine di comparsa nel testo e comunque in numero non superiore a 100÷120.

# Seminari di Ematologia Oncologica

PERIODICO DI AGGIORNAMENTO  
SULLA CLINICA E TERAPIA  
DELLE EMOPATIE NEOPLASTICHE

**Bibliografia**

Per lo stile nella stesura seguire le seguenti indicazioni o consultare il sito "International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References".

*Es. 1 - Articolo standard*

- Bianchi AG, Rossi EV. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2004; 232: 284-7.

*Es. 2 - Articolo con più di 6 autori (dopo il 6° autore et al.)*

- Bianchi AG, Rossi EV, Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2004; 232: 284-7.

*Es. 3 - Letter*

- Bianchi AG, Rossi AV. Immunologic effect of donor lymphocytes [Letter]. *N Engl J Med.* 2004; 232: 284-7.

*Es. 4 - Capitoli di libri*

- Bianchi AG, Rossi AV. Immunologic effect of donor lymphocytes. In: Caplan RS, Vigna AB, editors. *Immunology.* Milano: MacGraw-Hill; 2002; p. 93-113.

*Es. 5 - Abstract congressi (non più di 6 autori)*

- Bianchi AG, Rossi AV. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation [Abstract]. *Haematologica.* 2002; 19: (Suppl. 1): S178.

**Ringraziamenti**

Riguarda persone e/o gruppi che, pur non avendo dignità di AA., meritano comunque di essere citati per il loro apporto alla realizzazione dell'articolo.

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl

**EDIMES**  
Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

Edizioni Internazionali Srl  
Divisione EDIMES

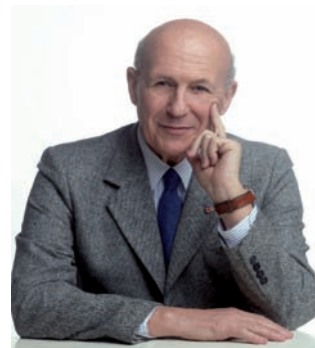
EDIZIONI MEDICO SCIENTIFICHE - PAVIA

Via Riviera. 39 • 27100 Pavia  
Tel. 0382526253 r.a. • Fax 0382423120  
E-mail: edint.edimes@tin.it

# Editoriale

**GIORGIO LAMBERTENGHI DELILIERIS**

Fondazione IRCCS Ca' Granda,  
Ospedale Maggiore Policlinico di Milano



Questo numero di *Seminari di Ematologia Oncologica*, ultimo dell'annata 2012, è dedicato alle neoplasie ematologiche dell'età pediatrica, che nell'ambito dei tumori infantili sono di gran lunga prevalenti in tutte le fasce di età. In questo ultimo decennio gli studi hanno portato notevoli contributi conoscitivi, evidenziando che numerose sono le differenze rispetto all'adulto in termini biologici, genetici, clinici ed anche terapeutici. Diverse sindromi ereditarie si associano ad un aumento del rischio di sviluppare nei bambini una sindrome mielodisplastica, la cui patogenesi è spesso correlata ad alterazioni genetiche, anche acquisite in epoca prenatale, che causano difetti dei meccanismi di riparazione del DNA. Analogamente la leucemia linfoblastica acuta è dovuta a mutazioni somatiche che insorgono durante la fase di post-concepimento *in utero* nelle cellule linfoidi in sviluppo. Le sindromi mielodisplastiche e le leucemie acute dell'infanzia sono pertanto malattie eterogenee composte da numerosi sottogruppi biologici, in genere con *score* prognostici sfavorevoli. Infatti, come ipotizzato nei rari casi pediatrici di leucemia mieloide cronica, gli eventi trasformativi nei progenitori emopoietici avvengono con rapidità e portano allo sviluppo di un clone maligno in un tempo molto più breve rispetto all'adulto.

Viceversa le sindromi mieloproliferative croniche Ph- raramente sono ereditarie o associate a mutazioni germinali; più frequenti sono le forme di trombocitosi ed eritrocitosi secondarie, che a causa della bassa morbidità richiedono un approccio conservativo e meno invasivo, anche sul piano diagnostico.

Un numero sempre più elevato di bambini con emopatie neoplastiche risponde in modo ottimale ai trattamenti polichemioterapici o biologicamente mirati, anche per la minore incidenza di disfunzioni d'organo e per l'assenza di concomitanti patologie croniche. Il trapianto di cellule staminali emopoietiche ha modificato profondamente la storia naturale delle patologie a prognosi più infausta, grazie sia alla disponibilità di fonti alternative al donatore familiare HLA identico, come il sangue cordonale, sia ai nuovi regimi non ablativi di condizionamento che, soprattutto nelle patologie non oncologiche, servono a limitare gli effetti tossici precoci e tardivi.

La popolazione dei pazienti in età pediatrica guariti dalla neoplasia ematologica di base è in continua crescita. È pertanto di notevole importanza un costante *follow up*, inteso a fotografare il suo stato di salute ed a gestire le problematiche, sia di pertinenza medica sia psicologiche e comportamentali, che possono comparire a lungo termine.

# Sindromi mielodisplastiche

**MARCO ZECCA, CHIARA CUGNO**

*Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico "San Matteo", Pavia*



Marco Zecca

## ■ INTRODUZIONE

Le sindromi mielodisplastiche (SMD) sono un gruppo eterogeneo di patologie clonali ematologiche caratterizzate da emopoiesi inefficace, citopenia progressiva, trasformazione displastica delle cellule emopoietiche e rischio di evoluzione in leucemia mieloide acuta (1). La loro incidenza in età pediatrica è nettamente inferiore rispetto agli adulti, soprattutto se di età superiore a 60 anni, e numerose sono le differenze tra le SMD dell'adulto e del bambino in termini di caratteristiche morfologiche, anomalie citogenetiche, fattori prognostici e condizioni predisponenti. Per questo motivo, negli ultimi 20 anni, è stata percepita come emergente la necessità di un approccio esclusivamente pediatrico per la diagnosi e la cura di tali patologie.

## ■ SINDROMI MIELODISPLASTICHE

### **Classificazione**

La classificazione elaborata dal gruppo cooperativo FAB (*French-American-British*) distingueva

**Parole chiave:** mielodisplasie, leucemia mieloide acuta, leucemia mielomonocitica giovanile, JMML.

*Indirizzo per la corrispondenza*

Marco Zecca  
Oncoematologia Pediatrica  
Fondazione IRCCS Policlinico "San Matteo"  
Viale Golgi, 19 - 27100 Pavia  
E-mail: m.zecca@smatteo.pv.it

nell'ambito delle sindromi mielodisplastiche 5 sottogruppi sulla base della conta blastica percentuale sul sangue periferico e midollare: anemia refrattaria (AR), AR con sideroblasti ad anello, AR con eccesso di blasti (AREB), AREB in trasformazione (AREB-T) e leucemia mielomonocitica cronica (CMML) (2). Tuttavia, la classificazione FAB, nonostante il notevole impatto prognostico esercitato anche in età pediatrica, si rivelò ben presto inadeguata in quest'ambito, non riuscendo a definire ed identificare peculiari patologie e caratteristiche morfologiche dei bambini (3, 4). La classificazione delle neoplasie ematologiche dell'Organizzazione mondiale della sanità (WHO) del 2001 (5) inserì tra i criteri classificativi le caratteristiche morfologiche e la presenza di anomalie citogenetiche oltre ad abbassare dal 30 al 20% il valore soglia della conta blastica necessario per distinguere tra SMD e leucemia mieloide acuta (LMA). Anche in questa classificazione, basata in prevalenza sulla revisione di casi in età adulta, non vennero riconosciute le specifiche peculiarità delle SMD pediatriche: l'estrema rarità delle AR con sideroblasti ad anello, la completa assenza della sindrome del 5q- e l'insorgenza precoce di SMD all'interno di condizioni genetiche costituzionali predisponenti. In più non vi sono dati sufficienti a supportare che una quota blastica pari al 20% piuttosto che al 30% meglio distingua le SMD dalle LMA nei bambini. La prima classificazione WHO modificata ed adattata all'età pediatrica (6) ha suddiviso le SMD nei seguenti sottogruppi (*Tabella 1* e *Figura 1*):

- citopenia refrattaria (CR): blasti nel sangue periferico <2%, blasti midollari <5%;



**I. Sindromi mielodisplastiche/mieloproliferative**

- Leucemia mielomonocitica giovanile (JMML)
- Leucemia mielomonocitica cronica (CMML) (solo secondaria)
- Leucemia mieloide cronica BCR-ABL-negativa

**II. Patologie della sindrome di Down**

- Mielopoiesi anormale transitoria (transient abnormal myelopoiesis, TAM)
- Leucemia mieloide della sindrome di Down

**III. Sindromi mielodisplastiche**

- Citopenia refrattaria (CR)
- Anemia refrattaria con eccesso di blasti (AREB)
- Anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione (AREB-T)

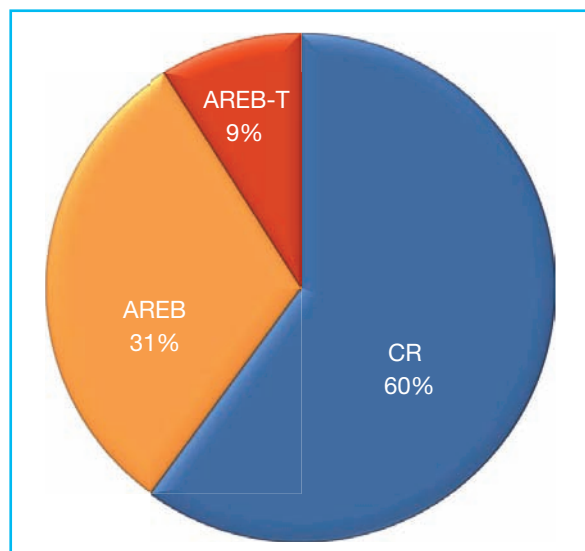
| % di blasti       |         |
|-------------------|---------|
| Sangue periferico | Midollo |
| <2%               | <5%     |
| 2-19%             | 5-19%   |
| 20-29%            | 20-29%  |

**IV. Leucemia mieloide acuta**

- Leucemia mieloide acuta secondaria ad SMD (myelodisplasia-related LMA, MDR-LMA): precedente mielodisplasia progredita e con blasti nel midollo o nel sangue periferico  $\geq 30\%$
- Leucemia mieloide acuta de novo: blasti nel midollo o nel sangue periferico  $\geq 30\%$  alla diagnosi o presenza di traslocazioni cromosomiche specifiche della LMA.

**TABELLA 1** - Classificazione delle SMD/mieloproliferative del bambino (6).

- AREB: blasti nel sangue periferico 2-19% e/o blasti midollari 5-19%;
- AREB-T: blasti nel sangue periferico e/o blasti midollari 20-29%;
- LMA secondaria a SMD (*Myelodisplasia-related LMA*, SMD-LMA): SMD evoluta e con blasti nel sangue periferico e/o blasti midollari  $\geq 30\%$ .

**FIGURA 1** - Frequenza dei diversi sottotipi morfologici delle SMD primitive.

Rispetto alla classificazione dell'adulto è stata mantenuta la categoria AREB-T, è stato specificato che la quota blastica di per sé era insufficiente per differenziare le LMA dalle SMD e che nell'iter diagnostico era fondamentale includere le caratteristiche cliniche, il decorso della malattia, il dato morfologico, immunofenotipico e citogenetico. Questo approccio ha consentito di classificare in maniera chiara e omogenea più del 95% dei pazienti (7) ed è stato in seguito incluso nella successiva classificazione WHO (Figura 2) (8). Le SMD diagnosticate in bambini altrimenti sani sono definite primitive. Le forme che si presentano, invece, in bambini con note condizioni predisponenti sono definite secondarie e si riscontrano più frequentemente in pazienti che abbiano ricevuto un trattamento chemio- o radioterapico o in pazienti con insufficienze midollari costituzionali. È tuttavia necessario tenere presente che bambini con cosiddette SMD primitive potrebbero avere un difetto genetico non riconosciuto predisponente l'insorgenza precoce di SMD e che, pertanto, anche la distinzione tra forma primitiva e secondaria potrebbe rivelarsi arbitraria (9). La CR si identifica con il gruppo delle SMD non avanzate o a basso rischio, mentre AREB, AREB-T e LMA costituiscono il gruppo delle SMD avanzate o ad alto rischio.

### **Epidemiologia e fattori predisponenti**

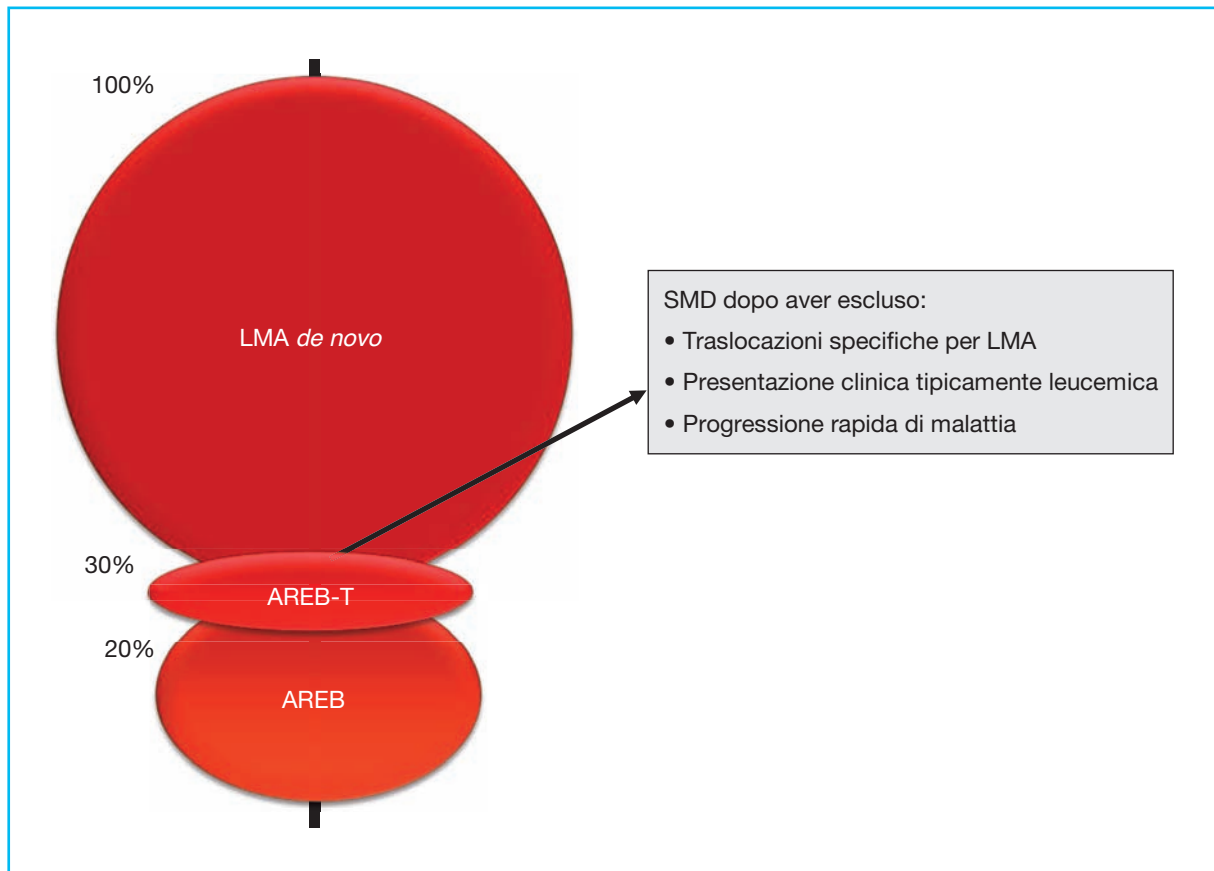
L'incidenza di SMD, sia primitive che secondarie, in base a studi di popolazione effettuati in Danimarca e Canada, è risultata pari a 1,8 casi/anno per milione di bambini tra 0-14 anni (10, 11), rappresentando le SMD il 4% di tutte le neoplasie ematologiche del bambino. In uno studio britannico emerge invece un'incidenza di 0,8 casi di SMD primitiva/anno per milione di bambini tra 0-14 anni (4). La distribuzione tra sesso maschile e femminile non mostra differenze; l'età media di esordio è di 6-8 anni (10-13).

La CR è il sottotipo più frequente di SMD nei bambini e negli adolescenti, rappresentando approssimativamente il 60% di tutti i casi (4, 14), AREB e AREB-T si attestano rispettivamente sul 31 e 9% dei casi (*Figura 1*).

L'incidenza delle SMD secondarie a trattamento radio o chemioterapico è pari al 7-18% di tutte le forme pediatriche, con una chiara tendenza

all'incremento negli ultimi anni per effetto dell'aumentata sopravvivenza dei bambini affetti da prima neoplasia (14). È ormai ampiamente dimostrato che l'utilizzo di agenti alchilanti ed inibitori della topoisomerasi II favorisce l'insorgenza di SMD e LMA, quali seconde neoplasie, in bambini precedentemente trattati per leucemia linfoblastica acuta (LLA) o altre neoplasie. Le SMD secondarie ad agenti alchilanti tendono a manifestarsi a 3-11 anni di distanza dal trattamento (15, 16) e sono classicamente caratterizzate da delezioni dei cromosomi 5 o 7 (17). Riarrangiamenti del gene MLL sono invece caratteristici dei casi di LMA secondaria a trattamento con inibitori delle topoisomerasi II (quali l'etoposide), che solitamente si presenta come una franca LMA dopo un breve periodo di latenza di 1-3 anni e senza una fase prodromica di SMD (17, 18).

Numerose condizioni ereditarie si associano ad un aumento del rischio di sviluppare SMD e con-



**FIGURA 2** - Differenziazione delle SMD dalle LMA *de novo*.

seguentemente LMA, in particolare le insufficienze midollari costituzionali e i difetti dei meccanismi di riparazione del DNA. Si stima che circa il 30% delle SMD insorga nell'ambito di un difetto costituzionale (4, 11). Il rischio di SMD/LMA è estremamente variabile ed è più elevato nell'anemia di Fanconi (AF), nella discheratosi congenita (DC) e nella neutropenia congenita grave (NCG) o sindrome di *Kostman*. Nell'AF le neoplasie mieloidi esordiscono precocemente durante l'infanzia o l'età giovanile ed il rischio di insorgenza dipende dal sottogruppo genetico e dalle eventuali anomalie associate (19, 20). Il rischio cumulativo a 15 anni di sviluppare una SMD nella NCG è del 15% (21) e non sembra incrementato dalla terapia con fattori di crescita emopoietici (G-CSF). D'altra parte i pazienti con scarsa risposta al G-CSF sembrano avere un rischio maggiore di SMD.

Nella sindrome di *Shwachman-Bodian-Diamond* (SBDS) il rischio di SMD è di circa il 30% (22) ed è spesso correlato con anomalie del cromosoma 7 ad eccezione dell'isocromosoma 7q che, al contrario, si associa ad una bassa probabilità di progressione (23). L'acquisizione di anomalie cromosomiche clonali successive aumenta con il passare del tempo e rende conto della condizione di instabilità cromosomica tipica della sindrome (24). L'incidenza cumulativa di SMD/LMA nella DC è sovrapponibile a quello dell'AF (25).

Occasionalmente SMD/LMA sono state descritte in pazienti con anemia di *Diamond-Blackfan* (26) e porpora amegacariocitica congenita (CAMT) (24). Un'evoluzione in senso mielodisplastico avviene nel 10-15% dei casi di anemia aplastica acquisita non sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche (27). Il fatto che il rischio maggiore si osservi per le forme non gravi di aplasia midollare acquisita (28) lascia ipotizzare che alcuni casi di CR possano in realtà non essere stati correttamente diagnosticati.

Esistono inoltre forme familiari di SMD in famiglie con più di un membro affetto, in assenza delle già descritte forme di insufficienza midollare costituzionale. In queste famiglie spesso si riscontra la monosomia del cromosoma 7 (3, 29, 30). Mutazioni *germline* dei fattori di trascrizione CEBPA e RUNX1 possono causare forme familiari di SMD/LMA ma nella maggior parte delle famiglie

la causa genetica predisponente rimane ignota (29). Sindromi mielodisplastiche sono state infine occasionalmente descritte in numerosi soggetti con anomalie citogenetiche costituzionali diverse dalla trisomia 21; l'unica chiara associazione dimostrata è con il mosaicismo della trisomia 8 (31) mentre la trisomia 8 può essere costituzionale nel 15-20% delle SMD con trisomia 8 (32). Le LMA in pazienti con condizioni predisponenti note condividono le stesse caratteristiche biologiche delle mielodisplasie, con l'eccezione della conta blastica, e la loro prognosi dipende in massima parte dal profilo citogenetico. Fanno eccezione alcune famiglie con mutazione germinale di CEBPA o RUNX1 a rischio di sviluppare LMA con caratteristiche cliniche e prognosi delle LMA *de novo* (33-35).

Sono state infine riportate malformazioni congenite in un numero relativamente alto di bambini con SMD (3, 4); si tratta tuttavia di malformazioni estremamente variegata e senza un modello associativo specifico.

### Fisiopatologia

Le SMD sono patologie clonali che coinvolgono un progenitore emopoietico precoce comune alla mielopoiesi, megacariocitopoiesi ed eritropoiesi (36, 37). L'evidenza della clonalità nelle SMD è stata dimostrata attraverso gli studi di inattivazione *non random* del cromosoma X in pazienti femmine affette da SMD (38, 39). Meno frequentemente l'evento iniziale accade in un progenitore più immaturo, comune anche alla linea linfocitica, esitando nella rarissima progressione della SMD in LLA (40). L'identificazione di mutazioni del gene oncosoppressore TET2 nel 20% di pazienti adulti con neoplasie mieloidi, incluse le SMD, ha permesso di iniziare a far luce sugli eventi iniziali del processo *multistep* che conduce alla SMD (41). L'eterogeneità clinica e biologica lascia ipotizzare che siano implicati differenti meccanismi di inizio e progressione della malattia. Un evento genetico a livello di un progenitore emopoietico pluripotente potrebbe causare instabilità cromosomica favorendo l'acquisizione successiva di altre lesioni molecolari (42). Difetti congeniti dei meccanismi di riparazione del DNA, quali l'AF, o mutazioni acquisite in geni deputati al mantenimento della stabilità geneti-



ca esitano in un fenotipo fortemente predisposto all'insorgenza di SMD (43, 44). Più nel dettaglio, ci sono 5 gruppi di difetti alla base delle sindromi da insufficienza midollare costituzionale fortemente predisposte allo sviluppo di SMD:

1. difetti dei meccanismi di riparazione del DNA (AF);
2. alterato controllo dell'apoptosi (NCG);
3. alterata biogenesi ribosomiale (SBDS);
4. difetti dei meccanismi di mantenimento del telomero (DC);
5. disregolazione trascrizionale dell'emopoiesi (piastrinopenia familiare).

Mutazioni precoci a carico del progenitore emopoietico potrebbero alterare il processo maturativo della linea mieloide e favorire l'apoptosi portando alla displasia, mentre difetti successivi coinvolgenti i segnali proliferativi ed antiapoptotici potrebbero causare l'espansione clonale di cellule aberranti ed una franca LMA.

L'aumento dell'apoptosi rappresenta uno dei principali meccanismi del complesso processo patogenetico delle SMD. Un elevato indice apoptotico è stato ritrovato nelle forme a basso rischio, seguito poi da una riduzione del segnale apoptotico nella popolazione blastica in pazienti in cui era avvenuta la trasformazione in LMA. È stato anche dimostrato che le cellule mielodisplastiche esprimono in maniera aberrante alcuni recettori di membrana ed i loro ligandi responsabili della trasmissione del segnale apoptotico. Tale espressione potrebbe essere indotta da segnali infiammatori provenienti dal microambiente midollare (45). D'altra parte i pazienti con una forma più avanzata hanno una ridotta espressione di recettori pro-apoptotici a dispetto di aumentati livelli di fattori antiapoptotici, come il Bcl2 (46, 47).

Eventi a catena, come ad esempio mutazioni di protocongeni quali la famiglia del gene RAS, TP53 o WT1, e anomalie cariotipiche quali la monosomia del cromosoma 7, possono essere parte di un comune processo di progressione di malattia (48-50). Le anomalie cromosomiche più frequenti nelle SMD pediatriche sono ampie delezioni ma poco è noto dei geni contenuti nei segmenti deleti (3, 51-53) e se tali aberrazioni genetiche possano essere un evento iniziale del processo che porta alla SMD o, piuttosto, un evento secondario. Oltre alle delezioni geniche sono stati identificati

numerosi altri difetti implicati nella patogenesi. Pur essendo rare le traslocazioni bilanciate che spesso si ritrovano nelle LMA *de novo*, nelle SMD sono talora coinvolti alcuni di quegli stessi geni.

Studi di metilazione in bambini con RAEB e RAEB-T hanno dimostrato che almeno la metà dei pazienti presenta ipermetilazione del gene CDKN2B (54) o dei geni CALCA e CDKNB (55) con una frequenza paragonabile a quella registrata nella popolazione adulta. Le conseguenze funzionali dell'ipermetilazione e la correlazione con le caratteristiche cliniche non sono ancora note. Le mutazioni a carico del gene TP53 e CSF1R (FMS), riscontrate nel 30% delle SMD dell'età adulta, non sono state mai identificate in età pediatrica (56), parimenti, le mutazioni del protooncogene NRAS che rappresentano l'anomalia molecolare più frequente nell'adulto, sono rare nel bambino (57). Le mutazioni di TERC, gene codificante la componente ad RNA della telomerasi, che causano allo stato autosomico dominante la DC, sono poco comuni nelle SMD a basso grado (58, 59) e, verosimilmente ancora più rare nelle forme avanzate (9).

La frequenza di mutazioni a carico dello spliceosoma (complesso enzimatico deputato allo *splicing* del pre-mRNA) è nettamente più bassa nei bambini rispetto a quanto rilevato negli adulti (60). Tale riscontro lascia supporre che la patogenesi delle SMD nei bambini sia probabilmente correlata ad alterazioni genetiche acquisite in epoca prenatale piuttosto che all'accumulo di mutazioni somatiche subentranti. Questa ipotesi ben si accorda anche con la scarsa prevalenza in età pediatrica di mutazioni somatiche a carico di geni quali DNMT3A, TET2, IDH e ASXL1 (61-64).

Infine, gli studi di espressione genica, attraverso la tecnica dei *microarray* di cDNA, hanno mostrato una chiara differenza tra le cellule del microambiente stromale di bambini sani e di bambini affetti da SMD/LMA. In particolare l'analisi dei profili funzionali dei geni ha consentito di identificare una riduzione dell'espressione, stadio-specifica, di geni deputati al trasporto proteico intracellulare (65).

### **Presentazione clinica**

Sintomi aspecifici di presentazione sono astenia, febbre, malessere, infezioni. All'esame obiettivo

si riscontrano spesso pallore, ematomi e petecchie, mentre non sono frequenti epatosplenomegalia e linfadenopatia. Localizzazioni mieloidi extramidollari possono essere segno di presentazione nelle SMD avanzate con monosomia del cromosoma 7 (3, 66).

I bambini si presentano di solito con segni e sintomi associati all'insufficienza midollare. Nella maggior parte dei casi il riscontro iniziale è quello di una pancitopenia, sebbene occasionalmente il primo campanello d'allarme possa essere una singola citopenia periferica. Il termine citopenia refrattaria, introdotto in sostituzione di anemia refrattaria, rende conto di questa differenza sostanziale di presentazione nel bambino in cui si osservano piastrinopenia e neutropenia più frequentemente rispetto all'anemia, più tipica dell'età adulta. Infatti circa 3/4 dei pazienti presenta alla diagnosi una conta piastrinica  $<150 \times 10^9/L$ , la metà e un quarto una conta di neutrofili rispettivamente  $<1,0 \times 10^9/L$  e  $0,5 \times 10^9/L$ . L'anemia con emoglobina  $<10$  g/dl si riscontra in circa la metà dei pazienti (67). È causata dal meccanismo di eritropoiesi inefficace ed è solitamente a bassa conta di reticolociti, macrocitica e con moderata poichilocitosi. L'emoglobina fetale è frequentemente aumentata.

### Morfologia

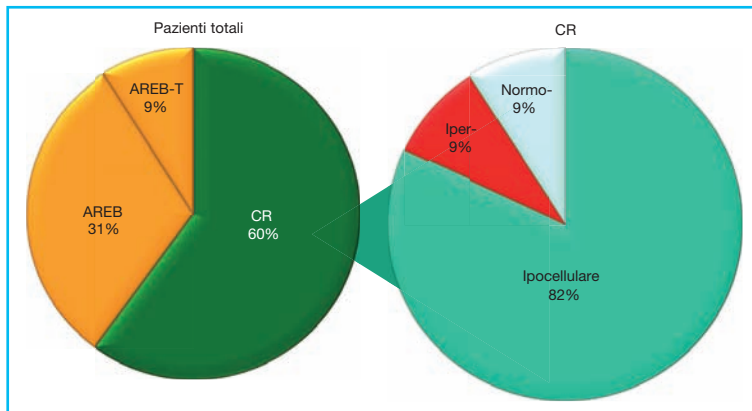
Le caratteristiche morfologiche delle SMD comprendono alterazioni displastiche midollari coinvolgenti le tre linee cellulari (displasia trilineare). L'asincronia maturativa nucleo-citoplasmatica è sempre presente, i nuclei appaiono abnormi e meno maturi rispetto al citoplasma. Le anomalie della serie eritroide consistono nella presenza di megaloblasti, di cellule multinucleate, di frammentazione nucleare e nell'aumentata percentuale di cellule immature. La dismegacariopoesi è invece caratterizzata da micromegacariociti, nuclei abnormi e anomala lobulazione nucleare. I caratteri displastici della serie granulocitica si ravvisano in cellule immature, ipogranulazione e anomalie di *Pelger-Heuet*. La displasia monocitoide include un elevato numero di monociti midollari, un'anomala granulazione citoplasmatica per la presenza di granuli azzurrofilii, immagini di emofagocitosi, nuclei anomali ed elementi giganti (68).

La cellularità midollare può essere ridotta, normale o aumentata. Nella CR la cellularità è ridotta nella maggioranza dei bambini (82%, EWOG-SMD, dati non pubblicati) (Figura 3). L'aspirato midollare rappresenta solo un elemento, spesso insufficiente, della diagnosi di CR. La necessità di distinguere la CR da altri disordini midollari con ipocellularità richiede infatti la valutazione della biopsia ossea. In assenza di marcatori citogenetici, la diagnosi di CR deve essere confermata da 2 rivalutazioni midollari ad almeno 2 settimane di distanza, monitorando nel contempo l'evoluzione clinica del paziente.

Solitamente non si documentano differenze all'esame morfologico tra casi di CR con monosomia 7 e/o altre aberrazioni e cariotipo normale. Dal punto di vista istopatologico, la CR ipocellulare è paragonabile con le forme normo o ipercellulari. In entrambe è importante l'identificazione di cellule eritroidi con anomalie maturative. Nella forma ipoplasica, uno o più *cluster* di almeno 10 precursori eritroidi, con un aumentato numero di proeritroblasti e di mitosi, sono distribuiti in maniera irregolare, a macchia, in un midollo altrimenti adiposo (8). I precursori mieloidi sono molto ridotti e spesso immaturi; i megacariociti rari o assenti e spesso si rende necessario l'utilizzo dell'immunoistochimica per localizzare i micromegacariociti. Linfociti, plasmacellule e mastociti possono essere aumentati, mentre solitamente non si riscontrano cellule blastiche.

La presenza di displasia emopoietica di per sé è suggestiva di mielodisplasia ma non può essere considerata diagnostica (6). Esiste una grande variabilità di giudizio nella valutazione della displasia tra i diversi osservatori (51), motivo per cui è sempre raccomandata una revisione centralizzata (68). Il grado di displasia (69) e l'estensione della fibrosi hanno valore prognostico negli adulti, mentre più incerto è il loro impatto prognostico nei bambini.

Cellule eritroidi megaloblastiche nucleate si riscontrano frequentemente nel sangue periferico. La disgranulocitopoiesi nel sangue periferico si presenta con mieloblasti e promielociti circolanti e cellule di *Pelger-Heuet*. Di frequente riscontro è inoltre un elevato numero di monociti e monoblasti in periferia.



**FIGURA 3** - Sottotipi morfologici delle SMD primitive e cellularità midollare (da EWOG-SMD 98 e EWOG-SMD 2006, analisi interinale).

### Citogenetica

Un cariotipo anormale si riscontra in circa il 55% dei bambini con SMD primitive avanzate e nel 76% delle forme secondarie avanzate (70). La monosomia 7, anomalia citogenetica più comune, si rinviene nel 25% dei casi (70). Seguono, in ordine di frequenza tra le anomalie numeriche dei cromosomi, la trisomia 8 e 21. Si dovrebbe ricercare sempre su cellule non emopoietiche (fibroblasti) un mosaicismo della trisomia 8 (spesso clinicamente silente) in caso di riscontro di trisomia 8 su sangue midollare (31). Anomalie citogenetiche favorevoli identificate negli adulti (monosomia Y, delezioni 5q- e 20q-) non si ritrovano quasi mai nei bambini e non hanno pertanto valore prognostico (71).

La definizione di cariotipo complesso rimane oggetto di discussione. Nella maggior parte degli studi un cariotipo complesso viene definito come presenza di 3 o più anomalie citogenetiche indipendenti (71-74). Nelle SMD dell'età adulta è stato inoltre definito un cariotipo monosomico (singola monosomia in presenza di un'aberrazione strutturale o almeno 2 distinte monosomie autosomiche) quale fattore di rischio fortemente sfavorevole (75). Nei pazienti pediatrici è stata recentemente introdotta una nuova definizione di cariotipo strutturalmente complesso (3 o più alterazioni cromosomiche, di cui almeno un'anomalia strutturale) che più di altre correla con una prognosi molto sfavorevole (Figura 4) (70). Le più frequenti aberrazioni cromosomiche dei cloni con citogenetica complessa in età pediatrica sono costituite da delezioni, traslocazioni non bilanciate e cromosomi dicentrici. Si posso-

no identificare monosomie anche se non si può avere la certezza che quel particolare cromosoma sia realmente perso. Infatti, attraverso le tecniche citogenetiche molecolari più avanzate si trova sempre più frequentemente che i cromosomi mancanti sono in realtà coinvolti in aberrazioni strutturali.

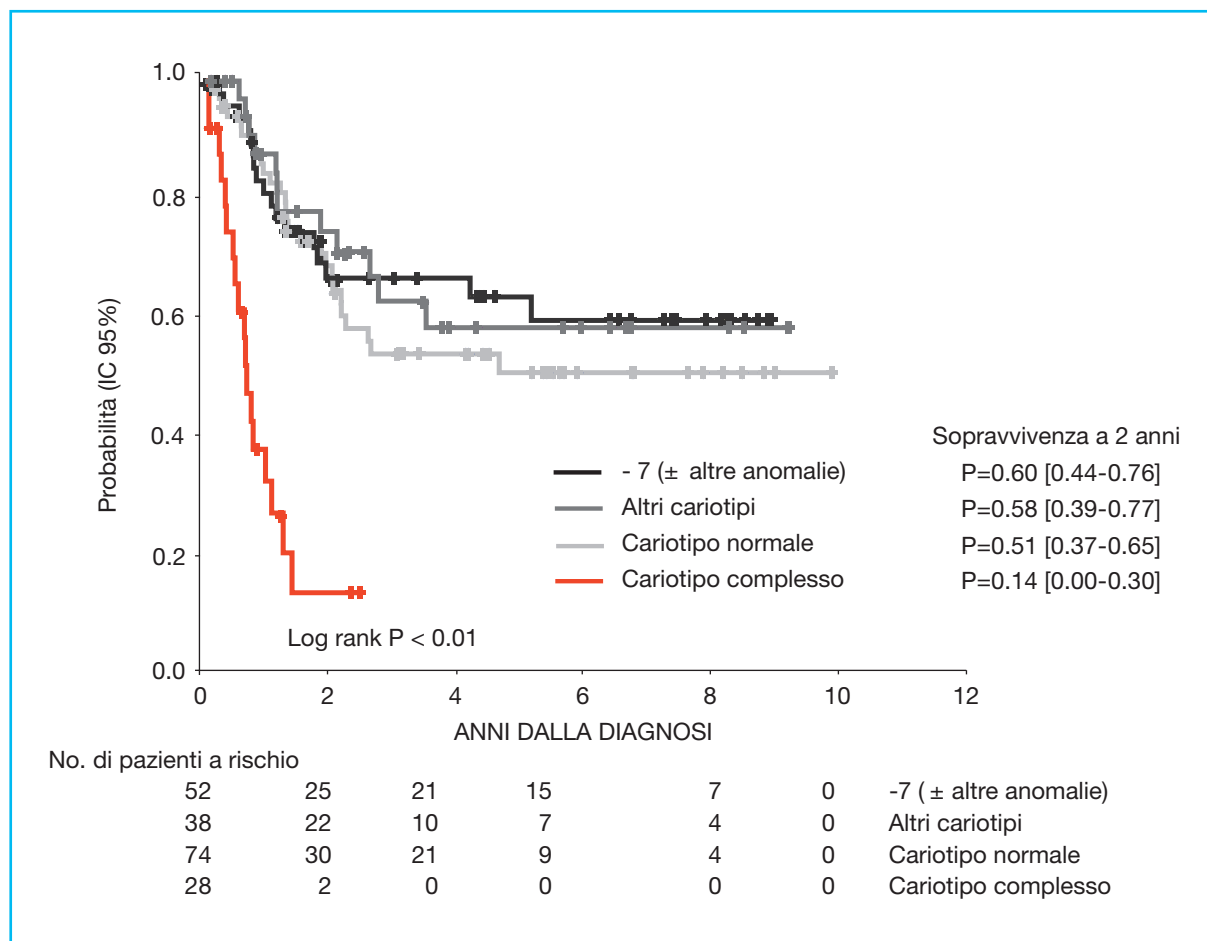
La presenza di traslocazioni specifiche per LMA, per esempio t(8;21), t(15;17), inv(16), dovrebbero sempre rimandare alla diagnosi di LMA, a prescindere dalla quota blastica (Figura 5).

Nelle forme secondarie l'alterazione citogenetica più frequente è rappresentata dalla monosomia del cromosoma 7 o dalla delezione del braccio lungo del cromosoma 7 (76). Vengono inoltre riportati spesso anche riarrangiamenti sbilanciati coinvolgenti il braccio lungo del cromosoma 1, con trisomia del cromosoma 1, e alterazioni strutturali del braccio corto del cromosoma 6 (77, 78).

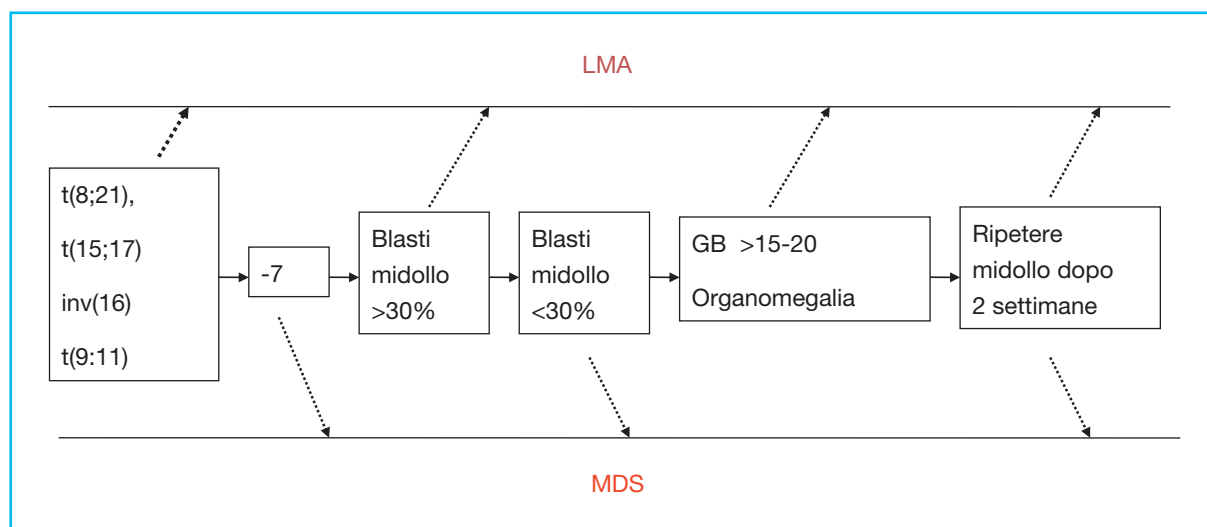
Le SMD secondarie a disordini midollari congeniti si caratterizzano per alcune frequenti anomalie citogenetiche, quali la delezione parziale o completa del cromosoma 7, le anomalie di 21q, la perdita di 11q, 20q o 5q e la trisomia 8. La progressione in LMA è poi quasi invariabilmente associata all'acquisizione di numerose altre alterazioni cromosomiche e genomiche, alcune specifiche della sottostante malattia congenita, altre comuni alle SMD primitive e alle SMD-LMA.

### Immunofenotipo

La citofluorimetria non ha ancora raggiunto un ruolo di primissimo piano nella diagnosi delle SMD in quanto non sono stati ancora chiaramente defi-



**FIGURA 4** - Sopravvivenza libera da eventi nei bambini con SMD avanzata primaria o secondaria in base al cariotipo (70).



**FIGURA 5** - Algoritmo per la diagnosi differenziale tra SMD ed LMA de novo.

niti profili di espressione fenotipica specifici per le SMD. Inoltre, sono limitati i dati sulle caratteristiche immunofenotipiche delle SMD nei bambini. Tuttavia l'identificazione di alcune specifiche alterazioni del *pattern* maturativo immunofenotipico può risultare molto utile in particolari circostanze. A questo proposito, Veltroni et al. (79) hanno recentemente descritto due particolari immunofenotipi specificamente espressi dai blasti di pazienti pediatriche affetti da SMD ma assenti su blasti di LMA *de novo* (fenotipo A: CD34+/CD117+ e fenotipo B: CD34+/CD117+/CD11a+/CD11b+/CD64-/CD65-/CD15-) ed hanno dimostrato un importante rapporto tra espressione del CD7 e prognosi particolarmente sfavorevole.

### Diagnosi differenziale

Gravi deficit nutrizionali di vitamina B12 e folati vanno esclusi in quanto possono provocare alterazioni midollari di tipo megaloblastico. Alcune infezioni virali, ad esempio da HIV, Parvovirus B19, virus di *Epstein-Barr*, Herpes virus 6, Citomegalovirus, possono provocare un quadro di insufficienza midollare con gradi variabili di displasia. Anche l'anemia aplastica grave può porre problemi di diagnosi differenziale con le SMD variante CR. Dal punto di vista morfologico l'anemia aplastica si distingue per l'assenza delle tipiche isole eritroidi con un numero aumentato di proeritroblasti e per l'assenza di micro-megacariociti. Le insufficienze midollari congenite (AF, DC, SBDS, CAMT, pancitopenia con sinostosi radioulnare) possono avere caratteristiche morfologiche e istopatologiche indistinguibili dalla CR. Le indagini diagnostiche per escludere l'AF (test di fragilità cromosomica con diepossibutano, studio del ciclo cellulare e ricerca delle mutazioni) sono obbligatorie per confermare la diagnosi iniziale di CR.

I maggiori problemi di diagnosi differenziale si pongono però tra SMD avanzate e LMA. Ci sono tuttavia differenze significative in quanto a presentazione clinica, citogenetica e, soprattutto, risposta alla terapia tra le due entità cliniche. La quota blastica non sembra essere sufficiente per differenziare le AREB-T dalle LMA e la diagnosi deve essere supportata dalla valutazione delle caratteristiche biologiche (80).

Un algoritmo (Figura 5) facilita la distinzione tra SMD e LMA. In casi *borderline* con quota blastica midollare compresa tra il 20 e il 30% e in assenza di alte-

razioni citogenetiche caratteristiche, viene raccomandata la ripetizione dell'aspirato midollare a distanza di 2 settimane. Un incremento della quota blastica al di sopra del 30% alla rivalutazione consente poi di porre diagnosi di LMA.

### Prognosi

Il rischio di progressione da SMD a LMA è variabile. L'evoluzione può avvenire in maniera rapida oppure richiedere alcuni mesi o, addirittura, anni. Le informazioni sui fattori prognostici predittivi di progressione sono quindi importanti al fine della programmazione del trattamento.

Ci sono stati numerosi tentativi di definire uno *score* prognostico nelle SMD pediatriche. Un sistema proposto dal gruppo britannico (30) assegnava un punto per ciascuno dei seguenti fattori: HbF superiore al 10%, conta piastrinica inferiore a  $40 \times 10^9/l$  e presenza di 2 o più anomalie citogenetiche (*score* PFC). Questo sistema prognostico tuttavia non è poi stato applicato a serie ampie di bambini con SMD soprattutto per la tendenza a non valutare in maniera routinaria l'HbF.

Altro sistema di *score* prognostico, sviluppato per le SMD dell'adulto e validato a livello internazionale, è l'IPSS (*International Prognostic Scoring System*). Questo sistema assegna un valore numerico all'entità della citopenia (mono, bi o trilineare), alle anomalie citogenetiche e alla percentuale di blasti nel midollo identificando 4 gruppi prognostici: rischio basso, intermedio 1, intermedio 2 e alto (Tabella 2) (81). Tuttavia, le anomalie citogenetiche considerate prognosticamente favorevoli dall'IPSS (monosomia Y, delezioni 5q- e 20q-) sono solitamente assenti nel bambino. Per questo motivo e per la maggior frequenza di citopenia bi o trilineare e di monosomia del cromosoma 7 nella coorte pediatrica solo pochi bambini possono essere classificati come rischio basso e, a differenza di quanto accade negli adulti, vengono inseriti nel gruppo ad alto rischio (71). Tra i criteri prognostici validati nell'IPSS, solo la percentuale di blasti midollari inferiore al 5% e la conta piastrinica superiore a  $100 \times 10^9/l$  si associano in maniera significativa ad una maggiore sopravvivenza nelle SMD pediatriche; nessun altro dei fattori proposti sembra avere un impatto prognostico rilevante. L'IPSS identifica quindi un piccolo gruppo di bambini a basso rischio (7% dei



| <b>IPSS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |               |               |             |        |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|-------------|--------|-------|
| Score                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 0             | 0,5           | 1           | 1,5    | 2,0   |
| Blasti midollari (%)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0-4           | 5-10          | -           | 11-20  | 21-29 |
| Numero di citopenie <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0-1           | 2-3           | -           | -      | -     |
| Gruppo di rischio citogenetico <sup>b</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Basso         | Interm.       | Alto        | -      | -     |
| <b>Gruppi di rischio:</b> Basso: score 0;<br>Intermedio 1: score 0,5-1;<br>Intermedio 2: score 1,52;<br>Alto: score ≥2.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |               |               |             |        |       |
| <sup>a</sup> Piastrine <100.000 mm <sup>3</sup> , Hb <10 g/dl, globuli bianchi <1.800 mm <sup>3</sup> .<br><sup>b</sup> Rischio basso: cariotipo normale, del(5q), del(20q), -Y.<br>Rischio intermedio: aberrazioni non comprese nell'alto e nel basso rischio.<br>Rischio alto: cariotipo complesso (≥3 anomalie, aberrazioni cromosoma 7).                                                                                                                                                                                                                                                                                               |               |               |             |        |       |
| <b>WPSS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |               |               |             |        |       |
| Variabile                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0             | 1             | 2           | 3      |       |
| Categoria WHO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | RA, RARS, 5q- | RCMD, RCMD-RS | RAEB-1      | RAEB-2 |       |
| Cariotipo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Favorevole    | Intermedio    | Sfavorevole | -      |       |
| Fabbisogno trasfusionale                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Assente       | Regolare      | -           | -      |       |
| <b>Gruppo di rischio:</b> Molto basso: score 0;<br>Basso: score 1;<br>Intermedio: score 2;<br>Alto: score 3-4;<br>Molto alto: score 5-6.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |               |               |             |        |       |
| Abbreviazioni: RA: <i>refractory anemia</i> , anemia refrattaria; RARS: <i>refractory anemia with ringed sideroblasts</i> , anemia refrattaria con sideroblasti ad anello; RCMD: <i>refractory cytopenia with multilineage dysplasia</i> , citopenia refrattaria con displasia multilineare; RCMD-RS: <i>refractory cytopenia with multilineage dysplasia and ringed sideroblasts</i> , citopenia refrattaria con displasia multilineare e sideroblasti ad anello. Cariotipo favorevole: normale, -Y, del(5q), del(20q). Cariotipo sfavorevole: complesso (≥3 alterazioni) anomalie del cromosoma 7. Cariotipo intermedio: altre anomalie. |               |               |             |        |       |

TABELLA 2 - International Prognostic Scoring System, IPSS (81) e WHO classification-based prognostic scoring system, WPSS (82).

pazienti) con un'ottima prognosi; si tratta di pazienti con CR, cariotipo normale e assenza di grave citopenia (67). Le altre 3 classi di rischio definite dall'IPSS mancano di capacità predittiva della sopravvivenza nelle SMD pediatriche.

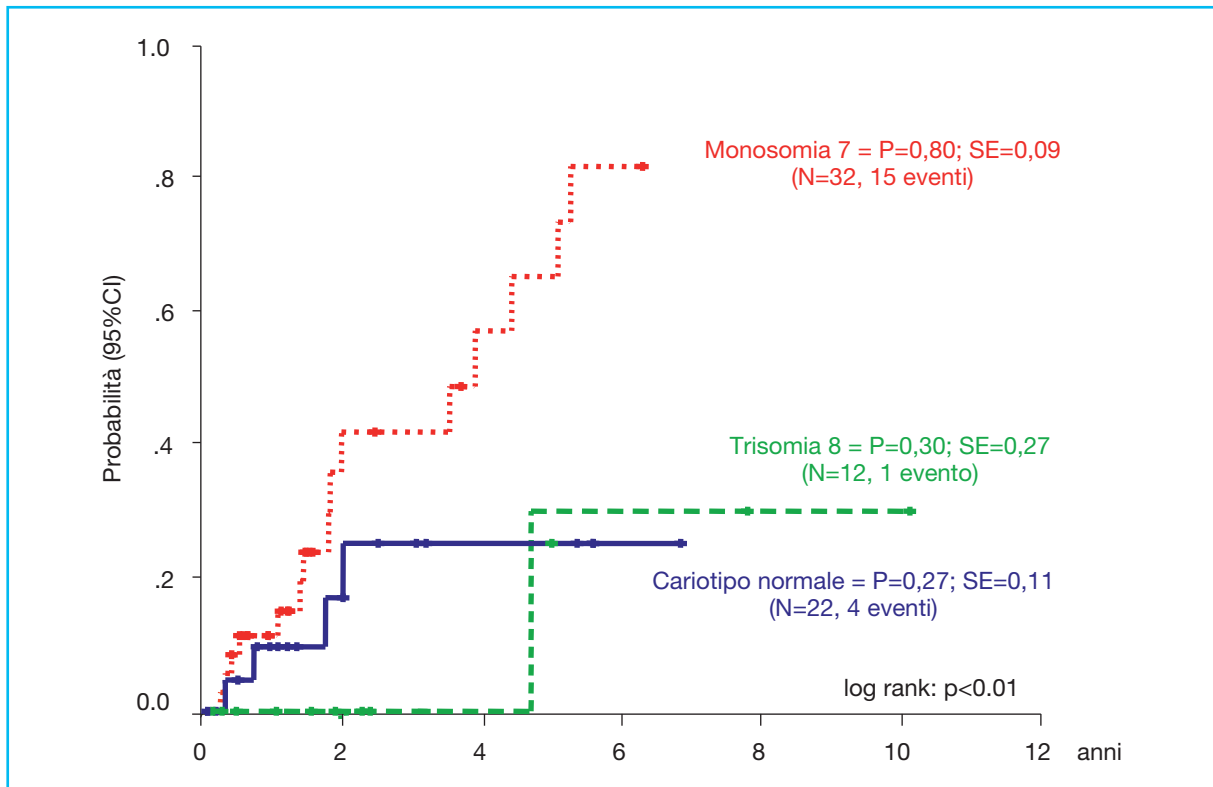
Più recentemente è stato proposto un ulteriore sistema prognostico per le SMD dell'adulto, denominato WPSS (Tabella 2) (82). A tutt'oggi, purtroppo, non esiste una validazione di questo sistema. La monosomia del cromosoma 7 rappresenta la più frequente alterazione citogenetica sfavorevole e nei bambini con CR si associa ad una più rapida progressione (67) e, conseguentemente, ad una ridotta sopravvivenza (Figura 6). In questa categoria di pazienti è stato infatti stimato un tempo medio di progressione pari a 1,9 anni, con un'incidenza cumulativa di progressione dell'80% a 6 anni dalla diagnosi. Al contrario, i pazienti con trisomia 8 o cariotipo normale possono presen-

tare una prolungata condizione di stabilità (67). La prognosi dei pazienti con monosomia 7 è, inoltre, estremamente sfavorevole nei casi in cui la monosomia 7 si associa ad altre anomalie strutturali (3, 50, 70, 83, 84).

Gli adolescenti e i pazienti con alterazioni citogenetiche complesse hanno una prognosi peggiore (70). Evento estremamente raro sono le remissioni spontanee di malattia, occasionalmente riportate in letteratura soprattutto nei bambini con monosomia 7 (85-89).

### Terapia

Essendo le SMD un disordine clonale delle cellule staminali emopoietiche, il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (TCSE) resta l'unico trattamento potenzialmente curativo. Nelle SMD non avanzate, tuttavia, può essere adottata, per i pazienti non gravemente citopenici e indi-



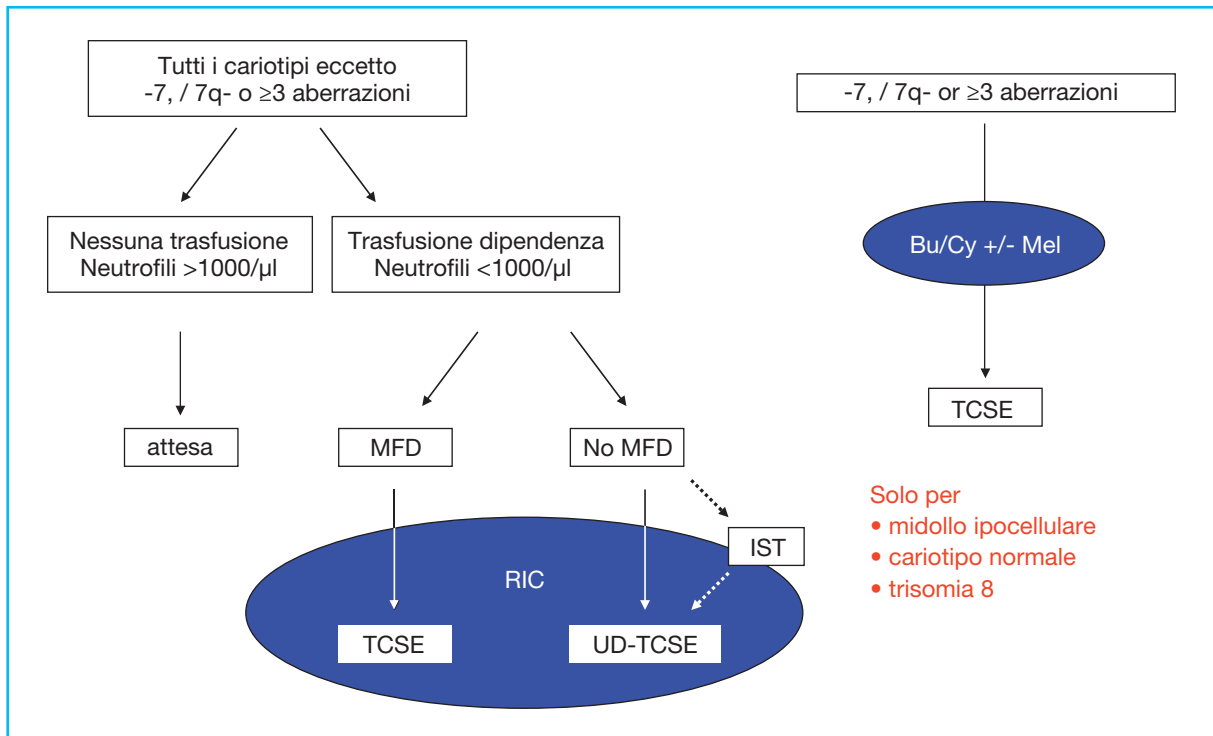
**FIGURA 6** - Probabilità di progressione della CR primitiva in SMD avanzata (67). SE: errore standard

pendenti da trasfusioni, anche una strategia di vigile attesa con periodica rivalutazione dello stato di malattia (Figura 7). Inoltre, in considerazione del fatto che l'insufficienza midollare può essere in parte mediata dall'azione immunosoppressiva dei linfociti T (90), in un sottogruppo selezionato di pazienti (CR con midollo ipocellulare e cariotipo normale o trisomia 8) potrebbe risultare efficace una terapia immunosoppressiva (91, 92). La percentuale di risposta a 6 mesi dopo un ciclo di terapia immunosoppressiva di prima linea è del 63% con una sopravvivenza globale e libera da malattia a 5 anni rispettivamente del 90 e 40% (93).

La maggior parte dei *trials* clinici è stata eseguita su una popolazione adulta; pochi studi hanno arruolato bambini. Numerose strategie terapeutiche alternative (fattori di crescita emopoietici, agenti differenzianti, farmaci anti-angiogenetici, ormoni, chemioterapia a basse dosi, farmaci sperimentali) sono state variamente testate in pazienti adulti e anziani non candidabili al TCSE, con

risultati scadenti e non sono generalmente indicate in bambini e adolescenti, laddove lo scopo del trattamento è la guarigione piuttosto che il prolungamento della sopravvivenza. La mancanza poi di anomalie molecolari ricorrenti rende ancora più problematico lo sviluppo razionale di una terapia *target*.

L'azacitidina e la decitabina che agiscono con un meccanismo di ipometilazione del DNA attraverso l'inibizione dell'attività della DNA metiltrasferasi, hanno mostrato efficacia clinica negli adulti. L'ipometilazione del DNA favorirebbe il ripristino di un normale controllo della crescita e della differenziazione in cellule emopoietiche mature (94-96). L'azacitidina inoltre possiede un effetto citotossico derivante dalla sua incorporazione nell'RNA (94). Sia l'azacitidina che la decitabina si caratterizzano per un lungo tempo di risposta al trattamento: nel caso dell'azacitidina i primi risultati terapeutici si documentano a partire dal secondo o terzo ciclo e nel 91% dei casi la prima risposta si ottiene dopo 6 cicli di terapia (97, 98).



**FIGURA 7** - Algoritmo di trattamento per la citopenia refrattaria. MFD: Matched sibling donor, donatore familiare HLA-compatibile; UD: unrelated donor, donatore volontario non consanguineo. TCSE: trapianto di cellule staminali emopoietiche; IST: immunosuppressive treatment, terapia immunosoppressiva.

L'azacitidina è l'unico agente ipometilante per il quale sia stato dimostrato un prolungamento significativo della sopravvivenza rispetto alle terapie convenzionali nei pazienti adulti con SMD ad alto rischio (99). L'efficacia terapeutica dell'azacitidina sembrerebbe, inoltre, indipendente dalla presenza di eventuali fattori di rischio quali la citogenetica sfavorevole, l'elevata percentuale di blasti midollari e la stratificazione nel gruppo ad alto rischio in base all'IPSS. La decitabina, d'altro canto, non ha dimostrato un vantaggio clinico significativo in termini di prolungamento della sopravvivenza rispetto alle terapie di supporto in 2 studi di fase 3 (95, 100).

È stato dimostrato che il fenomeno dell'ipermetilazione del DNA si può presentare con ugual frequenza in età adulta e pediatrica (54, 55), rendendo pertanto i bambini potenziali candidati per la terapia demetilante, sebbene siano ancora scarsi i dati pubblicati sui risultati del trattamento in questa fascia d'età. Lo schema di trattamento con azacitidina approvato dalla Food and Drug

Administration negli Stati Uniti prevede la somministrazione di cicli della durata di 7 giorni ogni 28 giorni alla posologia di 75 mg/m<sup>2</sup> al giorno. Da esperienze recenti sembra che uno schema di trattamento su 5 giorni invece di 7 possa dare risultati simili nelle SMD sia a basso che ad alto rischio (97, 101), anche se allo stato attuale mancano studi prospettici, randomizzati atti a confrontare i due schemi terapeutici.

La chemioterapia convenzionale senza TCSE si rivela di solito inefficace nell'eradicazione delle cellule staminali pluripotenti responsabili della SMD. La maggior parte degli studi ha mostrato un aumento significativo di morbidità e mortalità per la chemioterapia di induzione con percentuali di remissione <60%, recidive molto frequenti e sopravvivenza globale <30% (102-104). Il tasso di mortalità correlato alla terapia nei vari studi è compreso tra il 10 e il 30% (83, 102-104). I pazienti con LMA secondaria a SMD possono invece beneficiare di un trattamento chemioterapico intensivo prima del TCSE (105).

Il trapianto autologo, spesso usato nei giovani adulti, è stato raramente impiegato nei bambini. Due studi includono 8 bambini sottoposti a trapianto autologo con un solo lungo-sopravviven- te (83, 104).

### **Trapianto di cellule staminali emopoietiche**

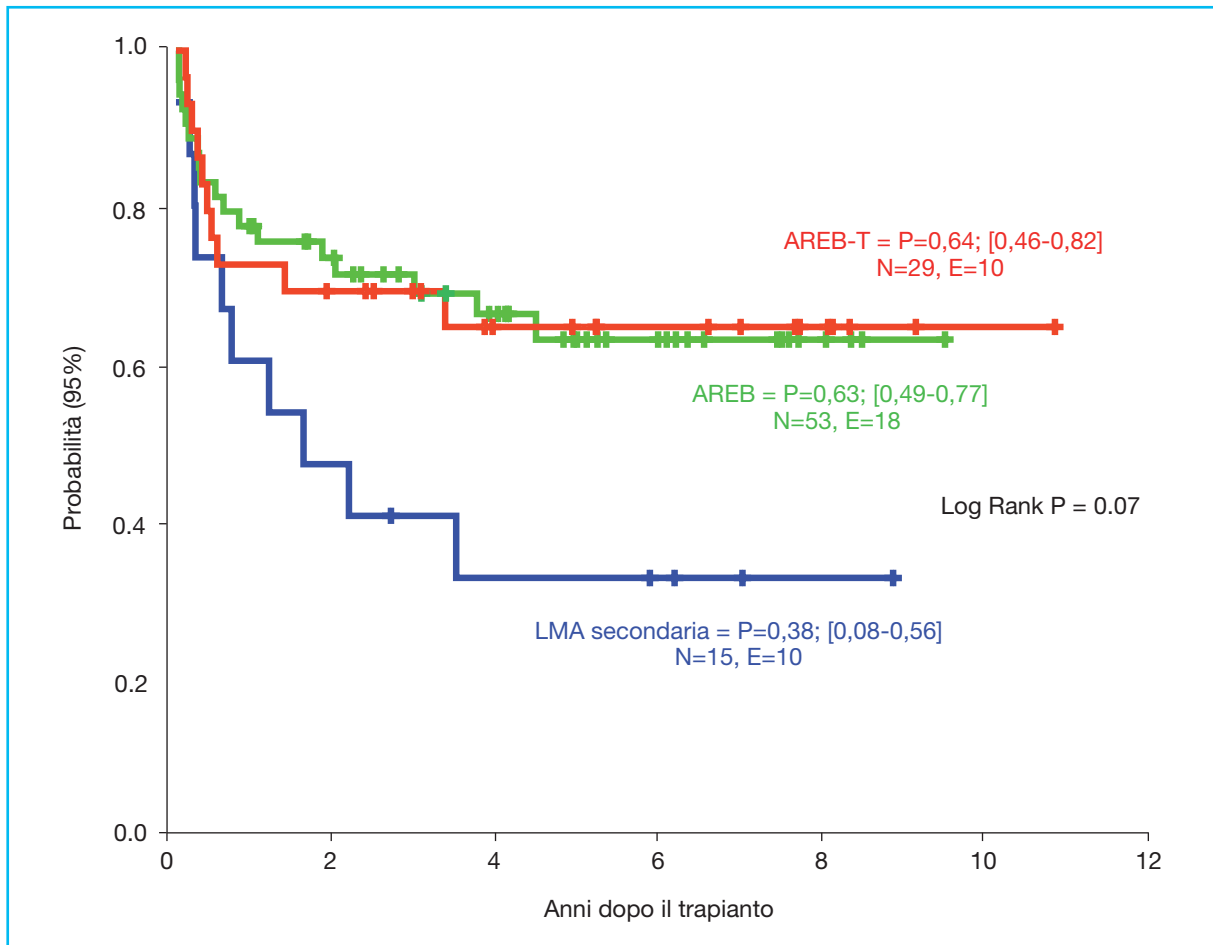
Rappresenta il trattamento di scelta per i pazienti con CR e monosomia 7 o cariotipo complesso e deve essere effettuato precocemente nel corso della malattia. I regimi di condizionamento sono simili a quelli utilizzati per le SMD avanzate. La sopravvivenza libera da eventi non differisce in maniera significativa tra il TCSE da donatore familiare HLA identico o con 1 disparità antigenica e il TCSE da donatore volontario compatibile, essendo rispettivamente del 78 e 73% (67). In considerazione della bassa mortalità trapianto correlata, il TCSE può inoltre essere raccomandato anche nei pazienti con altri cariotipi in presenza di un donatore HLA-compatibile (106, 107). Per i bambini con CR ipocellulare e cariotipo normale un regime di condizionamento ad intensità ridotta può rappresentare una valida strategia terapeutica (107), con buoni risultati in termini di sopravvivenza globale (100% e 92% rispettivamente per donatori familiari e volontari) e di sopravvivenza libera da eventi (81% e 78% rispettivamente per donatori familiari e volontari). Con questo approccio il rischio di mancato attecchimento o di perdita del trapianto è lievemente maggiore ma questi pazienti possono beneficiare di un secondo TCSE con risultati soddisfacenti.

Numerosi studi hanno mostrato che il TCSE può curare una buona percentuale dei bambini con SMD avanzate (83, 108-111). La terapia mieloablata con agenti alchilanti, in particolare busulfano, ciclofosfamide e melfalan, seguita da TCSE, ha portato alla guarigione di più del 50% dei bambini con SMD, sia impiegando un donatore familiare che un donatore volontario non consanguineo HLA-compatibile (105, 112), con risultati sovrapponibili. Nella maggior parte dei protocolli terapeutici si impiega un regime di condizionamento basato sul busulfano 16 mg/kg, in associazione a ciclofosfamide 120 mg/kg, e melfalan 140 mg/m<sup>2</sup> (108). L'irradiazione totale corporea può essere omessa, non avendo dimostrato maggiore efficacia antileucemica rispetto al

busulfano ed essendo associata a più frequenti effetti collaterali a lungo termine. La probabilità di sopravvivenza dopo TCSE è simile per le forme AREB e AREB-T (circa 63%), mentre è significativamente più bassa per le LMA secondarie a SMD a causa dell'aumentato rischio di ricaduta (32%) (Figura 8) (105). La ricaduta e la mortalità trapianto correlata contribuiscono in maniera pressoché equivalente all'insuccesso del trattamento. La mortalità trapianto correlata si attesta attorno al 20% (105, 109-111) ed i principali fattori di rischio sono costituiti dall'età >12 anni e dall'insorgenza della malattia del trapianto contro l'ospite (*graft-versus-host disease*, GVHD) di grado III-IV (105). L'elevata mortalità trapianto correlata osservata anche in pazienti con SMD *de novo*, a parità di regime di condizionamento, supporta l'ipotesi che alcuni bambini con SMD possano presentare disordini sottostanti non identificati e responsabili di maggiore sensibilità al trattamento chemioterapico e predisposizione all'effetto alloreattivo.

Rimane ancora oggetto di discussione l'utilità del trattamento chemioterapico pre-TCSE per ridurre il rischio di ricaduta e migliorare la sopravvivenza. In alcuni studi con un piccolo numero di pazienti trapiantati senza alcun trattamento chemioterapico precedente (possibile causa di tossicità aggiuntiva) è stata ottenuta una sopravvivenza pari al 65-70% (103, 113). Nell'esperienza del Gruppo Europeo di studio delle SMD in età pediatrica (EWOG-SMD), la somministrazione di cicli di chemioterapia intensiva prima del TCSE non ha consentito di migliorare la sopravvivenza globale e la sopravvivenza libera da malattia. Parimenti non si è trovata alcuna differenza significativa in termini di incidenza di recidiva e mortalità trapianto correlata (105). Quindi, alla luce del riscontro di una riduzione significativa del rischio di ricaduta (pur senza un vantaggio significativo in termini di sopravvivenza libera da eventi) nel gruppo di bambini affetti da LMA secondaria a SMD e trattati con chemioterapia intensiva prima del TCSE, il trattamento chemioterapico pre-trapianto può essere preso in considerazione esclusivamente in questa particolare categoria di pazienti (105) mentre, in linea generale, non è raccomandato nelle AREB ed AREB-T.

In mancanza di un donatore HLA compatibile, il



**FIGURA 8** - Sopravvivenza libera da malattia dopo TCSE allogenico per AREB, AREB-T ed LMA secondaria (105).

TCSE da sangue placentare (114) e il trapianto aploidentico di cellule staminali emopoietiche (115) rappresentano valide alternative.

La ricaduta dopo TCSE è solitamente associata ad una prognosi infausta e l'unica possibilità di ottenere remissioni prolungate passa attraverso un secondo TCSE allogenico, gravato tuttavia da un'elevata mortalità trapianto correlata (109, 116, 117). Approcci alternativi a questo, tesi ad incrementare o indurre un effetto immunologico contro la leucemia (*graft-versus-leukemia*, GVL), sono costituiti dalla rapida riduzione o sospensione della terapia immunosoppressiva (118, 119), dalla somministrazione di citochine (120) e dalle infusioni di linfociti del donatore (*donor lymphocyte infusions*, DLI), queste ultime potenzialmente efficaci nelle recidive precoci (121, 122). Il moni-

toraggio stretto dello stato del chimerismo post-trapianto consente di identificare i pazienti con chimerismo misto destinati inevitabilmente ad una recidiva, sui quali un trattamento immunoterapico precoce potrebbe prevenire la ricaduta ematologica di malattia (123).

La prognosi dei bambini con SMD secondarie a pregressi trattamenti radio o chemioterapici resta estremamente sfavorevole. Un trattamento chemioterapico simile a quello utilizzato nelle LAM può indurre la remissione ma la mantiene solo in una piccolissima percentuale di pazienti, laddove anche il TCSE offre possibilità di guarigione in circa il 20-30% dei casi (124-128). Il rischio di tossicità secondaria al trattamento è elevato (128), mentre il rischio di recidiva è simile a quello osservato negli adulti con SMD primaria (129).



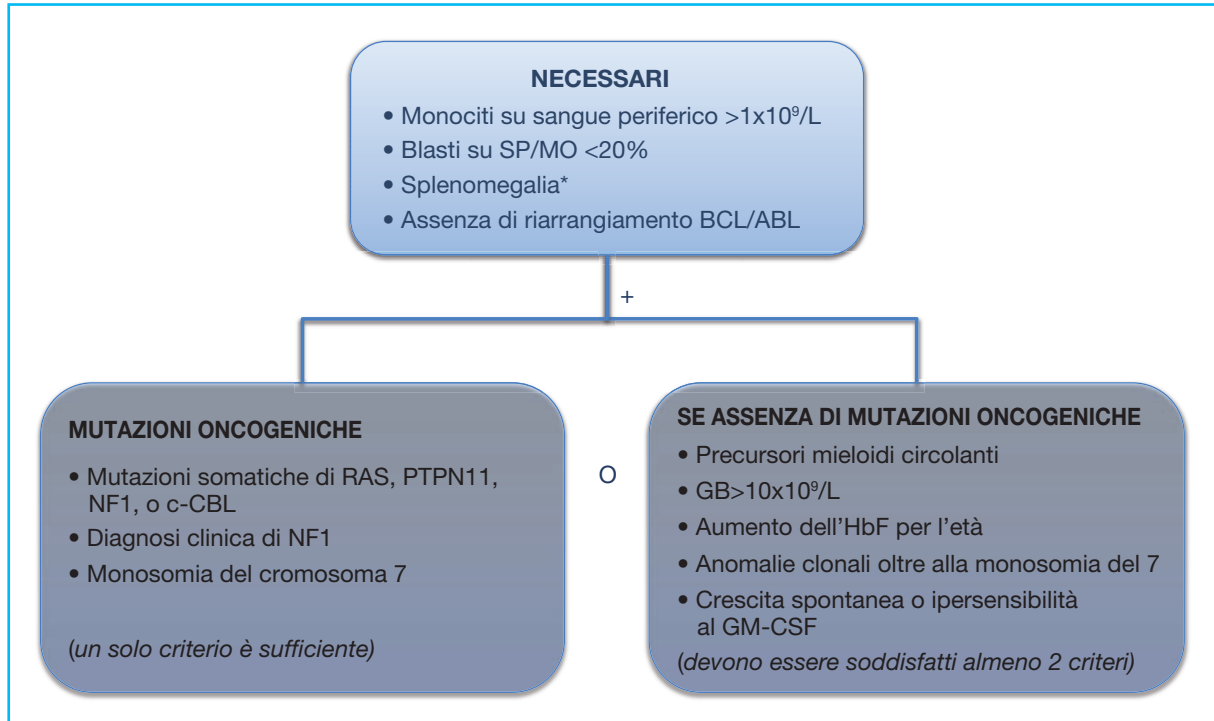
I dati, peraltro scarsi, sui TCSE nei casi di SMD insorti a partire da una condizione di insufficienza midollare congenita o di anemia grave mostrano una bassa probabilità di sopravvivenza. Il TCSE eseguito precocemente, prima dell'evoluzione neoplastica e comunque in forme di SMD meno avanzate, potrebbe essere associato ad un miglioramento della prognosi (130, 131).

## ■ LEUCEMIA MIELOMONOCITICA GIOVANILE

La leucemia mielomonocitica giovanile (*juvenile myelomonocytic leukemia*, JMML) è stata recentemente classificata dalla WHO come una SMD/sindrome mieloproliferativa combinata (Tabella 1) (5, 6), presentando caratteristiche tipiche e peculiari di entrambe le condizioni (6). La JMML è una malattia rara, che costituisce il 3% di tutte le neoplasie ematologiche dell'età pediatrica (11).

La malattia esordisce tipicamente nella prima infanzia, con un'età media alla diagnosi di circa 2 anni e si presenta con epatomegalia, spiccatissima splenomegalia, anemia e piastrinopenia, monocitosi e, frequentemente, elevati livelli di Hb F (132, 133). Frequente è l'interessamento polmonare, con infiltrazione del parenchima da parte di elementi neoplastici.

L'esame morfologico dello striscio di sangue periferico è spesso più importante dell'agoaspirato midollare per porre diagnosi di JMML in quanto dimostra la presenza di spiccata monocitosi con presenza di monociti atipici, di precursori mieloidi circolanti, di sporadici precursori eritroidi ma, generalmente, di una percentuale di blasti ridotta o assente (132). L'agoaspirato midollare è necessario per escludere una diagnosi di leucemia acuta, in particolare della forma mielomonocitica FAB M4. L'assenza della traslocazione t(9;22) e del riarrangiamento BCR/ABL sono dei criteri diagnostici indispensabili. L'alterazione



**FIGURA 9** - I criteri diagnostici della JMML. Sono indispensabili tutti i criteri diagnostici maggiori più un criterio genetico oppure due criteri clinico/biologici. SP: sangue periferico; MO: midollo osseo; NF1: neurofibromatosi tipo 1; GB: globuli bianchi; HbF: emoglobina fetale; GM-CSF: fattore di crescita stimolante le colonie di granulociti-macrofagi; \* La splenomegalia è presente all'esordio nel 95% dei casi; la maggioranza dei pazienti ha un'età inferiore ai 13 anni.

cromosomica più frequente nella JMML è la monosomia del cromosoma 7, osservabile in circa il 25% dei casi. Altre aberrazioni sono osservabili in un ulteriore 10% di pazienti mentre nel 65% dei casi il cariotipo è normale (132). La figura 9 riassume i criteri diagnostici maggiori e minori da soddisfare per porre diagnosi di JMML.

### Fisiopatologia della JMML

– *Ipersensibilità al GM-CSF*. Rappresentata nella figura 10, ha costituito per anni il paradigma della JMML (134). I progenitori emopoietici dei pazienti affetti presentano infatti, in colture cellulari a breve termine effettuate con dosi scalari di GM-CSF, una crescita significativamente maggiore rispetto a controlli normali e, a differenza di questi, sono in grado di crescere anche senza l'aggiunta di GM-CSF esogeno (crescita spontanea). Questi saggi clonogenici hanno rappresentato per anni un elemento fondamentale per la diagnosi. Attualmente è noto che questi reperti sono dovuti ad una attivazione continua della via di trasmissione del segnale di proliferazione cellulare dal recettore per il GM-CSF a RAS, RAF, MEK ed ERK verso il nucleo. È noto che quest'attivazione costante del *pathway* di RAS è dovuta a diverse mutazioni genetiche, di solito mutualmente esclusive, che sono riassunte nella figura 11. La trasduzione aberrante del segnale di proliferazione cellulare dal recettore per il GM-CSF al

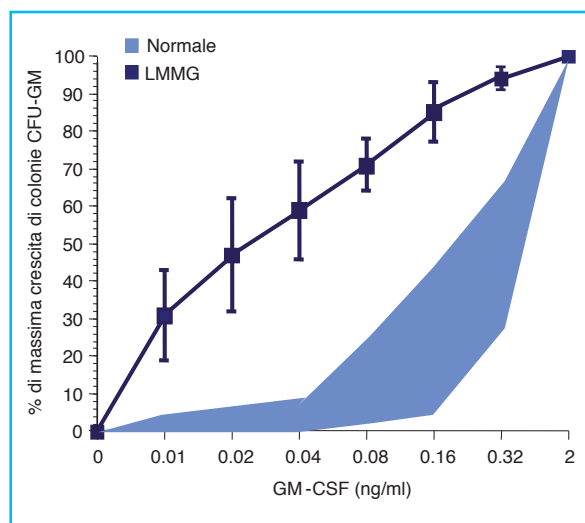
nucleo è stata recentemente dimostrata anche studiando mediante citofluorimetria a flusso la fosforilazione di STAT5 (135). Le cellule midollari di pazienti con JMML presentano, dopo breve incubazione con concentrazioni scalari di GM-CSF, una iperfosforilazione di STAT5 rispetto a controlli normali.

– *La via di RAS*. Le proteine codificate dai geni della famiglia RAS svolgono un ruolo importante nella trasmissione dei segnali dall'ambiente extracellulare al nucleo. Queste molecole regolano molti processi cellulari grazie alla possibilità di passare da una forma attiva [RAS legato al guanosin trifosfato (GTP)] ad una forma inattiva [RAS legato al guanosin difosfato (GDP)]. La forma attiva di RAS, legata quindi a GTP, è in grado di attivare a sua volta la RAF chinasi, causando un effetto proliferativo a valle. Al contrario, la forma inattiva di RAS, legata a GDP, non è in grado di attivare RAF e non trasmette al nucleo nessuno stimolo proliferativo. La quantità di RAS-GTP presente all'interno della cellula è modulata dall'azione di fattori denominati GNEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) e da proteine dotate di attività GTPasica (GAPs). Le proteine GNEFs sono necessarie per la conversione da RAS-GDP a RAS-GTP e possono a loro volta essere stimulate da altre molecole, quali Shp1 o SOS (*Son of Sevenless*). Al contrario, molecole ad attività GTPasica, come ad esempio la neurofibromina, sono responsabili del blocco della trasmissione del segnale di proliferazione cellulare tramite la riconversione di RAS-GTP a RAS-GDP (136).

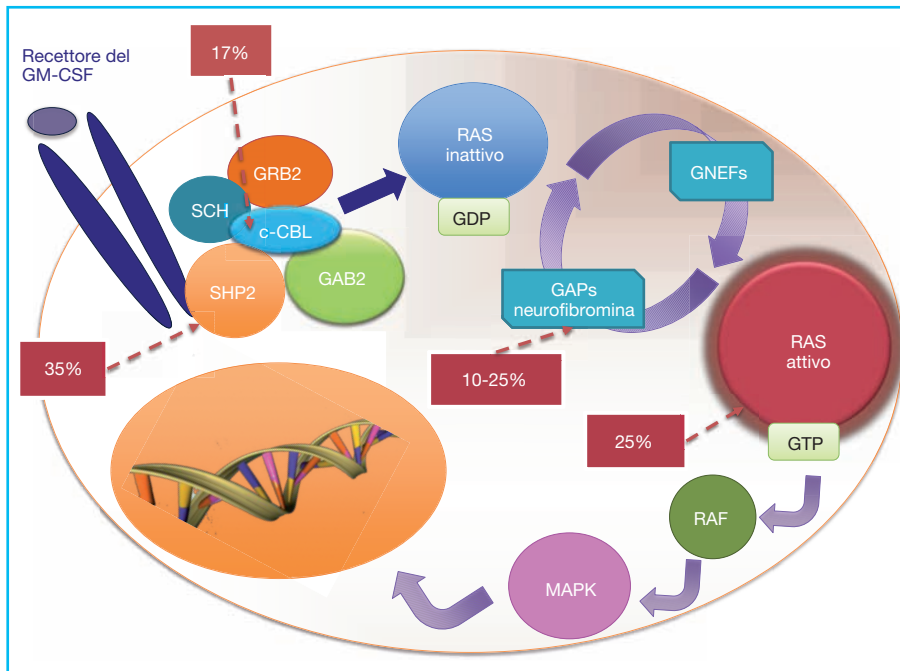
Mutazioni somatiche di geni coinvolti nel *pathway* di RAS sono di frequente riscontro nei pazienti affetti da JMML, sono in genere mutuamente esclusive e quando presenti determinano una attivazione e proliferazione cellulare costante.

– *Mutazioni somatiche di RAS*. Mutazioni a carico di RAS si ritrovano nel 20-30% delle neoplasie umane. Per quanto riguarda la JMML, mutazioni attivanti dei geni RAS sono presenti nel 25% dei pazienti. In particolare, queste mutazioni interessano i codoni 12, 13 e 61 dei geni NRAS e KRAS e sono in grado di determinare un'attivazione continua della via di trasmissione del segnale di proliferazione cellulare mediata da RAS dal recettore per il GM-CSF al nucleo (137).

– *Neurofibromatosi di tipo 1 ed il gene NF1*. L'11%



**FIGURA 10** - Rappresentazione schematica dell'ipersensibilità al GM-CSF.



**FIGURA 11** - La via di trasmissione del segnale di proliferazione cellulare dal recettore del GM-CSF al nucleo tramite RAS e le mutazioni rinvenute nei pazienti affetti da JMML. GNEF: guanine nucleotide exchange factor; GAP: GTPase activating proteins. Nel 35% dei casi di JMML è stata trovata una mutazione a carico di PTPN11, nel 20-25% a carico di RAS e nel 17% a carico di CBL. Nel 10-25% dei casi si può ritrovare una mutazione a carico del gene NF1, che codifica per la neurofibromina, o segni clinici di NF1.

dei pazienti affetti da JMML mostra dei segni clinici compatibili con una diagnosi di neurofibromatosi di tipo 1 (132). Successivamente, è stato dimostrato che nel 15% dei pazienti con JMML ma senza segni clinici di neurofibromatosi sono presenti mutazioni del gene NF1 (*Figura 11*) (138). Il gene NF1 è un gene oncosoppressore che codifica per una proteina, chiamata neurofibromina, dotata di attività GTPasica. Quindi, questa proteina converte la forma attiva RAS-GTP nella forma inattiva RAS-GDP (138). Le cellule di pazienti con JMML e neurofibromatosi di tipo 1 hanno una ridotta attività della neurofibromina, con conseguente accumulo intracellulare di RAS-GTP attivo (139). A questo proposito, Flotho et al. (140) hanno mostrato la perdita di eterozigosi (*loss of heterozygosity*, LOH) in pazienti affetti da neurofibromatosi tipo 1 e JMML a causa della sostituzione del gene NF1 normale residuo da parte di una seconda copia del gene mutato attraverso il meccanismo della disomia uniparentale. Più recentemente, anche Steinemann et al. (141) ha descritto una inattivazione di entrambi gli alleli di NF1 in 15 pazienti affetti da neurofibromatosi di tipo 1 e JMML. In questo studio l'inattivazione di entrambi gli alleli era dovuta o a LOH o ad ulteriori mutazioni somatiche del gene NF1.

Tutti questi dati confermano quindi che la neurofibromatosi di tipo 1 è una condizione predisponente allo sviluppo di JMML o di altre forme di leucemia, ma che sono necessari eventi genetici aggiuntivi per abolire completamente la funzione del gene NF1 e per portare allo sviluppo di leucemia. A conferma di questa ipotesi, sono state descritte mutazioni bi-alleliche somatiche di NF1 anche in soggetti non affetti da neurofibromatosi di tipo 1 ma che hanno sviluppato una LMA o LLA ad immunofenotipo T (142).

– *PTPN11 e la sindrome di Noonan*. Il gene PTPN11 codifica per la proteina SHP-2, dotata di attività tirosin fosfatase. Mutazioni del gene PTPN11, che impediscono il normale passaggio della proteina SHP-2 dalla sua conformazione attiva a quella inattiva, ne causano un guadagno di funzione che, a sua volta, induce un'attivazione dei fattori GNEFs e, quindi, un'attivazione continua di RAS. Tartaglia et al. (143) hanno descritto mutazioni somatiche a carico degli esoni 3 e 13 di PTPN11 nel 35% dei pazienti con JMML (*Figura 11*). Inoltre, mutazioni *germline* di PTPN11, differenti da quelle riscontrate nella JMML, sono osservabili nel 50% dei pazienti affetti da sindrome di Noonan in assenza di JMML (144). La sindrome di Noonan si caratterizza per alterazioni dello svi-

luppo psico-motorio, bassa statura, dismorfie facciali, anomalie scheletriche e difetti cardiaci. I bambini hanno un rischio maggiore di ammalarsi di JMML rispetto alla popolazione sana, anche se in questo caso la malattia esordisce tipicamente nella primissima infanzia e va frequentemente incontro a regressione spontanea (145, 146).

– *Gene CBL*. Il gene CBL è quello più recentemente descritto tra i geni coinvolti nella patogenesi della JMML. Mutazioni del gene CBL sono state riscontrate nel 17% dei pazienti affetti (147). Il gene codifica per una proteina, c-CBL, che è una ubiquitina-ligasi E3 responsabile del trasporto e della degradazione intracellulare di un elevato numero di recettori della tirosina kinasi (148). È stato dimostrato che mutazioni omozigoti di CBL che determinano, in assenza di proteina normale, una carente attività ubiquitino-ligasica E3, sono la causa di una prolungata attivazione delle tirosina kinasi dopo stimolazione da parte di citochine, di iperfosforilazione di ERK, AKT e S6 e di conseguente ipersensibilità ai fattori di crescita emopoietici così come di crescita spontanea dei progenitori emopoietici in assenza di fattori di crescita esogeni (149, 150).

Niemeyer et al. (150) hanno inoltre scoperto che mutazioni *germline* di CBL provocano un quadro fenotipico caratterizzato da ritardo della crescita staturo-ponderale e dello sviluppo psicomotorio, criptorchidismo e predisposizione a sviluppare una JMML. Sorprendentemente, la JMML insorta nei soggetti con mutazioni *germline* omozigoti di CBL va frequentemente incontro a regressione spontanea, anche se questi soggetti sviluppano spesso, entro la seconda decade di vita, gravi vasculiti. Ulteriori ricerche effettuate su soggetti con mutazioni omozigoti di CBL hanno mostrato la presenza di mutazioni eterozigoti su tessuti *germline*, ereditate in maniera autosomica dominante nel 50% circa dei casi e comparse spontaneamente nel restante 50%.

– *Altri geni coinvolti?* Mutazioni a carico dell'esone 12 del gene ASXL1 sono state scoperte in 2 di 49 pazienti affetti da JMML (in un caso in associazione con una mutazione di PTPN11). ASXL1 coopera con altri geni (ad esempio KDM1A) nella repressione della trascrizione genica e potrebbe quindi agire in sinergismo o in analogia con gli altri geni coinvolti nella JMML (63).

Al contrario di quanto osservato nell'adulto, non sono state fino ad ora descritte mutazioni di JAK2 (151) o di TET2 (62). È stato invece descritto un singolo caso di mutazione di FLT3 (152).

In conclusione, le attuali evidenze mostrano come le mutazioni di NF1, RAS, PTPN11 e CBL siano responsabili di specifiche alterazioni della regolazione della trasmissione del segnale di proliferazione cellulare dal recettore per il GM-CSF al nucleo, tramite RAS/MAPK, nella maggior parte dei casi di JMML (153).

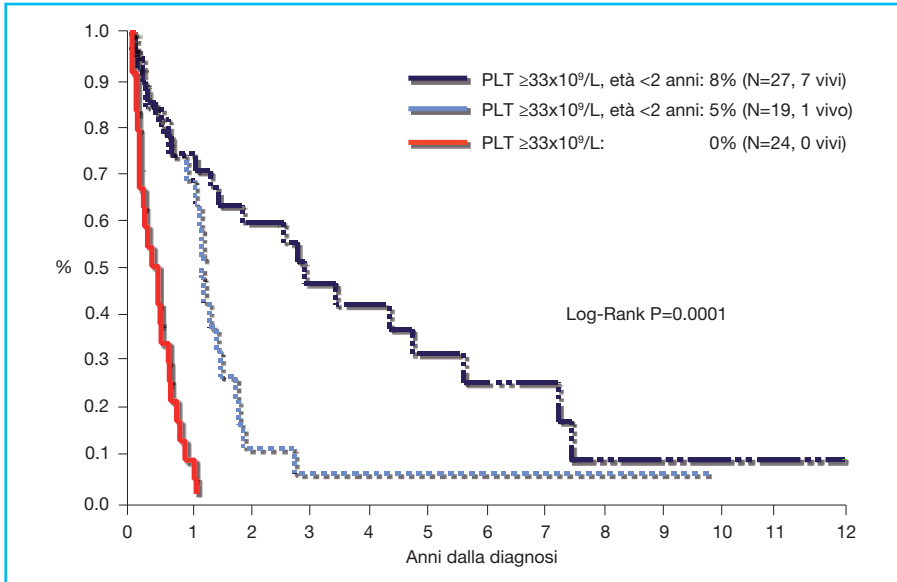
### Fattori prognostici

La JMML è una malattia estremamente aggressiva, con una prognosi infausta spesso entro il primo anno dalla diagnosi (132). Fanno eccezione i casi insorti in epoca neonatale in soggetti affetti da sindrome di Noonan, che di solito vanno incontro a risoluzione spontanea senza necessità di TCSE (145, 146), e probabilmente (ma sono necessarie ulteriori conferme) quelli con mutazione di CBL (150). Tra i parametri clinici hanno un significato prognostico favorevole un'età alla diagnosi inferiore ai 2 anni, una conta piastrinica all'esordio  $\geq 33.000 \text{ mm}^3$  e livelli di emoglobina fetale bassi (*Figura 12*) (132).

Matsuda et al. (154) hanno descritto un decorso clinico meno aggressivo ed una risoluzione spontanea in 3 pazienti con mutazione di RAS<sup>G12S</sup>, tuttavia, questo dato non è stato confermato da altri autori (155). Infine, Bresolin et al. hanno recentemente mostrato come l'analisi del profilo di espressione genica permetta di identificare in maniera estremamente precisa i soggetti con un profilo simile alla LMA (profilo LMA-like) e differenziarli da quelli con un profilo non LMA-like. I due gruppi di pazienti hanno un outcome clinico molto diverso, con una sopravvivenza libera da malattia del 63% per i pazienti non LMA-like e di solo il 6% per i pazienti LMA-like (156). Questo dato appare di estremo interesse e potrebbe consentire in un prossimo futuro di disegnare percorsi terapeutici differenti in base al profilo di espressione genica.

### Terapia

A tutt'oggi l'unico trattamento potenzialmente curativo per la JMML è il TCSE. In assenza di trapianto la sopravvivenza media è circa 1 anno (132). La chemioterapia convenzionale non è in

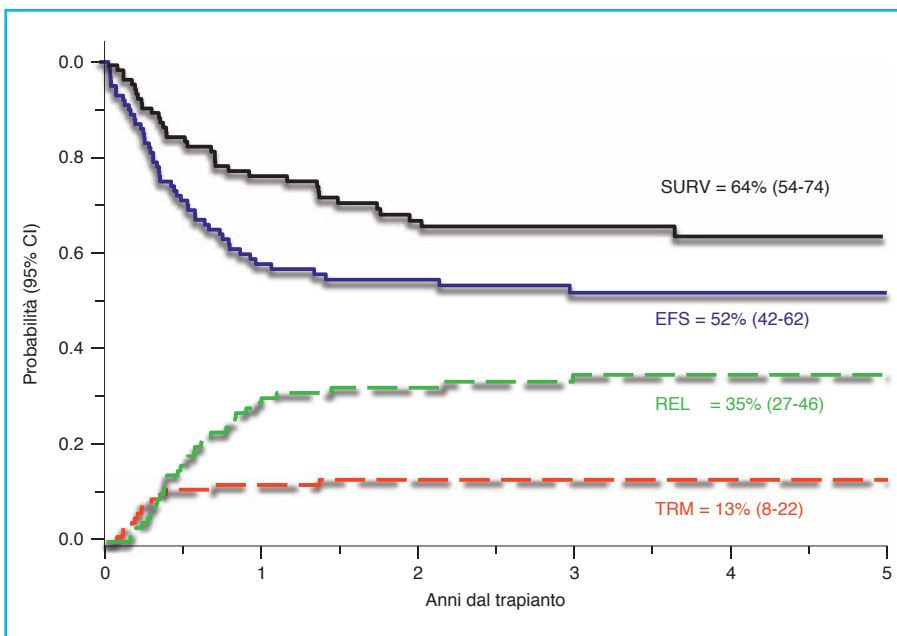


**FIGURA 12** - Sopravvivenza dei pazienti con JMML in assenza di TCSE e fattori prognostici clinici (132).

grado di modificare l'evoluzione clinica della malattia e la splenectomia prima del trapianto non ne migliora le probabilità di successo (157).

Il TSCE dopo un regime mieloablativo basato sulla combinazione di busulfano, ciclofosfamide e melfalan è in grado di guarire circa il 50% dei pazienti, con un'incidenza cumulativa di recidiva del 35% e un rischio di mortalità trapianto-correlata del 15% (Figura 13) (157).

In attesa del TCSE vi è consenso sulla somministrazione di un trattamento citoriduttivo a basse dosi per i pazienti con iperleucocitosi, importante organomegalia o coinvolgimento polmonare: 6-mercaptopurina (50 mg/m<sup>2</sup>/die) eventualmente associata ad acido cis-retinoico (100 mg/m<sup>2</sup>/die). Per pazienti molto compromessi si consiglia anche l'impiego di citosina arabinoside a basse dosi (40 mg/m<sup>2</sup>/die per 5 giorni) e, in caso di assenza di



**FIGURA 13** - Risultati del TCSE nella JMML. SURV: sopravvivenza; EFS: sopravvivenza libera da eventi; REL: recidiva; TRM: mortalità trapianto-correlata (157).



risposta, di citosina arabinoside ad alte dosi (2 gr/m<sup>2</sup>/die per 5 giorni) associata a fludarabina (30 mg/m<sup>2</sup>/die per 5 giorni) (133).

In caso di ricaduta un secondo TCSE è la strategia terapeutica più efficace (158), mentre le DLI sono gravate da elevata tossicità e da una bassa probabilità di ottenere una nuova remissione di malattia (159, 160).

A tutt'oggi è riportato in letteratura un solo caso di JMML, con monosomia 7 e mutazione c.38 G\_A di KRAS, trattato con agenti ipometilanti (azacitidina) prima del TCSE (161). In questo caso la terapia ha sorprendentemente condotto ad una remissione clinica, ematologica, citogenetica e molecolare al termine di 8 cicli di trattamento. Ulteriori valutazioni sono tuttavia necessarie per poter confermare l'efficacia dell'azacitidina nella JMML. Infine sono tutt'ora in fase di iniziale sperimentazione terapie con inibitori di JAK2, basate sulla dimostrazione dell'iperfosforilazione di STAT5 in risposta all'esposizione a basse dosi di GM-CSF (135), e di altri componenti della via di trasmissione del segnale di RAS (PI3K, MEK ed mTOR) (162).

*La Fondazione Sofia Luce Rebuffat Onlus ha contribuito a finanziare la ricerca sulle sindromi mielodisplastiche condotta dall'Oncoematologia Pediatrica del Policlinico San Matteo di Pavia.*

## ■ BIBLIOGRAFIA

1. Koeffler HP. Myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol.* 1996; 33: 87-94.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982; 51: 189-99.
3. Hasle H, Arico M, Basso G, Biondi A, Cantu Rajnoldi A, Creutzig U, et al. Myelodysplastic syndrome, juvenile myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia associated with complete or partial monosomy 7. European Working Group on MDS in Childhood (EWOG-MDS). *Leukemia.* 1999; 13: 376-85.
4. Passmore SJ, Chessells JM, Kempinski H, Hann IM, Brownbill PA, Stiller CA. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia in the UK: a population-based study of incidence and survival. *Br J Haematol.* 2003; 121: 758-67.
5. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
6. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia.* 2003; 17: 277-82.
7. Elghetany MT. Myelodysplastic syndromes in children: a critical review of issues in the diagnosis and classification of 887 cases from 13 published series. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131: 1110-6.
8. Baumann I, Niemeyer CM, Bennett JM, Shannon K. Childhood myelodysplastic syndrome. WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC, 2008; 104-7.
9. Hasle H, Niemeyer CM. Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. *Br J Haematol.* 2011; 154: 185-95.
10. Hasle H, Kerndrup G, Jacobsen BB. Childhood myelodysplastic syndrome in Denmark: incidence and predisposing conditions. *Leukemia.* 1995; 9: 1569-72.
11. Hasle H, Wadsworth LD, Massing BG, McBride M, Schultz KR. A population-based study of childhood myelodysplastic syndrome in British Columbia, Canada. *Br J Haematol.* 1999; 106: 1027-32.
12. Luna-Fineman S, Shannon KM, Atwater SK, Davis J, Masterson M, Ortega J, et al. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: a study of 167 patients. *Blood.* 1999; 93: 459-66.
13. Sasaki H, Manabe A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Ikuta K, et al. Myelodysplastic syndrome in childhood: a retrospective study of 189 patients in Japan. *Leukemia.* 2001; 15: 1713-20.
14. Niemeyer CM, Baumann I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Semin Hematol.* 2008; 45: 60-70.
15. Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F, et al. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1996; 334: 745-51.
16. Josting A, Wiedenmann S, Franklin J, May M, Sieber M, Wolf J, et al. Secondary myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in patients treated for Hodgkin's disease: a report from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 3440-6.
17. Bhatia S. Cancer survivorship-pediatric issues. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005: 507-15.
18. Smith MA, Rubinstein L, Anderson JR, Arthur D, Catalano PJ, Freidlin B, et al. Secondary leukemia or myelodysplastic syndrome after treatment with epipodophyllotoxins. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 569-77.
19. Cioc AM, Wagner JE, MacMillan ML, DeFor T, Hirsch B. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a



- cohort of 119 patients with fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. *Am J Clin Pathol.* 2010; 133: 92-100.
20. Rosenberg PS, Huang Y, Alter BP. Individualized risks of first adverse events in patients with Fanconi anemia. *Blood.* 2004; 104: 350-5.
  21. Rosenberg PS, Zeidler C, Bolyard AA, Alter BP, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Stable long-term risk of leukaemia in patients with severe congenital neutropenia maintained on G-CSF therapy. *Br J Haematol.* 2010; 150: 196-9.
  22. Smith OP. Shwachman-Diamond syndrome. *Semin Hematol.* 2002; 39: 95-102.
  23. Minelli A, Maserati E, Nicolis E, Zecca M, Sainati L, Longoni D, et al. The isochromosome i(7)(q10) carrying c.258+2t>c mutation of the SBDS gene does not promote development of myeloid malignancies in patients with Shwachman syndrome. *Leukemia.* 2009; 23: 708-11.
  24. Maserati E, Pressato B, Valli R, Minelli A, Sainati L, Patitucci F, et al. The route to development of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukaemia in Shwachman-Diamond syndrome: the role of ageing, karyotype instability, and acquired chromosome anomalies. *Br J Haematol.* 2009; 145: 190-7.
  25. Alter BP, Giri N, Savage SA, Peters JA, Loud JT, Leathwood L, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br J Haematol.* 2010; 150: 179-88.
  26. Vlachos A, Ball S, Dahl N, Alter BP, Sheth S, Ramenghi U, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol.* 2008; 142: 859-76.
  27. Ohara A, Kojima S, Hamajima N, Tsuchida M, Imashuku S, Ohta S, et al. Myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia as a late clonal complication in children with acquired aplastic anemia. *Blood.* 1997; 90: 1009-13.
  28. Fuhrer M, Rampf U, Baumann I, Faldum A, Niemeyer C, Janka-Schaub G, et al. Immunosuppressive therapy for aplastic anemia in children: a more severe disease predicts better survival. *Blood.* 2005; 106: 2102-4.
  29. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia-a review. *Br J Haematol.* 2008; 140: 123-32.
  30. Passmore SJ, Hann IM, Stiller CA, Ramani P, Swansbury GJ, Gibbons B, et al. Pediatric myelodysplasia: a study of 68 children and a new prognostic scoring system. *Blood.* 1995; 85: 1742-50.
  31. Hasle H, Clausen N, Pedersen B, Bendix-Hansen K. Myelodysplastic syndrome in a child with constitutional trisomy 8 mosaicism and normal phenotype. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995; 79: 79-81.
  32. Maserati E, Aprili F, Vinante F, Locatelli F, Amendola G, Zatterale A, et al. Trisomy 8 in myelodysplasia and acute leukemia is constitutional in 15-20% of cases. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; 33: 93-7.
  33. Minelli A, Maserati E, Rossi G, Bernardo ME, De Stefano P, Cecchini MP, et al. Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosome anomalies. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004; 40: 165-71.
  34. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, Mueller BU. Somatic CEBPA mutations are a frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 5088-93.
  35. Shinawi M, Erez A, Shardy DL, Lee B, Naeem R, Weissenberger G, et al. Syndromic thrombocytopenia and predisposition to acute myelogenous leukemia caused by constitutional microdeletions on chromosome 21q. *Blood.* 2008; 112: 1042-7.
  36. Busque L, Gilliland DG. X-inactivation analysis in the 1990s: promise and potential problems. *Leukemia.* 1998; 12: 128-35.
  37. Tefferi A, Thibodeau SN, Solberg LA, Jr. Clonal studies in the myelodysplastic syndrome using X-linked restriction fragment length polymorphisms. *Blood.* 1990; 75: 1770-3.
  38. Abkowitz JL, Fialkow PJ, Niebrugge DJ, Raskind WH, Adamson JW. Pancytopenia as a clonal disorder of a multipotent hematopoietic stem cell. *J Clin Invest.* 1984; 73: 258-61.
  39. Raskind WH, Tirumali N, Jacobson R, Singer J, Fialkow PJ. Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome. *Blood.* 1984; 63: 1318-23.
  40. Aktas D, Tuncbilek E. Myelodysplastic syndrome associated with monosomy 7 in childhood: a retrospective study. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 171: 72-5.
  41. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Tranoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 2009; 360: 2289-301.
  42. Head DR. Revised classification of acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1996; 10: 1826-31.
  43. Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 3230-9.
  44. Maserati E, Minelli A, Pressato B, Valli R, Crescenzi B, Stefanelli M, et al. Shwachman syndrome as mutator phenotype responsible for myeloid dysplasia/neoplasia through karyotype instability and chromosomes 7 and 20 anomalies. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006; 45: 375-82.
  45. Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 118-29.
  46. Boudard D, Sordet O, Vasselon C, Revol V, Bertheas MF, Freyssen D, et al. Expression and activity of caspases 1 and 3 in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2000; 14: 2045-51.

47. Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, Mijovic A, Devereux S, Pagliuca A. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*. 2000; 96: 3932-8.
48. Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Inoue K, et al. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1999; 13: 393-9.
49. Sheng XM, Kawamura M, Ohnishi H, Ida K, Hanada R, Kojima S, et al. Mutations of the RAS genes in childhood acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and juvenile chronic myelocytic leukemia. *Leuk Res*. 1997; 21: 697-701.
50. Luna-Fineman S, Shannon KM, Lange BJ. Childhood monosomy 7: epidemiology, biology, and mechanistic implications. *Blood*. 1995; 85: 1985-99.
51. Barnard DR, Kalousek DK, Wiersma SR, Lange BJ, Benjamin DR, Arthur DC, et al. Morphologic, immunologic, and cytogenetic classification of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in childhood: a report from the Childrens Cancer Group. *Leukemia*. 1996; 10: 5-12.
52. Lessard M, Herry A, Berthou C, Leglise MC, Abgrall JF, Morice P, et al. FISH investigation of 5q and 7q deletions in MDS/AML reveals hidden translocations, insertions and fragmentations of the same chromosomes. *Leuk Res*. 1998; 22: 303-12.
53. Martinez-Climent JA, Garcia-Conde J. Chromosomal rearrangements in childhood acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1999; 21: 91-102.
54. Hasegawa D, Manabe A, Kubota T, Kawasaki H, Hirose I, Ohtsuka Y, et al. Methylation status of the p15 and p16 genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2005; 128: 805-12.
55. Vidal DO, Paixao VA, Brait M, Souto EX, Caballero OL, Lopes LF, et al. Aberrant methylation in pediatric myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2007; 31: 175-81.
56. Jekic B, Novakovic I, Lukovic L, Kuzmanovic M, Popovic B, Milasin J, et al. Lack of TP53 and FMS gene mutations in children with myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006; 166: 163-5.
57. Jekic B, Novakovic I, Lukovic L, Kuzmanovic M, Popovic B, Pastar I, et al. Low frequency of NRAS and KRAS2 gene mutations in childhood myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004; 154: 180-2.
58. Field JJ, Mason PJ, An P, Kasai Y, McLellan M, Jaeger S, et al. Low frequency of telomerase RNA mutations among children with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006; 28: 450-3.
59. Ortmann CA, Niemeyer CM, Wawer A, Ebell W, Baumann I, Kratz CP. TERC mutations in children with refractory cytopenia. *Haematologica*. 2006; 91: 707-8.
60. Hirabayashi S, Flotho C, Moetter J, Heuser M, Hasle H, Gruhn B, et al. Spliceosomal gene aberrations are rare, coexist with oncogenic mutations, and are unlikely to exert a driver effect in childhood MDS and JMML. *Blood*. 2012; 119: e96-e999.
61. Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbuccia N, Hidalgo-Curtis C, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 119: 3211-8.
62. Muramatsu H, Makishima H, Jankowska AM, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, et al. Mutations of an E3 ubiquitin ligase c-Cbl but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2010; 115: 1969-75.
63. Sugimoto Y, Muramatsu H, Makishima H, Prince C, Jankowska AM, Yoshida N, et al. Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. *Br J Haematol*. 2010; 150: 83-7.
64. Wlodarski MW, Motter J, Gorr TA, Olk-Batz C, Hasle H, Dworzak M, et al. Abnormal promoter DNA methylation in juvenile myelomonocytic leukemia is not caused by mutation in DNMT3A. *Blood*. 2011; 118: 4490-1.
65. Roela RA, Carraro DM, Brentani HP, Kaiano JH, Simao DF, Guarnieiro R, et al. Gene stage-specific expression in the microenvironment of pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2007; 31: 579-89.
66. Hicsonmez G, Cetin M, Yenicesu I, Olcay L, Koc A, Aktas D, et al. Evaluation of children with myelodysplastic syndrome: importance of extramedullary disease as a presenting symptom. *Leuk Lymphoma*. 2001; 42: 665-74.
67. Kardos G, Baumann I, Passmore SJ, Locatelli F, Hasle H, Schultz KR, et al. Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7. *Blood*. 2003; 102: 1997-2003.
68. Cantu Rajnoldi A, Fenu S, Kerndrup G, van Wering ER, Niemeyer CM, Baumann I. Evaluation of dysplastic features in myelodysplastic syndromes: experience from the morphology group of the European Working Group of MDS in Childhood (EWOG-MDS). *Ann Hematol*. 2005; 84: 429-33.
69. Rosati S, Anastasi J, Vardiman J. Recurring diagnostic problems in the pathology of the myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*. 1996; 33: 111-26.
70. Gohring G, Michalova K, Beverloo HB, Betts D, Harbott J, Haas OA, et al. Complex karyotype newly defined: the strongest prognostic factor in advanced childhood myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2010; 116: 3766-9.
71. Hasle H, Baumann I, Bergstrasser E, Fenu S, Fischer

- A, Kardos G, et al. The International Prognostic Scoring System (IPSS) for childhood myelodysplastic syndrome (MDS) and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia*. 2004; 18: 2008-14.
72. Olney HJ, Le Beau MM. Evaluation of recurring cytogenetic abnormalities in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2007; 31: 427-34.
  73. Schoch C, Kohlmann A, Dugas M, Kern W, Hiddemann W, Schnittger S, et al. Genomic gains and losses influence expression levels of genes located within the affected regions: a study on acute myeloid leukemias with trisomy 8, 11, or 13, monosomy 7, or deletion 5q. *Leukemia*. 2005; 19: 1224-8.
  74. Slovak ML, Dewald GW. International Working Group on MDS cytogenetics: October 2007 meeting report. *Leuk Res*. 2008; 32: 1329-32.
  75. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 4791-7.
  76. Aguilera DG, Vaklavas C, Tsimberidou AM, Wen S, Medeiros LJ, Corey SJ. Pediatric therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia: the MD Anderson Cancer Center experience. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009; 31: 803-11.
  77. Mecucci C, Michaux JL, Louwagie A, Boogaerts M, Van den Berghe H. The short arm of chromosome 6 is nonrandomly rearranged in secondary myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet*. 1988; 31: 147-55.
  78. Morerio C, Rapella A, Tassano E, Lanino E, Micalizzi C, Rosanda C, et al. Gain of 1q in pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2006; 30: 1437-41.
  79. Veltroni M, Sainati L, Zecca M, Fenu S, Tridello G, Testi AM, et al. Advanced pediatric myelodysplastic syndromes: can immunophenotypic characterization of blast cells be a diagnostic and prognostic tool? *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 52: 357-63.
  80. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; 100: 2292-302.
  81. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89: 2079-88.
  82. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2009; 25: 3503-10.
  83. Woods WG, Barnard DR, Alonzo TA, Buckley JD, Kobrinsky N, Arthur DC, et al. Prospective study of 90 children requiring treatment for juvenile myelomonocytic leukemia or myelodysplastic syndrome: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 434-40.
  84. Woods WG, Neudorf S, Gold S, Sanders J, Buckley JD, Barnard DR, et al. A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission. *Blood*. 2001; 97: 56-62.
  85. Benaim E, Hvizdala EV, Papenhausen P, Moscinski LC. Spontaneous remission in monosomy 7 myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 1995; 89: 947-8.
  86. De Simone A, Cantu Rajnoldi A, Sainati L, D'Avanzo M, Allen M, Maserati E, et al. Spontaneous remission from RAEB in a child. *Leukemia*. 2001; 15: 856-7.
  87. Mantadakis E, Shannon KM, Singer DA, Finklestein J, Chan KW, Hilden JM, et al. Transient monosomy 7: a case series in children and review of the literature. *Cancer*. 1999; 85: 2655-61.
  88. Parker TM, Klaassen RJ, Johnston DL. Spontaneous remission of myelodysplastic syndrome with monosomy 7 in a young boy. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008; 182: 122-5.
  89. Scheurlen W, Borkhardt A, Ritterbach J, Huppertz HI. Spontaneous hematological remission in a boy with myelodysplastic syndrome and monosomy 7. *Leukemia*. 1994; 8: 1435-8.
  90. de Vries AC, Langerak AW, Verhaaf B, Niemeyer CM, Stary J, Schmiegelow K, et al. T-cell receptor Vbeta CDR3 oligoclonality frequently occurs in childhood refractory cytopenia (MDS-RC) and severe aplastic anemia. *Leukemia*. 2008; 22: 1170-4.
  91. Sloand EM, Wu CO, Greenberg P, Young N, Barrett J. Factors affecting response and survival in patients with myelodysplasia treated with immunosuppressive therapy. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 2505-11.
  92. Yoshimi A, Baumann I, Fuhrer M, Bergstrasser E, Gobel U, Sykora KW, et al. Immunosuppressive therapy with anti-thymocyte globulin and cyclosporine A in selected children with hypoplastic refractory cytopenia. *Haematologica*. 2007; 92: 397-400.
  93. Yoshimi-Noellke A, Van den Heuvel-Eibrink M, Baumann I. Immunosuppressive therapy with anti-thymocyte globulin and cyclosporine A in patients with refractory cytopenia in childhood. (Abstract). *Bone Marrow Transplant*. 2011; 46: s369.
  94. Kaminskis E, Farrell A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, et al. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 3604-8.
  95. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer*. 2006; 106: 1794-803.
  96. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the

- cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 2429-40.
97. Lyons RM, Cosgriff TM, Modi SS, Gersh RH, Hainsworth JD, Cohn AL, et al. Hematologic response to three alternative dosing schedules of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 1850-6.
  98. Silverman LR, Fenaux P, Mufti GJ, Santini V, Hellstrom-Lindberg E, Gattermann N, et al. Continued azacitidine therapy beyond time of first response improves quality of response in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer.* 2011.
  99. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 223-32.
  100. Lubbert M, Suci S, Baila L, Ruter BH, Platzbecker U, Giagounidis A, et al. Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 1987-96.
  101. Itzykson R, Thepot S, Quesnel B, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Turlure P, et al. Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood.* 2011; 117: 403-11.
  102. Chan GC, Wang WC, Raimondi SC, Behm FG, Krance RA, Chen G, et al. Myelodysplastic syndrome in children: differentiation from acute myeloid leukemia with a low blast count. *Leukemia.* 1997; 11: 206-11.
  103. Hasle H, Kerndrup G, Yssing M, Clausen N, Ostergaard E, Jacobsen N, et al. Intensive chemotherapy in childhood myelodysplastic syndrome. A comparison with results in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1996; 10: 1269-73.
  104. Webb DK, Passmore SJ, Hann IM, Harrison G, Wheatley K, Chessells JM. Results of treatment of children with refractory anaemia with excess blasts (RAEB) and RAEB in transformation (RAEBt) in Great Britain 1990-99. *Br J Haematol.* 2002; 117: 33-9.
  105. Strahm B, Nollke P, Zecca M, Korthof ET, Bierings M, Furlan I, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for advanced myelodysplastic syndrome in children: results of the EWOG-MDS 98 study. *Leukemia.* 2011; 25: 455-62.
  106. Niemeyer CM, Kratz CP. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia: molecular classification and treatment options. *Br J Haematol.* 2008; 140: 610-24.
  107. Strahm B, Locatelli F, Bader P, Ehlert K, Kremens B, Zintl F, et al. Reduced intensity conditioning in unrelated donor transplantation for refractory cytopenia in childhood. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 40: 329-33.
  108. Locatelli F, Pession A, Bonetti F, Maserati E, Prete L, Pedrazzoli P, et al. Busulfan, cyclophosphamide and melphalan as conditioning regimen for bone marrow transplantation in children with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 1994; 8: 844-9.
  109. Munoz A, Diaz-Heredia C, Badell I, Bureo E, Gomez P, Martinez A, et al. Allogeneic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes in children: a report from the Spanish Working Party for Blood and Marrow Transplantation in Children (GETMON). *Pediatr Hematol Oncol.* 2009; 26: 345-55.
  110. Parikh SH, Mendizabal A, Martin PL, Prasad VK, Szabolcs P, Driscoll TA, et al. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric myelodysplastic syndrome: a single-center experience. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009; 15: 948-55.
  111. Yusuf U, Frangoul HA, Gooley TA, Woolfrey AE, Carpenter PA, Andrews RG, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in children with myelodysplastic syndrome or juvenile myelomonocytic leukemia: the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 33: 805-14.
  112. Castro-Malaspina H, Harris RE, Gajewski J, Ramsay N, Collins R, Dharan B, et al. Unrelated donor marrow transplantation for myelodysplastic syndromes: outcome analysis in 510 transplants facilitated by the National Marrow Donor Program. *Blood.* 2002; 99: 1943-51.
  113. Nagatoshi Y, Okamura J, Ikuno Y, Akamatsu M, Tasaka H. Therapeutic trial of intensified conditioning regimen with high-dose cytosine arabinoside, cyclophosphamide and either total body irradiation or busulfan followed by allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome in children. *Int J Hematol.* 1997; 65: 269-75.
  114. Madureira AB, Eapen M, Locatelli F, Teira P, Zhang MJ, Davies SM, et al. Analysis of risk factors influencing outcome in children with myelodysplastic syndrome after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia.* 2011; 25: 449-54.
  115. Kalwak K, Wojcik D, Gorczynska E, Toporski J, Turkiewicz D, Slociak M, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation from alternative donors in children with myelodysplastic syndrome: is that an alternative? *Transplant Proc.* 2004; 36: 1574-7.
  116. Barrett AJ, Locatelli F, Treleaven JG, Gratwohl A, Szydlo R, Zwaan FE. Second transplants for leukaemic relapse after bone marrow transplantation: high early mortality but favourable effect of chronic GVHD on continued remission. A report by the EBMT Leukaemia Working Party. *Br J Haematol.* 1991; 79: 567-74.
  117. Bosi A, Laszlo D, Labopin M, Reffeffs J, Michallet M, Gluckman E, et al. Second allogeneic bone marrow transplantation in acute leukemia: results of a



- survey by the European Cooperative Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 3675-84.
118. Abraham R, Szer J, Bardy P, Grigg A. Early cyclosporine taper in high-risk sibling allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 20: 773-7.
  119. Collins RH, Jr., Rogers ZR, Bennett M, Kumar V, Nikein A, Fay JW. Hematologic relapse of chronic myelogenous leukemia following allogeneic bone marrow transplantation: apparent graft-versus-leukemia effect following abrupt discontinuation of immunosuppression. *Bone Marrow Transplant*. 1992; 10: 391-5.
  120. Mehta J, Powles R, Singhal S, Tait D, Swansbury J, Treleaven J. Cytokine-mediated immunotherapy with or without donor leukocytes for poor-risk acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 16: 133-7.
  121. Skinner R, Velangi M, Bown N. Donor lymphocyte infusions for post-transplant relapse of refractory anemia with excess blasts and monosomy 7. *Pediatr Blood Cancer*. 2008; 50: 670-2.
  122. Tamura K, Kanazawa T, Suzuki M, Koitabashi M, Ogawa C, Morikawa A. Successful rapid discontinuation of immunosuppressive therapy at molecular relapse after allogeneic bone marrow transplantation in a pediatric patient with myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol*. 2006; 81: 139-41.
  123. Bader P, Niemeyer C, Willasch A, Kreyenberg H, Strahm B, Kremens B, et al. Children with myelodysplastic syndrome (MDS) and increasing mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation have a poor outcome which can be improved by pre-emptive immunotherapy. *Br J Haematol*. 2005; 128: 649-58.
  124. Barnard DR, Lange B, Alonzo TA, Buckley J, Kobrinsky JN, Gold S, et al. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children treated for cancer: comparison with primary presentation. *Blood*. 2002; 100: 427-34.
  125. Leahey AM, Friedman DL, Bunin NJ. Bone marrow transplantation in pediatric patients with therapy-related myelodysplasia and leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 23: 21-5.
  126. Tsurusawa M, Manabe A, Hayashi Y, Akiyama Y, Kigasawa H, Inada H, et al. Therapy-related myelodysplastic syndrome in childhood: a retrospective study of 36 patients in Japan. *Leuk Res*. 2005; 29: 625-32.
  127. Woodard P, Barfield R, Hale G, Horwitz E, Leung W, Ribeiro R, et al. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation for pediatric patients with therapy-related acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 2006; 47: 931-5.
  128. Yakoub-Agha I, de La Salmoniere P, Ribaud P, Sutton L, Wattel E, Kuentz M, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: a long-term study of 70 patients-report of the French society of bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 963-71.
  129. De Witte T. Stem cell transplantation for patients with myelodysplastic syndrome and secondary leukemias. *Int J Hematol*. 2000; 72: 151-6.
  130. Cesaro S, Oneto R, Messina C, Gibson BE, Buzyn A, Steward C, et al. Haematopoietic stem cell transplantation for Shwachman-Diamond disease: a study from the European Group for blood and marrow transplantation. *Br J Haematol*. 2005; 131: 231-6.
  131. Zeidler C, Welte K, Barak Y, Barriga F, Bolyard AA, Boxer L, et al. Stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia without evidence of leukemic transformation. *Blood*. 2000; 95: 1195-8.
  132. Niemeyer CM, Arico M, Basso G, Biondi A, Cantu Rajnoldi A, Creutzig U, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). *Blood*. 1997; 89: 3534-43.
  133. EWOG-MDS. Clinical Trial protocol EWOG-MDS 2006. Prospective non-randomized multi-center study for epidemiology and characterization of Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Juvenile Myelomonocytic Leukemia (JMML) in childhood. 2007.
  134. Emanuel PD, Bates LJ, Castleberry RP, Gualtieri RJ, Zuckerman KS. Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. *Blood*. 1991; 77: 925-9.
  135. Gaipa G, Bugarin C, Longoni D, Cesana S, Molteni C, Faini A, et al. Aberrant GM-CSF signal transduction pathway in juvenile myelomonocytic leukemia assayed by flow cytometric intracellular STAT5 phosphorylation measurement. *Leukemia*. 2009; 23: 791-3.
  136. de Vries ACH, Zwaan CM, Van den Heuvel-Eibrink MM. Molecular basis of juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2010; 95: 179-82.
  137. Flotho C, Valcamonica S, Mach-Pascual S, Schmahl G, Corral L, Ritterbach J, et al. RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia*. 1999; 13: 32-7.
  138. Side LE, Emanuel PD, Taylor B, Franklin J, Thompson P, Castleberry RP, et al. Mutations of the NF1 gene in children with juvenile myelomonocytic leukemia without clinical evidence of neurofibromatosis, type 1. *Blood*. 1998; 92: 267-72.
  139. Bollag G, Clapp DW, Shih S, Adler F, Zhang YY, Thompson P, et al. Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet*. 1996; 12: 144-8.
  140. Flotho C, Steinemann D, Mullighan CG, Neale G,

- Mayer K, Kratz CP, et al. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis in juvenile myelomonocytic leukemia identifies uniparental disomy surrounding the NF1 locus in cases associated with neurofibromatosis but not in cases with mutant RAS or PTPN11. *Oncogene*. 2007; 26: 5816-21.
141. Steinemann D, Arning L, Praulich I, Stuhmann M, H. H, Stary J, et al. Mitotic recombination and compound-heterozygous mutations are predominant NF1-inactivating mechanisms in children with juvenile myelomonocytic leukemia and neurofibromatosis type 1. *Haematologica*. 2010; 95: 320-3.
  142. Balgobind BV, Van Vlierberghe P, van den Ouweland AM, Beverloo HB, Terlouw-Kromosoeto JN, van Wering ER, et al. Leukemia-associated NF1 inactivation in patients with pediatric T-ALL and AML lacking evidence for neurofibromatosis. *Blood*. 2008; 111: 4322-8.
  143. Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2003; 34: 148-50.
  144. Kratz CP, Niemeyer CM, Castleberry RP, Cetin M, Bergstrasser E, Emanuel PD, et al. The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/myeloproliferative disease. *Blood*. 2005; 106: 2183-5.
  145. Bader-Meunier B, Tchernia G, Mielot F, Fontaine JL, Thomas C, Lyonnet S, et al. Occurrence of myeloproliferative disorder in patients with Noonan syndrome. *J Pediatr*. 1997; 130: 885-9.
  146. Fukuda M, Horibe K, Miyajima Y, Matsumoto K, Nagashima M. Spontaneous remission of juvenile chronic myelomonocytic leukemia in an infant with Noonan syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997; 19: 177-9.
  147. Loh ML, Sakai DS, Flotho C, Kang M, Fliegauf M, Archambeault S, et al. Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2009; 114: 1859-63.
  148. Schmidt MH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6: 907-18.
  149. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, et al. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature*. 2009; 460: 904-8.
  150. Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, Furlan I, Erlacher M, Bunin NJ, et al. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2010; 42: 794-800.
  151. Zecca M, Bergamaschi G, Kratz C, Bergstrasser E, Danesino C, De Filippi P, et al. JAK2 V617F mutation is a rare event in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2007; 21: 367-9.
  152. Gratias EJ, Liu YL, Meleth S, Castleberry RP, Emanuel PD. Activating FLT3 mutations are rare in children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2005; 44: 142-6.
  153. Loh ML. Recent advances in the pathogenesis and treatment of juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2011; 152: 677-87.
  154. Matsuda K, Shimada A, Yoshida N, Ogawa A, Watanabe A, Yajima S, et al. Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations. *Blood*. 2007; 109: 5477-80.
  155. Flotho C, Kratz CP, Bergstrasser E, Hasle H, Stary J, Trebo M, et al. Genotype-phenotype correlation in cases of juvenile myelomonocytic leukemia with clonal RAS mutations. *Blood*. 2008; 111: 966-7; author reply 7-8.
  156. Bresolin S, Zecca M, Flotho C, Trentin L, Zangrando A, Sainati L, et al. Gene expression-based classification as an independent predictor of clinical outcome in juvenile myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 1919-27.
  157. Locatelli F, Nollke P, Zecca M, Korthof E, Lanino E, Peters C, et al. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood*. 2005; 105: 410-9.
  158. Yoshimi A, Mohamed M, Bierings M, Urban C, Korthof E, Zecca M, et al. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) results in outcome similar to that of first HSCT for patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2007; 21: 556-60.
  159. Yoshimi A, Niemeyer CM, Bohmer V, Duffner U, Strahm B, Kreyenberg H, et al. Chimaerism analyses and subsequent immunological intervention after stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2005; 129: 542-9.
  160. Yoshimi A, Bader P, Matthes-Martin S, Stary J, Sedlacek P, Duffner U, et al. Donor leukocyte infusion after hematopoietic stem cell transplantation in patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2005; 19: 971-7.
  161. Furlan I, Batz C, Flotho C, Mohr B, Lubbert M, Suttrop M, et al. Intriguing response to azacitidine in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia and monosomy 7. *Blood*. 2009; 113: 2867-8.
  162. Flotho C, Kratz C, Niemeyer CM. Targeting RAS signaling pathways in juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Drug Targets*. 2007; 8: 715-25.



# Leucemie acute

## MOMCILO JANKOVIC

Clinica Pediatrica dell'Università di Milano-Bicocca,  
Fondazione Monza e Brianza per il Bambino e la sua Mamma (MBBM),  
Azienda Ospedaliera S. Gerardo, Monza



Momcilo Jankovic

## ■ INTRODUZIONE

Quando sentiamo, leggiamo, pensiamo alla parola leucemia, spesso la nostra mente la collega in automatico non tanto alla malattia in sé, ma alle conseguenze che l'annuncio di una simile diagnosi inevitabilmente ha nella vita di una persona, e in particolare avrebbe nella propria vita. Scriveva nel 2008 Paolo Barnard nell'introduzione al libro "Dall'altra parte": "la malattia, quella grave in particolar modo, assomiglia più a un sequestro di persona che a un incidente biochimico: ti blocca ovunque tu sia, qualsiasi cosa tu stia o non stia facendo, e senza rispettare nessuna delle tue esigenze, dei tuoi progetti e dei tuoi diritti, ti porta via in un luogo lontano da tutto ciò che hai sempre conosciuto come te stesso, il tuo ambiente, e ogni tua sicurezza".

L'esperienza di una malattia grave, di una minaccia così reale e nello stesso tempo intangibile alla propria vita, segna per sempre chi ne è venuto fuori: i guariti, i cosiddetti *survivors* della letteratura anglosassone. E non solo: tutta la famiglia

e, in qualche modo, tutto l'ambiente intorno alla persona colpita risentono della situazione. L'impatto psicologico sul malato è evidente per quei pazienti che nel momento in cui contraggono e affrontano la leucemia hanno consapevolezza delle proprie condizioni di salute. Come vive invece questo momento un bambino? Quali conseguenze implica l'aver affrontato una leucemia in età pediatrica in chi è guarito ormai da svariati anni? Una patologia emato-oncologica porta sempre con sé le conseguenze della terapia e delle sequele che in qualche modo impattano la vita del guarito con inevitabili risvolti psicologici, che vanno a sommarsi a quelli che derivano dal fatto in sé di aver affrontato una minaccia potenzialmente mortale. Il clima che si respira nella famiglia in cui un bambino si ammala gravemente genera ripercussioni psicologiche anche sui genitori e sui fratelli del piccolo malato. Il processo di *coping*, ovvero le strategie che inconsciamente ognuno di noi mette in atto nell'affrontare una situazione stressante, riguarda così non solo il paziente in prima persona, ma tutta la famiglia. La terapia delle neoplasie ematologiche infantili ha fatto notevoli passi avanti negli ultimi decenni, con un conseguente aumento esponenziale del numero dei guariti, una popolazione bisognosa di cure e attenzioni specifiche. Il campo dell'ematologia pediatrica si trova necessariamente a dover abbracciare discipline che esulano dal campo strettamente medico, diventando così argomento d'interesse per studiosi di scienze sociali, psicologi, psichiatri, neuropsichiatri, operatori sociali, fisioterapisti, etici medici. Lo scopo degli studi svolti a riguardo è quello di chiarire l'impatto

**Parole chiave:** leucemia linfoblastica acuta, leucemia mieloide acuta, bambino, assistenza globale.

*Indirizzo per la corrispondenza*

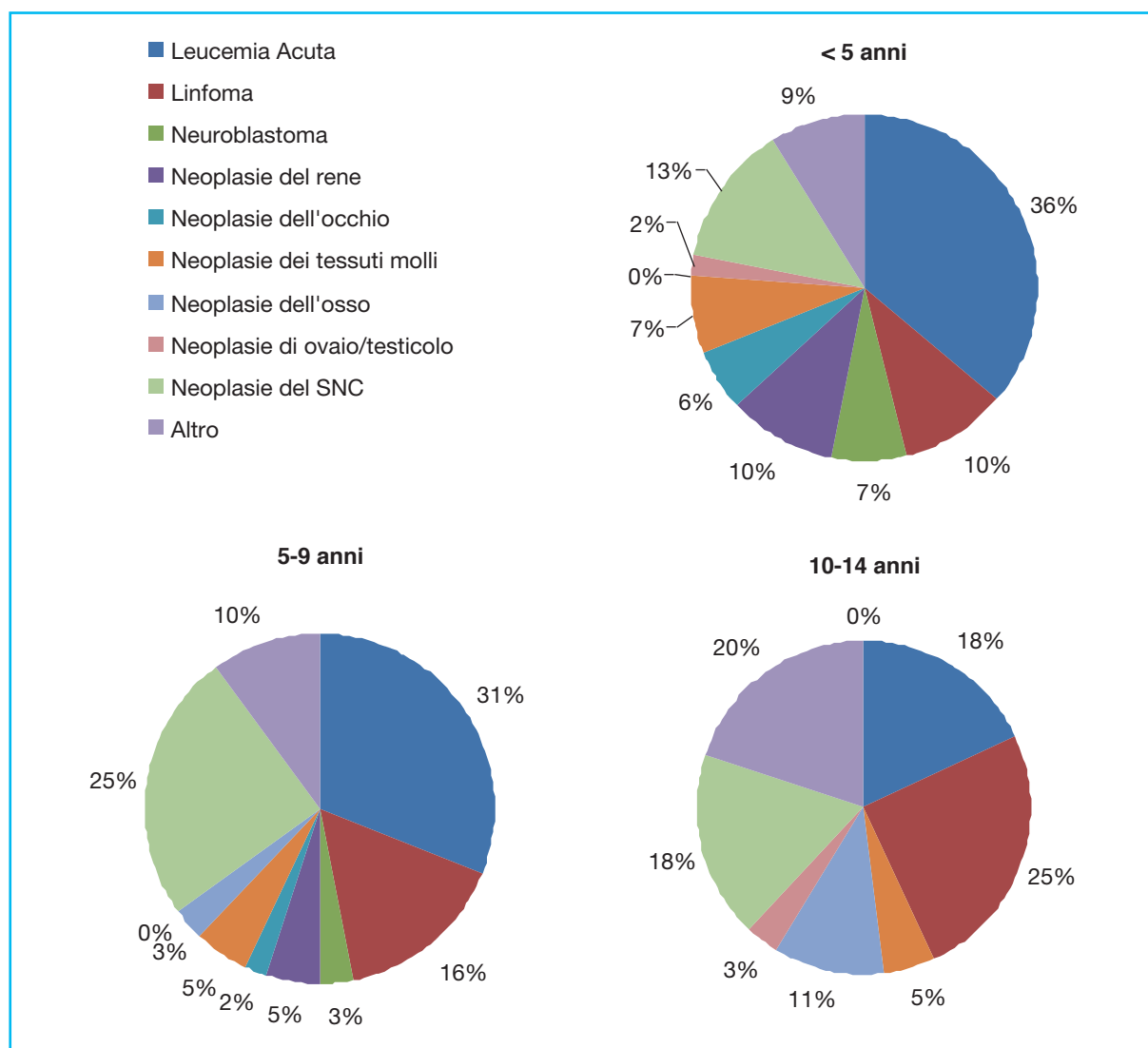
Momcilo Jankovic  
Clinica Pediatrica dell'Università di Milano-Bicocca  
Fondazione Monza e Brianza per il Bambino  
e la sua Mamma (MBBM)  
Azienda Ospedaliera S. Gerardo  
Via Pergolesi, 33 - 20900 Monza  
E-mail: m.jankovic@hsgerardo.org

fisico e psicologico degli effetti avversi delle terapie, sui quali ancora molto resta da capire, e di approfondire anche le conseguenze che la malattia ha sui prossimi al paziente.

## ■ EPIDEMIOLOGIA DEI TUMORI INFANTILI

I tumori infantili sono un'evenienza rara, rappresentando solo l'1-2% di tutti i casi di neoplasie diagnosticate in Europa e USA ogni anno. Nonostante ciò e nonostante i progressi terapeutici,

il tumore rimane la seconda causa di morte nei bambini oltre il primo anno di vita, seconda solo agli incidenti. Il tasso d'incidenza complessivo si aggira intorno ai 140-160 casi/anno, delineando un rischio di ammalarsi di tumore entro i primi 15 anni di vita di 1 su 500 soggetti. Nella casistica annuale, le neoplasie di pertinenza ematologica sono di gran lunga prevalenti in tutte le fasce d'età, con una predominanza di leucemie acute nei pazienti di età inferiore a 9 anni e di linfoma negli adolescenti (Figura 1). L'eziologia del tumore infantile è estremamente varia e non riconosce quasi mai un agente sin-



**FIGURA 1** - Distribuzione delle tipologie neoplastiche per età e istotipo.

golo. Le leucemie rappresentano nel loro complesso le neoplasie più frequenti in età pediatrica, con un'incidenza annua di 40 casi/100.000 soggetti. Le forme croniche, diversamente da quanto accade nell'adulto, possono dirsi una rarità tra i bambini (5% delle diagnosi). Le leucemie acute, di gran lunga più frequenti, sono più che altro leucemie ad origine linfatica.

Le leucemie possono essere definite come un gruppo di patologie maligne in cui delle anomalie genetiche in cellule ematopoietiche danno origine a una proliferazione clonale di cellule. I progenitori di queste cellule hanno un vantaggio di crescita rispetto ai normali elementi cellulari, possedendo un aumentato tasso di proliferazione, una tendenza diminuita all'apoptosi spontanea o entrambe. Il risultato è la disregolazione del normale funzionamento midollare e, negli stadi terminali, la sua insufficienza.

L'eziologia è alquanto varia e discussa, di certo multifattoriale. Sicuramente un ruolo fondamentale viene giocato dai fattori genetici. I fratelli di leucemici hanno infatti un rischio fino a 6 volte superiore a quello della popolazione generale di ammalarsi anch'essi di leucemia. Nel caso di gemelli identici, tale rischio sale al 20% durante i primi 12 mesi dalla diagnosi; nei mesi successivi il rischio cala progressivamente, assestandosi su livelli pari a quelli dei fratelli in 5-7 anni. Nel caso la diagnosi di leucemia sia posta nel corso del primo anno di vita, il rischio per un gemello omozigote di ammalarsi è prossimo al 100%: in questi casi è stata spesso dimostrata la medesima origine clonale della neoplasia.

Alcune condizioni morbose risultano essere geneticamente predisponenti, sia nel caso vengano considerati bambini con anomalie cromosomiche (Sindrome di *Down*: rischio 20 volte maggiore, Sindrome di *Klinefelter*), sia nel caso il piccolo paziente sia affetto da patologie del sistema di *mismatch repair* (indispensabile strumento di riparazione dei danni al DNA) o altre patologie a elevata fragilità cromosomica (Atassia-Teleangectasia, Anemia di Fanconi, Sindrome di *Bloom*, Discheratosi congenita), sia ancora la disfunzione cellulare risieda a livello dei *pathway* di maturazione e morte cellulare (Sindrome di *Noonan*, NF1, Anemia di *Biamond/Blackfan*). Inoltre, anche tutte le forme immunosoppressive

congenite rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di leucemie (Agammaglobulinemia di *Bruton*, Sindrome di *Wiskott Aldrich*).

L'età avanzata della madre sembra contribuire a innalzare la soglia di allerta, probabilmente a causa della maggiore probabilità di dare alla luce un bambino con anomalie cromosomiche.

I fattori ambientali annoverano al primo posto le radiazioni ionizzanti. Un'incidenza di leucemie pari a 10-20 volte quella standard è stata riscontrata nelle aree di *Hiroshima* e *Nagasaki* dopo le esplosioni nucleari e il rischio appare notevolmente aumentato anche per i bambini nati da madri esposte a radiazioni dopo l'incidente di *Chernobyl*. Analogamente, l'esposizione della madre a esami radiologici, soprattutto durante il primo trimestre di gestazione, o la necessità di TBI (*Total Body Irradiation*) per un trapianto di cellule staminali emopoietiche, sono gravate da un'aumentata incidenza di leucemie pediatriche e non. Importanti correlazioni sono state dimostrate per l'uso pregresso di citostatici e antiblastici, soprattutto per le forme secondarie.

Un certo grado di partecipazione virale è considerabile nel caso di alcuni sottogruppi specifici: è il caso ad esempio dell'*Epstein Barr virus* per le leucemie linfoblastiche B *Burkitt-like*. Il ruolo dell'HTLV-1 e 2 non è mai stato dimostrato nei pazienti pediatrici, pur essendo il certo responsabile di linfomi T e dell'hairy cell leukemia nell'adulto.

## ■ LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) rappresenta l'80% delle leucemie di bambini e adolescenti sotto i 15 anni. Solo in Europa ne vengono diagnosticati circa 5.000 casi l'anno con un picco di incidenza tra i 2 e i 5 anni di vita. La razza caucasica risulta essere la più colpita e prevalgono le diagnosi in individui di sesso maschile (1). In Italia, sono stati registrati negli ultimi anni, presso il centro raccolta dati dell'Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP) in collaborazione con il CINECA (Bologna), circa 500 casi/anno di leucemia in età pediatrica: di questi, circa 400 sono LLA. Dal punto di vista cito/isto-

- L1 Piccole cellule linfoidi, cromatina omogenea, assenza di nucleoli, scarso citoplasma, nuclei regolari.
- L2 Grandi cellule eterogenee, cromatina disomogenea, forma irregolare del nucleo, presenza di nucleoli, citoplasma.
- L3 Grandi cellule con cromatina nucleare finemente punteggiata, nucleoli prominenti, citoplasma fortemente basofilo e vacuolato.

**TABELLA 1** - Classificazione FAB della LLA.

logico deriva dalla proliferazione maligna di cellule progenitrici linfoidi, bloccate in uno stadio precoce di differenziazione. L'80% riconosce un'origine di tipo B, solo il 20% ha invece un precursore T.

Le LLA sono storicamente distinte in tre diversi sottogruppi FAB (proposti dal gruppo Franco-Anglo-Britannico nel 1976) (1) (*Tabella 1*).

I criteri di classificazione usati comprendono dimensioni e morfologia della cellula e del suo nucleo, qualità della cromatina, quantità e qualità del citoplasma ed eventuale presenza di nucleoli. Il sottotipo L1 è il più frequente in ambito pediatrico (80% dei casi), il sottotipo L3 è invece il più raro ed è solitamente correlato ad LLA-B.

La citochimica rivela cellule sempre PAS+, mentre la fosfatasi acida risulta positiva soprattutto nelle forme T.

Una distinzione certa tra LLA B e T può però essere fatta solo tramite criteri immunologici, non a caso grandi progressi nella diagnosi differenziale, e dunque nella possibilità di stratificazione prognostica e scelta terapeutica, sono stati fatti dopo l'introduzione in medicina degli anticorpi monoclonali a scopo diagnostico. Questi evidenziano nell'80% dei casi la positività a marcatori tipici delle cellule B, quali CD19, CD22 e HLA-DR. Le forme immature Slg- rappresentano circa il 60% delle LLA-B del bambino, mentre quelle mature Burkitt-like solo l'1-2% della casistica. Le forme T, molto meno comuni, sono distinguibili per la positività a CD7 e TcR. Anche tra queste è possibile un'ulteriore sottoclassificazione basata sul diverso grado di maturazione. Possibile è anche il contemporaneo riscontro di marker mieloidi e linfoidi sulle medesime cellule (leucemie ibride, 5-20% delle LLA) o, più raramente, in due popolazioni cellulari distinte (leucemie biclonali).

Alla base del miglioramento nella cura della LLA vi sono una sempre più approfondita conoscenza dei sottogruppi biologici e un'elevata qualità nella terapia di supporto (1).

L'applicazione di metodiche standard sia citogenetiche (cariotipo classico con o senza FISH) che molecolari (PCR e RT-PCR) permette poi di identificare numerose alterazioni genetiche. Con l'utilizzo di nuove metodiche quali gene *expression profile* (GEP), *genome-wide analysis* (GWA) e *next generation sequencing* (NGS) si riesce a caratterizzare virtualmente il 100% dei casi con LLA.

### Storia naturale

Sebbene le cause esatte della LLA siano ancora tutte da chiarire, l'applicazione delle nuove metodiche di laboratorio a nostra disposizione, dal GEP alla NGS, hanno chiaramente dimostrato due importanti concetti:

- a) la leucemia del bambino è il risultato di un processo *multistep* associato all'acquisizione di alterazioni genetiche nelle cellule leucemiche (mutazioni somatiche);
- b) la LLA del bambino è una malattia eterogenea composta da numerosi sottogruppi biologici, classificati in base alle alterazioni genetiche che li caratterizzano.

È ormai accertato che la maggior parte dei casi derivino da mutazioni somatiche che insorgono durante la fase di post-concepimento *in utero* nelle cellule linfoidi in sviluppo (2). Questa evidenza emerge chiaramente dagli studi sui gemelli monooriali, che mostrano elevata concordanza di eventi leucemici, compresi identici riarrangiamenti genetici (2). Il *backtracking* delle alterazioni genetiche diagnostiche utilizzando le *Guthrie cards*, ha dimostrato la presenza delle stesse traslocazioni già anni prima della diagnosi clinica di LLA (2). Tra queste traslocazioni, la t(12;21) che genera il trascritto TEL/AML1 è stato riscontrato nel sangue cordonale dell'1% di soggetti sani, una frequenza 100 volte superiore rispetto alla prevalenza di questo sottotipo di leucemia, suggerendo che ulteriori mutazioni post-natali si rendono necessarie per la trasformazione maligna (1).

Questo schema dei due *hits* è stato recentemente dimostrato anche nel caso della t(9;22). È stato dimostrato, per la prima volta, in una coppia di gemelli monooriali con una LLA concordan-

te per la t(9;22) che il gene di fusione BCR-ABL1 può esser considerato un evento prenatale “iniziale” la trasformazione leucemica e che la mutazione (o delezione) di IKZF1 (gene chiave nello sviluppo dei linfociti B) è un evento secondario (*driver*) e postnatale incidendo sulla prognosi, in senso negativo (3). Questo report conferma un altro studio collaborativo sui gemelli con la t(12;21) nel quale, applicando una *Genome Wide Copy Number Analysis*, si è confermato che mediamente vi sono circa 5 CNV per gemello e che queste alterazioni funzionano da driver post-natali (4).

### Genetica molecolare

– LLA B-lineage. I più comuni difetti cromosomici osservati nei blasti leucemici sono guadagni (*gains*) numerici o perdite (*losses*) di interi cromosomi e traslocazioni. L'iperdiploidia è segnalata in quasi un terzo dei casi e l'iperdiploidia con 51-65 cromosomi è associata ad una buona prognosi (5). La prognosi favorevole nella iperdiploidia sembra esser maggiormente correlata con i *gains* dei cromosomi 4, 10 e 17 (tripla trisomia) o dei cromosomi 4 e 10 (doppia trisomia) (5). Di contro, l'ipodiploidia con meno di 44 cromosomi nei blasti leucemici è legata ad una cattiva prognosi (5).

Le traslocazioni nella LLA del bambino comunemente colpiscono fattori di trascrizione ematopoietici o attivano oncogeni e sono eventi chiave nella leucemogenesi: questi comprendono la traslocazione (spesso criptica) t(12;21) TEL-AML1 (o ETV6-RUNX1) che è riscontrata nel 25% dei casi; la t(1;19) TCF3-PBX1 nel 5%; la t(9;22) BCR-ABL1 (generalmente p190) nel 3%; i riarrangiamenti del gene MLL (cromosoma 11 banda q23) nell'8% dei casi. Quelli elencati rappresentano i principali sottogruppi biologici per i quali è ben definito l'impatto sulla prognosi, come descritto nella tabella 1. Infatti, se per i casi con iperdiploidia, la t(12;21) e la t(1;19) si può pronosticare una sopravvivenza superiore all'85%, per la t(9;22) siamo partiti da un modesto 35-40%, ma attualmente con l'utilizzo degli inibitori delle tirosin-chinasi associati alla chemioterapia siamo oltre il 75% a tre anni (1). Tutt'altro che confortanti sono invece i dati relativi ai casi con riarrangiamento del gene MLL: la t(4;11) MLL-AF4, la traslocazione più frequente (>60%) nei casi di riarrangiamento di MLL,

è ancor oggi associata ad una prognosi cattiva soprattutto negli infants (<12 mesi d'età) di età inferiore ai 6 mesi e con un numero di globuli bianchi alla diagnosi superiore o uguale a 300.000 mm<sup>3</sup> (1). Nel caso della LLA con t(4;11) non-infant gli attuali presidi terapeutici (chemioterapia ad alte dosi con o senza trapianto allogenico) sembrano garantire un sopravvivenza a due anni non superiore al 55%, come segnalato da un'analisi dei casi arruolati nei protocolli AIEOP LLA-2000 e R-2006. A causa di questi non brillanti risultati, questo sottotipo di LLA è oggetto di approfonditi studi biologici anche in ambito AIEOP.

Una osservazione chiave è che più dei due terzi di casi con LLA B-lineage presentano alterazioni genetiche che modificano il normale processo di maturazione linfoide (6).

– *Studi epigenetici*. La LLA del bambino di età inferiore ai 12 mesi è caratterizzata dal riarrangiamento del gene MLL (*mixed lineage leukemia*) presente in circa l'80% dei casi, ed è gravata da una percentuale di sopravvivenza nettamente inferiore rispetto a quella dei bambini più grandi (1). Studi biologici approfonditi hanno dimostrato che:

- a) il riarrangiamento del gene MLL è da solo sufficiente per dare inizio al processo leucemico, in quanto non vi sono associate delezioni o amplificazioni geniche (6);
- b) nel caso dei gemelli con LLA e MLL riarrangiato, vi è una concordanza del 100%, indicando una insorgenza *in utero* ed una metastatizzazione del clone da un gemello all'altro (2);
- c) la caratterizzazione della sequenza genomica dei riarrangiamenti ha permesso di individuare numerosi nuovi geni partner di MLL, di caratterizzare la malattia minima residua (MRM) con un metodo molto più specifico e quindi di meglio classificare i pazienti in fasce di rischio utili per le scelte terapeutiche (7);
- d) il *gene expression profile* di queste forme di LLA è caratteristico ed unico e mostra delle differenti signature come dimostrato da diversi gruppi, compreso quello di Trentin et al. (8), e come più recentemente confermato dal COG (9). Poiché il gene MLL agisce modificando direttamente la cromatina e quindi la struttura del DNA mediante la metilazione degli istoni, gli studi epigenetici in questo sottotipo di LLA hanno dato un grande contributo nella



comprensione della malattia offrendo potenziali target terapeutici.

– LLA *T-lineage*. Se questi sottogruppi biologici nella LLA *B-lineage* sono ben consolidati, viceversa nel caso della LLA *T-lineage* mancano delle ben definite traslocazioni nella maggior parte dei casi. Nella *Tabella 2* sono riassunte le alterazioni genetiche riscontrate anche nella forma *T-lineage*, in associazione alla prognosi.

L'analisi citogenetica evidenzia anomalie cromosomiche nel 90% dei casi. Numericamente l'alterazione più diffusa è la pseudodiploidia (40%), seguita dall'iperdiploidia (30%), con conte cromosomiche che possono superare i 50, mentre l'ipodiploidia è un reperto riscontrabile solo nel 6% circa delle LLA infantili. Un metodo alternativo per la valutazione della ploidia cellulare è il DNA *index*, meno costoso e più facilmente amministrabile rispetto alle metodiche citogenetiche. A un DNA *index* di 1 corrisponde l'assetto diploide della cellula (2N=46 cromosomi), un valore  $\geq 1,16$  è invece suggestivo per iperdiploidia.

Traslocazioni, delezioni e mutazioni puntiformi sono considerabili ricorrenti in non più del 30% dei casi. Alcune di esse sono comunque degne di nota in quanto di discreto riscontro in ambito pediatrico, come la t(12;21), evidenziabile in un quarto circa dei pazienti (*Tabella 2*).

### Aspetti clinici

L'esordio delle LLA è nella maggior parte dei casi acuto, sebbene malessere, irritabilità e febbre (da infezione o a origine neoplastica) possano precedere di qualche settimana il quadro manifesto. Clinicamente, i sintomi e i reperti obiettivi sono per lo più riconducibili alla situazione di citopenia, dovuta a sua volta al sovvertimento midollare. Un'anemia iporigenerativa (con reticolociti bassi)

è riscontrabile nel 90% dei casi, e non di rado in forma severa (Hb <5 mg/dl). Contingentemente il paziente lamenterà astenia e all'esame fisico pallore e tachicardia sono reperti tipici.

La diatesi emorragica, con petecchie, ecchimosi, epistassi e gengivorragia, è spesso la controparte obiettiva di una piastrinopenia da insufficienza midollare, che risulta severa (PLT <20.000 mm<sup>3</sup>) nel 30% circa delle diagnosi di LLA.

L'epatosplenomegalia è un reperto pressoché costante. Un'adenomegalia delle stazioni superficiali è più suggestiva per una forma B, mentre nelle forme T l'interessamento timico con massa bulky mediastinica può essere talmente importante da determinare una sindrome mediastinica.

Nel 10-15% vi è interessamento del SNC all'esordio, con presenza di blasti all'esame liquorale. Senza un'adeguata profilassi, la percentuale dei pazienti con localizzazioni nervose sale al 50-60% (5% con le attuali misure di profilassi). I sintomi correlati, dovuti essenzialmente a un aumento della pressione intracranica, crescono di severità su una scala che va da vomito, cefalea e irritabilità fino a rigidità nucale (segno di chiaro interessamento meningeo), crisi convulsive e coma. Possibile è anche il riscontro di segni e sintomi focali, tra i quali i più comuni risultano essere disturbi del visus per infiltrazione della retina o paralisi del VI nervo cranico e SIADH (sindrome da inappropriata secrezione di ormone antidiuretico) da interessamento ipotalamico.

I testicoli risultano mono o bilateralmente ingranditi all'esordio nel 2% dei bambini, soprattutto se colpiti da forme T. Un'infiltrazione occulta, rilevabile solo tramite esame microscopico, è però evidenziabile nel 30% circa dei casi. Ben più raro risulta invece essere l'interessamento ovarico. Nel 30% dei casi i pazienti lamentano dolori ossei o articolari, suggestivi di coinvolgimento osseo o periostale.

Le forme B sono in grado di invadere anche il sistema gastroenterico, con localizzazioni che spesso rimangono asintomatiche, ma che possono occasionalmente dar luogo a manifestazioni acute quali enteropatia necrotizzante o occlusione intestinale.

Appannaggio esclusivo delle forme T è invece l'interessamento delle parotidi (sindrome di Mikulicz). Dal punto di vista ematochimico, il 50% dei

| Traslocazione            | Geni coinvolti | Frequenza |
|--------------------------|----------------|-----------|
| t(12;21)(p12-13;q22)     | TEL/AML1       | 25%       |
| t(1;19)(q23;p13.3)       | PBX/E2A        | 5-6%      |
| t(9;22)(q34;q11)         | ABL/BCR        | 3-5%      |
| t(24;11)(q21;q23)        | AF4/MLL        | 2%        |
| Riarrangiamenti di 11q23 | MLL/AF         | 2%        |
| t(8;14)(q24;q32)         | c-Myc-IgH      | 1-2%      |

TABELLA 2 - Traslocazioni frequenti nelle LLA.

pazienti presenta all'esordio una conta linfocitaria aumentata ( $GB > 10.000 \text{ mm}^3$ , in un quarto dei soggetti possibile riscontro di  $GB > 100.000 \text{ mm}^3$ ). Le cellule prevalenti sono nettamente blasti, con le caratteristiche peculiari di una delle tre forme FAB; neutrofili e linfociti sono invece meno rappresentati, il che spiega l'aumentato rischio di infezione. Anemia e piastrinopenia sono come già detto di frequente riscontro. La pancitopenia è un reperto osservabile in poco più dell'1% dei casi.

L'aspirato midollare mostra una sostituzione più o meno estesa della normale popolazione linfocitaria. I blasti possono essere l'80% delle cellule presenti anche quando la situazione periferica non è particolarmente eclatante e devono superare il 25% della popolazione midollare perché possa essere fatta diagnosi di LLA.

### Terapia

– *Il contributo internazionale.* Nel 1948 Farber S. (10) applica per la prima volta un antifolico, l'aminopterina, aprendo la strada alla chemioterapia della LLA e all'uso di uno degli antiblastici ancor oggi di maggior importanza. Da notare che il *methotrexate* (ameterina) inizialmente era utilizzato per via orale alla dose di 2-5 mg/die; negli ultimi anni è stato usato per via endovenosa alla dose, unica ripetibile, di 2.000-5.000 mg/m<sup>2</sup> (in alcuni casi fino alla dose di 33.000 mg/m<sup>2</sup>).

È merito del padre della ematologia pediatrica italiana, Sansone (11), aver per primo utilizzato nel 1954 l'aminopterina per via intratecale, aprendo la strada a uno dei cardini della terapia della LLA, sia nella prevenzione che nella terapia delle localizzazioni al sistema nervoso. Deve essere riconosciuto invece principalmente a Donald Pinkel e a Hansjörg Riehm il merito di aver consentito due grandi progressi sulla via della guarigione nella LLA. Nel 1967 Pinkel (12) propose il concetto, allora ritenuto rivoluzionario rispetto all'orientamento tradizionale, che la LLA dovesse essere trattata con l'obiettivo di ottenere la guarigione, utilizzando una polichemioterapia, nel tentativo di eradicare il clone leucemico, integrata con un intervento precoce sul sistema nervoso, allora applicato mediante radioterapia e methotrexate intratecale. Questa strategia consentì il primo balzo verso il 40% circa di guarigione (tem-

po di osservazione superiore a 20 anni); Riehm (13, 18) introdusse nel 1970 una polichemioterapia molto intensa, con 8 farmaci, portando la sopravvivenza libera da eventi al 50% circa. Fondamentale è stata l'introduzione della reinduzione con l'ormai famoso protocollo II, somministrato dopo 3-4 mesi dalla remissione completa, comprendente i farmaci già usati in induzione (con la variante desametasone e adriblastina in sostituzione rispettivamente di prednisone e daunoblastina).

In Germania, in particolare nei centri di Berlino-Francoforte-Münster (da cui la sigla BFM), si ottennero per la prima volta, a partire dal 1976, risultati particolarmente favorevoli (13) con event free survival (EFS) superiore al 65%. L'impostazione BFM è stata adottata sempre più ampiamente a livello internazionale e, negli ultimi anni, il gruppo cooperativo *Children Cancer Group* - USA (CCG) ha pubblicato eccellenti risultati sulla valutazione del ruolo del Protocollo II nelle varie stratificazioni per fasce di rischio nella LLA.

Occorre poi ricordare i progressi nella genetica molecolare che consentono oggi di individuare sottogruppi di LLA con caratteristiche biologiche, cliniche e prognostiche molto specifiche e di valutare con precisione molto elevata la presenza di malattia residua, essendo possibile diagnosticare la presenza di cellule leucemiche a livello di una cellula leucemica su 10.000-100.000 cellule normali, con apertura di interessanti prospettive per nuove strategie terapeutiche.

Meritano infine di essere menzionate nuove prospettive terapeutiche rispetto alle risorse attualmente disponibili: la possibilità di provocare una risposta citotossica specifica nei confronti della cellula leucemica; la manipolazione genetica per aumentare e incrementare le difese dell'organismo e infine interventi terapeutici che interagiscono con il microambiente di crescita delle cellule leucemiche (ad esempio farmaci che inibiscono la formazione di nuovi vasi sanguigni, angiogenesi).

Una nota negativa in questa analisi di un successo deve essere riservata alla discrepanza tra efficacia delle attuali cure della LLA ed efficienza nella loro applicazione. Se infatti l'efficacia è continuamente migliorata tanto da consentire la guarigione in oltre l'80% dei casi, l'efficienza nell'assicurare tali cure è limitata dai costi in continuo

aumento e dalle condizioni socio-sanitarie della maggior parte dei paesi: di fatto le terapie della LLA sono accessibili ancora oggi solo a circa il 20% dei bambini affetti da LLA nel mondo. Da qui la forte sollecitazione della Società Internazionale di Oncologia Pediatrica (SIOP), attraverso il gruppo di lavoro PODC (*Pediatric Oncology in Developing Countries*) a promuovere iniziative a favore della oncologia pediatrica anche nei paesi con risorse limitate. Significativa è la *Monza International School of Pediatric Hematology and Oncology* (MISPHO) (14) per la formazione, l'aggiornamento e la promozione di programmi di sviluppo-ricerca in paesi quali Bolivia, Nicaragua, Guatemala, Perù, Ecuador, Colombia, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Honduras, Paraguay, Repubblica Dominicana, Uruguay, Venezuela.

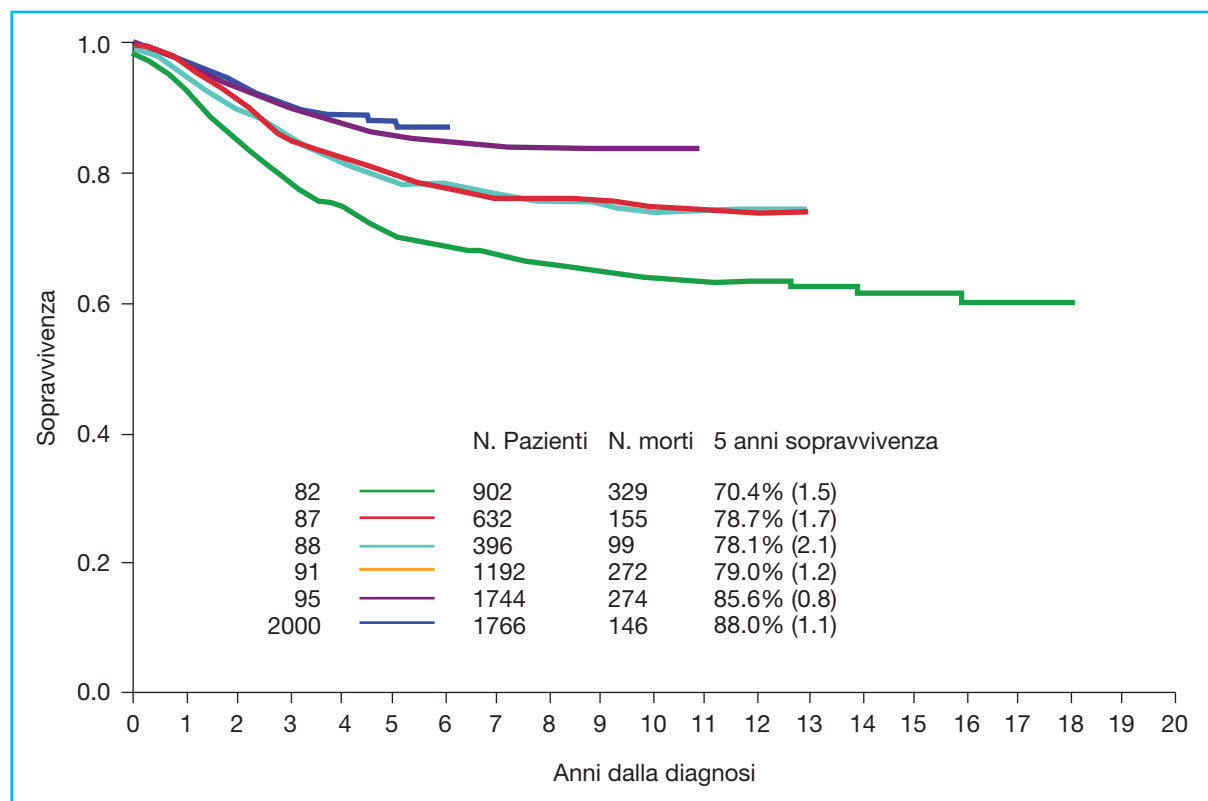
– *Il contributo italiano.* Al di là del contributo fondamentale di Sansone (11), precedentemente citato, l'elemento fondamentale che ha caratterizzato il successo ottenuto nella terapia della LLA nel

nostro paese deve essere individuato nella cooperazione a livello nazionale che si è realizzata fin dai primi anni 70 con la realizzazione di due obiettivi:

1. ottimizzare lo *standard* di cura su tutto il territorio nazionale;
2. promuovere la ricerca attraverso studi clinici aperti alla cooperazione del maggior numero possibile di istituzioni pediatriche.

Questo impegno è stato alla base della creazione della AIEOP. A partire dal 1974 è stata realizzata una lunga sequenza di protocolli per la LLA: '74, '76, '79, '82, '87, '88, '91, '95 e 2000 (*Figura 2*). A partire dal 1988 si è entrati in collaborazione con il gruppo europeo BFM adottandone la strategia terapeutica e apportando alcune modifiche derivate dalla esperienza AIEOP.

Nel 1985 si è realizzato a Bologna un efficiente centro raccolta dati (CRD) con il quale ha interagito, per l'analisi statistica, il centro di Monza in collaborazione con l'Istituto di Statistica Medica e Biometria dell'Università di Milano.



**FIGURA 2** - Probabilità di sopravvivenza a 5 anni nei protocolli AIEOP LLA.

Dal 1987 si è inoltre realizzata una iniziativa di grande valore sia per la qualità degli studi clinici sia per la ricerca biologica: la banca di campioni biologici, organizzata presso la clinica pediatrica di Padova, in collaborazione con la clinica pediatrica di Monza (Centro Tettamanti per gli studi di biologia molecolare).

Di notevole importanza è stata l'istituzione del registro nazionale dei fuori terapia (ROT), prezioso strumento per studi epidemiologici e per la raccolta di dati sugli eventi maggiori (mortalità, tossicità maggiore, progenie, secondi tumori), indispensabili a fotografare lo stato di salute dei soggetti guariti, per tipo di tumore. Questo registro, che viene gestito dal centro operativo e di ricerca statistica presso la clinica pediatrica di Monza, è stato attivato nel 1980 allo scopo di raccogliere informazioni sui bambini affetti da neoplasia maligna che hanno raggiunto la sospensione delle cure in assenza di segni clinici di malattia. Attualmente risultano iscritti al ROT 16.531 soggetti di cui 6.976 (42,2%) LLA.

Una componente essenziale del successo ottenuto nelle leucemie (e più in generale in oncologia

pediatrica) è da ricercarsi nella capacità dei pediatri ematologi e oncologi di offrire un approccio a tutto campo (olistico), aperto ai bisogni globali del bambino e della famiglia e capace di offrire non solo cure, ma una vera presa in carico e la realizzazione di quella collaborazione tra operatori sanitari e genitori che è stata definita alleanza terapeutica, consentendo di ottenere eccellenti realizzazioni (strutture, ricerca, collaborazione internazionale).

– *Sequenza terapeutica.* Attualmente la terapia della LLA è divisa in cinque fasi: citoriduzione, induzione della remissione, consolidamento, reinduzione e mantenimento. A queste fasi può affiancarsi la radioterapia o seguire il trapianto di midollo. L'evidenza clinica ha provato l'efficacia di diversi cicli polichemioterapici, a loro volta inclusi in protocolli. Attualmente, il più usato a livello internazionale è il protocollo AIEOP-BMF ALL 2009, elaborato dall'AIEOP e dal gruppo di lavoro Berlin-Frankfurt-Muenster. I pazienti vengono dapprima stratificati in tre classi di rischio sulla base di alcuni criteri prognostici e si procede dunque alla terapia secondo lo Schema 1. In aggiunta allo sche-

|                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Citoriduzione                                                                        | PDN 60 mg/m <sup>2</sup> /die po/ev in 3 somministrazioni/die dal giorno 1 al giorno 7<br>MTX IT 8-12 mg a seconda dell'età al giorno 1                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Induzione                                                                            | PDN 60 mg/m <sup>2</sup> /die po/ev dal giorno 8 al giorno 28, successivamente a scalare<br>VCR 1,5 mg/m <sup>2</sup> ev (max 2 mg) ai giorni 8, 15, 22, 29<br>DNR 30 mg/m <sup>2</sup> ev (max 2 mg) ai giorni 8, 15, 22, 29<br>CPM 1000 mg/m <sup>2</sup> ev in 1h al giorno 10 (solo per LLA-T)<br>PEG-L-ASP 2500 UI/m <sup>2</sup> ev in 2 ore ai giorni 12 e 26<br>MTX IT 8-12 mg a seconda dell'età ai giorni 12 e 33 |
| Consolidamento<br>(a 2 settimane<br>dal termine<br>dell'induzione)                   | 6-MP 25 mg/m <sup>2</sup> /die po dal giorno 1 al giorno 56<br>HD MTX 5g/m <sup>2</sup> in 24 h ai giorni 8, 22, 36, 50<br>MTX IT 8-12 mg a seconda dell'età ai giorni 8, 22, 36, 50                                                                                                                                                                                                                                        |
| Reinduzione (a 2<br>settimane dal termine<br>del consolidamento)                     | DXM Desametasone 10 mg/m <sup>2</sup> /die po in 3 somministrazioni/die dal giorno 1 al giorno 21, successivamente a scalare<br>VCR 1,5 mg/m <sup>2</sup> ev (max 2 mg) ai giorni 8, 15, 22, 29<br>ADM 30 mg/m <sup>2</sup> ev ai giorni 8, 15, 22, 29<br>PEG-L-ASP 2500 UI/m <sup>2</sup> ev in 2 ore al giorno 8<br>MTX IT 8-12 mg a seconda dell'età ai giorni 1 e 18 (solo se localizzazioni SNC all'esordio)           |
| Mantenimento (a 2<br>settimane dal termine<br>della reinduzione.<br>Durata: 24 mesi) | 6-MP 25 mg/m <sup>2</sup> /die po dal giorno 1<br>MTX 20 mg/m <sup>2</sup> settimana po 1 volta a settimana dal giorno 1<br>PEG-L-ASP 2500 UI/m <sup>2</sup> ev in 2 ore ogni 2 settimane per 10 dosi (solo per randomizzati R2)<br>MTX IT 8-12 mg ogni 6 settimane per 6 dosi<br>RTP CRANIALE (solo per sottogruppi in stadio SNC3)                                                                                        |

SCHEMA 1

ma base, i pazienti ad alto rischio (HR) dovranno eseguire anche cicli appositi, eventualmente amplificabili in caso di mancata risposta al ciclo HR. Per i pazienti con sospetto o manifesto interessamento del SNC sono previste anche alcune sedute di radioterapia.

A) Induzione. Il trattamento previsto in questa fase ha lo scopo di ottenere la remissione completa (RC). L'intensità della chemioterapia di induzione è aumentata nel corso degli ultimi decenni, con una combinazione dapprima di due farmaci (vincristina + steroidi), indi di tre o quattro agenti (+ antracicline e/o asparaginasi) e con un tasso di RC attualmente superiore al 95%. Prednisone e prednisolone sono stati i glucocorticoidi più comunemente usati in questa fase. Tuttavia recenti evidenze suggeriscono che il desametasone sia più efficace nella prevenzione delle ricadute midollari e SNC isolate o combinate. Il desametasone tuttavia comporta una più severa immunosoppressione e aumenta la tossicità acuta e a lungo termine.

B) Terapia preventiva del sistema nervoso centrale. La prevenzione della localizzazione della malattia al SNC è un concetto acquisito sin dalla fine degli anni '60. L'introduzione della radioterapia craniale (RTC) combinata con chemioterapia intratecale ha consentito di ottenere una riduzione della ricaduta al SNC dal 50% dei casi al 10% circa. Nelle decadi successive tuttavia si è gradualmente modificata questa strategia per ridurre gli effetti tossici legati al trattamento preventivo (15, 16). Attualmente si tende a somministrare la RTC solo ai pazienti a più alto rischio di recidiva, ed è possibile che in futuro la RTC possa essere omessa per tutti i pazienti che ottengono la remissione completa.

C) Consolidamento/reinduzione. Ogni gruppo cooperativo adotta una propria strategia sul tipo di consolidamento/reinduzione. Il gruppo BFM ha utilizzato con successo, dopo un'induzione intensiva (protocollo I, fasi IA+IB) basata su 8 farmaci, una fase di consolidamento (denominato protocollo M e basato sull'uso di methotrexate ad alte dosi) e una di reinduzione (molto simile alla fase di induzione e denominata protocollo II) prima della terapia di mantenimento.

D) Terapia di mantenimento e durata del trattamento. Nella maggior parte dei regimi terapeutici di mantenimento vengono somministrati methotre-

xate settimanalmente e 6-mercaptopurina (6-MP) giornalmente. La durata ottimale della chemioterapia di mantenimento non è ancora stata definitivamente stabilita. Tuttavia la maggior parte dei gruppi utilizza uno schema che prevede di trattare i pazienti per un totale di 2 anni (inclusa terapia di mantenimento).

– Risultati. Negli anni '80-'90 i risultati ottenuti dai principali gruppi cooperativi (17-20) in oncologia pediatrica sono stati sostanzialmente uniformi. Il miglioramento della prognosi è stato ottenuto con differenti strategie terapeutiche, aventi tutte un approccio comune volto all'intensificazione del trattamento. L'AIEOP sin dal 1988 ha promosso a livello nazionale protocolli chemioterapici basati sull'esperienza del gruppo BFM. I Centri AIEOP hanno trattato quasi cinquemila bambini in cinque trials consecutivi tra il 1982 ed il 2000 (21, 22). La percentuale di EFS e di overall survival (OS) a 10 anni è passata rispettivamente dal 52,8% e 63,8% nello studio AIEOP LLA 82 al 71,7% ed 82,4% nello studio AIEOP LLA 95. L'incidenza cumulativa di ricadute a 10 anni si è ridotta dal 38,4% nello studio AIEOP LLA 82 al 22,8% nello studio AIEOP LLA 95. L'incidenza cumulativa di ricadute SNC isolate è stata del 9,9% nello studio AIEOP LLA 82 contro l'1,2% nello studio AIEOP LLA 95. Le strategie di trattamento sono state caratterizzate da una progressiva sostituzione della RTC con una terapia intratecale protratta come profilassi delle recidive al SNC (Tabella 3). Negli ultimi 15-20 anni diverse tecniche sono state sviluppate per misurare in vivo la risposta al trattamento, introducendo il concetto di MRM (23-25).

In Italia, dal settembre 2000 al luglio 2006, i bambini affetti da LLA ed afferenti ai centri AIEOP sono stati trattati secondo il protocollo AIEOP-BFM ALL 2000, uno studio multicentrico, prospettico, condotto in collaborazione con il gruppo BFM. Globalmente, 1999 pazienti AIEOP affetti da LLA Ph<sup>-</sup> sono risultati eleggibili allo studio AIEOP-BFM ALL 2000. Questo studio è stato il primo trial clinico, su larga scala, prospettico, in cui è stata sistematicamente impiegata la MRM, misurata mediante metodica PCR, in corrispondenza di due *time points* definiti (al giorno 33 ed al giorno 78 del trattamento), per classificare i pazienti in tre gruppi di rischio e per adattare il trattamento post-



|                            | Protocolli AIEOP LLA |      |       |       |
|----------------------------|----------------------|------|-------|-------|
|                            | 82                   | 88   | 91    | 95    |
| Pazienti eleggibili        | 902                  | 396  | 1.192 | 1.743 |
| CR (%)                     | 94,8                 | 94,7 | 96,5  | 98,5  |
| Mortalità in induzione (%) | 2,2                  | 1,3  | 1,3   | 0,7   |
| Mortalità in CR (%)        | 3,3                  | 1,8  | 1,9   | 1,6   |
| EFS a 10 anni (%)          | 52,8                 | 64,8 | 68,4  | 71,7  |
| OS a 10 anni (%)           | 63,8                 | 74,3 | 76,9  | 82,4  |

**TABELLA 3** - Dati riassuntivi di protocolli AIEOP LLA.

induzione alla fascia di rischio. La MRM ha dimostrato una netta superiorità rispetto ai fattori prognostici convenzionali nella stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio, ossia si è rivelata maggiormente predittiva di ricaduta (26, 27). In accordo con quanto detto, la strategia AIEOP-BFM applicata nel protocollo AIEOP-BFM LLA 2009, propone più estensivamente il concetto di risposta precoce al trattamento valutata mediante MRM midollare, combinando la valutazione citofluorimetrica al giorno +15 con la valutazione in PCR al giorno 33 e 78.

Il protocollo AIEOP-BFM ALL 2000 prevedeva durante il primo mese di trattamento (Induzione IA) la somministrazione randomizzata di desametasone vs prednisone. I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'uso del desametasone alla dose di 10 mg/m<sup>2</sup>/die per tre settimane ha comportato un rischio aggiuntivo di tossicità, ma allo stesso tempo una significativa riduzione delle ricadute. Sulla base di ciò, nel protocollo di trattamento AIEOP-BFM LLA 2009, quasi tutti i pazienti ricevono terapia steroidea con prednisone nella fase d'Induzione. Il desametasone viene impiegato solo in specifici sottogruppi di pazienti (LLA-T clinicamente non ad alto rischio), che nei precedenti trials hanno beneficiato di questa terapia senza presentare un eccesso di tossicità.

Nello studio AIEOP-BFM ALL 2009 la percentuale di pazienti che ricevono RTC viene ulteriormente ridotta (meno del 10%) rispetto allo studio 2000. Lo studio AIEOP-BFM ALL 2009 prevede inoltre la somministrazione in tutti i pazienti del prodotto L-asparaginasi coniugato con polietilenglicole (PEG-L-asparaginasi), che nei protocolli precedenti era invece previsto come prodotto L-asparaginasi di seconda linea nei pazienti che avevano pre-

sentato reazione allergica al prodotto nativo. La LLA nel paziente adolescente o giovane adulto si caratterizza per una prognosi meno soddisfacente rispetto ai pazienti di età inferiore. Diverse esperienze collaborative hanno segnalato che i pazienti adolescenti o giovani adulti presentano prognosi migliore quando trattati in protocolli pediatrici. E ciò è confermato anche nell'esperienza italiana, grazie ad uno studio collaborativo tra gruppo AIEOP e Gruppo Italiano di Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA). Negli ultimi anni la strategia pediatrica è stata pertanto implementata anche nei protocolli degli adulti per il trattamento di pazienti più giovani.

– **Conclusioni.** La principale causa di insuccesso del trattamento della LLA è la resistenza alla terapia che può manifestarsi raramente come refrattarietà al trattamento all'esordio e più frequentemente come ricaduta della malattia. L'approccio terapeutico più efficace per la maggior parte di questi pazienti è il trapianto di midollo osseo allogenico (TMO). Per migliorare ulteriormente i risultati in questi pazienti è tuttavia necessario sviluppare strategie terapeutiche innovative, che utilizzano nuove molecole attive nella LLA grazie a meccanismi d'azione diversi da quelli implicati nelle terapie attualmente disponibili e l'uso di anticorpi monoclonali specifici (Figura 3).

## ■ LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

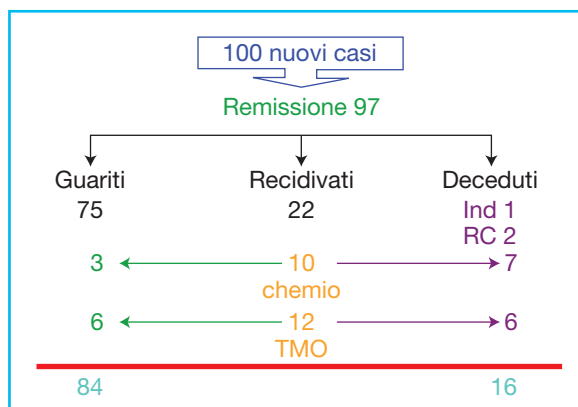
### **Aspetti biologici e clinici**

La leucemia mieloide acuta (LMA) rappresenta non più del 20% delle leucemie pediatriche, con un'incidenza di 5-10 nuovi casi l'anno ogni 1.000.000

di soggetti di età inferiore a 15 anni. È definita come un disordine mieloproliferativo clonale, secondario a trasformazione maligna di un progenitore emopoietico o di una cellula staminale di derivazione midollare, capace di auto-mantenimento e caratterizzato da un'alterata capacità di differenziazione e una ridotta possibilità di autodistruzione. L'insieme di questi eventi determina l'accumulo di elementi cellulari maligni di origine mieloide nel midollo osseo, in circolo e in altri organi.

Vengono riconosciuti diversi tipi classificati tenendo conto di criteri diversi, che spaziano da quelli morfologici, a quelli immunofenotipici, a quelli citochimici. La classificazione FAB, storicamente la più diffusa, ne riconosce 8 sottotipi, distinti sulla base di criteri morfologici e istochimici (Tabella 4). Più recentemente la WHO (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems - 10th Revision, 2008*) ha integrato la classificazione FAB con criteri genetici e molecolari e fissato al 20% la percentuale d'infiltrazione blastica midollare necessaria a porre diagnosi di LMA, mentre la stessa percentuale era del 30% nella precedente classificazione FAB. Tale classificazione però non è ancora d'uso routinario nell'ematologia pediatrica in quanto mancano criteri che si indirizzino specificatamente alla popolazione in questione (29).

Nel 50-60% dei casi di bambini affetti da LMA,



**FIGURA 3** - Impatto della chemioterapia e del TMO sulla guarigione della LLA del bambino.

la malattia può essere classificata come forma M1, M2, M3, M6 o M7; approssimativamente nel 40% dei casi, mostra i sottotipi M4 o M5. In circa l'80% dei bambini affetti da LMA d'età inferiore a 2 anni, il sottotipo è M4 o M5 ed è talora associato a riarrangiamenti della banda 11q23 e più specificamente del gene MLL.

Per porre diagnosi differenziale tra LLA e LMA, soprattutto per quanto riguarda le forme mieloidi di poco differenziate (essenzialmente M0), è indispensabile l'analisi immunoistochimica, che evidenzia nel caso di M0 cellule perossidasi negative e che permette anche di diagnosticare even-

| Sigla | Categoria                            | Criteri morfologici                                                                                             | Immuno-istochimica              |
|-------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| M0    | Indifferenziata                      | Blasti privi di markers citologici e citochimici                                                                | MPO <3% ; NSE-                  |
| M1    | Mieloblastica senza maturazione      | Blasti >90% (esclusi eritroblasti); Monociti <10%; Granulociti <10%                                             | MPO >3%                         |
| M2    | Mieloblastica con maturazione        | Blasti 30-90%; Granulociti <10%; Monociti <20%                                                                  | CD13+; CD33+; MPO >3%           |
|       | Promielocitica                       | Promielociti ipergranulari con Corpi di Auer >20%                                                               | CD13+; CD33+; MPO >3%           |
| M3    | Promielocitica variante ipogranulare | Blasti con nuclei reniformi; Granulazioni fini nel citoplasma                                                   | CD13+; CD33+; MPO >3%           |
|       | Mielomonocitica                      | Blasti >30%; Componente granulocitaria/monocitaria 20-80%; Monociti nel sangue periferico >5x10 <sup>9</sup> /l | CD13+; CD33+; CD14+; MPO >3%    |
| M4    | Mielomonocitica con eosinofilia      | Criteri M4; Eosinofili anomali con granuli eosinofili e basofili                                                | CD13+; CD33+; CD14+; MPO >3%    |
|       | Monoblastica                         | Monoblasti >80%                                                                                                 | CD13+; CD33+; CD14+; NSE+       |
| M5    | Monocitica                           | Monociti >80%; Monoblasti <80%                                                                                  | CD13+; CD33+; CD14+; NSE+; ACP+ |
| M6    | Eritroleucemia                       | Eritroblasti >50%; Blasti >30% delle cellule eritroidi                                                          | CD42+; ACP+; PAS+               |
| M7    | Megacarioblastica                    | Blasti >30%; Megacarioblasti                                                                                    | CD 41+                          |

**TABELLA 4** - Classificazione FAB delle LMA.

tuali forme biclonali. Sullo stesso tipo di ricerca si ottiene anche la collocazione della malattia all'interno dei gruppi FAB.

Recentemente, grande importanza è stata attribuita alla mutazione della nucleofosmina (NPM1), riscontrabile nel 10-20% dei pazienti pediatrici (negli adulti la frequenza è invece del 60%) e associata a prognosi positiva (29, 30). Una prognosi più severa si ha invece in caso di mutazione di FLT3 e C-KIT (31).

L'analisi citogenetica rileva nell'80% dei casi alterazioni cromosomiche, alcune delle quali caratteristiche per un determinato sottotipo e portatrici di un certo valore prognostico. Tra queste la t(8;21)(q22;q22) ETO/AML1 è di frequente riscontro nelle M2, la inv(16)(p13q22) MYH11/CBFB è patognomonica di M4 con eosinofilia e possibile reperto nelle M1 e M2 è anche il gene BCR/ABL, tipico delle leucemie mieloidi croniche. La LMA promielocitica (M3 secondo FAB) va considerata a parte non solo per le sue tipiche alterazioni cromosomiche, ma anche per la prognosi particolarmente favorevole dei pazienti che ne sono interessati. La quasi totalità di cellule leucemiche è costituita da promielociti atipici, spesso con evidenti corpi di *Auer*. L'alterazione più frequentemente presente è la t(15;17)(q22;q21), con formazione del gene PML/RAR $\alpha$ . Nelle forme negative per la t(15;17) è quasi sempre possibile evidenziare altre traslocazioni che interessano il recettore per l'acido retinoico (codificato proprio dal gene RAR $\alpha$ ), quali la t(11;17)(q23;q21) PLZF/RAR $\alpha$ , la t(5;17)(q35;q21) NPM/RAR $\alpha$  e la t(11;17)(q13;q21) NuMA/RAR $\alpha$ . Di recente scoperta è il fatto che le M3 con t(15;17) giovano dell'introduzione in terapia dell'acido transretinoico, associato a idarubicina (protocollo AIDA del GIMEMA). Questo, legandosi al proprio recettore, è in grado di promuovere la maturazione dei promielociti leucemici, portando il paziente alla RC. I pazienti portatori di traslocazioni diverse non sono responsivi ad acido retinoico, ma lo diventano con la contemporanea somministrazione di G-CSF. L'introduzione dell'ATRA in terapia permette oggi una completa guarigione in circa il 70% dei pazienti pediatrici.

Clinicamente le LMA si manifestano con i sintomi della pancitopenia, in quanto il clone leucemico determina soppressione della normale produ-

zione e differenziazione delle cellule ematiche a livello midollare. Alla diagnosi la neoplasia è infatti costantemente disseminata nel sistema ematopoietico, mentre la localizzazione extramidollare è più comune nei bambini al di sotto dei 2 anni. Alcune LMA sono contraddistinte da caratteristiche cliniche peculiari. La tendenza a infiltrare i tessuti, tipica delle M4 e M5, determina nel 25% dei pazienti ipertrofia gengivale e meno frequentemente interessamento cutaneo con noduli violacei a consistenza dura o invasione del sistema nervoso centrale. Dolori ossei sono sintomatici di localizzazioni al tessuto scheletrico. La malattia può esordire anche come coagulazione intravasale disseminata; questo aspetto è presente nel 90% delle leucemie tipo M3.

### Aspetti terapeutici

Diversamente a quanto accaduto per la LLA i moderni protocolli non hanno modificato in modo significativo la prognosi della LMA. Buoni progressi sono stati fatti invece grazie al perfezionamento del trapianto allogenico o autologo di midollo.

Il cardine della terapia di prima linea è, come nel caso della LLA, la polichemioterapia, che può essere eventualmente integrata nei sottogruppi HR con il trapianto di cellule staminali emopoietiche allogenico o autologo. Il trattamento ottimale di questa patologia mira essenzialmente al controllo della malattia midollare e sistemica, mentre la profilassi della localizzazione al SNC, pur essendo una componente prevista dai vari protocolli, non si è mai dimostrata un fattore essenziale per il miglioramento della sopravvivenza. La radioterapia craniale non è necessaria né come profilassi né come trattamento della meningosi leucemica che, qualora presente, è controllata dalla sola terapia intratecale e dalla chemioterapia sistemica.

Il trattamento si articola essenzialmente in due fasi: l'induzione, con lo scopo del raggiungimento della RC, e il consolidamento/intensificazione post-remissione, necessario per rendere permanente lo stato di RC. L'induzione può essere preceduta da una pre-CTP citostatica con ARA-C nei bambini con GB $\geq$ 200.000, allo scopo di portare la conta dei bianchi sotto la soglia dei 100.000. I farmaci più efficaci nella terapia d'induzione sono

citosina arabinoside (ARA-C) antracicline (daunorubicina, idarubicina), eventualmente associate a etoposide (VP-16), tioguanina (6-TG) e corticosteroidi (desametasone). In particolare, il protocollo AIEOP LAM 2002/01-02, condiviso a livello nazionale, prevede per i due gruppi SR (rischio standard) e HR (alto rischio) due cicli ICE (ARA-C intratecale ed endovena, idarubicina ed etoposide) effettuati a distanza di 21 giorni, con un controllo dello stato midollare ai giorni 14 e 21 dall'inizio del ciclo.

A ciclo completo è prassi effettuare una tipizzazione HLA nell'eventuale necessità di un trapianto: donatore familiare HLA-identico (Allo-TMO) o autologo (Auto-TMO).

La terapia post-remissionale può consistere in una chemioterapia addizionale a cicli ripetuti oppure in una chemioterapia ad alte dosi seguita da TMO: il protocollo AIEOP LAM 2002/01-02 prevede per entrambi i gruppi di rischio un ciclo AVE (ARA-C IT, ARA-C ev, etoposide) seguito da un ciclo HAM (ARA-C IT, ARA-C ev, mitoxantrene), entrambi associati a un controllo midollare a 21 giorni. Nel gruppo SR il consolidamento verrà terminato da un ciclo di ARA-C HD (alte dosi). Studi clinici condotti nell'adulto e confermati da controlli su popolazioni pediatriche hanno dimostrato come alte dosi di ARA-C siano maggiormente efficaci rispetto a dosi standard, specie in pazienti con t(8;21) o inv(16). Nei pazienti a basso rischio si preferisce dunque una terapia essenzialmente farmacologica, per evitare gli effetti collaterali a lungo termine del trapianto (essenzialmente il rigetto e tutte le conseguenze dell'immunosoppressione).

Nei i pazienti classificati come HR, al ciclo HAM segue invece il TMO. L'efficacia del trapianto di midollo nella fase di terapia post-remissionale della LAM HR è stato oggetto di studio fin dagli anni '70 e si è rivelato fondamentale in tale popolazione. In considerazione della limitata disponibilità, non più del 25% dei casi può essere sottoposto a trapianto allogenico da donatore familiare HLA compatibile. Il 60-70% dei casi con donatore familiare HLA compatibile 6/6 o 5/6 va incontro a stabile e duratura remissione in misura superiore a quella ottenibile con la sola chemioterapia o con il ricorso all'Auto-TMO. Nei pazienti a rischio standard, allo stato attuale delle conoscenze, è consigliabi-

le il ricorso all'Allo-TMO da donatore familiare solo dopo una prima ricaduta in seconda RC. Per i pazienti ad alto rischio, il ricorso al trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) in prima RC offre una maggiore probabilità di guarigione.

I protocolli vigenti prevedono dosi farmacologiche piuttosto alte, tali da provocare mielosoppressione intensa. Per questo motivo i bambini con LMA dovrebbero essere seguiti solo da centri onco-ematologici attivi presso ospedali di III livello o policlinici, secondo quanto previsto dalle linee guida per l'oncologia pediatrica in Italia.

– *Trapianto di midollo osseo.* Giacchè l'Allo-TMO è stato tradizionalmente considerato un trattamento post-remissionale più efficace rispetto a qualunque altro trattamento chemioterapico, la disponibilità di un donatore familiare HLA-identico ha invariabilmente determinato l'esecuzione dell'Allo-TMO nei pazienti con LMA in prima RC che disponessero di tale tipo di donatore. Per questo motivo una reale comparazione tra l'opzione di una moderna chemioterapia intensiva e quella di un Allo-TMO non è mai stata condotta in maniera randomizzata e stratificata. A questo proposito va notato che il rischio di recidiva è generalmente più basso nei pazienti sottoposti ad Allo-TMO rispetto a quelli sottoposti a moderni ed intensive schemi di chemioterapia; ciononostante, i risultati finali delle due strategie terapeutiche non differiscono molto a causa delle più elevate percentuali di mortalità correlate al TMO e per la migliore risposta alle terapie di salvataggio nei pazienti non sottoposti, in prima RC, ad Allo-TMO. Alcuni sottogruppi di LMA appaiono peraltro curabili in una elevata percentuale di casi con trattamenti di tipo esclusivamente chemioterapico. Alla luce di queste considerazioni, e delle note sequele che si osservano a lungo termine nei pazienti (soprattutto in quelli trapiantati ad età molto bassa) sottoposti ad Allo-TMO, la scelta di sottoporre oggi un paziente ad Allo-TMO viene valutata da alcuni gruppi internazionali con particolare attenzione. In generale l'uso dell'Allo-TMO in prima RC non è raccomandato nei soggetti che abbiano fattori prognostici favorevoli quali (inv16), t(8;21), t(15;17) o la trisomia costituzionale del cromosoma 21, ammesso che abbiano ottenuto la RC. Il TMO da donatore HLA identico non-consanguineo (MUD) viene oggi

riservato solamente a ristretti sottogruppi di LMA, quali per esempio quelle di derivazione mielodisplastica, o con monosomia del cromosoma 7 o quelle secondarie o quelle resistenti ai primi due cicli intensivi di induzione.

L'efficacia dell'Auto-TMO è stata studiata in numerosi e recenti trials clinici (32-34). Nello studio inglese MRC AML10, i bambini con LMA venivano assegnati, in maniera randomizzata e dopo aver ricevuto 4 cicli intensivi di chemioterapia, ad essere sottoposti ad un Auto-TMO oppure a non ricevere ulteriore terapia. La percentuale di ricaduta è stata significativamente più elevata nel braccio non sottoposto ad Auto-TMO mentre la sopravvivenza globale è risultata sovrapponibile per i due bracci di randomizzazione. L'AIEOP ha riportato risultati positivi nell'applicazione dell'Allo ed Auto-TMO nella LMA in 1° RC (34, 35). Per questo motivo il protocollo attualmente in uso in Italia (AIEOP LMA 2002) prevede nell'ambito della strategia terapeutica post-remissionale un ampio uso delle procedure trapiantologiche.

## ■ LA GESTIONE GLOBALE DEL BAMBINO CON LEUCEMIA

Quando ad un bambino viene posta la diagnosi di patologia grave o cronica inizia per lui e per la sua famiglia un cammino particolarmente lungo e difficoltoso che deve durare per tutto il decorso delle cure (circa due anni) e oltre. La presa in carico, cioè il prendersi cura di tutti gli aspetti più strettamente medici ma anche psicologici e sociali in grado di aiutarlo o meglio comprendere e accettare ciò che sta succedendo, diventa indispensabile per accompagnarlo al conseguimento dell'obiettivo vera guarigione o comunque, qualora la situazione fosse più complessa, la miglior qualità di vita (36, 37). Nulla però deve essere lasciato al caso e occorre che tale strategia sia il punto di partenza di quella alleanza terapeutica (38) dove vanno a confluire tutte le potenzialità operative delle persone che ruotano intorno al bambino e alla sua famiglia in modo che operatori sanitari (medici e infermiere), istituzioni (ospedale e società), volontari, sostenitori, non agiscano come battitori liberi ma possano trovare insieme un'armonia di espressione e di operatività.

Per poter impostare una simile iniziativa occorre tenere ben in considerazione:

- a) i bisogni della famiglia e del bambino;
- b) l'importanza del medico e/o pediatra di famiglia.

La famiglia e il bambino (compatibilmente con la sua età) devono essere aiutati a comprendere la nuova realtà e le implicazioni che essa comporta sul futuro della loro vita e sui cambiamenti che la famiglia dovrà affrontare; avere certezze sulla diagnosi ed essere informati sulle caratteristiche della malattia, sulla prognosi e le possibilità di cura; non sentirsi isolati, avere fiducia nel centro e nei medici curanti, poter contare su un'equipe multidisciplinare e sul proprio pediatra curante in grado di infondere fiducia e capacità di reazione positiva nell'impegno a sconfiggere la malattia.

Per quanto riguarda più specificamente il medico/pediatra di famiglia deve assistere la famiglia nella definizione del programma di cura: assicurare al bambino un momento di continuità con la realtà precedente; saper infondere fiducia nella famiglia ed aiutarla nelle eventuali necessità di scelte difficili ed impegnative (sia in caso di evoluzione favorevole che meno favorevole).

Il percorso da fare è lungo e articolato e inizia con l'esordio della malattia del bambino. La comunicazione di diagnosi alla famiglia e al bambino contraddistinguono l'avvio di questo cammino dove più che la diagnosi occorre comunicare l'intero progetto di cura (37).

Progetto quindi è tutto ciò che ruota intorno al bambino e alla famiglia e tutto ciò che la malattia comporta; progetto è qualcosa di più che semplice diagnosi, dei soli termini scientifici e tecnici, progetto di cura apre una panoramica e un orizzonte ben più ampi: quali sono i cambiamenti da affrontare e come li aiutiamo ad affrontarli e con che mezzi e con l'aiuto di chi.

La comunicazione di diagnosi deve essere fatta all'intera famiglia e al bambino ed eventuali fratelli da parte del medico in sessioni separate (39). La modalità con cui instaurare e realizzare la comunicazione nella varie fasi di una malattia è quella del dialogo. La comunicazione non è una lezione di medicina ma un entrare in sintonia con il bambino.

Questo dialogo deve proseguire anche durante tutto il decorso delle cure, al momento dell'inter-



ruzione delle cure stesse e nel tempo successivo quando il bambino diventa un soggetto guarito (40). Attualmente 1/900 giovani adulti è un guarito da tumore infantile... lo dice la storia, lo dicono i numeri raccolti a livello nazionale e internazionale. Il protagonista di questa presa in carico è senza dubbio il bambino che pertanto va ascoltato, e non è facile, va rispettato, e non solo protetto, va aiutato, ma anche fatto divertire.

Il co-protagonista invece è la famiglia e tutti i passaggi di ogni intervento devono avvenire attraverso la famiglia: la famiglia deve capire, convincersi, ascoltare e mediare con il bambino.

I referenti sono tutti i membri dell'*équipe* assistenziale e possono essere tanti: medici, infermiere, psicologa, assistente sociale, arte-terapista, pedagogista, insegnanti, educatori, volontari, clown-dottori, associazioni.

Tutti gli interventi di tutti gli operatori devono però essere armoniosi e calibrati, per poter offrire al bambino e famiglia la miglior qualità di vita. È indispensabile un lavoro di coordinamento che faciliti l'inserimento delle diverse figure e la comunicazione interdisciplinare attraverso vari passaggi: la selezione, quando possibile; la formazione-informazione; l'aggiornamento; il monitoraggio costante e la verifica dell'efficacia degli interventi. La presa in carico attraverso sia gli operatori che i vari passaggi deve favorire la ripresa della vita sociale del bambino (e della famiglia) al più alto livello possibile. E quando si parla di ripresa della vita sociale si intende soprattutto ripresa della scuola (41). La scuola è oggi nella nostra realtà un modello funzionale ben consolidato e strutturato. È presente (come elementare e media) nei vari centri italiani da diversi anni e si propone come elemento di normalizzazione della vita dei bambini ricoverati. L'obiettivo generale della scuola in ospedale è quello di assicurare al bambino malato la continuità del suo sviluppo educativo anche nel momento problematico della malattia, mantenendo uno stretto collegamento con la scuola di appartenenza nei momenti dell'esordio della malattia, in itinere e al momento del reinserimento. Il percorso educativo si sviluppa nelle fasi fondamentali di accoglienza, di attività didattica e di reinserimento nella scuola di appartenenza utilizzando anche nuove tecnologie, come la videoconferenza e *internet*, in grado di mantenere reale

un'apertura della scuola verso l'ambiente esterno. Nulla deve essere lasciato al caso e, tutto nei limiti del possibile, deve essere opportunamente e adeguatamente organizzato. Solo così gli interventi dei diversi operatori possono mantenere quella continuità anche in loro assenza, quella genuinità come interscambio efficace e quella veridicità come realizzazione concreta che costituiscono il vero aiuto all'intero nucleo familiare. Essere informati non vuol dire capire ma condividere, accogliere non vuol dire comunicare ma dedicare tempo, dedizione, impegno, professionalità e omogeneità, caratteristiche indispensabili di un intervento che possa accompagnare positivamente il bambino e i suoi genitori attraverso il duro cammino della malattia (42, 43).

### **Il concetto di resilienza**

Con la guarigione è possibile che nel soggetto si generino effetti positivi, acquisendo talvolta una maggiore maturità emotiva e scoprendo una nuova prospettiva di vita; nelle situazioni stressanti si attivano infatti strategie di coping che mirano al mantenimento di un'immagine di sé positiva (44). Negli ultimi anni, sicuramente anche grazie al miglioramento delle terapie e alla conseguente minimizzazione degli effetti neurotossici, si è affermata sempre di più l'idea che i guariti da leucemia in età pediatrica siano individui capaci di sviluppare la resilienza.

Fondamentale è fornire una definizione accurata del termine, in quanto sia gli psicologi che i clinici ritengono sia un concetto che possa essere considerato sotto molteplici punti di vista. Il carattere, la stima di sé e le capacità intellettive sono solo alcuni dei parametri che sono generalmente presi in considerazione nella valutazione del concetto di resilienza. Diversi studi (44, 45) mostrano come tali parametri migliorino progressivamente negli anni dopo la diagnosi, delineando la resilienza come un processo e non come un'acquisizione istantanea. Appare evidente quanto importanti e significative siano state le misure di sostegno psicologico, le quali, quando correttamente messe in atto, rendono di fatto i malati maggiormente in grado di diventare resilienti.

La resilienza essendo un processo e non una qualità fissa, per definizione è suscettibile di variazioni col passare del tempo. I soggetti resilienti non

sono dunque da considerare come soggetti che per tutta la durata della loro vita saranno insensibili e inattaccabili dagli eventi avversi, ma semplicemente come individui maggiormente capaci di adattarsi alle situazioni stressanti, per lo meno nel momento in cui vengono valutati.

Il progressivo consolidamento di questo pensiero, ha fatto sì che dal concetto di invulnerabilità si sia progressivamente passati a quello di resilienza, definita come la capacità di fronteggiare con successo le avversità (46).

La resilienza si configura durante il processo di cura più come pensiero positivo, capacità che rende i bambini in grado di affrontare le pesanti terapie a cui vengono sottoposti. Al termine delle cure il bambino evolve verso la capacità di superare l'esperienza traumatica e la rimozione dei sentimenti negativi tramite un processo simile alla memoria selettiva. Il soggetto mette dunque in atto due tipi diversi di negazione: un primo al momento della terapia (non pensare alle cure), e un secondo una volta guarito (non pensare al periodo di malattia: rimozione selettiva).

Alcuni moderni studi sulla resilienza descrivono il bambino sopravvissuto al tumore quasi come un superbambino: attivo, energico, positivo, maturo e sicuro di sé e del proprio futuro. Non bisogna invece mai sottovalutare che, sebbene le ricerche non sempre li evidenzino, questi bambini o giovani adulti sopravvissuti hanno sicuramente parecchi aspetti di vulnerabilità, che potrebbero emergere una volta superato l'avvenimento acuto.

La promozione dei programmi di aiuto psicologico è indispensabile per far sì che i bambini e gli adolescenti ricoverati sviluppino le competenze atte a far sì che la terapia dia come esito la guarigione globale del soggetto, intesa come stato di completo benessere fisico, psichico e sociale e non semplice assenza di malattia. Anche la famiglia è stata identificata da più di uno studio come strumento necessario per il supporto del bambino e lo sviluppo della resilienza (47, 48). Gli stessi studi evidenziano anche l'importanza del supporto esterno (scolastico, relazioni con i coetanei, attività ricreative...). Non ci sono però al momento evidenze monofattoriali di come il contesto sociale, in particolar modo quello familiare, possa influenzare positivamente lo sviluppo della resilienza nei bambini con diagnosi di tumore.

### ***I guariti dalla leucemia***

L'obiettivo della terapia delle LLA e LMA è la guarigione globale, intesa secondo il concetto di salute della WHO come benessere fisico, psicologico, e sociale. A tal scopo, fin dai primi mesi della diagnosi è importante assicurare al bambino e alla famiglia un forte sostegno per superare nel modo migliore il trauma della malattia. Garantire un supporto psicologico a lungo termine costituirebbe però un problema di ampie dimensioni, considerando che il numero dei bambini affetti dalla leucemia curati con successo è in continuo aumento. Negli ultimi 40 anni il tasso di guarigione dei malati di LLA, la forma più comune di tumore infantile, è passato dallo 0 a oltre l'80%. Nel registro italiano fuori terapia (ROT) dopo leucemia-tumore insorto in età pediatrica, i lungo sopravvissuti (o meglio, guariti) hanno raggiunto recentemente il numero di 16.531, con un aumento annuo compreso tra 900 e 1.000 casi.

Lo *status* di guarito si assume dopo 5 anni liberi da malattia dall'interruzione delle cure. Si può pensare che ci sia da parte dei pediatri di tali bambini una certa riluttanza a usare la parola "guarito" nel parlare ai pazienti o alle famiglie, per via delle possibili conseguenze a lungo termine, fisiche e psicologiche, che la terapia e la malattia stessa portano con sé. Al contrario, uno studio condotto a livello europeo mette in luce come l'80% dei pediatri utilizzi questa parola con una certa confidenza nel colloquio con i pazienti (49). Nel caso delle leucemie pediatriche, le cure mediche sono senza dubbio un punto decisivo per l'individuo e la famiglia, sebbene il suo pieno significato psicologico non sia ancora stato sufficientemente indagato (50). Lo stesso diradarsi delle visite di *follow-up* dall'oncologo è espressione del diminuito bisogno medico di una rivalutazione frequente del paziente. Tali cambiamenti, compresa l'acquisizione dello *status* di guarito, hanno un particolare valore emotivo e sono dunque importanti per la salute globale del paziente e il suo ritorno alla vita normale da persona sana.

### **■ CONCLUSIONI**

Negli ultimi due decenni notevoli progressi sono stati ottenuti sia nella conoscenza dei meccani-

smi biologici che nel trattamento della LLA e della LMA dell'età pediatrica. Grazie all'attuale possibilità di assegnazione dei pazienti a specifiche fasce di rischio in base ad affidabili criteri prognostici, all'uso di aggressivi schemi di terapia, del trapianto di midollo osseo e di una efficace terapia di supporto, circa l'80% dei bambini con LLA e circa il 50% di quelli con LMA possono essere oggi guariti.

Una moderna diagnosi di LLA viene oggi eseguita attraverso la valutazione di aspetti morfologici, citochimici, citogenetici e di espressione genica. Questi fattori, insieme alla valutazione della risposta iniziale al trattamento valutato in termini di riduzione della quota blastica nel sangue periferico o nell'aspirato midollare, concorrono ad una accurata stratificazione dei pazienti e ad un trattamento basato sul rischio di recidiva. La misurazione della MRM, il cui livello riflette indirettamente sia le caratteristiche genetiche dei blasti leucemici che variabili di tipo farmacogenetico/farmacodinamico, rappresenta oggi il più affidabile fattore prognostico. La disponibilità della misurazione della MRM può quindi consentire, nell'ambito di clinical trials controllati, la riduzione dell'intensità del trattamento nelle categorie di pazienti con eccellente risposta al trattamento iniziale ed una intensificazione invece del trattamento stesso in quelli con prognosi scadente, per i quali possono anche essere scelte procedure maggiormente impegnative quali quelle trapiantologiche. Il trattamento della LLA in generale prevede alcune fasi intensive, di durata variabile, seguite da una fase prolungata di mantenimento, per una durata totale che per la maggior parte dei gruppi cooperativi è di 2 anni.

Anche per quanto riguarda la LMA esistono sottogruppi ben individuabili sulla base di criteri morfologici, genetici e di espressione genica. L'uso della MRM sembra promettente nell'individuare in maniera precisa il rischio di recidiva. In generale, i cardini del trattamento consistono nell'ottenimento e nel consolidamento della remissione completa con schemi di terapia caratterizzati dall'uso di pochi farmaci, usati spesso a dosi elevate e somministrati in schemi della durata di pochi giorni (blocchi). La durata globale del trattamento è solitamente di circa 4-6 mesi e non prevede, in generale, alcuna terapia di mantenimen-

to. Nel trattamento post-remissionale della LMA le procedure trapiantologiche hanno indicazioni più ampie rispetto alle LLA; ciononostante, alla luce dei notevoli effetti collaterali a breve e lungo termine associati al trapianto di midollo osseo, viene ritenuto di estrema importanza in questi pazienti una accurata valutazione del rapporto rischio/beneficio.

Negli ultimi anni particolare attenzione è stata anche dedicata, da parte di numerosi gruppi cooperativi internazionali:

- alla realizzazione di accurati programmi di *follow-up* a breve e lungo termine con l'intenzione di monitorare, eventualmente prevenire e tempestivamente trattare eventuali patologie secondarie alle cure somministrate per il trattamento *front-line* della leucemia acuta;
- all'assistenza psicosociale oggi indispensabile per garantire quella qualità di vita necessaria a legittimare i successi terapeutici.

#### *Ringraziamenti*

*Si ringrazia Carla Manganini per l'eccellente lavoro segretariale di editing e revisione del lavoro.*

## ■ BIBLIOGRAFIA

1. Pui CH, Carroll W, Meshinchi S, Arceci R. Biology, risk stratification and therapy of pediatric leukemias: an update. *Journal Clinical Oncology*. 2011; 29: 551-65.
2. Greaves M, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003; 102: 2321-33.
3. Cazzaniga G, van Delft FW, Lo Nigro L, Ford AM, Score J, Iacobucci I, et al. Developmental origins and impact of BCR-ABL1 fusion and IKZF1 deletions in monozygotic twins with Ph+ acute lymphoblastic leukaemia. *Blood*. 2011; 118: 5559-64.
4. Bateman CM, Colman SM, Chaplin T, Young BD, Eden TO, Bhakta M, et al. Acquisition of genome-wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010; 115: 3553-8.
5. Harrison CJ. Cytogenetics of pediatric and adolescent acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol*. 2009; 144: 147-56.
6. Mullighan C. Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best Practise & Research Clin Haematol*. 2011; 24: 489-503.
8. Trentin L, Giordan M, Dingermann T, Basso G, Te Kronnie G, Marschalek R. Two independent gene signatures in pediatric t(4;11) acute lymphoblastic leukemia patients. *Eur J Haematol*. 2009; 85: 406-19.

9. Kang H, Wilson CS, Harvey RC, Chen IM, Murphy MH, Atlas SR, et al. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2012; 119: 1872-81.
10. Farber S. Chemotherapy in the treatment of leukemia and Wilms' tumor *JAMA*. 1966; 198: 826-36.
11. Sansone G, Leva R, Piga A. Modern therapy of acute leukemia in children; results in 24 cases]. *Minerva Pediatr*. 1954; 6: 471-3.
12. Pinkel D. Curability of childhood cancer. *JAMA* 1976; 235: 1049-50.
13. Henze G, Langermann HJ, Ritter J, Schellong G, Riehm H. Treatment strategy for different risk groups in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the BFM Study Group. *Haematol Blood Transfus*. 1981; 26: 87-93.
14. Howard SC, Marinoni M, Castillo L, Bonilla M, Tognoni G, Luna-Fineman S, et al. MISPHO Consortium Writing Committee. Improving outcomes for children with cancer in low-income countries in Latin America: a report on the recent meetings of the Monza International School of Pediatric Hematology/Oncology (MISPHO). *Pediatr Blood Cancer*. 2007; 48: 364-9.
15. Conter V, Aricò M, Valsecchi MG, Rizzari C, Testi AM, Messina C, et al. Extended intrathecal methotrexate may replace cranial irradiation for prevention of CNS relapse in children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia treated with Berlin-Frankfurt-Munster-based intensive chemotherapy. *The Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica. J Clin Oncol*. 1995; 13: 2497-502.
16. Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*. 2009; 360: 2730-41.
17. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN, et al. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. *N Engl J Med*. 1998; 338: 1663-71.
18. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Leukemia*. 2000; 14: 2205-22.
19. Pui CH, Boyett JM, Rivera GK, Hancock ML, Sandlund JT, Ribeiro RC, et al. Long-term results of total therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St. Jude Children's research Hospital. *Leukemia* 2000; 14: 2286-94.
20. Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA, Sensel MG, Sather HN, Hammond GD, et al. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. *Leukemia*. 2000; 14: 2223-33.
21. Conter V, Aricò M, Valsecchi MG, Basso G, Biondi A, Madon E, et al. Long term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Acute Lymphoblastic Leukemia studies, 1982-1995. *Leukemia*. 2000; 14: 2196-204.
22. Aricò M, Valsecchi MG, Rizzari C, et al. Long-term results of the AIEOP-ALL-95 trial for childhood acute lymphoblastic leukemia: insight on the prognostic value of DNA index in the framework of Berlin-Frankfurt-Muenster based chemotherapy. *Clin Oncol*. 2008; 26: 283-9.
23. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet*. 1998; 352: 1731-8.
24. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *New Eng J Med*. 1998; 339: 591-8.
25. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998; 351: 550-4.
26. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leucemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010; 115: 3206-14.
27. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Late MRD response determines relapse risks overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM -ALL 2000 study. *Blood*. 2011; 118: 2077-84.
28. Kaspers GJL, Zwaan CM. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Hematologica*. 2007; 92: 1519-32.
29. Falini B, Meccucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R e al. Cytoplasmic Nuclophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. The GIMEMA acute leukemia working party. *N Eng J Med*. 2005; 352: 256-66.
30. Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G e al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood*. 2007; 110: 979-80.
31. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Zhang Q, Sweetser DA e al. Activating mutations of RTK/ras signal trasduction pathway in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003; 102: 1474-9.
32. Hann IM, Stevens RF, Goldstone AH, Rees JK, Wheatley K, Gray RG, et al. Randomized comparison of DAT versus ADE as induction chemotherapy in children and younger adults with acute myeloid leukemia. Results of the Medical Research Council's 10th AML trial (MRC AML10). Adult and Childhood Leukaemia Working Parties of the Medical Research Council. *Blood*. 1997; 89: 2311-8.

33. Creutzig U, Ritter J, Zimmermann M, Hermann J, Gadner H, Sawatzki DB, et al. Idarubicin improves blast cell clearance during induction therapy in children with AML: results of study AML-BFM 93. *Leukemia*. 2001; 15: 348-54.
34. Locatelli F, Labopin M, Ortega J, Meloni G, Dini G, Messina C, et al. Factors influencing outcome and incidence of long-term complications in children who underwent autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission. *Blood*. 2003; 101: 1611-9.
35. Dini G, Boni L, Abla O, Uderzo C, Polchi P, Locatelli F, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in children with acute myelogenous leukemia in first remission. *Bone Marrow Transplant*. 1994; 13: 771-6.
36. Masera G, Jankovic M, Adamoli L, Corbetta A, Fraschini D, Lia R, et al. The psychosocial program for childhood leukemia in Monza, Italy. *Ann N Y Acad Sci*. 1997; 824: 210-20.
37. Masera G, Chesler MA, Jankovic M, Ablin AR, Ben Arush MW, Breatnach F, et al. SIOP Working Committee on psychosocial issues in pediatric oncology: guidelines for communication of the diagnosis. *Med Pediatr Oncol*. 1997; 28: 382-5.
38. Masera G, Spinetta JJ, Jankovic M, Ablin AR, Buchwall I, Van Dongen-Melman J, et al. Guidelines for a therapeutic alliance between families and staff: a report of the SIOP working committee on psychosocial issues in pediatric oncology. *Med Pediatr Oncol*. 1998; 30: 183-6.
39. Spinetta JJ, Jankovic M, Eden T, Green D, Martins AG, Wandzura C, et al. Guidelines for assistance to siblings of children with cancer: report of the SIOP Working Committee on Psychosocial Issues in Pediatric Oncology. *Med Pediatr Oncol*. 1999; 33: 395-8.
40. Masera G, Chesler M, Jankovic M, Eden T, Nesbit ME, Van Dongen-Melman J, et al. SIOP Working Committee on Psychosocial issues in pediatric oncology: guidelines for care of long-term survivors. *Med Pediatr Oncol*. 1996; 27: 1-2.
41. Masera G, Jankovic M, Deasy-Spinetta P, Adamoli L, Ben Arush MW, Challinor J, et al. SIOP Working Committee on Psychosocial Issues in Pediatric Oncology: guidelines for school/education. *Med Pediatr Oncol*. 1995; 25: 429-30.
42. Masera G, Spinetta JJ, Jankovic M, Ablin AR, D'Angio GJ, Van Dongen-Melman J, et al. Guidelines for assistance to terminally ill children with cancer: a report of the SIOP Working Committee on psychosocial issues in pediatric oncology. *Med Pediatr Oncol*. 1999; 32: 44-8.
43. Spinetta JJ, Jankovic M, Masera G, Ablin AR, Barr RD, Ben Arush MW, et al. Optimal care for the child with cancer: A summary statement from the SIOP Working Committee on Psychosocial Issues in Pediatric Oncology. *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 52: 904-7.
44. Harila MJ, Niinivirta TIT, Winqvist S, Harila-Saari AH. Low depressive symptom and mental distress scores in adult long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Ped Hemat Onc*. 2011; 33: 194-8.
45. Jörmgården, Mattsson E, von Essen L. Health-related quality of life, anxiety and depression among adolescents and young adults with cancer: A prospective longitudinal study. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 1952-8.
46. Stewart M, Reid G, Mangham C. Fostering children's resilience. *J Pediatr Nurs*. 1997; 12: 21-31.
47. Enskär K, Carlsson M, Golsäter M, Hamrin E. Symptom distress and life situation in adolescents with cancer. *Cancer Nursing*. 1997; 20: 23-33.
48. Novakovic B, Fears T, Wexler L, McClure L, Wilson D, McCalla J, Tucker M. Experience of cancer in children and adolescents. *Cancer Nursing*. 1996; 19: 54-9.
49. Haupt R, Spinetta JJ, Ban I, Barr RD, Beck JD, Byrne J, et al. International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group Early and Late Toxicity Educational Committee (I-BFM-SG ELTEC). Long term survivors of childhood cancer: cure and care. The Erice statement. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 1778-80.
50. Kazak AE. Posttraumatic distress in childhood cancer survivors and their parents. *Med Pediatr Oncol*. 1998; (Suppl. 1): 60-8.



# Sindromi mieloproliferative croniche



Fiorina Giona

## FIORINA GIONA

*Ematologia, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università degli Studi di Roma "Sapienza"*

### ■ INTRODUZIONE

Le sindromi mieloproliferative croniche, tipiche patologie dell'età adulta, classicamente sono considerate malattie clonali della cellula staminale emopoietica, caratterizzate dalla proliferazione di una o più linee mieloidi e comprendono:

- la leucemia mieloide cronica (LMC), caratterizzata dalla presenza del cromosoma Philadelphia (Ph+) e/o dal riarrangiamento BCR-ABL;
- la trombocitemia essenziale (TE), la policitemia vera (PV), e la mielofibrosi primitiva (MP), definite nella classificazione WHO del 2008 neoplasie mieloproliferative BCR-ABL negative (1). A differenza della LMC, questi disordini possono presentare alterazioni genetiche e cromosomiche eterogenee e non patognomoniche.

Recentemente, per le forme pediatriche è stata proposta la definizione di malattie o sindromi mieloproliferative croniche (SMC), dal momento che

**Parole chiave:** leucemia mieloide cronica, trombocitemia sporadica, trombocitosi ereditaria, policitemia sporadica, policitemia ereditaria.

*Indirizzo per la corrispondenza*

Fiorina Giona  
Ematologia  
Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia  
Università degli Studi di Roma "Sapienza"  
Via Benevento, 6 - 00161 Roma  
E-mail: fiorinagiona@gmail.com

nei bambini molte forme sono policlonali e/o derivanti da mutazioni genetiche familiari (2). Inoltre, per la rarità delle forme con caratteristiche simili a quelle dell'adulto, nei bambini la TE viene più appropriatamente definita trombocitemia sporadica (TS) e la PV policitemia sporadica (PS).

### ■ LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

La LMC rappresenta meno del 3% di tutte le leucemie pediatriche, con un'incidenza che aumenta con l'età. È eccezionale nei neonati (finora è stato riportato un solo caso con una diagnosi a 12 mesi) (3). L'incidenza annuale incrementa con l'età: nei soggetti di età <14 anni è di 0.7 per milione mentre negli adolescenti (fino a 20 anni) è di 1.2 per milione (4).

La storia naturale della LMC pediatrica, analogamente a quanto si osserva negli adulti, si contraddistingue per l'inevitabile evoluzione dalla fase cronica (FC) alla crisi blastica (CB), attraverso una fase intermedia non sempre identificabile, a lenta progressione, definita fase accelerata (FA). Circa il 95% dei bambini viene diagnosticato in FC, mentre il rimanente 5% viene diagnosticato in fase più avanzata. La LMC che colpisce i bambini è caratterizzata dalla stessa traslocazione bilanciata presente negli adulti, la t(9;22)(q34;q11). Il risultato è la formazione di un gene ibrido, BCR-ABL, derivante dalla fusione del proto-oncogene c-ABL (originariamente situato sul cromoso-

ma 9) con il BCR (*breakpoint cluster region*), localizzato sul cromosoma 22. In base al punto di rottura del BCR si possono avere trascritti diversi, di cui i più frequenti, b2a2 e b3a2, sono a carico di una specifica regione (M-BCR) e possono anche manifestarsi simultaneamente, mentre altri riarrangiamenti che avvengono al di fuori della regione M-BCR sono rari (2%). Anche nelle leucemie acute (LA) del bambino Ph<sup>+</sup>, i punti di rottura della t(9;22) si trovano nelle stesse regioni del gene BCR sul cromosoma 22. BCR-ABL codifica per una tirosin-chinasi (TK) costitutivamente attiva, una proteina di peso molecolare variabile da 210 kDa, come si osserva nella LMC, a 190 kDa come più frequentemente si riscontra nella LA linfoide (LLA) della linea B. Nei casi in cui l'esordio della malattia è caratterizzata da una CB, senza una precedente FC identificabile, è impossibile discriminare una CB di LMC da una LA Ph<sup>+</sup>.

La strategia terapeutica nella LMC pediatrica si basa sui dati derivati da studi condotti su popolazioni di adulti, tenendo presente che nella scelta è implicito l'obiettivo da raggiungere: l'eradicazione della malattia, cioè la guarigione. Ad oggi, il trapianto rimane l'unica terapia in grado di guarire la LMC, anche se recentemente è stata prospettata la stessa possibilità in categorie ben definite di adulti utilizzando l'imatinib, un'inibitore delle TK (5).

Data la rarità di questa patologia in età pediatrica, i dati finora disponibili sulla LMC nei bambini non risolvono ancora completamente alcuni quesiti, inevitabili nell'era degli inibitori delle TK.

### **Caratteristiche biologiche**

È noto che il gene ibrido BCR-ABL gioca un ruolo causale nella patogenesi della LMC e che il processo della sua formazione è multifattoriale e multistep, e richiede un periodo di latenza molto lungo e variabile (circa 10 anni) prima di essere completato, come dimostrato da recenti dati biologici e da modelli matematici (6). Tuttavia, i casi di LMC osservati in bambini molto piccoli, addirittura di un anno di età (3), suggeriscono che gli eventi trasformativi possono avvenire in un arco di tempo molto ristretto e portare allo sviluppo di un clone maligno in un tempo molto più breve rispetto a quanto ipotizzato per l'adulto. Le cellule con riarrangiamento BCR-ABL presentano

una proliferazione incontrollata ed un blocco dell'apoptosi, che sono il risultato sia dell'attivazione di una complessa rete di segnali all'interno della cellula che della mancata risposta ai meccanismi di regolazione molecolare che governano la crescita e la differenziazione dei progenitori emopoietici. Inoltre, la proteina di fusione BCR-ABL, avendo perduto la sua funzione nel processo di riparazione del DNA in seguito a stress genotossici, favorisce l'instaurarsi di un'instabilità genomica generalizzata che è alla base delle mutazioni geniche e/o alterazioni cromosomiche addizionali che determinano l'evoluzione della malattia dalla FC alla CB (7). C'è da aggiungere che la proteina di fusione BCR-ABL agisce in sinergia con diversi altri eventi genetici e cellulari che si accumulano nel tempo e che inevitabilmente portano alla CB (6). Recentemente, è stato dimostrato che la progressione di malattia è dovuta all'instabilità cromosomica dei progenitori leucemici della LMC causata dalla continua generazione di lesioni cromosomiche instabili attraverso ripetuti cicli di rottura e riparazioni (8).

Non sembrano esserci predisposizioni genetiche o etniche che favoriscono l'insorgenza della malattia. Nei bambini, non è stato dimostrato il ruolo causale di alcuni fattori di rischio, quali le radiazioni ionizzanti e altri agenti ambientali, considerati per lo sviluppo della patologia negli adulti. Finora, non sono state identificate differenze biologiche nel processo di leucemogenesi nei pazienti di età differenti. Tuttavia, fattori legati all'ospite possono influenzare il decorso clinico sia dei pazienti in trattamento con gli inibitori delle TK (metabolismo dei farmaci) sia di quelli sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali (TACS), che tende ad essere migliore nei bambini probabilmente per una minore incidenza di disfunzioni d'organo legate all'età e all'assenza di patologie croniche (3).

Dal punto di vista ematologico, all'esordio della malattia i bambini presentano un'iperleucocitosi di grado più elevato rispetto agli adulti, in genere associata a splenomegalia (70%) e trombocitosi (60%). Un recente studio su un'ampia casistica pediatrica ha dimostrato che nei bambini, come negli adulti, specifici trascritti BCR/ABL, sono associati più frequentemente ad alterazioni ematologiche particolari, come ad esempio il

trascritto b3a2 ad un più elevato numero di piastrine. Al contrario di quanto riscontrato negli adulti, la frequenza dei diversi tipi di trascritto BCR-ABL sembra essere diversa nella popolazione pediatrica, in cui è riportata una prevalenza del trascritto b2a2 rispetto al b3a2 (9).

### Strategie terapeutiche

La terapia della LMC ha subito un profondo cambiamento negli ultimi anni con l'avvento di un farmaco, l'imatinib mesilato, in grado di inibire selettivamente alcune TK implicate nel processo di oncogenesi. Prima dell'introduzione nella pratica clinica dell'Imatinib, il TACS era considerato la terapia eradicante standard per i bambini con LMC.

L'azione curativa del TACS è legata essenzialmente all'effetto *graft-versus-leukemia* (GVL) come dimostrato dall'efficacia dei linfociti del donatore

nel trattamento delle recidive dopo trapianto. Fino a metà degli anni '80, quei pazienti che non potevano beneficiare della procedura trapiantologica, venivano trattati con terapia citoriduttrice ed il farmaco più frequentemente utilizzato era l'idrossiurea (HU), capace di ridurre rapidamente la massa cellulare inducendo una buona remissione clinica ed ematologica in più del 90% di pazienti adulti e bambini con LMC, senza, però, portare ad un prolungamento della sopravvivenza.

Nel 1983 sono state riportate delle risposte ematologiche in pazienti con LMC trattati con Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (10), che dal 1985 fino al 2000 è stato utilizzato sistematicamente sia negli adulti che nei bambini, da solo o in associazione con la citosina-arabina, con un significativo prolungamento della sopravvivenza. I dati disponibili su bambini con LMC trattati con IFN- $\alpha$  sono molto scarsi, tuttavia i risultati ottenuti, anche se mol-

| Autore/<br>referenza          | Numero<br>pazienti/fase<br>di malattia/<br>terapia                         | Risposta                                                                                                                                                                        | Outcome                                                                        | Note                                                                                                                                                            |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dow LW et al.,<br>1991 (11)   | 15 pazienti<br>con LMC in FC<br><br>IFN- $\alpha$                          | Risposta ematologica completa<br>= 66,5% (10/15 pazienti)                                                                                                                       | 2 pazienti vivi<br>in RCiM                                                     | 10 pazienti hanno sospeso<br>l'IFN- $\alpha$ per scarsa risposta<br>o effetti collaterali                                                                       |
| Millot F et al.,<br>2002 (12) | 12 pazienti con<br>LMC in FC<br>6 IFN- $\alpha$ + ARA-C<br>6 IFN- $\alpha$ | Risposta ematologica completa<br>= 83% (10/12 pazienti)<br>RCiM = 41,5% (5/12 pazienti)                                                                                         | 5 pazienti vivi<br>in RCiM                                                     | Studio multicentrico<br>randomizzato (IFN- $\alpha$ vs<br>ARA-C + IFN- $\alpha$ )                                                                               |
| Giona F et al.,<br>2005 (13)  | 30 pazienti con<br>LMC in FC<br><br>IFN- $\alpha$                          | Risposta ematologica completa<br>= 94,5% (17/18 pazienti valutabili)<br><br>RCiM = 65% (11/17 pazienti)<br>RCiC = 23,5% [4/11 (36%)<br>pazienti con RCiM]<br>RMC = 3/4 con RCiC | Sopravvivenza<br>globale a 8 anni<br>= 63% con IFN- $\alpha$<br>e 62% con TACS | Studio monocentrico<br>retrospettivo italiano<br>con un follow-up<br>mediano di 8 anni<br>13 TACS (familiare HLA+<br>e/o non rispondenti<br>all'IFN- $\alpha$ ) |
| Millot F et al.,<br>2006 (14) | 14 pazienti<br><br>IFN- $\alpha$ + ARA-C                                   | Risposta ematologica completa<br>entro 3 mesi = 7/14 pazienti<br>RCiM = 50% (7/14 pazienti)<br>RCiC entro 12 mesi = 2/7 pazienti                                                | 13/14 (93%) hanno<br>ricevuto TACS<br>8/13 (61,5%) vivi<br>in RCiC             | Studio pluricentrico<br>pediatrico (12 centri)<br>8 pazienti hanno<br>lasciato la terapia<br>per eventi avversi<br>di grado 3 e 4                               |

FC = fase cronica; RCiM = risposta citogenetica maggiore; RCiC = risposta citogenetica completa; RMC = risposta molecolare completa; TACS = trapianto allogenico di cellule staminali; IFN- $\alpha$  = interferon- $\alpha$ .

**TABELLA 1** - Risultati della terapia con interferon- $\alpha$  in pazienti pediatrici con LMC.

to variabili, sono simili a quelli riportati negli adulti: una risposta ematologica è stata osservata in una percentuale di pazienti variabile dal 66.5% al 94.5%, una risposta citogenetica maggiore nel 41.5-65% e una sopravvivenza globale a 8 anni del 63% (11-14) (Tabella 1).

– *Trapianto di cellule staminali allogeniche.* Sono stati finora pubblicati pochi studi retrospettivi riguardanti il TACS nei bambini con LMC (Tabella 2), da cui emerge che i risultati del trapianto sono condizionati da diversi fattori, simili a quelli identificati nei pazienti adulti, quali: la fase di malattia in cui è stato eseguito il trapianto (FC o fase avanzata), la fonte di cellule staminali utilizzata (dona-

tore familiare o volontario) e l'intervallo di tempo tra la diagnosi di LMC ed il trapianto (15-18).

Per quanto riguarda i risultati dei TACS tra il 1982 ed il 2004, nei bambini in FC trapiantati da donatore familiare compatibile l'EFS (sopravvivenza libera da eventi) a 3-5 anni è risultata del 63-73% con una OS (sopravvivenza complessiva) del 75-87% (15-17), mentre in quelli trapiantati da donatore volontario compatibile l'andamento era peggiore (EFS variabile dal 27% al 55% e un'OS del 45-65%) (15-18) per una maggiore incidenza di *graft-versus-host disease* (GVHD), sia acuta che cronica. Anche nei bambini trapiantati in fase avanzata (FA, CB o 2° fase cronica) la pro-

| <i>Autore/referenza/<br/>periodo di<br/>reclutamento</i> | <i>Numero<br/>di pazienti</i>                                               | <i>Tipo di<br/>donatore e<br/>stato di malattia</i>                                                                                                                                                                   | <i>Outcome</i>                                                                                                                    | <i>Commenti</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Millot F et al.,<br>2003 (15)<br>1982-1998               | 76 pz                                                                       | MSD: 60 pz<br>VUD: 16 pz<br>1° FC → TACS da MSD<br>FA → TCSA da MSD                                                                                                                                                   | EFS a 5 anni = 61%<br>EFS a 5 anni = 27%<br>EFS a 5 anni = 73%<br>EFS a 5 anni = 32%                                              | Studio retrospettivo multicentrico francese<br>Elevata probabilità di recidiva a 5 anni<br>nei pazienti trapiantati in FA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Cwynarski K<br>et al., 2003 (16)<br>1985-2001            | 314 pz<br><br>253 pz in 1° FC<br>(61 pz in FC>1)                            | MSD = 182 pz<br>VUD = 132 pz<br><br>1° FC → TACS da MSD<br>= 156 pazienti<br>1° FC → TACS da VUD<br>= 97 pazienti                                                                                                     | OS a 3 anni = 66%<br>LFS a 3 anni = 55%<br><br>OS a 3 anni = 75%<br>LFS a 3 anni = 63%<br>OS a 3 anni = 65%<br>LFS a 3 anni = 56% | Analisi retrospettiva del registro EBMT<br>Sia l'OS che la LFS sono superiori nei<br>pazienti trapiantati in 1° FC.<br>Maggiore TRM dopo trapianto da VUD<br>rispetto a quello da MSD: 35% vs 20%                                                                                                                                                                                                                                                |
| Muramatsu H<br>et al., 2010 (17)<br>1993-2005            | 125 pz<br><br>88 pz in 1° FC<br>13 pz in FC>1<br>11 pz in FA<br>13 pz in CB | VUD<br><br>55/125 TACS da<br>donatore con 10/10<br>o 9/10 HLA-match                                                                                                                                                   | OS a 5 anni = 59%<br>LFS a 5 anni = 55%                                                                                           | Analisi retrospettiva multicentrica<br>giapponese di TCSA da donatore volontario<br>17 pazienti trattati con imatinib pre-TACS<br>37/125 (30%) pazienti con malattia avanzata<br>Elevato numero di pazienti con differenze HLA                                                                                                                                                                                                                   |
| Suttorp M et al.,<br>2009 (18)<br>1995-2004              | 176 pz<br><br>144 pz in 1° C                                                | MSD = 41 pz/VUD = 108 pz<br><br>LMC-FC1 TACS da MSD = 41 pz<br>LMC-FC1 TACS da VUD = 71 pz<br>LMC-FC1 TACS da MMD = 23 pz<br><br>TACS in FC1:<br>entro 6 mesi: 49 pz<br>entro 7-12 mesi: = 52 pz<br>>12 mesi: = 43 pz | OS a 5 anni = 87%<br>OS a 5 anni = 52%<br>OS a 5 anni = 45%<br><br>OS a 5 anni = 74%<br>OS a 5 anni = 62%<br>OS a 5 anni = 62%    | Studio prospettico tedesco sul TCSA (CML-<br>paed I) con l'obiettivo di eseguire il trapianto<br>da MSD entro 6 mesi e quelli con VUD entro<br>12 mesi dalla diagnosi, dopo terapia<br>standardizzata.<br>La TRM e la GVHD hanno contribuito ai<br>risultati inferiori nel trapianto da VUD e da<br>HLA-mismatched.<br>Lo studio è stato chiuso quando l'imatinib è<br>stato registrato, a causa della mancanza di<br>arruolamento dei pazienti. |

FC = fase cronica; FA = fase accelerata; CB = crisi blastica; TACS = trapianto allogenico di cellule staminali; MSD = donatore familiare compatibile; VUD = donatore volontario non familiare; MMD = donatore non compatibile; EFS = sopravvivenza libera da eventi; OS = sopravvivenza globale; LFS = sopravvivenza libera da leucemia; EBMT = European Bone Marrow Transplant; TRM = mortalità correlata al trapianto

**TABELLA 2 - Risultati del TACS in studi clinici con un numero di pazienti pediatrici con LMC >50 (29 modificato).**

gnosi è risultata peggiore, analogamente a quanto riportato negli adulti (15, 17). Purtroppo la GVHD è la complicanza più temibile e devastante del trapianto perché influenza negativamente sia la sopravvivenza che la qualità di vita. Numerosi sono stati i tentativi di ridurre la comparsa e l'entità, ma, purtroppo, l'incidenza e la morbidità della GVHD rimangono ancora troppo elevati. In uno studio su 1.117 bambini con leucemia o mielodisplasia trapiantati tra il 1995 ed il 2004 utilizzando fonti diverse di cellule staminali (familiare compatibile o *mis-matched*, donatore volontario, cellule cordonali), la GVHD cronica è risultata associata con una significativa mortalità (24% a 5 anni dalla diagnosi di GVHD, in assenza di malattia) (19). Anche la comparsa di una recidiva può condizionare la prognosi di questi pazienti, anche se l'infusione di linfociti da donatore, sfruttando l'effetto GVL di queste cellule, può rappresentare un trattamento efficace per le recidive post-trapianto (20).

Un recente studio retrospettivo nell'ambito dell'IBMTR (*International Blood and Marrow Transplant Research*) ha dimostrato che i pazienti che avevano ricevuto l'imatinib o altri inibitori delle TK prima del trapianto risultavano avere un rischio più basso di morte rispetto a quelli non trattati (21), probabilmente perché la terapia con inibitori delle TK, riducendo la massa leucemica al momento della procedura, comporta un minor rischio di recidiva. L'efficacia terapeutica dell'imatinib è stata segnalata anche nel post-trapianto, nel trattamento della GVHD cronica (22) e nel prevenire le recidive, anche se in quest'ultimo caso sono ancora da definire il timing di inizio e la durata (23, 24).

– *Imatinib*. Inibitore delle TK di prima generazione, si lega alla forma inattiva del BCR-ABL. Il suo impiego nella LMC è stato approvato da parte delle autorità regolatorie nel 2001 per gli adulti e nel 2003 per i bambini. L'introduzione dell'imatinib ha rivoluzionato la terapia negli adulti con LMC. Il gruppo IRIS (*International Randomized Study of Interferon and ST1571*) con il primo studio comprendente 553 adulti con LMC ha dimostrato l'efficacia dell'imatinib sia sulla risposta ematologica che sulla sopravvivenza a breve termine nei pazienti trattati in FC (25). Il *follow-up* a lungo termine ne ha confermato l'efficacia in questi

pazienti, con una risposta ematologica completa nel 97% dei casi, una risposta citogenetica completa (RCiC) nell'82% e una sopravvivenza libera da malattia e globale, rispettivamente, del 83% e 88% a più di 6 anni dall'inizio della terapia con imatinib (26). Negli adulti in FC con una risposta subottimale alla dose considerata standard (400 mg/die), l'imatinib si è dimostrato efficace ad un dosaggio progressivamente crescente (da 400 a 800 mg/die) con una RCiC nel 40% dei pazienti e una EFS del 57% a 2 anni e di circa il 10% a 7 anni (27). L'attività dell'imatinib è risultata inferiore nelle forme avanzate di LMC (FA, CB, FC >1) con una risposta ematologica completa nel 34% di adulti trattati in FA e nell'8% dei casi trattati in CB mieloide, con una sopravvivenza globale ad 1 anno del 74% nei primi e con una mediana di progressione di malattia di 10 mesi (28). Finora, pochi sono gli studi riguardanti l'impiego dell'imatinib nella LMC in età pediatrica (Tabella 3). Al 2010, il numero di bambini trattati con imatinib risultava essere meno di 200 (29).

In uno studio su un piccolo numero di bambini con leucemia Ph+, l'imatinib (400 mg/m<sup>2</sup>/die per quelli con superficie corporea <1 m<sup>2</sup> e 400mg/die per quelli con superficie >1 m<sup>2</sup>) si è dimostrato ben tollerato ed efficace: tutti i bambini (4 con LMC e 1 con LA a fenotipo misto) hanno ottenuto una risposta ematologica, citogenetica e molecolare completa dopo una mediana, rispettivamente, di meno di 30, 285, e 287 giorni (30). In uno studio di fase I su 31 bambini con leucemia Ph+, l'imatinib è risultato ben tollerato ai diversi dosaggi utilizzati, variabili da 260 a 570 mg/m<sup>2</sup>/die. Un dato importante che è emerso è stato quello della dose-equivalente: le dosi di 260 mg/m<sup>2</sup>/die e 340 mg/m<sup>2</sup>/die corrispondevano, rispettivamente, a quelle di 400 e 600 mg utilizzate negli adulti. Sebbene l'obiettivo finale dello studio fosse quello di stabilire la dose massima tollerata, una RCiC è stata osservata in 10 su 12 (83%) bambini con LMC trattati in fase cronica (31). In uno studio di fase 2 su 30 bambini con LMC ad alto rischio (FC resistenti o intolleranti all'IFN- $\alpha$ , FA, CB o in recidiva dopo TACS), l'imatinib ha dimostrato la sua efficacia ad un dosaggio variabile da 260 a 340 mg/m<sup>2</sup>/die. Una remissione ematologica completa e una RCiC sono state ottenute rispettivamente nell'80% e nel 60%



| Autore/referenza                   | Numero pazienti e fase di malattia                                                                                                                   | Risposta                                                                                                                                                                                                                     | Outcome                                                                                                                                                             | Note                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Champagne MA et al., 2004 (31)     | 31 pz<br>14 pz LMC-FC<br>7 pz in fase avanzata con forma mieloide (1 LAM + 6 LMC-CB)<br>10 pz in fase avanzata con forma linfoide (9 LAL + 1 LMC-CB) | 14 pz LMC-FC → risposta ematologica completa = 100%<br>RCiC = 83% (10/12)<br>7 pz con forma mieloide → risposta ematologica completa = 33% (2/7)<br>10 pz con forma linfoide → risposta ematologica completa = 70% (7/10 pz) | 13/14 pz LMC-FC vivi (93%)<br>(1 deceduto x complicanze da TACS)<br>Sopravvivenza mediana x pz in fase avanzata:<br>7 mesi forma mieloide<br>15 mesi forma linfoide | Studio francese di farmacocinetica. Obiettivo: identificare la dose massima tollerata di imatinib in età pediatrica. Conclusione: le dosi di 260 e 340 mg/m <sup>2</sup> utilizzate nei bambini corrispondono, rispettivamente, alle dosi di 400 e 600 mg, utilizzate negli adulti |
| Millot F et al., 2006 (32)         | 30 pz<br>22 pz LMC-FC<br>5 pz LMC-FA<br>3 pz LMC-CB                                                                                                  | LMC-FC → risposta ematologica completa = 80% (8/10 pz)<br>RCiC = 60% (12/20 pz)<br>fase avanzata → risposta ematologica completa = 75% (6/8 pz)<br>RCiC=29% (2/7 pz)                                                         | Riduzione del bcr-abl/abl ratio <10 <sup>-4</sup> in 11 (50%) bambini in FC.<br>OS proiettata a 12 mesi: 95% per i pz in FC e 75% per quelli in fase avanzata       | Studio multicentrico europeo di fase 2 con l'obiettivo di valutare l'efficacia dell'imatinib nella LMC in fase avanzata, nelle recidive post-trapianto e/o resistenti ad IFN-α                                                                                                     |
| Giona F et al., 2010-2011 (33, 34) | 29 pz LMC-FC (5/29 resistenti o intolleranti all'IFN-α)                                                                                              | risposta ematologica completa = 96% (23/24 pz valutabili)<br>RCiC = 96% (24/25 pz valutabili)<br>RMM = 88% (15/17 pz valutabili)                                                                                             | 8 pz in RMM >24 mesi → imatinib a intermittenza (3 settimane e 1 settimana stop)<br>3 pz in RMC → stop imatinib → RMC >24 mesi dopo stop                            | Studio retrospettivo in 8 centri pediatrici italiani. Dosaggio imatinib 340 mg/m <sup>2</sup> /die<br>10% di pz ha sospeso l'imatinib per tossicità                                                                                                                                |
| Millot F et al., 2011 (35)         | 44 pazienti LMC-FC                                                                                                                                   | risposta ematologica completa = 98% (43/44 pz)<br>RCiC = 77% (36/44 pz)<br>[61% (27/44 pz) a 12 mesi]<br>RMM = 57% (25/44 pz)<br>[31% (14/44 pz) a 12 mesi]                                                                  | Incremento della dose nel 20% dei casi.<br>Interruzione dell'imatinib per insoddisfacente risposta.                                                                 | Studio multicentrico francese di fase 4 con l'obiettivo di valutare in bambini con nuova diagnosi di LMC-FC l'efficacia dell'imatinib (260 mg/m <sup>2</sup> /die → 340 mg/m <sup>2</sup> /die)                                                                                    |

FC = fase cronica; FA = fase accelerata; CB = crisi blastica; TACS = trapianto allogenico di cellule staminali; IFN-α = interferon-α; RCiC = risposta citogenetica completa; RMM = risposta molecolare maggiore; RMC = remissione molecolare completa; OS = sopravvivenza globale;

**TABELLA 3** - Risultati della terapia con imatinib nei principali studi clinici su pazienti pediatrici con LMC.

dei bambini in FC avanzata, e nel 75% e nel 29% nei bambini trattati in una fase di malattia più avanzata. L'OS a 1 anno è stata del 95% per i bambini trattati in FC e del 75% per quelli trattati in fase più avanzata (32). In uno studio comprendente 29 pazienti con LMC in FC, 5 dei quali intolleranti o resistenti all'IFN-α, l'imatinib, somministrato ad alto dosaggio (340 mg/m<sup>2</sup>/die), si è dimostrato attivo ed efficace a breve e a lungo termine, con una tossicità limitata (solo il 10% dei pazienti ha interrotto il farmaco). Le risposte com-

plete sia ematologiche che citogenetiche sono state elevate (96%), così come le risposte molecolari maggiori (RMM) (88%), probabilmente per l'alto dosaggio utilizzato. Nei pazienti in RMM, l'imatinib è stato continuato alla stessa dose per 3 settimane e sospensione di una settimana al mese, allo scopo di ridurre gli effetti collaterali sul metabolismo osseo e sulla crescita osservati nei soggetti trattati in età prepubere, senza conseguenze sulla risposta terapeutica. In 3 pazienti in remissione molecolare completa (RMC) persisten-

te è stato deciso di interrompere la somministrazione dell'imatinib e di controllare l'andamento della malattia con un monitoraggio mensile del trascritto su sangue venoso periferico (SVP). Dopo 24 mesi di follow-up, i 3 pazienti continuano a mantenere una RMC (33, 34). Il più ampio studio prospettico è un trial clinico di fase 4 comprendente 44 bambini con LMC in FC trattati con imatinib a basso dosaggio (260 mg/m<sup>2</sup>/die, corrispondente a 400 mg/die nell'adulto), in cui la remissione ematologica completa è stata ottenuta nel 98% dei casi, con una percentuale di RCiC e di una RMM ad 1 anno, rispettivamente, del 61% e del 31% e una sopravvivenza libera da malattia del 98% dopo un *follow-up* mediano di 31 mesi. Purtroppo, circa il 30% di pazienti ha dovuto interrompere l'imatinib per un'insoddisfacente risposta, per cui sono stati avviati a TACS o a terapia con inibitori delle TK di seconda generazione (35).

– *Gli inibitori delle TK di seconda generazione.* Si legano sia alla forma attiva che a quella inattiva del BCR-ABL, dimostrando una sensibilità 2-logaritmi maggiore rispetto all'imatinib ed un'attività terapeutica nei casi di mutazioni di BCR-ABL che provocano la resistenza all'imatinib, tranne che per la mutazione T315I. Per quanto riguarda l'autorizzazione al loro uso, l'FDA ha approvato l'utilizzo del dasatinib nel 2006 e del nilotinib nel 2007 per il trattamento degli adulti con LA Ph<sup>+</sup>, intolleranti o resistenti all'imatinib. Diversi studi clinici su casistiche ampie di adulti hanno riportato risultati promettenti sull'impiego di questi inibitori delle TK anche come trattamento di prima linea (36, 37). In uno studio randomizzato su pazienti con LMC in FC, il dasatinib si è dimostrato superiore all'imatinib nell'indurre una risposta sia citogenetica che molecolare, con una tossicità sovrapponibile. Dopo 1 anno di trattamento, la RCiC era del 77% nei pazienti trattati con dasatinib contro il 66% in quelli che avevano ricevuto l'imatinib, con una RMM del 46% in quelli del primo gruppo (dasatinib) contro il 28% di quelli del secondo gruppo (imatinib) (36). Un altro studio multicentrico internazionale ha dimostrato la superiorità del nilotinib rispetto all'imatinib, con gli stessi effetti collaterali: ancora dopo 1 anno di trattamento, la RCiC era dell'80% nei pazienti trattati con nilotinib contro il 65% in quelli che ave-

vano ricevuto l'imatinib, con una RMM del 44% per quelli trattati con nilotinib contro il 22% di quelli trattati con imatinib (37). Questi due studi su ampie casistiche hanno messo le basi per l'impiego degli inibitori delle TK di seconda generazione come terapia di prima linea negli adulti con LMC e nei bambini con leucemie BCR-ABL<sup>+</sup>. In un recente studio di fase 1, il dasatinib è stato impiegato a dosi scalari in 39 bambini con tumori solidi o leucemie. Tutti e 8 i bambini con LMC valutabili hanno ottenuto una risposta, in particolare sono state osservate 6 risposte citogenetiche, di cui 3 complete e 3 parziali (38). Attualmente, è aperto all'arruolamento uno studio di fase 2 con il dasatinib (NCT00777036) per pazienti pediatriche con LMC in FC di nuova diagnosi. Per quanto riguarda l'uso del nilotinib nei bambini, i dati sono limitati. La casistica più ampia finora riportata comprende 16 pazienti pediatriche (8 LLA Ph<sup>+</sup> e gli altri con LMC in FA o CB) trattati con nilotinib, ottenuto per uso compassionevole, ad un dosaggio diverso in base al peso corporeo (400 mg x 2 volte al dì per quelli con peso >40Kg e 300 mg x 2 volte al dì per quelli con peso inferiore). Sebbene la tossicità rilevata sia stata simile a quella osservata negli adulti, purtroppo l'efficacia si è dimostrata inferiore, con scarsi benefici per quei pazienti non rispondenti all'imatinib e al dasatinib (39). Attualmente, è aperto all'arruolamento uno studio multicentrico internazionale di fase 1 con il nilotinib (NCT01077544) per pazienti pediatriche con LMC resistenti o intolleranti all'imatinib in FC o in FA oppure con LLA Ph<sup>+</sup> refrattaria alla terapia *standard*.

– *La resistenza all'imatinib.* Gli indiscutibili successi clinici degli inibitori delle TK sono ridimensionati da una certa percentuale di fallimenti osservati, comprendenti sia le resistenze primarie che quelle secondarie. Nello studio IRIS in cui l'imatinib veniva impiegato in pazienti con una nuova diagnosi di LMC, nel 2% di casi si è osservata una resistenza ematologica primaria, mentre l'8-13% di pazienti non ha ottenuto una risposta citogenetica maggiore o completa (40). Questo tipo di resistenza, definita primaria, può essere il risultato di variazioni farmacocinetiche, comprendenti anomalie nel trasposto o nel flusso del farmaco. Le sue basi biologiche sono al momento sconosciute; sembra esserci una predisposizione gene-

tica dal momento che una resistenza primaria è stata osservata più frequentemente in pazienti provenienti dal Sud-Est asiatico rispetto a quelli dell'Europa e Nord America (41). La resistenza secondaria o acquisita comprende quegli eventi che si verificano dopo una iniziale risposta all'imatinib, quali la recidiva ematologica o citogenetica o la progressione in FA o in CB, che si osservano nel 15-20% di pazienti, soprattutto nei primi 4 anni di trattamento (40). La resistenza secondaria è dovuta soprattutto all'acquisizione di mutazioni puntiformi all'interno del dominio di BCR-ABL e, meno frequentemente, all'overespressione del BCR-ABL. Una delle mutazioni, la T315I, causa una resistenza non solo all'imatinib ma anche agli altri inibitori delle tirosin-chinasi finora approvati. Attualmente sono in via di sperimentazione in diversi *trials* clinici, altri farmaci, quali il ponatinib (42) ed il bosutinib (43) in grado di inibire l'attività della TK associata alla T315I. I meccanismi di resistenza indipendenti da alterazioni BCR-ABL comprendono: l'evoluzione clonale, i livelli plasmatici sub-ottimali dell'inibitore come conseguenza di un più rapido metabolismo mediato dagli enzimi del citocromo P450; la riduzione della disponibilità intracellulare dell'imatinib dovuto a un ridotto flusso dall'esterno all'interno e/o dall'aumento del flusso dall'interno all'esterno della cellula.

– *La farmacocinetica degli inibitori delle TK.* Uno studio su volontari sani ha dimostrato che l'imatinib viene completamente assorbito dopo somministrazione orale ed il 95% si lega alle proteine plasmatiche e scisso nel suo metabolita principale, il CGP-74588 (44). Entrambe le molecole hanno proprietà farmacocinetiche simili e sono metabolizzate nel fegato dagli enzimi CYP3A4 e CYP3A5 del citocromo P450, come dimostrato in uno studio su bambini affetti da leucemie Ph+ trattati con imatinib (45). Diversi farmaci possono interferire con il citocromo P450, aumentando (chetoconazolo, itraconazolo, eritromicina, claritromicina, ecc.) o diminuendone i livelli plasmatici (carbamazepina, fenobarbitale, fenitoina, rifampicina, desametasone, ecc). Nei bambini, l'emivita plasmatica dell'imatinib è di 15 ore, leggermente più breve rispetto a quella riscontrata negli adulti, che è di 17 ore, con livelli stabili dopo 7 giorni dall'inizio della terapia (31). Sono state, comunque, segnalate variabilità individuali signifi-

ficative nelle concentrazioni plasmatiche e in altri parametri farmacocinetici (emivita e clearance) per quanto riguarda non solo l'imatinib (31, 44, 46) ma anche il dasatinib (38) mentre per il nilotinib è tuttora in corso uno studio di farmacocinetica in bambini con LA Ph+ (NCT01077544), aperto all'arruolamento nel Dicembre 2010. Purtroppo, dati di farmacocinetica degli inibitori delle TK nei bambini molto piccoli, di età inferiore a 4 anni, sono molto scarsi. In base alla farmacocinetica di altri farmaci, è possibile che i neonati e i bambini molto piccoli abbiano un aumentato metabolismo e, di conseguenza, più basse concentrazioni plasmatiche degli inibitori delle TK rispetto ai bambini più grandi e agli adolescenti.

La formulazione in capsule degli inibitori delle TK comporta dei problemi di compliance nei bambini, soprattutto quelli più piccoli. In caso di una persistente difficoltà di assunzione, possono essere utilizzate delle formulazioni liquide dei farmaci da somministrare immediatamente dopo la preparazione.

– *Monitoraggio del trattamento.* L'efficacia della terapia con inibitori delle TK negli adulti viene valutata in base sia al raggiungimento di una risposta (ematologica, citogenetica e molecolare) definita secondo precisi criteri sia al tempo impiegato per il suo ottenimento. Il primo obiettivo terapeutico è la risposta ematologica (scomparsa dei sintomi iniziali; leucociti  $\leq 10 \times 10^9/L$  con formula leucocitaria normale senza forme immature e basofili  $< 5\%$ ; piastrine  $< 450 \times 10^9/L$ ; milza non palpabile). Il secondo obiettivo è la risposta citogenetica, che si valuta con la citogenetica convenzionale su metafasi ottenute da cellule midollari [completa: assenza di metafasi Ph+; maggiore:  $\leq 35\%$  metafasi Ph+, minore: 36-65% metafasi Ph+ (risposta maggiore+ minore=risposta parziale); minima: 66-95% metafasi Ph+; assente:  $> 95\%$  metafasi Ph+]. Nei casi in cui si ottiene un numero di metafasi  $< 20$  con la citogenetica convenzionale, si raccomanda di utilizzare la metodica FISH (*Interphase fluorescence in situ hybridization*) con la valutazione di almeno 200 nuclei. Per il monitoraggio dei pazienti in FC è stato suggerito l'impiego della FISH sui leucociti da SVP, in sostituzione della citogenetica convenzionale su midollo. Rispetto alla citogenetica, la FISH presenta dei vantaggi, perchè meno costosa, di più

rapida esecuzione e meno invasiva; purtroppo, non rileva eventuali alterazioni cromosomiche aggiuntive, evidenziabili con la metodica classica. L'obiettivo finale è la risposta molecolare, valutata con la metodica della PCR (*polimerase chain reaction*) quantitativa, in grado di identificare la presenza del trascritto BCR-ABL di 1 su 100.000 cellule ( $10^{-6}$ ). A causa della estrema variabilità numerica derivante dalla metodica, si è deciso di esprimere la risposta molecolare in termini di un *International Scale* (IS) frutto dei risultati standardizzati in diversi laboratori internazionali (47,48). È definita RMM, un rapporto BCR-ABL/ABL  $<0,1\%$ , mentre la RMC viene definita quando il rapporto è  $<0,001$  oppure il trascritto non è evidente. Per quanto riguarda il tempo impiegato per raggiungere la risposta, negli adulti vengono considerate risposte ottimali: l'ottenimento della risposta ematologica completa a 3 mesi, il raggiungimento di una risposta citogenetica parziale a 6 mesi, di una RCiC a 12 mesi e di una RMM a 18 mesi. Alcuni autori raccomandano il monitoraggio della risposta alla terapia con la citogenetica da midollo ogni 3-6 mesi, con o senza analisi FISH da SVP ogni 3 mesi, con o senza la PCR quantitativa da SVP ogni 3 mesi (49). In considerazione delle opzioni terapeutiche attualmente disponibili (inibitori delle TK per un tempo indeterminato vs trapianto), è indispensabile un accurato monitoraggio della malattia sia con la PCR quantitativa da SVP che con la citogenetica da midollo. Quando si verifica un incremento del trascritto BCR-ABL e/o una perdita della risposta o quando la malattia esordisce in FA o CB, è utile eseguire l'analisi delle mutazioni. Benché ci possano essere delle oscillazioni nei livelli del trascritto con la metodica della PCR quantitativa, specialmente a livelli assoluti molto bassi, un aumento di 5-10 volte è considerato preoccupante e deve indirizzare ad un cambiamento di terapia, mentre per un aumento del trascritto inferiore a 5 volte è indicato ripetere la PCR quantitativa dopo 1-3 mesi senza modificare la terapia (49).

Al momento non ci sono dati e indicazioni specifiche riguardanti la popolazione pediatrica.

– *Tossicità a breve e lungo termine degli inibitori delle TK.* L'imatinib è generalmente ben tollerato e gli effetti collaterali immediati sono inferiori rispetto a quelli osservati con la chemioterapia con-

venzionale. La tossicità ematologica, che si verifica più frequentemente entro i primi 6 mesi di terapia, è rappresentata soprattutto da trombocitopenia o neutropenia; in questo caso è consigliabile sospendere momentaneamente l'inibitore piuttosto che ridurre le dosi. Per quanto riguarda la tossicità extra-ematologica, caratterizzata da una sintomatologia gastrointestinale, quale nausea, vomito, diarrea e alterazione della funzionalità epatica, *rash*, edema, mialgia e dolori osteo-articolari, compare anch'essa nei primi mesi della somministrazione dell'inibitore. Nel caso di una persistenza di sintomi di grado  $\geq 3$  secondo la classificazione WHO, si consiglia l'interruzione del farmaco e una strategia terapeutica alternativa. Purtroppo, l'azione dell'imatinib non è limitata solo all'inibizione della funzione tirosin-chinasica di BCR-ABL, ma anche al blocco del *platelet-derived growth factor receptor* (PDGF-R) e del c-KIT, presenti sulle cellule normali, con effetti collaterali su diversi organi ed apparati. Negli adulti sono state osservate alterazioni sia nel metabolismo osseo che endocrino con ginecomastia; entrambi questi effetti collaterali sono stati attribuiti all'inibizione del PDGF-R e del c-KIT di cellule normali (50-52). In bambini trattati con imatinib in età prepubere, sono stati riscontrati livelli di progesterone plasmatico più elevato della norma (51), analogamente a quanto osservato in maschi adulti (53). Inoltre, una riduzione del rapporto inhibina-B/FSH con severa oligozoospermia anche durante la terapia con imatinib ad intermittenza si è osservata in un ragazzo in cui il farmaco era stato iniziato in età prepubere (53). Per quanto riguarda l'azione dell'imatinib sul metabolismo osseo, i dati disponibili sugli adulti indicano che l'imatinib stimola la formazione dell'osso inibendone il riassorbimento, con sequestro del calcio e del fosforo nell'osso e concomitanti più bassi livelli sierici di questi minerali (52, 54). Al contrario, in alcuni bambini è stato riscontrato un aumentato riassorbimento osseo con valori sierici normali o addirittura superiori alla norma del calcio e del fosforo (53). La discrepanza tra l'attività osteogenica riportata negli adulti e lo stimolo al riassorbimento osseo osservato nella popolazione pediatrica può essere spiegato con il fatto che l'azione dell'inibitore sul metabolismo osseo è diverso a seconda dell'età del soggetto. L'effetto a lungo termine più frequente nei bam-

bini è un rallentamento nella crescita, soprattutto in quelli che hanno iniziato l'imatinib in età prepubere (53, 55-57). Un gruppo giapponese ha evidenziato un ritardo di crescita nel 73% dei bambini che avevano ricevuto l'imatinib per un periodo mediano di 34 mesi (57). Il meccanismo attraverso il quale l'imatinib causa un ritardo nella crescita rimane sconosciuto. Recentemente è stato

ipotizzato che il farmaco agisce a livello ipofisario provocando una ridotta secrezione di GH (58). Tuttavia, in 4 pazienti trattati in età prepubere è stato rilevato un ritardo nella crescita in presenza di valori normali non solo di GH, ma anche di TSH, e IGF-1. Questi pazienti hanno raggiunto un normale sviluppo quando l'imatinib è stato somministrato ad intermittenza, suggerendo una relazio-

|               | <i>Inibitori delle TK</i>                                                                                                                                                                                                                                      | <i>TACS</i>                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Pro</i>    | La PCR quantitativa permette un accurato monitoraggio della risposta alla terapia e dell'eventuale perdita di risposta, dando così la possibilità di eseguire il trapianto prima della progressione della malattia.                                            | Al momento, il TACS si è dimostrata l'unica terapia che può portare alla guarigione della LMC, sebbene sia stata segnalata una recidiva tardiva post-trapianto (dopo oltre 18 anni).                                                                                      |
|               | La tossicità a breve termine è bassa e gestibile.                                                                                                                                                                                                              | La sopravvivenza è elevata (87%) nei trapianti da fratello compatibile.                                                                                                                                                                                                   |
|               | L'uso dell'imatinib prima del TACS non sembra influenzare negativamente la sopravvivenza globale.                                                                                                                                                              | Il TACS rappresenta una scelta mirata per ogni bambino dopo aver raggiunto la migliore risposta, ematologica o meglio citogenetica, con gli inibitori delle TK.                                                                                                           |
|               | L'intervallo tra la diagnosi ed il TACS non sembra influenzare la sopravvivenza nei pazienti trattati con inibitori delle TK.                                                                                                                                  | I risultati del trapianto sono migliori se il TACS è effettuato precocemente in FC, subito dopo la diagnosi.                                                                                                                                                              |
|               | Non essendo possibile applicare nei bambini i fattori prognostici utilizzati per gli adulti con LMC, quale il Sokal o l'Hasford score, la risposta precoce all'imatinib rappresenta un parametro clinicamente rilevante per valutare l'aggressività della LMC. | Uno scoring system pre-TACS codificato per i pazienti pediatrici permette di stimare la mortalità correlata al trapianto (59).                                                                                                                                            |
| <i>Contro</i> | In caso di fallimento della terapia con imatinib, possono essere utilizzati con successo gli inibitori delle TK di seconda generazione.                                                                                                                        | Dovrebbero essere trapiantati i bambini che non rispondono in maniera ottimale alla terapia con TKI.                                                                                                                                                                      |
|               | Raramente, qualche bambino può sviluppare improvvisamente una crisi blastica.                                                                                                                                                                                  | La mortalità e la morbidità acute correlate al trapianto, anche da donatore consanguineo, non sono trascurabili.                                                                                                                                                          |
|               | Le donne devono evitare una gravidanza perché l'imatinib è teratogeno.                                                                                                                                                                                         | Infertilità dopo condizionamento con regimi contenenti il busulfano.                                                                                                                                                                                                      |
|               | La tossicità a lungo termine è ancora da definire. Tuttavia, sono state riportate alterazioni del metabolismo osseo e della sfera endocrina nei bambini, soprattutto in quelli trattati con imatinib in età prepubere.                                         | L'altezza finale dei pazienti trapiantati in età pediatrica è inferiore rispetto all'altezza dei loro genitori. Una crescita più bassa si osserva nei bambini di età inferiore ai dieci anni al momento del trapianto e in quelli irradiati sul sistema nervoso centrale. |
|               | La terapia con inibitori delle TK, iniziata in età pediatrica, può essere proseguita indefinitamente, con effetti a lungo termine non ancora conosciuti.                                                                                                       | La morbidità a lungo termine del TACS non è trascurabile. Rispetto ai fratelli sani, un considerevole numero di sopravvissuti trapiantati sviluppano diversi problemi di salute, limitazioni fisiche e alterazioni comportamentali che danneggiano la vita sociale.       |
|               | Basandosi sui dati del TACS in epoca pre-imatinib, per la sua buona riuscita è meglio eseguire il trapianto, quando previsto, entro 12 mesi dalla diagnosi. Il trapianto in fase avanzata comporta elevate possibilità di insuccesso.                          | Disfunzioni d'organo multi-sistemiche di severa entità sono frequentemente osservate in bambini che sviluppano una GVHD cronica                                                                                                                                           |

**TABELLA 4** - Argomenti pro e contro la terapia con inibitori delle tirosin-chinasi (TK) ed il TACS come terapia di prima linea in pazienti pediatrici con LMC in FC (29 modificato).



ne tra l'esposizione continua e prolungata all'imatinib ed il rallentamento della crescita (53).

Non è noto se la somministrazione prolungata degli inibitori delle TK possa influire sulla funzionalità cardiaca. Recentemente, sono state riportate anomalie ventricolari in topi trattati con imatinib, a causa dell'inibizione del c-ABL (56). Per quanto riguarda il dasatinib, sono stati descritti casi di effusione pleurica in 2 bambini arruolati in un protocollo di fase 1 (45), mentre con il nilotinib è stato osservato un prolungamento del QT con rischio di morte improvvisa, in presenza di ipomagnesemia e ipocaliemia.

### **Come orientarsi nella scelta terapeutica**

Nell'era degli inibitori delle TK, il TACS è il trattamento di scelta di seconda o terza linea per gli adulti con LMC in FC, mentre il timing ottimale per i bambini è ancora oggetto di discussione. Nella *Tabella 4* sono illustrati gli argomenti a favore e quelli contro ciascuna delle due opzioni terapeutiche per quanto riguarda i bambini con LMC in 1° FC. Nelle fasi avanzate della LMC, il TACS è la scelta obbligata dopo l'ottenimento di almeno una risposta ematologica, o meglio dopo aver raggiunto la risposta citogenetica. In alcuni paesi, la scelta terapeutica è condizionata anche dal costo, sicuramente a favore del trapianto rispetto agli inibitori delle TK, anche se sulla base dei costi medici diretti calcolati per un periodo di 2 anni, l'imatinib offre un vantaggio costo-beneficio rispetto al TACS da donatore non correlato (60). Le analisi economiche riguardanti la procedura trapiantologica, tuttavia, non comprendono tutti i costi associati con le diverse modalità di trattamento, difficili da definire, quali i costi delle *compliance* e delle relative terapie e le perdite finanziarie dei genitori. D'altra parte, sono difficili da calcolare anche i costi del trattamento prolungato con inibitori delle TK a causa della possibilità di interrompere il farmaco dopo un periodo di tempo di risposta molecolare completa e della probabilità di riduzione dei costi quando il farmaco diventa generico (l'esclusività per l'imatinib scade nel Gennaio 2015, e per il dasatinib nel giugno 2020). Un altro aspetto da considerare nella scelta degli inibitori delle TK è la *compliance* al trattamento, un problema riguardante in particolare gli adolescenti ed i giovani adulti.

### **Conclusioni**

Forse, non vi è alcun altro tumore maligno come la LMC in cui i progressi terapeutici sono stati così rapidi, rivoluzionari e consistenti. Lo score prognostico, proposto da Sokal circa 30 anni fa per identificare i pazienti con rischio diverso (basso, intermedio e alto rischio) è considerato utile per gli adulti anche nell'era degli inibitori delle TK. Purtroppo, due fattori, l'età e le dimensioni spleniche, indispensabili per il suo calcolo ne precludono l'applicazione nei bambini e quindi la strategia terapeutica in età pediatrica non può essere decisa secondo i criteri validi per gli adulti. A questo elemento si aggiungono altri fattori, quali la diversa farmacocinetica, la *compliance* alla terapia con inibitori delle TK durante l'adolescenza, gli effetti dell'imatinib sulla crescita e la pubertà e, teoricamente, un periodo di trattamento più lungo di molti anni. Tuttavia, considerando la rarità della LMC in età pediatrica, la gestione clinico-terapeutica dei bambini deve necessariamente tenere conto dei risultati dei trials clinici sugli adulti. Recentemente, l'*European Leukemia NET* (ELN) ha proposto delle raccomandazioni per i pazienti con LMC di tutte le età in cui vengono stabiliti alcuni elementi fondamentali, quali uno stretto monitoraggio sia della risposta al trattamento che degli effetti collaterali a breve e a lungo termine, nonché l'identificazione dei fattori prognostici. In particolare, è raccomandata la tempestività nell'identificare lo sviluppo di una resistenza all'imatinib, di una progressione di malattia, di un'eventuale intolleranza e/o di una scarsa compliance.

## **■ SINDROMI MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE PH-**

Già nel 1951, Dameshek aveva considerato la TE, la PV e la MP, attualmente classificate come classiche neoplasie mieloproliferative clonali (NMC) Ph-, in un unico gruppo, dal momento che tali patologie presentano un comportamento clinico molto simile, caratterizzato da episodi di emorragie e trombosi, evoluzione in fibrosi midollare e possibile evoluzione in leucemia acuta (61). La scoperta di una mutazione attivante (V617F) nel gene per JAK2 (*Janus kinase 2*), una tirosina chi-

nasi utilizzata dai recettori delle cellule ematopoietiche per eritropoietina, trombopoietina e G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), ha fornito una spiegazione per le caratteristiche cliniche comuni a questi disordini.

Dal punto di vista epidemiologico, le SMC Ph- sono considerate come patologie dell'età avanzata, essendo diagnosticate in media intorno alla sesta decade, mentre nei bambini e negli adolescenti sono estremamente rare. L'incidenza annuale della trombocitemia in età pediatrica varia da 1 a 4 nuovi casi ogni 10 milioni di persone, 40-90 volte più bassa rispetto agli adulti (62, 63). Per quanto riguarda l'incidenza della PV in età pediatrica, l'unico dato è quello riportato da Osgood (64) su un'ampia casistica di pazienti, di cui solo lo 0,1% aveva un'età <20 anni. La MP è di riscontro eccezionale in età pediatrica e molti dei casi descritti sono familiari (65).

Le principali acquisizioni sulla patogenesi delle SMC Ph-, peraltro ancora parzialmente note, si sono avute a partire dal 2005, con l'identificazione di una mutazione a carico del gene JAK2, la V617F (66), presente nel 95% di PV, nel 55% di TE e nel 65% circa di MP dell'adulto (67). Il gene JAK2, localizzato sul braccio corto del cromosoma 9, codifica per una proteina (tirosin-chinasi) che riveste un ruolo centrale nella trasduzione dei segnali indotti da fattori di crescita emopoietici. A partire dal 2007 sono state descritte, nei pazienti affetti da PV negativi per la mutazione V617F, altre alterazioni del gene JAK2, a carico dell'esone 12 (68, 69). La mutazione JAK2<sup>V617F</sup> nell'esone 14 (che può essere presente sia in etero che omozigosi) e quelle a carico dell'esone 12 sono responsabili di un acquisto di funzione dell'enzima con conseguente iperproliferazione delle tre corrispondenti linee cellulari con successiva evoluzione, in base alla linea predominante, in PV, TE o MP. Queste mutazioni insorgono spontaneamente in una cellula staminale emopoietica pluripotente, manifestandosi solo sulla linea mieloide e non su quella linfoide (i recettori per l'eritropoietina, la trombopoietina ecc. espressi solo sulle cellule mieloidi) e conferiscono un vantaggio proliferativo ai precursori emopoietici mutati e si rendono responsabili di alcuni fenomeni già conosciuti da tempo, come la crescita spontanea delle colonie eritroidi (EECs)

(70). L'identificazione di questi fattori ha indotto il WHO a riconsiderare sia la nomenclatura (vengono definite neoplasie mieloproliferative) sia i criteri diagnostici per la loro classificazione (1) (Tabella 5). Quasi contemporaneamente nei pazienti con MP e TE negativi per mutazioni del gene JAK2, sono state individuate mutazioni a carico dell'MPL, che codifica per il recettore per la trombopoietina, un componente chiave del pathway di JAK2.

### **Trombocitosi e trombocitemia**

In condizione di normalità, il complesso processo della megacariocitopoiesi è regolato da diversi fattori trascrizionali e citochine, di cui la più importante per la filiera megacariocitaria è la trombopoietina (TPO), il cui effetto è mediato dal suo recettore MPL presente sui megacariociti. La TPO agisce in combinazione con altri fattori di crescita quali il GM-CSF, l'IL-3, l'IL-6, l'IL-11 e diversi altri ad azione pro-infiammatoria. I livelli plasmatici della TPO sono regolati dal suo assorbimento con successiva internalizzazione da parte delle cellule che esprimono il recettore MPL. A seguito del legame con la TPO, MPL va incontro ad una modificazione conformazionale che porta all'attivazione delle chinasi della famiglia JAK, le quali danno il via ad una serie di eventi che svolgono un ruolo chiave nel promuovere la sopravvivenza e la proliferazione megacariocitaria. Di conseguenza, essendo numerosi ed eterogenei i fattori coinvolti nel complesso meccanismo della megacariocitopoiesi, alterazioni qualitative (mutazioni) o quantitative (processi infiammatori) di uno o più di loro possono influenzare il processo di megacariocitopoiesi e quindi il numero di piastrine circolanti. In età pediatrica, è di frequente riscontro una piastrinosi, nella maggioranza dei casi secondaria a processi infiammatori e/o anemia sideropenica. Una conta piastrinica  $>500 \times 10^9/L$  è stata riportata in una percentuale variabile dal 13% al 36% dei neonati alla nascita, soprattutto in quelli con infezione e/o con basso peso. La trombocitosi neonatale potrebbe dipendere da fenomeni fisiologici, quali una più alta espressione del gene della TPO nel midollo durante l'ontogenesi ematopoietica, una più alta concentrazione di TPO in circolo nei feti e nei neonati rispetto ai bambini e agli adulti ed un'aumen-

tata sensibilità delle cellule progenitrici megacariocitarie alla TPO (71).

Le *forme primitive*, meno frequenti nei bambini, comprendono:

- la trombocitemia sporadica (TS) con caratteristiche simili a quelle della TE dell'adulto (72);
- le forme familiari, che a loro volta si distinguono in *ereditarie* dovute a mutazioni genetiche nelle cellule germinali (in questo caso sono forme policlonali) e *forme familiari* dovute a muta-

zioni somatiche di tipo mono o policlonale. Queste ultime, caratterizzate da mutazioni MPL515, non sono ancor state descritte nei bambini e sono incluse nel gruppo delle neoplasie mieloproliferative familiari (73).

Le TS in età pediatrica, analogamente alla TE degli adulti, sono forme clonali caratterizzate, dal punto di vista biologico, dalla formazione di colonie eritroidi spontanee e/o da mutazioni somatiche dei geni JAK2 (finora è stata identificata solo la muta-

|                         | <i>Policitemia vera</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <i>Trombocitemia essenziale</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <i>Mielofibrosi primitiva<sup>a</sup></i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Criteri maggiori</b> | <ol style="list-style-type: none"> <li>Hb &gt;18,5 g/dl (maschio)<br/>&gt;16,5 g/dl (femmina)<br/><i>oppure</i><br/>Hb o Hct &gt;99° percentile del range di riferimento per età, sesso e altitudine di residenza<br/><i>oppure</i><br/>Hb &gt;17 g/dl (maschio)<br/>&gt;15 g/dl (femmina)<br/>se associata a sostanziale aumento <math>\geq 2</math> g/dl rispetto ai valori di base non attribuibili a correzione di carenza marziale<br/><i>oppure</i><br/>Elevata massa eritrocitaria <math>\geq 25\%</math> il valore medio normale previsto.</li> <li>Presenza di JAK2<sup>V617F</sup> o mutazioni simili</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>Conta piastrinica <math>&gt;450 \times 10^9/L</math></li> <li>Proliferazione megacariocitaria con piastrine giganti e mature. Assenza di proliferazione granulocitaria o eritrocitaria.</li> <li>Esclusione di criteri WHO per LMC, PV, MP, SMD o altre neoplasie mieloidi.</li> <li>Presenza di JAK2<sup>V617F</sup> o di altri marker clonali oppure assenza di trombocitosi reattiva.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>Proliferazione megacariocitaria con atipia<sup>b</sup> accompagnata da fibrosi reticolinica,<br/><i>oppure</i><br/>In assenza di fibrosi reticolinica, i cambiamenti megacariocitari devono essere accompagnati da incremento di cellularità midollare, proliferazione granulocitaria e spesso riduzione della eritropoiesi (p.e. MP pre-fibrosi).</li> <li>Esclusione di criteri WHO per LMC, PV, TE, SMD o altre neoplasie mieloidi.</li> <li>Presenza di JAK2<sup>V617F</sup> o di altri marker clonali<br/><i>oppure</i><br/>assenza di fibrosi midollare reattiva.</li> </ol> |
| <b>Criteri minori</b>   | <ol style="list-style-type: none"> <li>Mieloproliferazione trilineare</li> <li>Livelli EPO sierica alterati</li> <li>Crescita EEC</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <ol style="list-style-type: none"> <li>Leucoeritroblastosi</li> <li>Incremento sierico LDH</li> <li>Anemia</li> <li>Splenomegalia palpabile</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

<sup>a</sup>La diagnosi di *mielofibrosi primitiva* (MP) deve soddisfare tutti e tre i criteri maggiori e due criteri minori.  
<sup>b</sup>Piccoli o grandi megacariociti con rapporto nucleo/citoplasma aberrante, nuclei irregolari e addensati in clusters.  
EEC = colonie eritroidi endogene; EPO = eritropoietina; Hb = emoglobina; Hct = ematocrito; LDH, latticodeidrogenasi; LMC = Leucemia mieloide cronica; PV = policitemia vera; TE = trombocitemia essenziale; SMD = sindromi mielodisplastiche.

TABELLA 5 - Criteri diagnostici delle neoplasie mieloproliferative croniche secondo la classificazione WHO 2008.

zione V617F a carico dell'esone 14). Negli adulti la TE può essere associata non solo alla mutazione somatica JAK2<sup>V617F</sup>, presente nel 50-60% dei casi, ma anche a mutazioni somatiche di MPL (W515L o W515K o W515A o S505N) in circa il 5% dei pazienti, mentre non è stata finora riscontrata la mutazione dell'esone 12 descritta nell'1-2% dei casi di PV. Nei primi studi riguardanti casistiche pediatriche (74, 75) l'incidenza della mutazione JAK2<sup>V617F</sup> (<30%) era risultata significativamente inferiore rispetto a quella riportata negli adulti (>50%). Studi successivi hanno permesso di identificare una forma familiare in alcuni bambini con diagnosi di TE, per cui l'incidenza della mutazione JAK2<sup>V617F</sup> (48%) così come l'emopoiesi clonale è risultata essere simile a quella degli adulti con TE (72). Diversi studi negli adulti hanno segnalato che lo stato mutazionale JAK2 caratterizza due popolazioni di pazienti TE, identificando un sottogruppo con caratteristiche simili a quelle dei soggetti affetti da PV (76-78). Tale dato non è stato confermato in uno studio su una popolazione pediatrica relativamente numerosa (72). Dal punto di vista clinico, i sintomi d'esordio della malattia sono presenti in un limitato numero di bambini e sono nella maggior parte dei casi aspecifici (cefalea); una splenomegalia, di modesta entità è presente in meno di un quinto di bambini (72).

- Le *forme ereditarie* possono essere dovute a mutazioni *germline* coinvolgenti il gene della TPO o quello per il suo recettore MPL. Solo nel 20% dei pazienti con una forma familiare sono state identificate mutazioni della TPO o di MPL, mentre nella maggior parte dei casi le alterazioni geniche che ne sono alla base rimangono ancora sconosciute (79). Per quanto riguarda le trombocitose ereditarie associate a mutazione germinale attivante il gene della TPO, sono state descritte quattro mutanti alleliche a trasmissione autosomica dominante (AD), responsabili della perdita della funzione di quella parte del gene che esercita un controllo inibitorio sulla propria trascrizione, da cui ne risulta una aumentata produzione della TPO con conseguente trombocitosi (80).

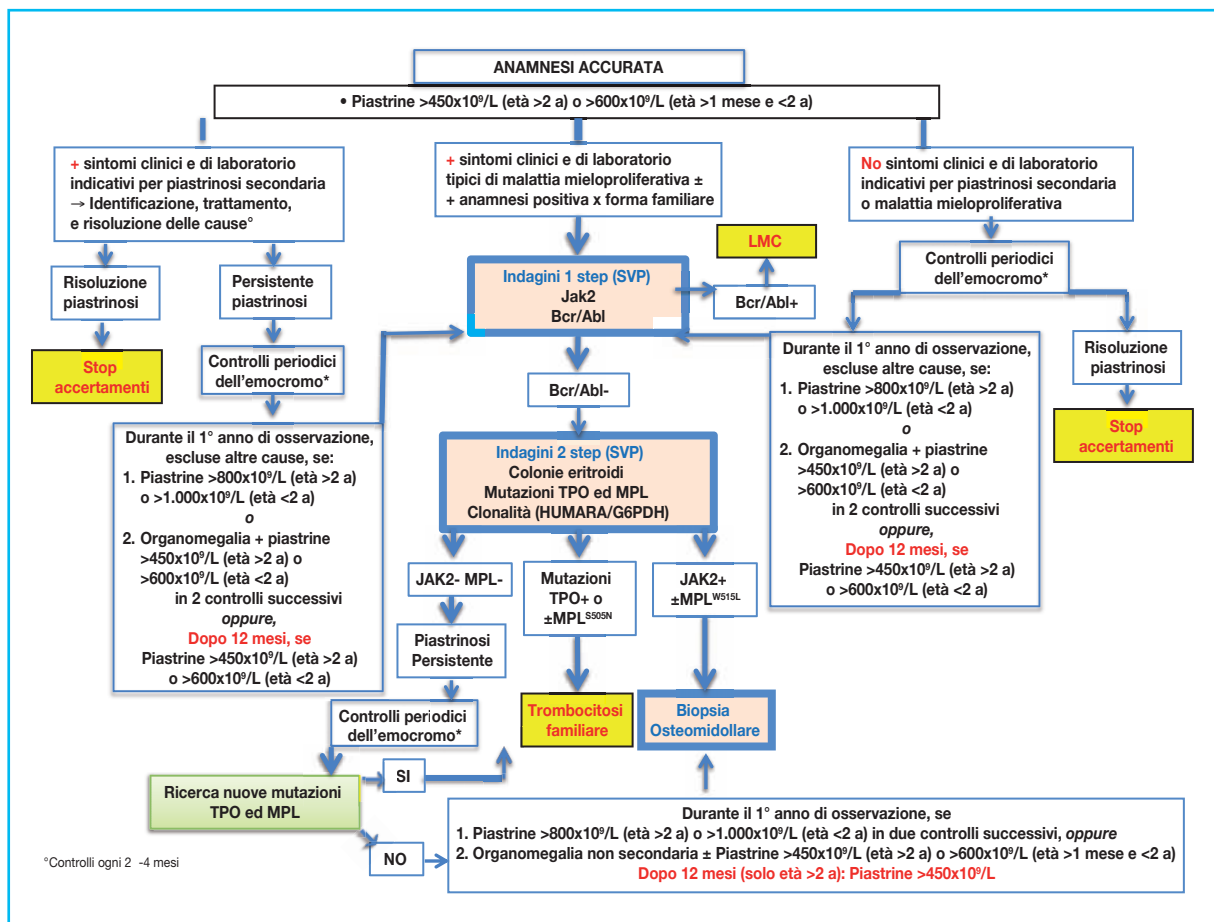
Recentemente, in 2 famiglie con la stessa mutazione di TPO sono state descritte alterazioni congenite a carico degli arti inferiori in una e comparsa precoce di mieloma multiplo in un membro dell'altra, ipotizzando che il guadagno di fun-

zione della TPO può disregolare sia l'emopoiesi che la vasculogenesi, predisponendo allo sviluppo di anomalie congenite e/o a malattie ematologiche clonali (81). Una nuova mutazione a carico del gene della TPO è stata recentemente riportata in una famiglia filippina (82). Anche a carico di MPL sono state finora riportate diverse mutazioni, che conferiscono alla struttura recettoriale un guadagno di funzione con attivazione incontrollata dei segnali intracellulari e conseguente proliferazione cellulare e trombocitosi. Le mutazioni finora riportate sono caratteristiche di famiglie appartenenti a specifiche etnie. La mutazione MPL<sup>S505A</sup> è stata descritta per la prima volta in una famiglia giapponese (83) e, successivamente, in alcune famiglie italiane (75) nelle quali è stato dimostrato che il cluster della mutazione, che si trasmette come carattere AD, è dovuto ad una mutazione presente in un capostipite comune risalente a circa 23 generazioni prima (84). È stato segnalato che i pazienti con mutazione MPL<sup>S505A</sup> hanno un aumentato rischio trombotico e sviluppano, ad un'età avanzata, una splenomegalia accompagnata da progressiva fibrosi midollare (85). Nel 2004 è stata descritta una forma ereditaria in una popolazione Afro-Americana associata al polimorfismo MPL<sup>K39N</sup> (*Baltimore*), in cui la mutazione agisce riducendo la funzione recettoriale di MPL, con conseguenti alti livelli di TPO e aumentata stimolazione della megacariocitopoiesi. Questa mutazione, a trasmissione AD e penetranza incompleta, in omozigosi è associata ad una conta piastrinica più alta rispetto alla condizione di eterozigosi (86). Nel 2009, è stata riscontrata in famiglie di discendenza araba un'altra mutazione nel dominio extracellulare del recettore MPL (MPL<sup>P106L</sup>) che probabilmente interferisce con l'internalizzazione e/o degradazione della TPO, conservando apparentemente la capacità di legame del recettore con il fattore di crescita e l'attivazione del recettore stesso (87).

- *Criteri diagnostici in età pediatrica.* Secondo i criteri utilizzati per gli adulti proposti dal WHO nel 2008, la diagnosi di TE richiede la presenza di quattro criteri, illustrati nella *Tabella 5* (1). L'applicazione di questi criteri nella popolazione pediatrica è difficile. Infatti, il valore di piastrine >450x10<sup>9</sup>/L può essere valido per bambini di età >2 anni, ma non per quelli di età inferiore dal

momento che una *mild* trombocitosi (piastrine  $450-700 \times 10^9/L$ ) è di frequente riscontro nei bambini molto piccoli. Anche la biopsia osteomidollare come parametro diagnostico presenta dei limiti, dal momento che un'iper cellularità midollare è di normale riscontro nei bambini e negli adolescenti. Utilizzando i *markers* biologici (JAK2 e clonalità) previsti dal WHO come criteri diagnostici, l'incidenza delle mutazioni di JAK2<sup>V617F</sup> nei bambini con TE è risultata essere di gran lunga inferiore rispetto a quella riportata negli adulti (74, 75). Ulteriori studi, hanno chiarito che questa discrepanza era dovuta alla presenza nella popolazione pediatrica studiata della mutazione MPL<sup>S505A</sup>, che caratterizza le forme familiari e che si manifesta con caratteristiche simili alle forme clonali (2, 72, 75). Considerando le caratteristiche della trombocitosi

in età pediatrica, l'applicazione dei criteri diagnostici del WHO utilizzati negli adulti (1) e/o dell'algoritmo diagnostico-terapeutico recentemente proposti anche per i bambini (89) può portare all'esecuzione di eccessive indagini diagnostiche, anche invasive, e alla prescrizione di trattamenti inappropriati. Per questo motivo, viene proposto un percorso diagnostico specifico per i bambini con un sospetto di SMC (Figura 1). L'algoritmo proposto è articolato: inizia con un'accurata valutazione anamnestica, clinica e di laboratorio (emocromo e striscio di SVP) in bambini che presentano trombocitosi. Per evitare indagini diagnostiche eccessive nei bambini di età <2 anni in cui è frequente il riscontro di una *mild* piastrinosi, viene proposto un *cut-off* del numero delle piastrine in base all'età (>450 x 10<sup>9</sup>/L per quelli con età >2 anni e >600 x 10<sup>9</sup>/L



**FIGURA 1** - Algoritmo diagnostico nei pazienti di età pediatrica con trombocitosi.



per quelli di età inferiore). Il percorso di approfondimento specifico per la caratterizzazione della piastrinosi deve tener conto, oltre che del valore piastrinico, anche della durata della piastrinosi e/o della presenza di sintomi. Il primo obiettivo è l'identificazione di eventuali cause responsabili della piastrinosi e, se presenti, eliminarle. La ricerca di marcatori specifici di malattie mieloproliferative (JAK2 e BCR-ABL) e lo studio di *markers* che possono orientare nella diagnosi (*test* di clonogenicità per identificare le forme primitive, ricerca di mutazioni TPO ed MPL per l'identificazione di quelle familiari) vanno eseguiti su SVP, mentre la biopsia osteomidollare va riservata ad una categoria ristretta di bambini ed esclusa nelle forme familiari.

– **Strategia terapeutica.** Le recenti raccomandazioni dell'ELN stabiliscono che l'obiettivo della terapia nei pazienti con PV e TE deve essere quello di evitare le complicanze sia trombotiche che emorragiche, di ridurre il rischio di leucemia acuta, di controllare i sintomi sistemici e gestire situazioni a rischio, quali la gravidanza e gli interventi chirurgici (88). La scelta terapeutica è condizionata dalla presenza di alcuni fattori di rischio, che non comprendono però il numero delle piastrine, considerate come indice di rischio emorragico solo se  $>1500 \times 10^9/L$ . (88, 90). L'età  $>60$  anni o una storia di trombosi e di rischio cardiovascolare rimangono gli unici fattori prognostici considerati perché derivati dai risultati di studi clinici controllati. Per i pazienti con TE a basso rischio (età  $<60$  anni, assenza di fattori di rischio cardiovascolari e di pregresse trombosi), è previsto un monitoraggio clinico senza alcun trattamento citoreducente. Una terapia antiaggregante con acido acetilsalicilico (ASA) a basse dosi viene riservata per quei pazienti che presentano disturbi del microcircolo, mentre l'inizio della terapia citoreducente è prevista per quelli che presentano un'evoluzione della malattia (88). In questo gruppo dovrebbero rientrare anche i bambini. Per i pazienti ad alto rischio (età  $>60$  anni o pregressa trombosi), è consigliato un trattamento citoreducente fin dalla diagnosi sulla base di quanto emerso da uno studio prospettico randomizzato in cui la sopravvivenza libera da trombosi è risultata essere significativamente migliore nel braccio randomizzato a ricevere la terapia citoreducente

va (67). Nei pazienti ad alto rischio, l'ASA a basse dosi è indicata solo se ci sono disturbi del microcircolo vascolare o con pregresso episodio trombotico arterioso. Nei pazienti a rischio intermedio (età  $<60$  anni, presenza di fattori di rischio cardiovascolare) è consigliato un atteggiamento personalizzato, anche se si è concordi che la strategia terapeutica deve essere simile al paziente a basso rischio (88, 91).

L'ASA, alla dose giornaliera di 75-100 mg, è considerata il farmaco antiaggregante di scelta, mentre la ticlopidina o il prasugrel vengono riservati per quei pazienti che presentano controindicazioni alla terapia con ASA (allergia o gastrite o ulcera peptica documentate). Per quanto riguarda la terapia citoreducente, fino a non molti anni fa l'HU, chemioterapico antimetabolita, ha rappresentato il farmaco di prima scelta, dal momento che sembra consentire un buon controllo delle complicanze vascolari. Purtroppo, è stato segnalato un aumentato rischio di evoluzione leucemica dopo trattamento prolungato (92), non confermato tuttavia in altri studi comprendenti pazienti giovani o bambini con un *follow-up* mediano superiore a 10 anni (72, 93). Dapprima l'IFN- $\alpha$  e, successivamente, l'anagrelide sono diventati una valida alternativa all'HU come farmaco di prima scelta, soprattutto nei pazienti più giovani. L'IFN- $\alpha$ , inibitore della crescita megacariocitaria attraverso la soppressione del segnale indotto dalla TPO, è in grado di ridurre il numero di piastrine senza rischio leucemogeno, e rappresenta quindi il migliore trattamento citoreducente somministrabile in gravidanza. I limiti del trattamento con l'IFN- $\alpha$  sono rappresentati dalla modalità di somministrazione (sottocutanea e giornaliera) che influenza la compliance, dagli effetti collaterali (astenia, sindromi simil-influenzali, alterazioni dell'umore, depressione) che sono motivo di interruzione del trattamento, e, infine, dall'elevato costo di una terapia prolungata. Un'alternativa sono le formulazioni di interferone a lento rilascio (PEG-IFN) che prevedono una somministrazione settimanale che potrebbe favorire sia un miglioramento della compliance che una riduzione degli effetti collaterali. Purtroppo, le due formulazioni differenti (PEG-IFN-alpha 2b e PEG-IFN-alpha 2a) utilizzate in pazienti con NMC BCR-ABL negative, pur dimo-

strando la stessa efficacia dell'IFN- $\alpha$ , provocano effetti collaterali simili a quelli dell'IFN- $\alpha$  (94, 95). L'anagrelide è un farmaco orale la cui attività piastrinopenizzante è stata scoperta casualmente nel 1979. L'FDA dapprima ne ha approvato l'uso nella TE e nella PV e, successivamente, per le trombocitosi in corso di SMC, grazie ai risultati ottenuti da un gruppo di studio su questo farmaco (96). In Europa è stato registrato successivamente, ma non come terapia di prima linea. Recentemente, in un trial randomizzato multi-centrico è stato dimostrato che l'associazione HU + ASA rispetto all'associazione anagrelide (ANA) + ASA è associata ad una minore incidenza di trombosi arteriosa, di emorragie maggiori e di trasformazione mielofibrotica e quindi si conclude che l'HU potrebbe rimanere la terapia di prima scelta nei pazienti affetti da TE ad alto rischio (97).

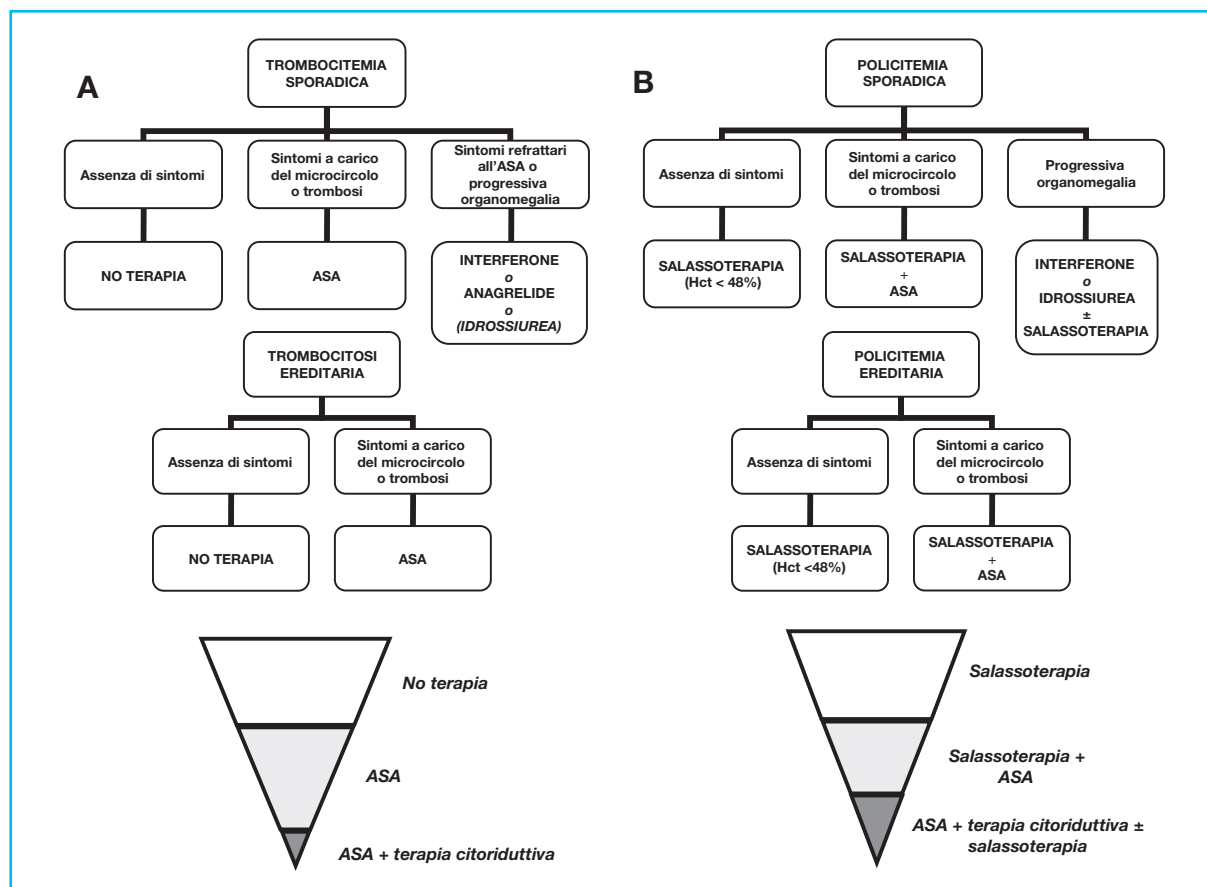
Nei bambini, la strategia terapeutica è stata finora decisa in base ai dati derivati dall'esperienza sugli adulti e, a volte, condizionata dalle convinzioni personali del medico. Spesso la terapia antiaggregante è stata iniziata quando il numero di piastrine superava  $1000 \times 10^9/L$ , indipendentemente dall'età e dalla presenza dei sintomi. La terapia citoriduttrice è stata aggiunta in quei bambini con un numero di piastrine  $>1500 \times 10^9/L$  con o senza organomegalia e/o sintomi, sia nelle forme familiari che in quelle sporadiche, essendo le caratteristiche cliniche ed ematologiche sovrapponibili (72). Come terapia antiaggregante il farmaco più utilizzato è stato l'ASA, anche se il suo impiego si è progressivamente ridotto nel corso degli anni sia nei pazienti di nuova diagnosi che in quelli in trattamento, senza aumento di complicanze trombotiche (72). Per quanto riguarda la terapia citoriduttrice, utilizzata soprattutto nei bambini con la forma sporadica, nei primi anni '80, analogamente agli adulti è stato utilizzato il pipobromano, che, successivamente, è stato sostituito dall'HU, dall'IFN- $\alpha$  e dall'ANA (72).

– *Come orientarsi nei bambini con trombocitosi?* L'elevata incidenza di trombocitosi secondarie in età pediatrica deve indirizzare il medico innanzitutto all'identificazione e alla risoluzione di eventuali cause, quali gli stati infiammatori e/o la carenza di ferro e/o, prima di decidere l'inizio di qualsiasi trattamento, anche quello antiaggregante

(Figura 1). Nei bambini è d'obbligo un atteggiamento terapeutico di tipo conservativo (Figura 2). Anche nelle forme clonali, prima di pianificare una terapia, antiaggregante e/o citoriduttrice, è importante considerare la relativa assenza di sintomi e la più bassa incidenza di trombosi rispetto agli adulti con TE (72). L'ASA, anche a basso dosaggio, non dovrebbe essere usata nelle forme secondarie, soprattutto nei soggetti di età  $<15$  anni, perché può causare disturbi anche gravi, conosciuti come sindrome di Reye. Sia nelle forme familiari che in quelle sporadiche, l'ASA deve essere elettivamente somministrata, a basso dosaggio, solo nei pazienti sintomatici ed è da evitare nei neonati, qualunque sia il numero delle piastrine. L'ASA va somministrata con attenzione perché, soprattutto quando usata per lungo tempo, può avere un effetto paradossale perché aumenta l'espressione dei recettori dell'ADP e della proteina trasportatrice MRP4 nelle piastrine (98) con conseguente aumento del rischio trombotico. L'uso di farmaci citoriduttrici è strettamente riservato per i pazienti con sintomi vascolari (spesso disturbi del microcircolo) resistenti all'ASA o per quelli con progressiva e marcata organomegalia. Il farmaco di prima linea può essere l'HU o IFN- $\alpha$ , scelta da fare in accordo con i genitori e/o con l'adolescente. Quando si decide di escludere l'HU, in caso di intolleranza o scarsa compliance all'IFN- $\alpha$ , l'ANA può rappresentare un'alternativa. Un fattore da valutare è la durata del trattamento che, in età pediatrica, dovrebbe essere interrotto non appena la situazione clinica lo permette.

### **Eritrocitosi**

In condizioni di normalità il processo di eritropoiesi è regolato da diversi fattori tra cui i più importanti sono l'eritropoietina (EPO) ed il suo recettore specifico, denominato EPO-R. L'EPO è un fattore specifico per la linea eritroide ossigeno-dipendente. L'ipossia attiva un segnale a livello delle cellule produttrici di EPO che determina l'incremento dell'espressione del principale fattore trascrizionale per il gene dell'EPO, detto HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*) (99). Al contrario, per aumenti della pressione di ossigeno, si ha la degradazione delle subunità del fattore ad opera dell'ubiquitina tramite l'intervento della proteina codifica-



**FIGURA 2** - Strategia terapeutica consigliata nei bambini con trombocitemia sporadica ed ereditaria (A) ed in quelli con politemia sporadica ed ereditaria.

ta dal gene VHL (*Von Hippel Lindau*). L'EPO agisce attraverso l'interazione con il suo recettore specifico, EPO-R, espresso sui precursori eritroidi. Tale interazione avvia una catena del segnale che determina proliferazione e differenziazione dei progenitori eritroidi e prevenzione dell'apoptosi. La via di trasduzione del segnale che viene attivata prevede il coinvolgimento del JAK2, e dei fattori trascrizionali STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Della via JAK-2/STAT si servono una grande quantità di fattori di crescita e di citochine (100).

Diversi fattori, intrinseci ed estrinseci, possono stimolare l'eritropoiesi con aumento dell'emoglobina, per cui le eritrocitosi [aumento dell'emoglobina (Hb) e dell'ematocrito (Hct) oltre i valori normali per sesso e per età] si distinguono in forme primitive e forme secondarie.

L'eritrocitosi secondaria può essere considerata come una fisiologica ed appropriata risposta a tutte quelle patologie organiche responsabili di una ridotta tensione dell'ossigeno, oppure come un'inappropriata risposta patologica a tutte quelle condizioni che stimolano l'eritropoiesi in quanto responsabili della produzione autonoma di EPO. In entrambe le situazioni è comunque l'eritropoietina (ma anche altre sostanze, come ad esempio gli androgeni, cui parimenti i precursori eritroidi sono sensibili) che agisce su precursori eritroidi del tutto normali. Le forme primitive di eritrocitosi, molto rare in età pediatrica, comprendono:

- la policitemia sporadica (PS), con caratteristiche simili a quelle della PV dell'adulto;
- le forme familiari, che comprendono forme ereditarie che possono essere primitive [dovute a mutazioni genetiche nei progenitori emopo-

ietici (in questo caso sono forme policlonali)] o secondarie (dovute ad aumentata produzione di eritropoietina) e quelle forme familiari in cui due o più membri di una stessa famiglia presentano mutazioni somatiche di tipo mono o policlonali, con caratteristiche cliniche simili a quelle della PV (101). Queste ultime rientrano nel gruppo delle neoplasie mieloproliferative familiari.

La PS nei bambini, analogamente alla PV degli adulti, è clonale. Per quanto riguarda le caratteristiche biologiche ci sono pochi studi riguardanti casistiche pediatriche. Quelli finora disponibili riportano un'overespressione del PRV-1 nel 60% dei casi (2), una crescita spontanea di colonie eritroidi *in vitro* in una percentuale del 37-100% di pazienti (72, 75, 102) e mutazioni somatiche dei geni JAK2 a carico sia dell'esone 14 (V617F) che dell'esone 12 (72, 102). Cario et al. (102) ha riportato la mutazione di JAK2 in tutti i pazienti con diagnosi di PV (in 6 la V617F e in 2 carico dell'esone 12). Tuttavia, in alcuni lavori su casistiche pediatriche, la percentuale di pazienti JAK2 mutati è risultata estremamente bassa (27-37%), confermando l'estrema rarità della PS nell'infanzia e ponendo il problema della reale natura di questi casi di policitemia idiopatica che, peraltro, si presentano con livelli normali di siero EPO (72, 75). È probabile che alcuni pazienti con diagnosi di PS JAK2 *wilde-type* abbiano delle forme ereditarie con mutazioni diverse da quelle finora note, come recentemente riportato in un ragazzo con una nuova mutazione dell'HIF (103). Per quanto riguarda le caratteristiche ematologiche, non sono state riportate differenze tra le forme sporadiche e quelle ereditarie per quanto riguarda il numero dei leucociti e delle piastrine, i livelli dell'emoglobina ed il valore dell'ematocrito.

Le forme di eritrocitosi ereditarie possono essere caratterizzata da livelli di EPO normali o ridotti oppure da aumentati livelli di EPO. Possono essere disordini congeniti primitivi (causati da un difetto di progenitori emopoietici) o secondari (dovuti ad incrementata produzione di EPO) (79, 104).

Il primo gruppo comprende la policitemia primitiva congenita e familiare (PFCP, *Primary Familial and Congenital Polycythemia*), trasmessa come carattere autosomico dominante, (anche se sono

state descritte mutazioni *de novo*), dovuta a diverse mutazioni coinvolgenti il gene che codifica per il recettore dell'eritropoietina (EPO-R) (101), che risulta alterato con conseguente ipersensibilità dei precursori eritroidi all'EPO, i cui livelli possono essere normali o addirittura ridotti (105). Finora, solo nel 15% dei pazienti sono state identificate le alterazioni geniche che sono alla base della PFCP. Dal punto di vista clinico ed ematologico, i pazienti presentano un'Hb elevata con valori normali di leucociti e piastrine, e con un modesto rischio di complicanze vascolari (106). Nella PFCP, l'ematopoiesi è policlonale e l'ipersensibilità all'EPO dei progenitori eritroidi *in vivo* non è accompagnata da una crescita spontanea delle colonie eritroidi endogene (EECs) *in vitro*, prerogativa della PV (107).

Il secondo gruppo di disordini congeniti secondari, comprende i difetti dovuti ad aumentata affinità dell'emoglobina per l'ossigeno, caratterizzata da una riduzione della P50 (pressione parziale di ossigeno cui l'emoglobina è saturata al 50%) ed i difetti nel *pathway* del *sensing* dell'ossigeno, caratterizzate da un'aumentata produzione di eritropoietina (108). Due tipi di condizioni sono alla base di un'incrementata affinità dell'emoglobina per l'ossigeno: la presenza di varianti dell'emoglobina ad elevata affinità per l'ossigeno (da mutazioni coinvolgenti la catena  $\alpha$  o quella  $\beta$ ) ed il deficit dell'enzima 2,3 bifosfoglicerato (2,3-BFG). La modalità di trasmissione per le forme da alterata molecola emoglobinica è sempre autosomica dominante e finora sono state descritte oltre 50 mutazioni, mentre per le forme da deficit di 2,3-BFG può essere autosomica dominante o recessiva. In entrambi le condizioni, i pazienti sono asintomatici in quanto la poliglobulia è compensatoria della bassa tensione di ossigeno tissutale. I difetti nel *pathway* del *sensing* dell'ossigeno possono coinvolgere diverse proteine che regolano la produzione di EPO, quali l'HIF, il VHL, le proteine PHD1, PHD2 e PHD3 (Prolyl Hydroxylase Domain). Il primo difetto ad essere descritto è stata una mutazione del gene VHL (mutazione *missense* 598C>T) nella popolazione russa del Chuvash in cui, nella forma omozigote, determina una forma endemica di policitemia familiare, caratterizzata da elevati livelli di eritropoietina con eritrocitosi (109). Mutazioni funzio-

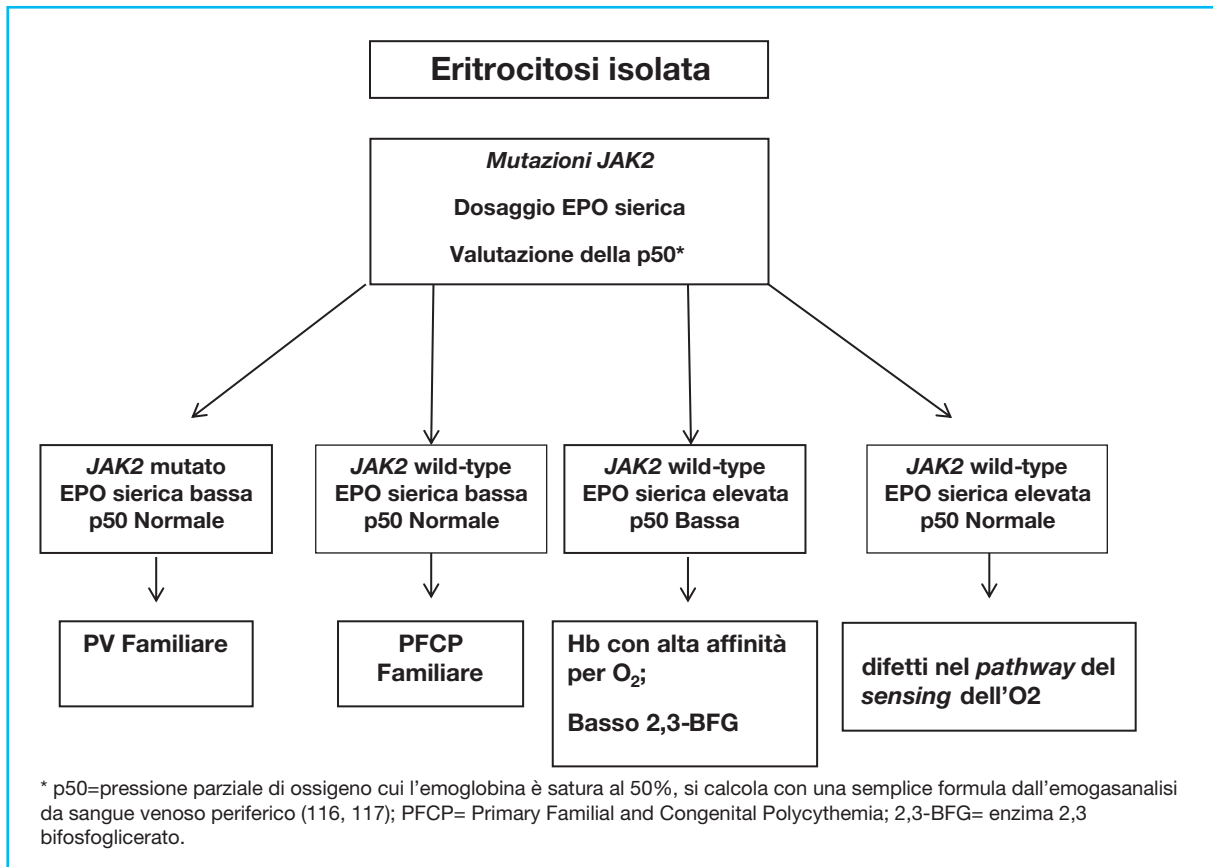
nalmente simili del VHL sono state descritte in famiglie di etnia diverse (110-113) e in numerose famiglie dell'isola di Ischia, l'unica regione oltre il Chuvass, in cui questa forma di policitemia è endemica (114). La mutazione del gene VHL provoca una forma di policitemia non associata ai tumori tipici della sindrome di *Von Hippel Lindau* (emangioblastoma spinocerebellare, carcinomi renali, feocromocitoma) ma predisponente a una morte prematura dovuta ad eventi cerebrovascolari e trombosi periferiche. Più recentemente sono state descritte differenti mutazioni di PHD2 (115, 116) e di HIF (103, 115), che nella forma eterozigote determinano eritrocitosi.

– *Approccio diagnostico.* Di fronte ad un bambino o adolescente con un elevato numero di globuli rossi, è importante valutare, mediante un'accurata anamnesi, la presenza di familiarità o di eventuale cause sottostanti (concomitanti patologie, assunzione di farmaci, disidratazione, altitudine, ecc.). Esclusa una forma secondaria, è d'obbligo un approfondimento diagnostico mirato, con una preferenza per le indagini meno invasive, dal momento che i marcatori biologici disponibili possono essere di grande ausilio, mentre la biopsia osteomidollare può avere un ruolo limitato, soprattutto nei bambini più piccoli, in considerazioni delle caratteristiche midollari in questa fascia d'età. Secondo i criteri utilizzati per gli adulti proposti dal WHO nel 2008, la diagnosi di PV deve soddisfare la presenza o di entrambi i criteri maggiori (aumento dell'Hb o dell'Ht o della massa eritrocitaria >25% del normale + la presenza di mutazione del JAK2) e un criterio minore (mieloprolifera trilineare o alterati livelli sierici di EPO o crescita spontanea di colonie eritroidi) oppure il primo criterio maggiore e 2 criteri minori (*Tabella 5*) (1). In considerazione delle caratteristiche biologiche riportate in alcune casistiche pediatriche, nel caso di eritrocitosi isolata, in assenza di cause che la sottendono, per un approfondimento diagnostico corretto è importante seguire un algoritmo diagnostico specifico per poter identificare le forme familiari (101, 117) (*Figura 3*).

– *Strategia terapeutica.* Gli obiettivi della terapia negli adulti con PV mirano ad evitare le complicanze dovute ad iperviscosità del sangue e l'evoluzione in leucemia acuta o in mielofibrosi, che

possono comparire durante il decorso della malattia. La decisione di iniziare un trattamento può dipendere non solo dalla presenza di sintomi considerati maggiori (ischemia cerebrale, infarto miocardio, trombosi arteriose e venose profonde, tra queste ultime la sindrome di Budd-Chiari) ma anche di sintomi cosiddetti minori, da alterazioni del flusso microcircolatorio, quali cefalea, vertigini, acufeni, disturbi visivi, lipotimia, parestesie e prurito, molto frequenti anche nei soggetti più giovani. La salassoterapia ha da sempre rappresentato il trattamento di scelta, con l'obiettivo di ridurre i sintomi che derivano dai livelli eccessivamente alti di ematocrito (Hct). In uno studio del 1978 è stato dimostrato che il rischio di eventi trombotici e vascolari aumenta significativamente per valori di Hct al di sopra del 44% (118). Quindi, il *target* Hct è fissato al 45% negli uomini, al di sotto del 42% nelle donne (119), anche se, nella pratica clinica, circa il 15% degli ematologi ancora utilizza come target terapeutico un livello di Hct >45% (119). Un *target* dell'Hct di 48 è stato riportato in un recente lavoro pediatrico, senza osservare eventi avversi (72). Per diversi anni la riduzione dell'Hct è stata ottenuta anche con farmaci alchilanti e con fosforo radioattivo (32P), sostituiti dall'HU e quindi dall'IFN- $\alpha$  e dall'anagrelide, a causa del loro elevato potere leucemogeno. L'HU è un farmaco maneggevole, ben tollerato dai pazienti, ma sembra aumenti il rischio leucemogeno. L'IFN- $\alpha$  rappresenta un efficace sostituto dell'HU soprattutto nei pazienti più giovani che necessitano di trattamento, ma è gravato da elevata tossicità. L'anagrelide, in grado di controllare la trombocitosi, è controindicata nei pazienti con PV a causa della sua potenzialità emorragica in associazione con l'ASA. La terapia antiaggregante viene presa in considerazione nei pazienti affetti da PV che presentano complicanze trombotiche e vascolari ricorrenti, in particolare in quelli con ischemia vascolare e digitale. Il farmaco di prima scelta è sempre l'ASA a basso dosaggio. Recentemente lo studio ECLAP condotto su pazienti con PV che non avevano controindicazioni alla somministrazione di ASA, ha dimostrato che l'aspirina a basse dosi (100 mg/die) è efficace nel prevenire le complicanze trombotiche senza il rischio di provocare emorragie maggiori





**FIGURA 3** - Algoritmo diagnostico per i pazienti con sospetto di eritrocitosi familiare (101).

(67). La scelta terapeutica ottimale essere fatta valutando quei parametri che permettono di identificare i pazienti che possono giovare di un trattamento senza incorrere in un aumento dei rischi legati all'uso prolungato di farmaci, sia antiaggreganti (aumento del rischio emorragico) sia citoriduttivi (aumento del rischio di trasformazione leucemica o mielofibrotica e di seconde neoplasie). Recentemente, l'ELN ha sviluppato un algoritmo terapeutico articolato per i pazienti con PV, non solo sulla base di fattori prognostici ma anche su definiti criteri di risposta al trattamento (120). Analogamente agli adulti, anche nelle scarse casistiche su pazienti pediatriche policitemiche, il trattamento è variato enormemente nel corso degli anni. Oltre al salasso e/o all'eritrocitaferesi, che è stato il trattamento cardine utilizzato nella maggioranza dei pazienti (72-75%) (72, 121), per ridurre l'Hct sono stati impiegati anche farmaci cito-

riduttivi, dapprima agenti alchilanti e fosforo, successivamente HU ed IFN- $\alpha$ . Addirittura in alcuni bambini è stato impiegato il TACS, senza successo.

Recentemente, è stato suggerito un approccio molto conservativo anche nei soggetti con policitemia diagnosticata in età pediatrica (Figura 2). Il salasso rimane la terapia citoriduttiva di scelta, con l'obiettivo di una riduzione Hct meno severa rispetto agli adulti, con un valore accettabile fino al 48%. In considerazione dell'assenza di eventi emorragici durante il decorso, la terapia con ASA può essere intrapresa solo nei bambini e adolescenti con disturbi del microcircolo. La terapia citoriduttiva viene riservata solo ai pazienti con progressiva epato e/o splenomegalia, con o senza sintomi resistenti alla ASA ed il farmaco (HU o IFN- $\alpha$ ) viene scelto in accordo con il paziente e i genitori.

## ■ SINDROMI MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE: CLINICA E COMPLICANZE

I dati disponibili sull'andamento clinico a lungo termine delle SMC (spettanza di vita, complicanze trombotiche ed emorragiche, evoluzione in mielofibrosi e/o leucemia, comparsa di neoplasie e andamento delle gravidanze) riguardano esclusivamente la popolazione adulta (122-129), mentre solo recentemente sono stati pubblicati dati riguardanti la popolazione pediatrica (72).

### **Complicanze trombotiche ed emorragiche**

L'incidenza di fenomeni trombotici riportata negli adulti con SMC varia dal 14 al 25% (122-125, 129), con un rischio cumulativo a 10 anni del 14% (123) e con una probabilità cumulativa a 20 anni di circa il 50% (130). Il rischio trombotico aumenta con l'età avanzata del paziente (>60 anni), con una storia di pregressa trombosi e con la presenza di altri rischi vascolari, quali l'ipercolesterolemia ed il fumo. Nella PV, l'aumento dell'ematocrito e della viscosità ematica globale potrebbero contribuire alla genesi delle trombosi nella PV mediante un meccanismo di perturbazione del flusso sanguigno, soprattutto a livello microcircolatorio. Infatti la normalizzazione dell'Hct mediante salassoterapia riduce, anche se non annulla, il rischio di tale complicanza. Tuttavia, l'eritrocitosi da sola non può spiegare la tendenza trombotica nei pazienti affetti da PV, dal momento che la normalizzazione dell'Hct non riduce il rischio; inoltre, nelle forme secondarie per livelli di globuli rossi simili o addirittura maggiori rispetto a quelli raggiunti in quelle primitive non si osservano trombosi. Nella TE sembra che il grado di piastrinosi non correli con il rischio di trombosi, anche se il controllo dei livelli piastrinici può ridurre la frequenza delle complicanze trombotiche nei pazienti ad alto rischio (131). Il significato prognostico di altri fattori, quali una leucocitosi e/o mutazione di JAK2<sup>V617F</sup>, deve essere ancora confermato. In un recente lavoro riguardante una popolazione pediatrica con SMC, le complicanze trombotiche osservate durante un lungo periodo di osservazione (follow-up mediano: 10 anni) in 3/64 pazienti (4,6%) non sono risultate essere correlate né con lo stato mutazionale di JAK2 né con anomalie

trombofiliche, ma con una leucocitosi dovuta a processi infettivi in atto e con la presenza della mutazione MPL<sup>S505A</sup> in 2/3 pazienti, già segnalata come elemento predisponente alla trombosi. I risultati dello studio confermano l'ipotesi che l'integrità dell'albero vascolare, tipico di individui giovani, protegga da eventi trombotici, mentre il suo ruolo diventa marginale con il sopravvento di fattori di rischio aggiuntivi, come la riduzione del flusso, infezioni e leucocitosi (72).

Eventi emorragici sono stati riportati sia in corso di PV che di TE in una percentuale variabile dal 9,5 a circa il 20% di adulti. La patogenesi non è completamente nota, ma sono state riportate diverse anomalie strutturali e funzionali delle piastrine (anomalia nell'espressione delle glicoproteine piastriniche di membrana, aggregazione piastrinica spontanea ed aggregati di piastrine circolanti, anomalie acquisite nello *storage pool*, anomalie nel metabolismo dell'acido arachidonico) che potrebbero essere all'origine delle manifestazioni emorragiche in questi pazienti. La presenza di una forma acquisita di malattia di von Willebrand (*AvWD = Acquired von Willebrand Disease*) sembra contribuire alla genesi delle emorragie, soprattutto nei pazienti affetti da TE (132), e sembra essere correlata al numero di piastrine (aumentato rischio emorragico nei casi con piastrine >1500x10<sup>9</sup>/L) e ridursi con la citoriduzione piastrinica. Un dato da tenere in considerazione per l'inizio di una terapia antiaggregante nei bambini con trombocitosi è che la forma acquisita della AvWD è stata riportata anche nelle forme reattive (133).

### **Sviluppo di neoplasie**

Sia la TE che la PV sono accomunate anche dalla tendenza all'evoluzione in mielofibrosi, in LA mieloide (LAM) e/o in sindrome mielodisplastiche (SMD) con l'uso di terapie citoriduttrici. Tuttavia, nella PV il rischio di una evoluzione ematologica può essere spontanea, come confermato da uno studio originale del *Polycythemia Vera Study Group* (PVSG) che calcolava all'1,5% l'incidenza della LAM in pazienti trattati soltanto con salassi (134). Nei pazienti affetti da PV, il rischio di evoluzione in mielofibrosi con metaplasia mieloide della milza e/o in LAM incrementa con l'età e con la terapia citoriduttrici, con un'incidenza del 2,3%

e del 13%, rispettivamente, a 3 e a più di 10 anni dalla diagnosi (135). Al contrario, nei pazienti affetti da TE, la trasformazione in LAM o in SMD è rarissima, mentre l'evoluzione in mielofibrosi durante terapia citoriduttiva incrementa nel tempo, soprattutto con l'anagrelide, con una probabilità dell'8% a 10 anni (136). In un recente studio su una popolazione pediatrica, relativamente ampia, con disordini mieloproliferativi cronici, è stato osservato lo sviluppo di una splenomegalia progressiva nell'8% dei pazienti, e di una fibrosi midollare di grado 1-2 nel 4,5% dei casi, dopo un *follow-up* mediano >10 anni. Un dato interessante è il fatto che nessuno di questi pazienti aveva ricevuto in precedenza terapia citoriduttiva, suggerendo che questa evoluzione può far parte della storia naturale di queste patologie (72).

L'incidenza di neoplasie, osservate soprattutto nei pazienti adulti con PV trattati con terapia citoriduttiva soprattutto alchilanti, incrementa con il periodo di osservazione (123-125). Per quanto riguarda l'esperienza in età pediatrica, sembra che l'esposizione prolungata a farmaci mielosoppressivi non influenzi l'incidenza di neoplasie, dal momento che una neoplasia è stata osservata in un paziente che in precedenza non aveva ricevuto alcun trattamento (72).

### **Gravidanza**

Nelle donne con SMC, soprattutto TE, circa il 21-35% (126-128) delle gravidanze si complica con aborti spontanei ricorrenti e con ritardo nella crescita fetale a causa di infarti placentari multipli. In una recente casistica di pazienti diagnosticate in età pediatrica, la percentuale di aborto spontaneo osservata nel primo trimestre era del 14%, simile a quella stimata nella popolazione generale. Il minor tasso di aborti spontanei osservato è stato attribuito agli interventi terapeutici personalizzati eseguiti nelle gravidanze programmate, dal momento che il tipo di profilassi antitrombotica è stato scelto in base ai diversi fattori di rischio trombofilico, identificati con analisi mirata (72).

### **Conclusioni**

In età pediatrica le SMC Ph- sono nella maggior parte dei casi secondari. Una trombocitosi reat-

tiva è di riscontro molto frequente nei bambini più piccoli, mentre un'eritrocitosi secondaria può essere trovata negli adolescenti e giovani adulti in seguito all'assunzione di alcune sostanze. La relativa assenza di sintomi e la più bassa incidenza di trombosi rispetto agli adulti suggeriscono che i bambini devono essere gestiti in modo più conservativo. Quindi, prima di procedere ad un approfondimento diagnostico specifico, diventa fondamentale un'anamnesi accurata, volta ad individuare eventuali cause secondarie. Inoltre, prima di intraprendere l'iter specifico per la definizione diagnostica e l'inizio di una terapia antiaggregante e/o citoriduttiva, bisogna considerare la bassa morbilità legata a questi disturbi in età pediatrica evitando al bambino un'eccessiva medicalizzazione. Per quanto riguarda la diagnosi, sono da preferire le indagini meno invasive e, comunque, dovrebbe essere considerata sempre la possibilità di una forma ereditaria. Lo *screening* trombofilico è raccomandato nelle donne con SMC in età fertile con l'obiettivo di pianificare un trattamento personalizzato durante la gravidanza. Sia la terapia antiaggregante che quella citoriduttiva va riservata a categorie limitate di bambini, evitando l'impiego della chemioterapia in assenza di *markers* di clonalità.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008; 22: 14-22.
2. Teofili L, Giona F, Martini M, Cenci T, Guidi F, Forti L, et al. The revised WHO diagnostic criteria for Ph-negative myeloproliferative diseases are not appropriate for the diagnostic screening of childhood polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood*. 2007; 110: 3384-6.
3. Andolina JR, Neudorf SM, Corey SJ. How I treat childhood CML. *Blood* 2012; 119: 1821-30.
4. Ries LAG SM, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR, editors. Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER Program; 1999. Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995 (NIH publication no. 99-4649).
5. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained

- complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 1029-35.
6. Radivoyevitch T, Hlatky L, Landaw J, Sachs RK. Quantitative modeling of chronic myeloid leukemia: insights from radiobiology. *Blood.* 2012; 119: 4363-71.
  7. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009; 113: 1619-30.
  8. Chakraborty S, Stark JM, Sun CL, Modi H, Chen W, O'Connor TR et al. Chronic myelogenous leukemia stem and progenitor cells demonstrate chromosomal instability related to repeated breakage-fusion-bridge cycles mediated by increased nonhomologous end joining. *Blood.* 2012; 119: 6187-97.
  9. Adler R, Viehmann S, Kuhlisch E, Martiniak Y, Röttgers S, Harbott J et al. Correlation of BCR/ABL transcript variants with patients' characteristics in childhood chronic myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 2009; 82: 112-8.
  10. Talpaz M, McCredie KB, Mavligit GM, Gutterman JU. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1983; 62: 689-92.
  11. Dow LW, Raimondi SC, Culbert SJ, Ochs J, Kennedy W, Pinkel DP. Response to alpha-interferon in children with Philadelphia chromosome-positive chronic myelocytic leukemia. *Cancer.* 1991; 68: 1678-84.
  12. Millot F, Brice P, Philippe N, Thyss A, Demeoq F, Wetterwald M et al. Alpha-interferon in combination with cytarabine in children with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002; 24: 18-22.
  13. Giona F, Moleti ML, Del Giudice I, Testi AM, Diverio D, De Cuia MR et al. Long-term follow-up of Philadelphia chromosome-positive (Ph) chronic myeloid leukaemia (CML) in children and adolescents managed at a single institution over a 20-year period. *Br J Haematol.* 2005; 130: 970-2.
  14. Millot F, Guilhot J, Nelken B, Leblanc T, Leverger G, Bernard F et al. Results of a phase II trial testing interferon-alpha 2b and cytarabine in children and adolescents with chronic myelogenous leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2006; 47: 555-9.
  15. Millot F, Esperou H, Bordigoni P, Dalle JH, Michallet M, Michel G, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in childhood: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire (SFGM-TC). *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32: 993-9.
  16. Cwynarski K, Roberts IA, Iacobelli S, van Biezen A, Brond R, Devergie A, et al. Stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in children. *Blood.* 2003; 102: 1224-31.
  17. Muramatsu H, Kojima S, Yoshimi A, Atsuta Y, Kato K, Nagatoshi Y, et al. Outcome of 125 children with chronic myelogenous leukemia who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16: 231-8.
  18. Suttorp M, Claviez A, Bader P, Peters C, Gadner H, Ebele W, et al. Allogeneic stem cell transplantation for pediatric and adolescent patients with CML: results from the prospective trial CML-paed I. *Klin Padiatr.* 2009; 221: 351-7.
  19. Jacobsohn DA, Arora M, Klein JP, Haddebroek A, Flowers ME, Cutler CS, et al. Risk factors associated with increased nonrelapse mortality and with poor overall survival in children with chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2011; 118: 4472-79.
  20. Huff CA, Fuchs EJ, Smith BD, Blackford A, Garrett-Mayer E, Brodsky RA, et al. Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006; 12: 414-21.
  21. Lee SJ, Kukreja M, Wang T, Giralt SA, Szer J, Arora M, et al. Impact of prior imatinib mesylate on the outcome of hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2008; 112: 3500-7.
  22. Olivieri A, Locatelli F, Zecca M, Sanna A, Cimminiello M, Raimondi R, et al. Imatinib for refractory chronic graft-versus-host disease with fibrotic features. *Blood.* 2009; 114: 709-18.
  23. Carpenter PA, Snyder DS, Flowers ME, Sanders JE, Gooley TA, Martin PJ, et al. Prophylactic administration of imatinib after hematopoietic cell transplantation for high-risk Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Blood.* 2007; 109: 2791-3.
  24. Klyuchnikov E, Schaffhausen P, Kroger N, Brummendorf TH, Osanmaz O, Asenova S, et al. Second-generation tyrosine kinase inhibitors in the post-transplant period in patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Acta Haematol.* 2009; 122: 6-10.
  25. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348: 994-1004.
  26. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1054-61.
  27. Jabbour E, Kantarjian HM, Jones D, Shan J, O'Brien S, Reddy N, et al. Imatinib mesylate dose escalation is associated with durable responses in patients with chronic myeloid leukemia after cytogenetic failure on standard-dose imatinib therapy. *Blood.* 2009; 113: 2154-60.
  28. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic

- ic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002; 99: 1928-37.
29. Suttorp M, Millot F. Treatment of pediatric chronic myeloid leukemia in the year 2010: use of tyrosine kinase inhibitors and stem-cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010; 2010: 368-76.
  30. Kolb EA, Pan Q, Ladanyi M, Steinherz PG. Imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive leukemia of childhood. *Cancer*. 2003; 98: 2643-50.
  31. Champagne MA, Capdeville R, Krailo M, Qu W, Peng B, Rosamilia M, et al. Imatinib mesylate (STI571) for treatment of children with Philadelphia chromosome-positive leukemia: results from a Children's Oncology Group phase 1 study. *Blood*. 2004; 104: 2655-60.
  32. Millot F, Guilhot J, Nelken B, Leblanc T, De Bont ES, Békassy AN, et al. Imatinib mesylate is effective in children with chronic myelogenous leukemia in late chronic and advanced phase and in relapse after stem cell transplantation. *Leukemia*. 2006; 20: 187-192.
  33. Giona F, Putti MC, Santoro N, Gottardi E, Ladogana S, Micalizzi C et al. Imatinib Mesylate induces high complete cytogenetic and major molecular response rates in children and adolescents with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia in chronic phase [Abstract]. *Haematologica*. 2010; 95 (Suppl. 2): 346.
  34. Giona F, Putti MC, Santoro N, Gottardi E, Ladogana S, Micalizzi C et al. Imatinib in children and adolescents with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. The Italian experience (Abstract). I-BFM Study Group Meeting, Gdansk. 6-8 May, 2011.
  35. Millot F, Baruchel A, Guilhot J, Petit A, Leblanc T, Bertrand Y, et al. Imatinib is effective in children with previously untreated chronic myelogenous leukemia in early chronic phase: results of the French National Phase IV Trial. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2827-32.
  36. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010; 362: 2260-70.
  37. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010; 362: 2251-9.
  38. Aplenc R, Blaney SM, Strauss LC, Balis FM, Shusterman S, Ingle AM, et al. Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of dasatinib: a report from the children's oncology group phase I consortium. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 839-44.
  39. Wayne A, Macedo C, Szczudlo T, Woodman R. Nilotinib treatment in pediatric patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) leukemia refractory to prior tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy: results from nilotinib compassionate use program (Abstract). *Blood*. 2008; 112. s 4264.
  40. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006; 355: 2408-17.
  41. Mauro MJ. Defining and managing imatinib resistance. *Hematology (ASH Education Program Book)*. 2006: 219-25.
  42. Shah NP. Ponatinib: targeting the T315I mutation in chronic myelogenous leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2011; 9: 925-6.
  43. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. Bosutinib for the treatment of chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Drugs Today*. 2012; 48: 177-88.
  44. Gschwind HP, Pfaar U, Waldmeier F, Zollinger M, Sayer C, Zbinden P, et al. Metabolism and disposition of imatinib mesylate in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33: 1503-12.
  45. Marangon E, Citterio M, Sala F, Barisone E, Lippi AA, Rizzari C, et al. Pharmacokinetic profile of imatinib mesylate and N-desmethyl-imatinib (CGP 74588) in children with newly diagnosed Ph+ acute leukemias. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 63: 563-6.
  46. Petain A, Kattygnarath D, Azard J, Chatelut E, Delbaldo C, Georger B, et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of imatinib in children and adults. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 7102-9.
  47. White HE, Matejtschuk P, Rigsby P, Gabert J, Lin F, Lynn Wang Y et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood*. 2010; 116: e111-7.
  48. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 6041-51.
  49. Radich JP. How I monitor residual disease in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009; 114: 3376-81.
  50. Berman E, Nicolaides M, Maki RG, Fleisher M, Chaneil S, Scheu K, et al. Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *N Engl J Med*. 2006; 354: 2006-13.
  51. Gambacorti-Passerini C, Tornaghi L, Cavagnini F, Rossi P, Pecori-Giraldi F, Mariani L, et al. Gynaecomastia in men with chronic myeloid leukaemia after imatinib. *Lancet*. 2003; 361: 1954-6.
  52. Jönsson S, Olsson B, Ohlsson C, Lorentzon M, Mellström D, Wadenvik H. Increased cortical bone mineralization in imatinib treated patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2008; 93: 1101-3.
  53. Giona F, Mariani S, Gnessi L, Moleti ML, Rea M, De Vellis A et al. Bone metabolism, growth rate and pubertal development in children with chronic myeloid leukemia treated with imatinib during puberty. *Haematologica*. 2012; Sep 14. [Epub ahead of print].



54. Fitter S, Dewar AL, Kostakis P, Hughes TP, Roberts MM, Lynch K et al. Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. *Blood*. 2008; 111: 2538-47.
55. Schmid H, Jaeger BA, Lohse J, Suttorp M. Longitudinal growth retardation in a prepubertal girl with chronic myeloid leukemia on long-term treatment with imatinib. *Haematologica*. 2009; 94: 1177-9.
56. Mariani S, Giona F, Basciani S, Brama M, Gnessi L. Low bone density and decreased inhibin-B/FSH ratio in a boy treated with imatinib during puberty. *Lancet*. 2008; 372: 111-2.
57. Shima H, Tokuyama M, Tanizawa A, Tono C, Hamamoto K, Muramatsu H, et al. Distinct impact of imatinib on growth at prepubertal and pubertal ages of children with chronic myeloid leukemia. *J Pediatr*. 2011; 159: 676-81.
58. Hobernicht SL, Schweiger B, Zeitler P, Wang M, Hunger SP. Acquired growth hormone deficiency in a girl with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitor therapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2011; 56: 671-3.
59. Matthes-Martin S, Pötschger U, Bergmann K, Frommlet F, Brannath W, Bauer P et al. Risk-adjusted outcome measurement in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008; 14: 335-43.
60. Skrepnek GH, Ballard EE. Cost-efficacy of imatinib versus allogeneic bone marrow transplantation with a matched unrelated donor in the treatment of chronic myelogenous leukemia: a decision-analytic approach. *Pharmacotherapy*. 2005; 25: 325-34.
61. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951; 6: 372-5.
62. Hasle H. Incidence of essential thrombocythaemia in children. *Br J Haematol*. 2000; 110: 751.
63. Jensen MK, de Nully Brown P, Nielsen OJ & Hasselbalch HC. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area. *European Journal of Haematology*. 2000; 65: 132-9.
64. Osgood EE. Polycythemia Vera: Age Relationships and Survival. *Blood* 1965; 26: 243-56.
65. Rossbach HC. Familial infantile myelofibrosis as an autosomal recessive disorder: preponderance among children from Saudi Arabia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2006; 23: 453-4.
66. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434: 1144-48.
67. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 573-82.
68. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007; 356: 459-68.
69. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am J Hematol*. 2011; 86: 668-76.
70. Goettler PS, Steimle C, Marz E, Johansson PL, Andreasson B, Griesshammer M et al. The JAK2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood* 2005; 106: 2862-4.
71. Wolber EM, Dame C, Fahrenstich H, Hofmann D, Bartmann P, Jelkmann W et al. Expression of the thrombopoietin gene in human fetal and neonatal tissues. *Blood*. 1999; 94, 97-105.
72. Giona F, Teofili L, Moleti ML, Martini M, Palumbo G, Amendola A et al. Thrombocythemia and polycythemia in patients younger than 20 years at diagnosis: clinical and biologic features, treatment, and long-term outcome. *Blood*. 2012; 119: 2219-27.
73. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006; 108: 3472-6.
74. Randi ML, Putti MC, Scapin M, et al. Pediatric patients with essential thrombocythemia are mostly polyclonal and V617FJAK2 negative. *Blood*. 2006; 108: 3600-2.
75. Teofili L, Giona F, Martini M, et al. Markers of myeloproliferative diseases in childhood polycythemia vera and essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 1048-53.
76. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005; 366: 1945-53.
77. Palandri F, Ottaviani E, Salmi F, et al. JAK2V617F mutation in essential thrombocythemia: correlation with clinical characteristics, response to therapy and long-term outcome in a cohort of 275 patients. *Leuk Lymphoma*. 2009; 50: 154-5.
78. De Stefano V, Za T, Rossi E, et al. Influence of the JAK2 V617F mutation and inherited thrombophilia on the thrombotic risk among patients with essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2009; 94: 733-7.
79. Kralovics R, Skoda RC. Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Blood Rev*. 2005; 19: 1-13.
80. Skoda R. The genetic basis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007: 1-10.
81. Stockklauser C, Echner N, Klotter AC, Hegenbart U, Dreger P, Kulozik AE. Hereditary thrombocythemia caused by a thrombopoietin (THPO) gain-of-function mutation associated with multiple myeloma and congenital limb defects. *Ann Hematol*. 2012; 91: 1129-33.
82. Zhang B, Ng D, Jones C, Oh ST, Nolan GP, Salehi

- S, et al. A novel splice donor mutation in the thrombopoietin gene leads to exon 2 skipping in a Filipino family with hereditary thrombocythemia. *Blood*. 2011; 118: 6988-90.
83. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A et al Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004; 103: 4198-200.
84. Liu K, Martini M, Rocca B, et al. Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in eight Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia. *Haematologica*. 2009; 94: 1368-74.
85. Teofili L, Giona F, Torti L, Cenci T, Ricerca BM, Rumi C et al. Hereditary thrombocytosis caused by MPLSer505Asn is associated with a high thrombotic risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis. *Haematologica*. 2010; 95: 65-70.
86. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2004; 101: 11444-7.
87. El-Harith HA, Roesl C, Ballmaier M, et al. Familial thrombocytosis caused by the novel germ-line mutation p.Pro106Leu in the MPL gene. *Br J Haematol*. 2009; 144: 185-94.
88. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European Leukemia Net. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 761-70.
89. Harrison CN, Bareford D, Butt N, Campbell P, Conneally E, Drummond M et al. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis. *Br J Haematol*. 2010; 149: 352-75.
90. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC et al Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*. 2009; 113: 4829-33.
91. Tefferi A. Annual Clinical Updates in Hematological Malignancies: a continuing medical education series: polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2011; 86: 292-301.
92. Passamonti F, Rumi E, Elena C, Cazzola M, Lazzarino M. Terapia della trombocitemia essenziale. *Haematologica Reports*. 2006; 2: 36-41.
93. Finazzi G, Ruggeri M, Rodeghiero F, Barbui T. Efficacy and safety of long-term use of hydroxyurea in young patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *Blood*. 2003; 101: 3749.
94. Jabbour E, Kantarjian H, Cortes J, Thomas D, Garcia-Manero G, Ferrajoli A et al. PEG-IFN-alpha-2b therapy in BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders: final result of a phase 2 study. *Cancer*. 2007; 110: 2012-8.
95. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M et al Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood*. 2008; 112: 3065-72.
96. Anagrelide Study Group. Anagrelide, a therapy for thrombocythemic states: experience in 577 patients. *Am J Med*. 1992; 92: 69-76.
97. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005; 353: 33-45.
98. Jedlitschky G, Greinacher A, Kroemer HK. Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy. *Blood*. 2012; 119: 3394-402.
99. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992; 12: 5447-54.
100. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signalling pathway. *J Cell Science*. 2004; 117: 1281-3.
101. Rumi E. Familial chronic myeloproliferative disorders: the state of the art. *Hematol Oncol*. 2008; 26: 131-8.
102. Cario H, Schwarz K, Herter JM, Komrska V, McMullin MF, Minkov M et al Clinical and molecular characterisation of a prospectively collected cohort of children and adolescents with polycythemia vera. *Br J Haematol*. 2008; 142: 622-6.
103. Martini M, Teofili L, Cenci T, et al. A novel heterozygous HIF2AM535I mutation reinforces the role of oxygen sensing pathway disturbances in the pathogenesis of familial erythrocytosis. *Haematologica*. 2008; 93: 1068-71.
104. Gordeuk VR, Stockton DW, Prchal JT Congenital polycythemia/erythrocytoses. *Haematologica*. 2005; 90: 109-16.
105. Van Maerken T, Hunnink K, Callewaert L, Benoit Y, Laureys G, Verlooy J. Familial and Congenital Polycythemia: A Diagnostic Approach. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004; 26: 407-16.
106. Prchal JT, Semenza GL, Prchal J, Sokol L. Familial polycythemia. *Science*. 1995; 268: 1831-2.
107. Kralovics R, Prchal JT. Genetic heterogeneity of primary familial and congenital polycythemia. *Am J Hematol*. 2001; 68: 115-21.
108. Kralovics R, Prchal JT. Congenital and inherited polycythemia. *Curr Opin Pediatr*. 2000; 12: 29-34.
109. Ang SO et al. disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet*. 2002; 32: 614-21.
110. Pastore YD, Jelinek J, Ang S, Guan Y, Liu E, Jedlickova K et al. Mutations in the VHL gene in spo-

- radic apparently congenital polycythemia. *Blood*. 2003; 101: 1591-5.
111. Percy MJ, McMullin MF, Jowitt SN, Potter M, Treacy M, Watson WH et al. Chuvash-type congenital polycythemia in 4 families of Asian and Western European ancestry. *Blood*. 2003; 102: 1097-9.
  112. Cario H, Schwarz K, Jorch N, Kyank U, Petrides PE, Schneider DT et al. Mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and VHL-haplotype analysis in patients with presumable congenital erythrocytosis. *Haematologica*. 2005; 90: 19-24.
  113. Bento MC, Chang KT, Guan Y, Liu E, Caldas G, Gatti RA, et al. Congenital polycythemia with homozygous and heterozygous mutations of von Hippel-Lindau gene: five new Caucasian patients. *Haematologica*. 2005; 90: 128-9.
  114. Perrotta S, Nobili B, Ferraro M, Migliaccio C, Borriello A, Cucciolla V et al. Von Hippel-Lindau-dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster. *Blood*. 2006; 107: 514-9.
  115. Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, Li X, Lappin TR, McMullin MF et al. A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2008; 358: 162-8.
  116. Al-Sheikh M, Moradkhani K, Lopez M, Wajcman H, Préhu C. Disturbance in the HIF-1 $\alpha$  pathway associated with erythrocytosis: further evidences brought by frameshift and nonsense mutations in the prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) gene. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 40: 160-5.
  117. Agarwal N, Mojica-Henshaw MP, Simmons ED, Hussey D, Ou CN, Prchal JT. Familial polycythemia caused by a novel mutation in the beta globin gene: essential role of P50 in evaluation of familial polycythemia. *Int J Med Sci*. 2007; 4: 232-6.
  118. Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet*. 1978; 2: 1219-22.
  119. Streiff MB, Smith B, Spivak JL. The diagnosis and management of polycythemia vera in the era since the Polycythemia Vera Study Group: a survey of American Society of haematology member's practice patterns. *Blood*. 2002; 99: 1144-9.
  120. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC et al. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*. 2009; 113: 4829-33.
  121. Cario H, McMullin MF, Pahl HL. Clinical and hematological presentation of children and adolescents with polycythemia vera. *Ann Hematol*. 2009; 88: 713-9.
  122. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica*. 2008; 93: 1645-51.
  123. Palandri F, Catani L, Testoni N et al. Long-term follow-up of 386 consecutive patients with essential thrombocythemia: safety of cytoreductive therapy. *Am J Hematol*. 2009; 84: 215-220.
  124. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 2224-32.
  125. Crisà E, Venturino E, Passera R et al. A retrospective study on 226 polycythemia vera patients: impact of median hematocrit value on clinical outcomes and survival improvement with anti-thrombotic prophylaxis and non-alkalizing drugs. *Ann Hematol*. 2010; 89: 691-9.
  126. Passamonti F, Randi ML, Rumi E, et al. Increased risk of pregnancy complications in patients with essential thrombocythemia carrying JAK2 (617V>F) mutation. *Blood*. 2007; 110: 485-9.
  127. Gangat N, Wolanskyj AP, Schwager S, Tefferi A. Predictors of pregnancy outcome in essential thrombocythemia: a single institution study of 63 pregnancies. *Eur J Haematol*. 2009; 82: 350-3.
  128. Melillo L, Tieghi A, Candoni A, et al. Outcome of 122 pregnancies in essential thrombocythemia patients. A report from the Italian registry. *Am J Hematol*. 2009; 84: 636-40.
  129. Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Bellosillo B, et al. Essential thrombocythemia in young individuals: frequency and risk factors for vascular events and evolution to myelofibrosis in 126 patients. *Leukemia*. 2007; 21: 1218-23.
  130. Wolanskyj A, Schwager SM, McClure F, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates and prognostic factors. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81: 159-66.
  131. Schafer AI. Thrombocytosis. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1211-9.
  132. Buddle U, van Gederen PJJ. Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Semin Thromb Hemostas*. 1997; 425-31.
  133. Sucker C, Michiels JJ, Zotz RB. Causes, etiology and diagnosis of acquired von Willebrand disease: a prospective diagnostic workup to establish the most effective therapeutic strategies. *Acta Haematol*. 2009; 121: 177-82.
  134. Berk PD, Goldberg JD, Silverstein MN, et al. Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy. *N Engl J Med*. 1981; 304: 441-7.
  135. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*. 2005; 105: 2664-70.
  136. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. for the United Kingdom Medical Research Council Primary Thrombocythemia 1 Study. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005; 353: 33-45.

# Trapianto di cellule staminali emopoietiche

**STEFANO GIARDINO, GIORGIO DINI**

*Istituto Giannina Gaslini di Genova, U.O.C. Ematologia e Oncologia Pediatrica,  
U.O. Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche*



Giorgio Dini

## ■ INTRODUZIONE

Nel 1968 Good pubblicò per la prima volta la guarigione di un bambino affetto da immunodeficienza combinata grave (SCID), sottoposto a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) prelevate dal fratello (1). A questa prima esperienza seguirono, con il riconoscimento del ruolo del sistema HLA nella tolleranza del trapianto, studi clinici di largo respiro condotti a Seattle su pazienti affetti da leucemia acuta e pubblicati da Thomas nel 1977 (2).

Da allora il TCSE ha avuto un'evoluzione costante, divenendo il trattamento di elezione di molteplici patologie oncologiche, ematologiche, immunologiche e metaboliche congenite o acquisite. Ad oggi, sebbene un numero sempre più elevato di bambini affetti da neoplasia (leucemia in particolare) risponda ai trattamenti chemioterapici a dosi convenzionali e a terapie biologiche mirate,

una percentuale ancora significativa necessita di una intensificazione del trattamento con relativo supporto di cellule staminali (trapianto autologo) oppure del ricorso ad un TCSE da donatore (trapianto allogenico).

L'impiego di tali procedure ha modificato profondamente la storia naturale di molte patologie a prognosi altrimenti infausta (neoplasie resistenti, anemia aplastica severa) e migliorato le prospettive di sopravvivenza e la qualità della vita di pazienti affetti da patologie che, pur non gravate da prognosi infausta nel breve termine, presentano un decorso naturale caratterizzato da importante morbidità. L'applicazione e l'evoluzione del TCSE sono pertanto da considerare una vera e propria rivoluzione terapeutica, che, incominciata diversi anni or sono e progressivamente raffinata nel corso degli anni grazie alla crescente conoscenza nel campo della biologia, dell'immunologia, dell'istocompatibilità, non ha ancora completato il suo percorso.

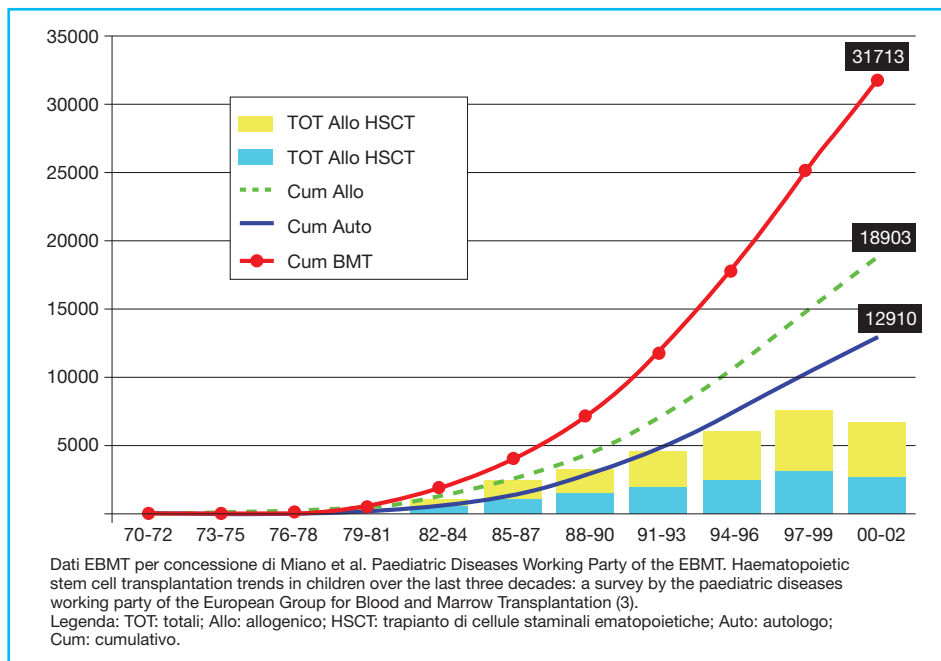
**Parole chiave:** trapianto di cellule staminali emopoietiche, chemioterapia ad alte dosi, condizionamento, donatore alternativo, unità sangue cordonale.

*Indirizzo per la corrispondenza*

Giorgio Dini  
U.O.C. Ematologia e Oncologia  
Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche  
Istituto Giannina Gaslini  
Largo Gerolamo Gaslini, 5 - 16147 Genova  
E-mail: giorgiodini@ospedale-gaslini.ge.it

## ■ INDICAZIONI IN PEDIATRIA

Recentemente abbiamo pubblicato i dati relativi all'attività trapiantologica europea riportata al Registro dell'*European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) che mostrano come nel corso degli ultimi decenni si sia verificato un incremento nell'applicazione del TCSE autologo nei tumori solidi e del TCSE allogenico.

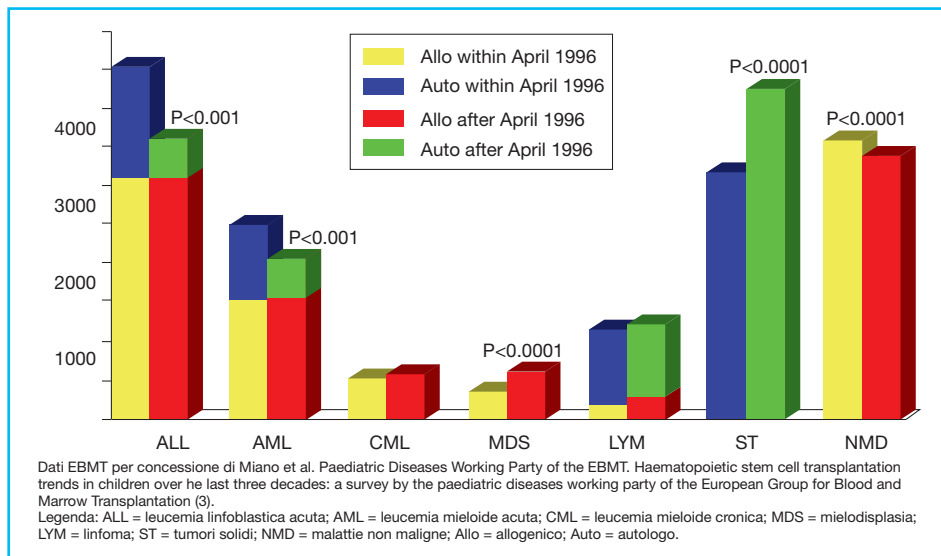


**FIGURA 1** - Numero e tipo di trapianti eseguiti per anno nei centri europei.

co in tutte le indicazioni (oncologiche e non oncologiche), con la sola eccezione della leucemia mieloide cronica, in relazione all'impiego efficace dei farmaci inibitori delle tirosin-chinasi in tale patologia (Figura 1 e 2) (3). Tali dati si osservano anche per quanto riguarda l'attività dei centri Italiani, riportata dall'Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP) (dati non pubblicati).

## ■ TCSE AUTOLOGO

Il termine trapianto autologo è una dicitura impropria con la quale è indicato un trattamento chemioterapico mieloablativo ad alte dosi di farmaci a cui segue l'infusione di cellule staminali emopoietiche provenienti dal paziente stesso, precedentemente prelevate. In passato la fonte di cellule staminali emopoietiche (CSE) nel trapianto



**FIGURA 2** - Numero di trapianti per patologia e per anno eseguiti nei centri europei.



autologo era rappresentata esclusivamente dal sangue midollare, prelevato mediante espianto di midollo. Attualmente sono utilizzate per lo più le staminali raccolte dal sangue periferico (*peripheral blood stem cells* - PBSC), che mostrano molteplici vantaggi nella gestione del paziente (invasività minore, anestesia non necessaria), nella gestione della fase post-trapianto (tempi di attecchimento più rapidi rispetto alle CSE da sangue midollare) e sulla malattia di base (minor rischio di contaminazione del prodotto).

La raccolta di CSE viene eseguita dopo un'adeguata stimolazione del paziente con fattori di crescita emopoietici (G-CSF) e viene eseguita mediante procedura aferetica dal sangue periferico presso un centro trasfusionale certificato. La stimolazione e la raccolta sono eseguite dopo un ciclo di chemioterapia definito mobilizzante, in genere in una fase in cui la malattia è in remissione, in particolar modo in quelle neoplasie nelle quali il midollo osseo è una potenziale sede di malattia, come nel caso del neuroblastoma.

Il marcatore cellulare utilizzato per le CSE è il CD34: la valutazione durante i giorni di stimolazione con G-CSF dei livelli periferici di cellule CD34+ consente di identificare il momento migliore per eseguire la raccolta. Questa sarà effi-

cace quando il numero totale di cellule CD34+ raccolte risulti adeguato a consentire, una volta infuse le cellule nel paziente, la ripresa della funzione emopoietica in tutti i cicli di chemioterapia ad alte dosi previsti per il paziente. Le cellule raccolte sono divise in aliquote e criopreservate con aggiunta di dimetilsolfossido (DMSO) in azoto liquido e scongelate al momento dell'infusione. Nei pazienti in cui la raccolta non risulta adeguata per scarsa mobilitazione si esegue un espanto di midollo osseo. In alternativa attualmente è in uso sperimentale in pediatria il plerixafor (Mozobil®), un farmaco ampiamente utilizzato in età adulta (4, 5), che agisce in sinergia con il fattore di crescita G-CSF, in grado di stimolare il rilascio in circolo delle cellule staminali CD34+ altrimenti bloccate nel microambiente midollare. Attualmente è in corso uno studio multicentrico europeo di fase 1-2 sull'impiego del plerixafor in prima scelta nella stimolazione di pazienti pediatrici (età >2 <18 anni) avviati ai cicli di chemioterapia ad alte dosi seguita da TCSE autologo.

Il trapianto di CSE autologo è una procedura consolidata in età pediatrica nel trattamento di molteplici tumori solidi a prognosi sfavorevole (*Tabella 1*), come in particolare il neuroblastoma (NB) disseminato, il sarcoma di Ewing metastatico e i

| <i>Diagnosi</i>                  | <i>Indicazione al TCSE autologo</i>                                                                             |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Leucemia mieloide acuta          | - Prima remissione completa (CR1) ad alto rischio<br>- Seconda remissione completa (CR2) dopo purging midollare |
| Linfomi maligni recidivati       | - Recidiva                                                                                                      |
| Neuroblastoma                    | - Alto rischio alla diagnosi<br>- Recidiva                                                                      |
| Tumore a cellule germinali (GCT) | - Recidiva/refrattarietà                                                                                        |
| Sarcoma di Ewing                 | - Alto rischio alla diagnosi<br>- Recidiva/refrattarietà                                                        |
| Tumore di Wilms                  | - Alto rischio alla diagnosi<br>- Recidiva/refrattarietà                                                        |
| Rabdomiosarcoma                  | - Alto rischio                                                                                                  |
| Retinoblastoma                   | - Diffusione extraoculare                                                                                       |
| Tumori SNC embrionali            | - Tutti                                                                                                         |
| Tumori SNC gialli                | - Alto rischio<br>- Recidiva/refrattarietà                                                                      |
| Malattie autoimmuni              | - Tipi selezionati, refrattari alle terapie convenzionali e a prognosi severa                                   |

**TABELLA 1** - Indicazione alla chemioterapia alte dosi e TCSE autologo in età pediatrica.

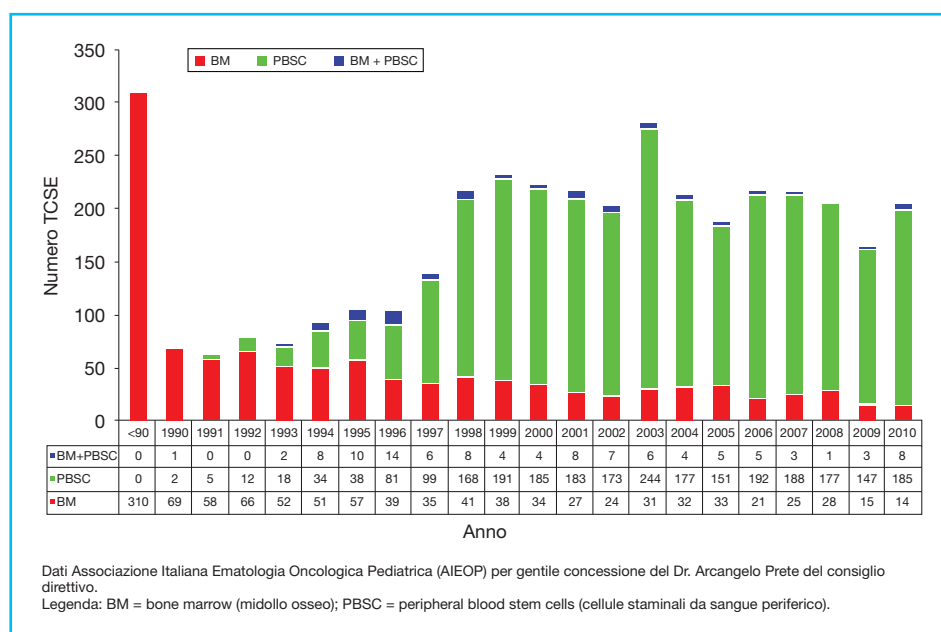
tumori cerebrali a prognosi severa (es. medulloblastoma, pinealoblastoma metastatici). Rientra in protocolli specifici per il trattamento di tali neoplasie e ha l'obiettivo primario di stabilizzare e consolidare i risultati ottenuti con i cicli chemioterapici a cui il paziente è stato precedentemente sottoposto.

La sua esecuzione ha visto una crescita esponenziale nell'ultimo decennio, come dimostrano i dati dell'attività dei centri accreditati europei e italiani (Figura 3).

In oncologia il razionale dell'impiego di dosi sovramassimali di radio/chemioterapia (alte dosi: da 1,5 a 3 volte superiori alle dosi *standard*) si fonda sull'effetto dose-risposta, in base al quale l'azione anti-tumorale dei farmaci citostatici è proporzionale all'aumentare della dose dei farmaci. Questa modalità pertanto ottimizza l'azione antitumorale, ma ha un effetto mieloablativo: l'infusione di CSE autologhe consente di ripristinare la normale emopoiesi autologa, dopo un periodo di aplasia midollare della durata media di 10-15 giorni. I limiti di tale procedura sono rappresentati essenzialmente dalla reale capacità del regime di condizionamento di ridurre in modo risolutivo le cellule neoplastiche residue e dalla possibile presenza delle cellule neoplastiche nel prodotto infuso. Tale potenziale rischio è molto limitato nel caso

di neoplasie solide e, come detto in precedenza, minimizzato nel caso di neoplasie che coinvolgano il midollo osseo, essendo eseguita la raccolta di CSE in fase di remissione morfologica della malattia. Inoltre, la selezione positiva delle cellule staminali CD34+ dal sangue periferico consente di ridurre al minimo tale rischio, essendo il CD34 un marcatore esclusivo non espresso dalle cellule neoplastiche. La metodica del *purging* eseguita sul prodotto autologo è stata ampiamente utilizzata in passato, in particolare quando il sangue midollare rappresentava l'unica fonte di CSE autologhe, ma non è dimostrata una reale efficacia nel ridurre il rischio di recidiva. Tale metodica ormai superata prevedeva la decontaminazione del prodotto autologo con l'utilizzo di farmaci derivati della ciclofosfamida, come la mafosfamida (ASTA-Z) e 4-idroperossiciclofosfamida (4-HC) o con metodi immunologici (anticorpi monoclonali specifici per marcatori espressi dalle cellule neoplastiche), con l'effetto citostatico che inevitabilmente comporta un ritardo nei tempi di attecchimento.

In passato il TCSE autologo è stato ampiamente impiegato come consolidamento dopo terapia di induzione nei bambini con leucemia mieloblastica acuta (LMA) ad alto rischio, in prima remissione completa (CR1) o in seconda remissione



**FIGURA 3** - Numero di trapianti autologi per anno e fonte di CSE nei centri italiani.

(CR2), in mancanza di un donatore allogenico. D'altra parte i risultati degli studi pediatrici, che confrontano il TCSE autologo alla chemioterapia ed al TCSE allogenico sono spesso in contrasto tra loro. Recentemente l'AIEOP ha riportato che i pazienti sottoposti a TCSE allogenico mostrano un esito superiore rispetto alla chemioterapia convenzionale e al trapianto autologo. Peraltro questi dati retrospettivi e non controllati devono essere trattati con cautela (6).

L'opinione attuale è che il TCSE autologo con *purging in vitro* impiegato nel consolidamento non rappresenti nei pazienti in CR 1 un'alternativa valida alla chemioterapia nel rischio standard o al TCSE allogenico nell'alto rischio (7).

Le principali indicazioni attualmente condivise dal Gruppo Europeo per il TCSE autologo (Tabella 1) sono state recentemente pubblicate, distinguendo l'opinione clinica in cui il TCSE può essere eseguito dopo attenta valutazione del rapporto rischio/beneficio, l'impiego generalmente non raccomandato; il trattamento convenzionale; l'uso sperimentale (8) e sul sito del Ministero Italiano della Salute è riportata una tabella con le indicazioni al TCSE autologo in età pediatrica (Basi Scientifiche per Linee Guida, sito ISS, 2012).

L'introduzione del trapianto autologo nei protocolli di trattamento dei tumori solidi a prognosi infausta in età pediatrica risale alla seconda metà degli anni '80 e ai primi anni '90, con le prime applicazioni nel NB ad alto rischio, nell'ipotesi che un aumento dell'intensità dei trattamenti chemioterapici potesse migliorare la sopravvivenza.

Numerosi studi retrospettivi e non controllati pubblicati in quegli anni e nei successivi dimostravano l'aumento dell'*event-free survival* (EFS) dei pazienti trattati (9, 10). La più grande analisi retrospettiva pubblicata dall'EBMT nel 1997 mostrava una sopravvivenza a 2 anni del gruppo di pazienti sottoposti a procedura autologa del 49%, con la maggior parte delle recidive di malattia che si verificavano entro i 18 mesi dal trapianto e le più tardive che si osservavano fino a 7 anni (11). Tali dati preliminari sono stati la base per i successivi studi prospettici randomizzati per la valutazione del TCSE autologo nel NB ad alto rischio, il più importante dei quali è stato lo studio di fase III del *Children's Cancer Group*. Tale studio prevedeva la randomizzazione dei pazien-

ti con NB alto rischio tra un regime di consolidamento con chemioterapia ad alte dosi e TCSE autologo *versus* la sola chemioterapia; una seconda randomizzazione successiva prevedeva il confronto tra l'avvio dopo il consolidamento alla terapia con acido cis-retinoico (RA) e l'assenza di ulteriori terapie. Lo studio dimostrò la significativa maggiore EFS nel braccio di pazienti sottoposti a TCSE autologo rispetto a quelli trattati con la sola chemioterapia e l'impatto positivo della terapia con RA (12, 13), contribuendo a definire il TCSE autologo seguito da 6 mesi di terapia orale con RA come il trattamento standard del NB alto rischio. Recentemente il gruppo del SIO-PEN (*International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma*) ha messo a confronto diverse combinazioni di chemioterapici utilizzati nel regime di condizionamento per il TCSE autologo nel NB: lo schema CEM (carboplatino, etoposide, melphalan), considerato il condizionamento standard, contro lo schema BU-MEL (busulfano, melphalan). I dati relativi a tale studio, sebbene non siano ancora stati pubblicati, sono stati presentati all'ultimo congresso dell'*American Society of Clinical Oncology*, e dimostrano una differenza statisticamente rilevante dell' EFS a 3 anni, migliore nel braccio BU-MEL (48% vs 33%), candidando tale schema a diventare lo *standard-care* (14).

Sull'onda dei risultati ottenuti nel NB, il TCSE autologo è stato impiegato negli anni come terapia di salvataggio in altri tumori solidi dell'età pediatrica con caratteristiche di prognosi infausta, quali il sarcoma di *Ewing* (15, 16) e il tumore di *Wilms* metastatici e/o in recidiva (17), il rabdomiosarcoma ad alto rischio (18) e i tumori germinali metastatici refrattari o recidivati, sebbene in questi ultimi un recente studio randomizzato non abbia mostrato una differenza significativa nella *long-term survival* dei pazienti trattati con TCSE autologo *versus* la chemioterapia sequenziale (19).

Più incoraggianti sono invece i risultati riportati in letteratura sull'impiego della chemioterapia ad alte dosi seguita da TCSE autologo nel trattamento dei tumori cerebrali con caratteristiche di maggiore aggressività, quali il medulloblastoma, il pinealoblastoma, il tumore rabdoide metastatici, con vari report che hanno dimostrato il suo ruolo positivo nell'incrementare la sopravvivenza libera da

malattia (20-23). I protocolli attuali per i tumori cerebrali dell'età pediatrica prevedono l'esecuzione, dopo la chirurgia e i cicli di chemioterapia a dosi *standard*, di due cicli di chemioterapia ad alte dosi con thiotepe e TCSE autologo, seguito dalla radioterapia locale o, se controindicata per età inferiore a tre anni, da un terzo ciclo di alte dosi con l'eventuale associazione del carboplatino.

## ■ TCSE ALLOGENICO

Il trapianto allogenico di CSE (TCSE allogenico) è un trattamento ampiamente utilizzato in pediatria in patologie ematologiche congenite o acquisite, oncologiche, immunologiche e metaboliche e negli ultimi 15 anni il numero di TCSE allogenico eseguiti nei bambini in Europa è aumentato in modo significativo.

Recentemente il gruppo EBMT ha pubblicato un documento in cui sono riportate le principali indicazioni attualmente condivise sull'impiego del

TCSE allogenico in pediatria (24). Sul sito del Ministero Italiano della Salute è riportata una tabella con le indicazioni al *TCSE allogenico* in età pediatrica (*Basi Scientifiche per Linee Guida*, sito ISS, 2012). Nella *tabella 2* sono riportate le principali indicazioni al TCSE allogenico in pediatria. Nelle patologie congenite o acquisite a carico del sistema emopoietico (insufficienze midollari, emoglobinopatie) e/o immunitario (immunodeficienze) lo scopo del trapianto di CSE allogenico è ottenere una ricostituzione emopoietica ed immunologica efficace originata dal donatore. Allo stesso modo, l'efficacia del TCSE allogenico nelle malattie metaboliche secondarie a deficit enzimatici (es.: M. di *Hurler* - MPS-I) è secondaria alla sostituzione del sistema immunitario ed emopoietico del paziente, con uno nuovo che agisca da sorgente valida e duratura dell'enzima deficitario, sia nel sangue che nei tessuti, colonizzati dalle cellule derivate dal sistema reticolo-endoteliale del donatore. Nel caso delle malattie neoplastiche lo scopo è l'eradicazione della malattia alla quale contribui-

| <i>Oncologiche</i>                               | <i>Immunodeficienze</i>                                                                     |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| LLA                                              | - SCID                                                                                      |
| - In 1° RC con caratteristiche di alto rischio*  | - Immunodeficienza con iper-IgM                                                             |
| - In ≥ 2° RC                                     | - Sindrome di Wiskott-Aldrich                                                               |
| LMA in 1° o ulteriore RC                         | - Sindrome di Omenn                                                                         |
| LMC                                              | - Selezionati disordini autoimmuni life-threatening resistenti ai trattamenti convenzionali |
| Sindromi mielodisplastiche                       | - Malattia granulomatosa cronica                                                            |
| Linfomi Hodgkin e non Hodgkin                    |                                                                                             |
| Tumori solidi casi selezionati**                 | <b>Istiocitosi/sindromi da attivazione macrofagica</b>                                      |
| - NB 4° stadio                                   | - Linfocitosi emofagocitica familiare (HLH)                                                 |
| - Carcinoma a cellule renali                     | - Sindrome di Chediak-Higashi                                                               |
| - Sarcoma di Ewing alto rischio                  | - Sindrome di Griscelli                                                                     |
| - Sarcomi tessuti molli                          | - Sindrome di Duncan (Sindrome linfoproliferativa)                                          |
|                                                  | X-linked - XLP                                                                              |
| <b>Insufficienze midollari e emoglobinopatie</b> | - Istiocitosi a cellule di Langherans                                                       |
| Anemia aplastica severa                          |                                                                                             |
| Anemia di Fanconi                                | Disordini congeniti del metabolismo e da accumulo                                           |
| Discheratosi congenita                           | - Mucopolisaccaridosi di tipo I                                                             |
| Sindrome di Kostmann                             | - Malattie lisosomiali e perossisomiali tipi selezionati                                    |
| Anemia di Blackfan Diamond                       | - Osteopetrosi                                                                              |
| Thalassemia major                                |                                                                                             |
| Drepanocitosi                                    |                                                                                             |

\*Pazienti ad alto rischio di recidiva: alti livelli di malattia residua minima ai punti di valutazione.

\*\*Neuroblastoma metastatico o refrattario alle terapie convenzionali o recidivato dopo trapianto autologo, rabdomiosarcoma refrattario alle terapie convenzionali o recidivato dopo trapianto autologo, sarcoma di Ewing metastatico ad altissimo rischio.

**TABELLA 2** - Principali indicazioni al TCSE allogenico in pediatria.

scono sia l'effetto antitumorale delle alte dosi mieloablative di radio/chemioterapia, sia l'effetto immunologico del trapianto. Ciò che accade *in vivo* dopo l'infusione delle CSE allogeniche e il loro attecchimento, con proliferazione oltre che dei precursori dell'emopoiesi anche dei linfociti T del donatore, è l'azione di immunosorveglianza che i linfociti del donatore, le cellule NK alloreattive e le cellule accessorie del sistema fagocitario svolgono nei confronti delle cellule del ricevente, diventando capaci di montare una risposta immunologica efficace contro le cellule tumorali. Questi eventi rappresentano la base della patogenesi della malattia del trapianto contro l'ospite (*Graft versus Host Disease* - GvHD), principale complicanza e causa di morbidità e mortalità trapianto-correlata, così come la base dell'effetto anti-tumorale (*Graft versus Tumor/Graft versus Leukemia* - GvT/GvL) del trapianto allogenico. La stretta correlazione tra questi due effetti è dimostrata dalla aumentata percentuale di recidiva nei pazienti che non sviluppino GvHD acuta e/o cronica dopo il trapianto (25).

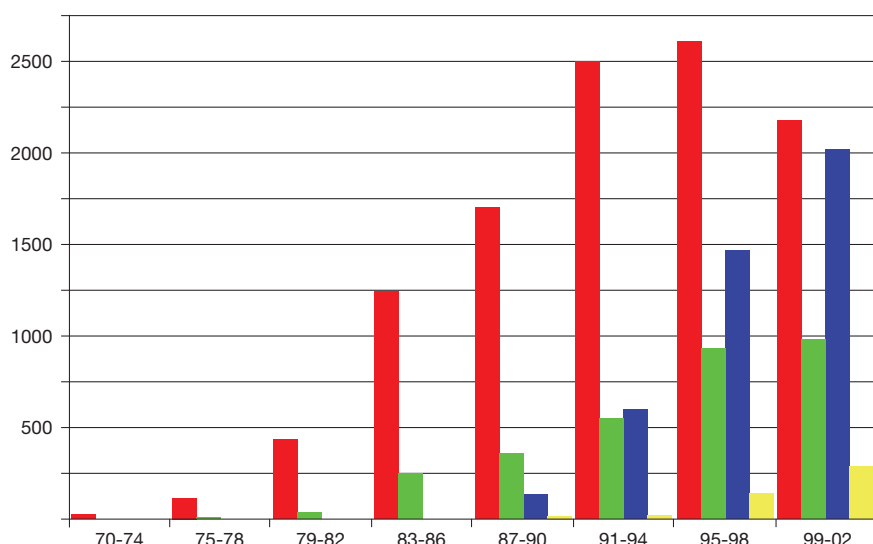
Tale è la ragione della necessità e del vantaggio di modulare lo schema di profilassi della GvHD sulla base delle caratteristiche della malattia di base, oltre che sul tipo di donatore (familiare iden-

tico, unrelated) e sulla fonte di CSE (sangue midollare, sangue periferico, sangue cordonale), con le malattie neoplastiche che verosimilmente beneficino di profilassi che non pregiudichino l'effetto GvL, mentre altre indicazioni al TCSE non se ne avvantaggiano (aplasie midollari, talassemia, immunodeficit congeniti, malattie lisosomiali).

## ■ TIPI DI DONATORE E FONTI DI CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE

Il donatore familiare identico (*matched sibling donor* - MSD) quando disponibile rappresenta la prima scelta in un TCSE allogenico, in relazione alla minore entità delle complicanze trapianto-correlate che si verifica in seguito a tale tipologia di trapianto, sebbene la sua presenza si verifichi solo nel 25% dei pazienti con indicazione al TCSE allogenico.

Nel corso degli anni è, dunque, sensibilmente aumentato il numero di trapianti eseguiti da donatore alternativo: volontario non correlato (*matched unrelated donor* - MUD), donatore familiare parzialmente compatibile (*mismatched related donor* - MRD) e sangue cordonale (CB), che sono oggi



**FIGURA 4** - TCSE allogenici per tipo di donatore di CSE negli anni.

Dati EBMT per concessione di Miano et al. Paediatric Diseases Working Party of the EBMT. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (3).

Legenda: VUD = donatore volontario; CB = sangue di corde ombelicale, sia familiare che non correlato; Sibling Donor = donatore familiare; partially matched family donor = 1, 2 o 3 antigen mismatched family donor.



utilizzati in oltre il 50% dei trapianti in pediatria (Figura 4).

Inoltre è progressivamente aumentato l'utilizzo di fonti di CSE alternative al midollo osseo; il cordone ombelicale è oggi considerato una valida alternativa sia nelle patologie oncologiche che non oncologiche e il sangue periferico, utilizzato come prima scelta nel trapianto autologo, è una valida alternativa nel trapianto allogenico, in particolare nei secondi trapianti dopo rigetto.

### **TCSE da donatore alternativo**

Come detto, solo il 25% dei pazienti che necessitano di un TCSE allogenico hanno un donatore familiare HLA-compatibile. In tutti gli altri casi quindi l'unica opzione è l'attivazione della ricerca di un MUD HLA-compatibile nei registri Internazionali. Attualmente i registri di donatori volontari di CSE sono una realtà diffusa nei paesi sviluppati, vantaggiosamente integrati con le banche di CB. Si stima che attualmente per la grande maggioranza dei pazienti che necessitano di un TCSE allogenico sia possibile trovare un donatore non consanguineo sufficientemente compatibile (HLA -A, -B, -DRB1 identico) per consentire il successo del trapianto (26).

### **Selezione del donatore**

Pertanto, in presenza di una diagnosi di patologia eligibile a un TCSE allogenico in un bambino, è necessario eseguire la tipizzazione degli alleli HLA del paziente e del gruppo familiare (genitori ed eventuali fratelli). Gli antigeni HLA -A, -B e -C vengono usualmente identificati attraverso una tecnica a bassa risoluzione, mentre per gli antigeni HLA -DR e -DQ deve essere utilizzata la metodica ad alta risoluzione. In presenza di un fratello MSD, il paziente può essere avviato al trapianto, compatibilmente con lo stato di malattia e in accordo agli eventuali protocolli di chemioterapia nelle patologie oncologiche. In assenza di un MSD, è necessario eseguire la tipizzazione completa HLA ad alta risoluzione del paziente e avviare la ricerca di un donatore volontario o di un'unità di sangue cordonale. Queste vengono eseguite attraverso un *network* internazionale (*Bone Marrow Donors World Wide - BMDW*) che comprende oltre 11 milioni di donatori volontari arruolati in 58 registri e oltre 260.000 unità di CB

in 36 banche e il *Netcord*, che include ulteriori 130.000 unità circa di CB in 22 banche.

La selezione del donatore riveste, pertanto, un ruolo fondamentale per il successo finale della procedura trapiantologica. Nel passato recente sono stati eseguiti varie analisi finalizzate ad identificare i fattori relativi alle caratteristiche del donatore e della coppia donatore/ricevente in grado di influenzare la sopravvivenza del paziente trapiantato e quindi potenzialmente utilizzabili come parametri di scelta del donatore.

È noto come il differente grado di compatibilità degli alleli del sistema maggiore di istocompatibilità sia associato ad un differente esito, con l'incidenza di GvHD grave e di conseguenza la mortalità trapianto correlata che aumenta all'aumentare del numero di differenze tra donatore e ricevente (27, 28).

La compatibilità sugli alleli HLA -A, -B, C e -DRB1 tra donatore e ricevente rappresenta la principale caratteristica necessaria affinché il trapianto abbia successo, in termini di attecchimento e di minore mortalità trapianto correlata, legata alla minore incidenza di GvHD. In particolare, una singola differenza su alleli HLA di classe I o II non ha alcuna influenza sulla sopravvivenza ed è pertanto accettabile, mentre un *mismatching* multiplo per più di un allele di classe I o una contemporanea disparità negli alleli di classe I e II si associano ad una TRM maggiore.

L'impatto potenziale sulla sopravvivenza di eventuali differenze sugli alleli HLA -DQ e -DP, invece, risulta ancora controverso, sebbene alcuni studi dimostrino come differenze su tali alleli in presenza di compatibilità sugli antigeni di classe I e II non influenzino la sopravvivenza (29).

Tra gli altri fattori considerati, la giovane età del donatore è risultata avere un'influenza positiva significativa sulla sopravvivenza, maggiore di quella legata ad altre caratteristiche della coppia donatore-ricevente, quali la sierologia per citomegalovirus, il genere e la compatibilità AB0 (30). Il donatore ideale è pertanto rappresentato da un individuo di età giovane adulta, compresa tra 18 e 30 anni, con una compatibilità HLA donatore/ricevente di 8 loci su 8 (8/8) (escludendo la valutazione dell'allele corrispondente al DQB1) o da un'unità di CB che presenti una compatibilità di 4 su 6 con il ricevente (considerando le differen-

ze antigeniche HLA -A, -B e la tipizzazione allelica del DRB1). La quantità minima di cellule nucleate diffusamente ritenuta sufficiente a consentire un attecchimento dell'emopoiesi del donatore in tempi adeguati è di  $3 \times 10^7$  cellule nucleate per kilogrammo di peso corporeo del ricevente.

La scelta definitiva del donatore è, inoltre, legata anche all'urgenza di eseguire il trapianto, dettata dalla situazione della malattia di base. Nel caso delle leucemie acute, se non si identifica un donatore volontario o un'unità di sangue cordonale adatto al paziente e in tempi adeguati (in genere entro i 3 mesi dalla remissione della malattia), il trapianto da donatore aploidentico rappresenta la potenziale alternativa da offrire. Alcuni centri definiscono il trapianto aploidentico l'opzione terapeutica di scelta nei casi in cui un donatore alternativo non è disponibile.

### Trapianto MUD

I primi dati riportati sull'*outcome* dei pazienti sottoposti a TCSE MUD mostravano una morbilità e mortalità trapianto correlata maggiore rispetto ai pazienti sottoposti a TCSE da donatore familiare identico, legata alla maggiore difficoltà nell'attecchimento e alla maggiore incidenza di GvHD sia acuta che cronica (31). Ciò era principalmente legato alla minore accuratezza delle metodiche di selezione del donatore e della tipizzazione HLA. Attualmente le tecniche di tipizzazione-HLA in alta risoluzione molecolare sia per gli antigeni HLA di classe I che di classe II, consentono di identificare quelle differenze in passato non evidenziabili, ottimizzando la ricerca del miglior donatore possibile (32, 33). L'applicazione di tali metodiche, l'affinamento delle terapie di supporto e la maggiore conoscenza nei meccanismi fisiopatologici della GvHD con lo sviluppo di nuovi approcci più efficaci di profilassi e terapia hanno consentito di ridurre significativamente negli anni la mortalità trapianto correlata, riducendo le differenze osservate in passato tra i TCSE da donatore alternativo rispetto ai TCSE da donatore familiare.

### Trapianto di CB

La prima descrizione di un trapianto di cellule staminali da sangue di CB risale al 1988 (34), rela-

tiva ad un paziente affetto da anemia di Fanconi trapiantato con il sangue raccolto dal CB di un fratello, dimostrato sano e compatibile.

La dimostrata sicurezza per il neonato della procedura di raccolta del sangue placentare al momento del parto (35) e la dimostrata efficacia dell'utilizzo del sangue cordonale come fonte alternativa di CSE nel TCSE allogenico in diverse patologie (36-38) hanno rappresentato le basi per la diffusione internazionale di un programma di raccolta, tipizzazione HLA e crioconservazione delle unità di sangue CB allo scopo di impiego nel trapianto di CSE allogenico in pazienti non sanguigni.

Nel corso degli anni sono pertanto nate banche specializzate nella conservazione delle unità cordonali, unite in un registro internazionale efficacemente integrato con i registri dei donatori volontari di midollo osseo e sangue periferico. Attualmente si stima che circa 300.000 unità cordonali siano state efficacemente raccolte, tipizzate e cripreservate nelle banche mondiali e circa 3.000 siano stati ad oggi i trapianti allogenici di CSE che hanno visto come fonte delle staminali sangue cordonale non correlato.

Diversi sono i potenziali vantaggi nell'utilizzo del CB nel trapianto allogenico di CSE: il principale è rappresentato dalla possibilità di utilizzare con dimostrata efficacia e sicurezza il CB anche in presenza di 2 differenze antigeniche HLA tra donatore e ricevente sui 6 loci considerati (4 su 6), maggiore rispetto a quella consentita nei trapianti la cui fonte di CSE sia il sangue midollare o periferico, in relazione al fatto che i linfociti *T naive* presenti nel CB hanno una dimostrata inferiore capacità di determinare GvHD, rispetto a quelli contenuti nel midollo osseo o nel sangue periferico (39). Altra caratteristica vantaggiosa, nei casi in cui il fattore tempo risulti determinante per la patologia di base, è la rapida disponibilità delle cellule cripreservate, essendo in media circa 3-4 settimane l'attesa tra l'attivazione della ricerca e la possibilità di utilizzare un'unità di sangue cordonale, il cui utilizzo, inoltre, non è dipendente dal donatore e dal suo stato di salute. Inoltre ridotto è il rischio di contaminazioni virali, quali il Citomegalovirus e l'Epstein Barr virus con ridotto rischio di trasmissione di infezioni.

Dal confronto tra casistiche pediatriche di TCSE

allogenici la cui fonte è stata il sangue midollare o periferico e quelli in cui è stato utilizzato CB emerge che nel TCSE da CB i tempi di attecchimento sia dei neutrofili che delle piastrine sono maggiori e più lenta è la ricostituzione immunologica che si osserva, con conseguente più alta mortalità trapianto correlata (TRM), nelle fasi precoci post trapianto, secondaria ad un maggior rischio infettivo. In compenso, inferiore appare l'incidenza della GvHD sia acuta che cronica. Tali differenze sono legate alla scarsità di linfociti T della memoria nel sangue cordonale rispetto al sangue midollare o periferico, con tali cellule che contribuiscono significativamente alla ricostituzione immunologica precoce nei riceventi un TCSE da midollo osseo o dal sangue periferico (40).

Inoltre in tali analisi è emersa la correlazione inversa tra il numero di cellule infuse con il sangue CB e l'incidenza cumulativa di mortalità trapianto correlata, con i soggetti che ricevono una dose di cellule nucleate per kilogrammo di peso corporeo minore che mostrano un rischio più elevato di sviluppare complicanze letali (41).

Il principale limite all'utilizzo del CB è rappresentato in effetti dalla cellularità dell'unità di sangue CB prelevata e conservata, che può non essere sufficiente a garantire l'attecchimento duraturo in pazienti di peso maggiore, motivo per cui il suo impiego è molto limitato negli adolescenti e negli adulti.

Alcune tecniche attualmente in sviluppo, come l'infusione di CB intraossea (42), l'infusione di due diverse unità di CB (43) e l'utilizzo di tecniche di espansione in vitro delle CSE da CB hanno come obiettivo proprio quello di superare tale limite.

### **TCSE da donatore aploidentico**

Per donatore aploidentico si intende un soggetto che condivida con il ricevente un solo allele per ciascuna coppia dei loci dell'HLA, come nel caso di un genitore con il proprio figlio. Il trapianto aploidentico rappresenta un'alternativa prontamente disponibile per quei pazienti affetti da leucemia per i quali la ricerca non identifica un donatore compatibile, ma come tale sarebbe gravato da un elevato rischio di GvHD grave, per l'elevata disparità HLA. Le tecniche di esecuzione del TCSE aploidentico prevedono, quindi, la

rimozione completa dei linfociti T dal prodotto infuso eseguita *in vivo* o *in vitro* e l'infusione di un numero elevato di cellule CD34+, consentendo in tal modo, come dimostrato da dati della letteratura recente, un attecchimento adeguato e sostenuto, in assenza di GvHD nella maggior parte dei casi (44).

La T-deplezione è una tecnica che, eliminando le cellule T di origine del donatore, da un lato azzerà il rischio della comparsa di GvHD al punto da non rendere necessaria l'immunosoppressione post-trapianto, ma dall'altro elimina l'effetto GvL mediato dai linfociti T del donatore. Alcuni *trials* di TCSE aploidentici in pazienti adulti affetti da LMA hanno, però, dimostrato che le cellule NK alloreattive sono in grado di garantire l'attecchimento e svolgere un effetto anti-leucemico, senza determinare GvHD (45).

L'alloreattività delle cellule NK del donatore contro il ricevente è un fenomeno unico del trapianto aploidentico, che deriva dalla differenza tra i cloni NK del donatore (che presentano recettori inibitori per le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità - MHC di classe I) e i ligandi MHC di classe I delle cellule del ricevente. Pertanto, un paziente che riceve un TCSE aploidentico T-depleto può beneficiare dell'effetto GvL mediato dalle cellule NK alloreattive, la cui efficacia andrebbe, quando possibile, testata *in vitro* per scegliere il donatore migliore tra i due genitori (46).

La principale causa di morbidità e mortalità nei trapianti aploidentici T-depleti è rappresentata dagli eventi infettivi sia virali che micotici, in genere gestibili con difficoltà dalle terapie antivirali e antifungine convenzionali e secondarie alla non adeguata ricostituzione immunologica nelle fasi precoci post-trapianto, per l'assenza delle cellule T della memoria del donatore. In tali pazienti è pertanto indicata e necessaria l'immunoterapia cellulare adottiva, che si avvale del trasferimento nel paziente di linfociti T citotossici del donatore stesso o *third-part* sensibilizzati contro i patogeni principalmente coinvolti nella morbidità post trapianto (es.: HCMV, EBV, *Aspergillus* spp.) ed espansi in vitro.

Tutte queste caratteristiche rendono il TCSE aploidentico T-depleto un'alternativa eseguibile solo in centri con particolare esperienza in questo settore e supportati da adeguati e certificati labora-

tori di ingegneria cellulare che rispondano ai criteri richiesti della GMP (*good manufacturing practice*).

L'uso dell'immunoterapia cellulare adottiva al fine di prevenire e/o trattare le infezioni rappresenta un'importante attrattiva, il cui sviluppo è auspicabile per la sua applicazione nel trapianto aploidentico, dove l'assenza dei linfociti T della memoria espone a notevole rischio infettivo, rappresentando un modello di studio unico per la sua applicazione, anche nel TCSE allogenico MUD, come utile arma al fine di ottimizzare la gestione delle infezioni.

## ■ REGIMI DI CONDIZIONAMENTO

Il TCSE prevede l'eradicazione dell'emopoiesi del paziente mediante la somministrazione di farmaci chemioterapici e/o immunosoppressivi che costruiscono il regime di condizionamento (RC) ed il successivo ripristino della normale cellularità midollare, ottenuta grazie all'infusione di cellule staminali prelevate da un donatore o, nel TCSE autologo, le cellule staminali del paziente stesso.

### **RC mieloablativi**

Storicamente prevedono l'utilizzo dell'irradiazione corporea totale (*total body irradiation*, TBI) o, in alternativa, del busulfano associata a chemioterapia mieloablativa, nonché dotata di capacità immunosoppressiva (ciclofosfamide, etoposide, melphalan, citosina-arabinese).

Gli obiettivi sono:

- 1) creare spazio alle cellule staminali del donatore in sostituzione di quelle del ricevente;
- 2) indurre un'immunosoppressione tale da impedire il rigetto del trapianto;
- 3) eradicare cellule neoplastiche presenti al momento della realizzazione della procedura trapiantologica.

Il principale problema secondario alla terapia di condizionamento è rappresentato dalla comparsa di effetti tossici sull'organismo del ricevente sia nelle fasi precoci (tossicità d'organo), con importante contributo alla mortalità del paziente trapiantato, che a lungo termine nei lungosopravvissuti. Il notevole affinamento delle terapie di suppor-

to, della gestione delle complicanze infettivologiche e immunologiche (GvHD) ha significativamente aumentato la sopravvivenza a lungo termine dei pazienti trapiantati, con le complicanze tardive (*late effects*) che rappresentano un'importante condizione, in particolar modo nella popolazione pediatrica.

In questa prospettiva, l'atteggiamento attuale è quello di ottimizzare il rapporto efficacia/tossicità dei protocolli utilizzati nella preparazione al trapianto, con l'obiettivo di conservare l'effetto curativo e limitarne quello tossico a breve e a lungo termine. Non stupisce, quindi, che, con l'eccezione della leucemia linfatica acuta (ove l'impiego della TBI offre, un vantaggio in termini di sopravvivenza finale) la radioterapia a dose convenzionale (990-1200 cGy) sia utilizzata sempre meno frequentemente. Il busulfano, rispetto alla TBI, è gravato da una minor incidenza di effetti collaterali, di tipo neurologico (47) ed inerenti ad un ritardo nell'accrescimento staturale (48) motivato da ridotta produzione di ormone somatotropo, conseguente al trattamento radiante. Per tali ragioni, il suo uso, a parità di efficacia antitumorale rispetto alla radioterapia, è raccomandato in maniera particolare nei pazienti di età <3 anni. Nonostante tali vantaggi, anche il busulfano è gravato da importante tossicità precoce (aumentata incidenza della malattia veno-occlusiva - VOD) e a lungo termine, in particolare sulla funzione riproduttiva.

Negli ultimi anni sono aumentate le esperienze riportate nell'utilizzo del treosulfano nel regime di condizionamento sia in patologie oncologiche che non oncologiche, un chemioterapico alchilante analogo strutturale del busulfano, che associa ad una efficace azione mieloablativa e antileucemica (49, 50), una ridotta tossicità (51), dimostrata in diversi studi condotti sulla popolazione adulta. La sua azione antitumorale è stata dimostrata anche in neoplasie dell'età pediatrica (52-54). Uno studio pilota del 2002 ha confermato i risultati positivi evidenziati negli adulti, dimostrando la sua efficacia nel condizionamento di TCSE allogenici eseguiti in pazienti pediatrici affetti da mielodisplasia (55). Su tali premesse il treosulfano è stato sempre più spesso utilizzato negli ultimi anni in età pediatrica, in particolare in pazienti con importanti co-morbilità o nei secondi trapianti. Un recente

studio retrospettivo dell'EBMT condotto su 51 pazienti sottoposti a TCSE allogenico per malattie neoplastiche, con treosulfano nel regime di condizionamento, non eleggibili ai trattamenti standard, ha dimostrato risultati adeguati in termini di attecchimento e sopravvivenza libera da malattia (61%), significativamente maggiore nei pazienti affetti da LMA rispetto a quelli affetti da leucemia linfoblastica acuta (73% vs 41%).

### **RC non mieloablativi**

La conoscenza che al successo del TCSE allogenico contribuisca più l'effetto immunologico del trapianto che l'intensità del trattamento farmacologico o radiante pre-trapianto, e la possibilità di ridurre la tossicità trapiantologica mediante l'impiego di regimi definiti ad intensità ridotta (RIC) (56) hanno contribuito allo sviluppo di regimi di condizionamento improntati ad un prevalente effetto immunosoppressivo. Questo approccio trapiantologico che è reso possibile dalla disponibilità di farmaci immunosoppressori quali la fludarabina (57) e dall'utilizzo di alte dosi (megadosi) di cellule staminali emopoietiche, attraverso cui ottenere uno stabile attecchimento emopoietico, affida alle cellule immunocompetenti del donatore (eventualmente con il supporto di ulteriori infusione di leucociti post-trapianto, *DLI-donor leukocyte infusion*) il compito non solo di mediare un effetto GvL nelle indicazioni oncologiche, ma anche quello di eliminare progressivamente l'emopoiesi del ricevente, riducendo significativamente la mortalità e la morbidità trapianto-correlata.

Molteplici risultano ad oggi le analisi che dimostrano l'efficacia degli approcci chemioterapici meno aggressivi nel TCSE allogenico in pediatria. RIC sono da anni utilizzati nella preparazione al trapianto di pazienti affetti da anemia di Fanconi, nei quali la condizione di fragilità cromosomica caratterizzante la malattia di base espone a grave tossicità secondaria alla chemioterapia mieloablativa. Tale tipologia di pazienti raggiunge un attecchimento stabile dopo condizionamento con dosi basse di ciclofosfamide associata ad irradiazione toraco-addominale (attualmente in disuso) o alla fludarabina (58, 59). Allo stesso modo, i pazienti affetti da anemia aplastica severa idiopatica condizionati con la

sola ciclofosfamide e il siero antilinfocitario sono in grado di raggiungere un chimerismo completo del donatore (60).

Pertanto, il requisito minimo richiesto ad un RIC affinché sia raggiunto un attecchimento stabile è rappresentato da un'immunosoppressione tale da consentire a breve termine alle CSE trapiantate di stabilirsi, proliferare e svilupparsi nel microambiente midollare e ai DLI contenuti nel prodotto infuso di effettuare un'immunosorveglianza nei confronti dei linfociti residui del ricevente e, nelle malattie neoplastiche, delle cellule tumorali.

L'impiego dei RIC nelle patologie non oncologiche ha, quindi, lo scopo di limitare gli effetti tossici a breve e lungo termine dei farmaci utilizzati nella preparazione al trapianto, mantenendo invariato l'obiettivo finale di correzione dell'errore congenito o acquisito alla base della malattia. Nelle patologie neoplastiche, invece, tali schemi vengono in genere applicati in pazienti selezionati, che, per importanti co-morbidità, non tollerebbero un condizionamento mieloablativo, conservando l'effetto GvL, eventualmente ottimizzato da adattamenti nella profilassi della GvHD. Attualmente è in corso di studio l'applicazione del TCSE allogenico con condizionamento non mieloablativo nel NB ad alto rischio resistente e/o recidivato dopo chemioterapia ad alte dosi seguita da infusione di CSE autologhe; in tale contesto l'obiettivo è esclusivamente quello di sfruttare l'effetto GvL, nei confronti di una malattia dimostrata resistente al regime di condizionamento mieloablativo già utilizzato nelle procedure di TCSE autologo.

Una condizione che si verifica più comunemente nei trapianti dopo regime di condizionamento non mieloablativo eseguito per patologie non neoplastiche è la comparsa di un chimerismo misto stabile, cioè la coesistenza nel paziente di cellule sia di origine del donatore che del ricevente, in percentuali che si mantengono stabili nel tempo, esempio di tolleranza immunologica. Tale condizione, come definito in seguito, non rappresenta in genere un limite all'efficacia della procedura trapiantologica, con il difetto di base per cui il trapianto è stato eseguito che si corregge anche in assenza di un chimerismo completo del donatore (61).



## ■ TCSE IN PATOLOGIE NON ONCOLOGICHE

Il TCSE allogenico rappresenta ad oggi il solo trattamento curativo per i pazienti affetti da molteplici patologie congenite o acquisite non oncologiche, a carico del sistema emopoietico (es.: emoglobinopatie, insufficienze midollari, immunodeficit) o di elementi cellulari da esso derivati (es.: osteopetrosi maligna) o caratterizzate da carenze enzimatiche (es.: malattie da accumulo lisosomiale). L'obiettivo del trapianto in queste patologie è quello di raggiungere un attecchimento sostenuto nel tempo al fine di migliorare la funzione emopoietica, ripristinare la competenza immunologica o normalizzare le funzionalità enzimatiche carenti. In tale contesto non è necessario sostituire completamente il sistema emopoietico dell'ospite, ma il raggiungimento di un chimerismo misto stabile tra le cellule del ricevente e quelle originatesi dalle CSE del donatore risulta in genere sufficiente a correggere la malattia di base (62). Pertanto, al fine di limitare la tossicità e la secondaria mortalità trapianto correlata, molti dei RC utilizzati in tali patologie sono di tipo non mieloablativo o a intensità ridotta. Inoltre, considerando che nel trapianto eseguito per una patologia oncologica manca il razionale dell'effetto GvL, la profilassi della GvHD eseguita è in genere più intensa, con la T-deplezione frequentemente eseguita in tali pazienti. Come conseguenza si osserva una più elevata frequenza di rigetto acuto o mancato attecchimento, che rappresentano le principali cause di insuccesso del TCSE in tali patologie.

### **Malattie metaboliche**

Il TCSE ha rappresentato il primo approccio terapeutico con finalità curative per le malattie metaboliche da accumulo lisosomiale (LSDs). La prima applicazione risale ai primi anni '80 in un paziente affetto da sindrome di Hurler (mucopolisaccaridosi di tipo I), che mostrò dopo il trapianto un eclatante miglioramento delle condizioni generali. La finalità del TCSE nelle LSDs e, più in generale, negli errori congeniti del metabolismo, è quella di fornire una sorgente valida e duratura dell'enzima deficitario, rappresentata dalla popolazione cellulare originata dalle CSE

del donatore: i leucociti circolanti e le cellule del sistema reticolo-endoteliale che, originate dalle CSE, sono in grado di colonizzare i tessuti (es.: macrofagi alveolari polmonari, cellule di *Kupffer* del fegato, macrofagi splenici, cellule dendritiche, osteoclasti, cellule della microglia cerebrale). La capacità di colonizzare il sistema nervoso centrale rappresenta la base dell'efficacia del TCSE nelle LSDs caratterizzate dal suo deterioramento.

Il successo del TCSE dipende dall'entità dell'enzima deficitario e dallo stadio della malattia al momento del trapianto. In generale, l'accumulo viscerale e i sintomi associati tendono a regredire dopo trapianto, così come il ritardo di crescita si attenua e lo sviluppo psicomotorio è incrementato, mentre tendenzialmente le deformità scheletriche e articolari persistono. In generale i migliori risultati a lungo termine si ottengono nei casi in cui il trapianto è eseguito precocemente nei primi 2 anni di vita.

Le principali esperienze sono nella sua applicazione nella sindrome di Hurler (MPS-I); attualmente sono stati eseguiti nel mondo oltre 500 trapianti, con evidenza di miglioramento nei sintomi cardiopolmonari, in quelli legati all'accumulo viscerale e corneale, nell'accrescimento staturo-ponderale e nello sviluppo cognitivo e psicomotorio, in particolare se il trapianto era eseguito entro i primi due anni di vita. Al contrario, le deformità scheletriche (es.: gibbo) e i difetti valvolari cardiaci non miglioravano (63). Attualmente le linee guida internazionali indicano il TCSE nella MPS-I-Hurler, nella MPS-IV, nella leucodistrofia metacromatica, nella leucodistrofia globoide-Krabbe, nell'adrenoleucodistrofia *X-linked* (malattia dei perossisomi), nella  $\alpha$ -mannosidosi, nella malattia di Nieman-pick di tipo B, patologie nelle quali è sufficientemente dimostrata dall'esperienza l'efficacia del trapianto nel migliorare l'*outcome* dei pazienti a breve e lungo termine. In molte altre LSDs l'indicazione al trapianto è ancora in fase di valutazione, essendo ancora scarse le esperienze descritte e con *follow-up* ancora troppo brevi per definirne l'efficacia a lungo termine (fucosidosi, lipogranulomatosi di Farber, gangliosidosi GM1, mucopolisaccaridosi I e II, aspartilglucosaminuria, mevalonico aciduria). Tali linee guida controindicano il TCSE nei casi in cui il danno del SNC è

ormai in fase avanzata, essendo in tali casi irreversibile (64).

## ■ COMPLICANZE TARDIVE

L'incremento del numero di patologie per cui il TCSE allogenico è indicato, l'aumentata disponibilità di donatori alternativi per quei pazienti con un fenotipo HLA più raro (CB o aploidentico), i notevoli progressi ottenuti nella gestione del paziente trapiantato (dalla selezione del donatore alle terapie della GvHD, alla gestione delle complicanze infettivologiche e tossiche precoci), con riduzione della TRM, hanno contribuito a creare una popolazione ampia e crescente di pazienti trapiantati lungosopravvissuti, guariti dalla patologia di base.

Le aspettative di vita dei guariti sono chiaramente maggiori negli individui trapiantati in età pediatrica. Inoltre in tali soggetti l'età evolutiva rappresenta un fattore che aggrava l'entità degli effetti tardivi, rispetto a quanto accade nel paziente sopravvissuto dopo TCSE eseguito in età adulta. La conoscenza e la gestione delle problematiche che possono comparire a lungo termine nel soggetto trapiantato, sia quelle fisiche di pertinenza medica che psicologiche e comportamentali, sono pertanto meritevoli di interesse medico e scientifico, anche in relazione al costo sociale che rappresentano.

In tale popolazione il tasso di mortalità è certamente più alto rispetto alla popolazione generale. Uno dei più grandi studi condotti sui pazienti sottoposti a TCSE con una sopravvivenza di almeno due anni dal trapianto, il *Bone Marrow Transplant Survivor Study* (BMT-SS), ha osservato che i TCSE allogenici presentano un rischio 9,9 volte maggiore rispetto alla popolazione generale di una morte prematura. Anche a 15 anni dal trapianto, questi individui continuano a presentare una mortalità due volte maggiore rispetto al resto della popolazione (*standardized mortality ratio* = 2,2). Sebbene la maggior parte dei decessi siano secondari alla recidiva della patologia di base e alla GvHD cronica, la mortalità tardiva è attribuita a cause secondarie al trattamento nel 25% dei casi, quali secondi tumori, le infezioni tardive e le cause cardiache o polmonari.

Nella maggior parte delle complicanze d'organo, sebbene si riconosca una patogenesi multifattoriale, un ruolo fondamentale è svolto dal danno iatrogeno del regime di condizionamento e dalla GvHD cronica.

Le alterazioni endocrinologiche rappresentano la complicanza di più frequente osservazione e di rilevanza particolare in pediatria. Circa il 30-55% dei bambini che hanno ricevuto la TBI e il 10% di quelli che hanno ricevuto un RC con la sola chemioterapia presentano un ritardo di crescita, secondario allo sviluppo di un quadro di ipopituitarismo con ridotta produzione dell'ormone somatotropo al danno diretto della radioterapia sulle cartilagini di accrescimento. In tale contesto la dose totale e la modalità di erogazione della TBI (dose singola o frazionata) giocano un ruolo importante. Concorrono a determinare una rallentata velocità di crescita e un'altezza finale inferiore l'eventuale terapia steroidea prolungata in presenza di GvHD cronica (65). La valutazione auxologica periodica è pertanto importante in tali pazienti, al fine di monitorare l'eventuale ritardo al fine di un trattamento con l'ormone della crescita nei casi in cui questo è indicato.

Circa il 40% dei pazienti presenta anomalie tiroidee, in genere sotto forma di ipotiroidismo, nella maggior parte dei casi compensato, ma che in circa un quarto dei casi progredisce con necessità di terapia sostitutiva.

Il danno gonadico diretto della radioterapia è responsabile di una condizione di ipogonadismo ipergonadotropo dovuto al danno sulle cellule germinali. Nel maschio la radioterapia determina una riduzione della spermatogenesi e un aumento dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) per un danno delle cellule di Sertoli, mentre, per la maggiore resistenza delle cellule di *Leydig* alla radioterapia, la secrezione del testosterone può essere normale o ridotta con livelli di ormone luteotropo normali o lievemente elevati (ipogonadismo - ipergonadotropo *compensato*). Sebbene la pubertà ritardata sia una condizione pressoché costante, generalmente i maschi avviano il processo puberale spontaneamente e sono in grado di completare tale processo senza necessità di alcuna terapia specifica. Per quanto riguarda le femmine il danno ovarico è relativo alla dose di radioterapia utilizzata e all'età di somministra-

zione (bambine di minore età necessitano di dosi più elevate di radioterapia per produrre un danno irreversibile). Nelle femmine l'ipogonadismo ipergonadotropo si manifesta o con un mancato avvio ed evoluzione puberale spontanea o con amenorrea o con menopausa precoce. La ciclofosfamide che viene spesso utilizzata nella terapia di condizionamento a dosaggi abituali pari a 120-200 mg/kg non determina danno gonadico permanente. Tuttavia è noto che l'associazione della ciclofosfamide con il busulfano è in grado di determinare un danno gonadico irreversibile nella maggior parte dei soggetti sottoposti a trapianto (66).

L'osteonecrosi rappresenta una ulteriore complicanza tardiva che si verifica con una frequenza variabile dal 4,3% al 19% dei pazienti sottoposti a TCSE allogenico in età pediatrica. È per definizione una necrosi di un segmento osseo; in base alla sede dell'osso interessata dal processo necrotico (midollare o corticale), l'osteonecrosi può essere asintomatica o manifestarsi con dolore e limitazione delle capacità funzionali del soggetto. La sua evoluzione può portare al collasso articolare o all'artrite cronica. Le sedi più frequentemente coinvolte sono: i condili prossimali dei femori (54-62%), i condili distali dei femori (33-37%), le teste degli omeri (9-10%); in tutte queste sedi l'interessamento può essere mono o bilaterale.

I principali fattori di rischio identificati per l'osteonecrosi sono:

- 1) l'età al trapianto, con l'età adolescenziale più tipicamente colpita;
- 2) il sesso (femminile per alcuni studi e maschile per altri);
- 3) la malattia primaria, essendo più frequente nell'aplasia midollare;
- 4) la presenza di GvHD acuta o cronica;
- 5) l'utilizzo della TBI;
- 6) le alte dosi e le prolungate terapie con steroidi eseguite sia nelle fasi pre che post-TCSE;
- 7) l'uso della ciclosporina.

Il trattamento ciclico con bifosfonati per via endovenosa, associato a supporto di calcio e vitamina D per via orale, rappresenta l'approccio terapeutico medico di prima scelta in pediatria, con discreto risultato a breve termine sul controllo del dolore e sul contenimento dei processi necrotici,

ma risulta insufficiente in quei processi ampi o in caso di persistenza della terapia steroidea. La sostituzione protesica (es.: testa del femore) rappresenta nei casi a prognosi peggiore l'unica soluzione, per l'esecuzione della quale nell'età evolutiva è spesso necessario attendere il termine della crescita staturale, al fine di evitare un'irreversibile interruzione dell'accrescimento del segmento osseo con conseguente dismetria finale degli arti.

Attualmente sono in sviluppo delle tecniche di chirurgia ortopedica che prevedono la decompressione del segmento osseo in necrosi (*core decompression*), la sua rivascolarizzazione e la instillazione locale di un concentrato di piastrine e CSE da sangue midollare autologo, prelevato dal paziente stesso mediante espianto. Tale tecnica ha lo scopo di sfruttare il potenziale effetto rigenerativo delle cellule staminali nella ricostruzione dell'osso colpito. Sebbene dati relativi all'effetto di tale trattamento nell'osteonecrosi del paziente trapiantato non siano ancora disponibili, a supporto dell'indicazione sono le esperienze riportate in letteratura che ne dimostrano l'efficacia (67).

## ■ BIBLIOGRAFIA

1. Gatti RA, Neuwissen WJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*. 1969; 2: 1366-9.
2. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation and allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1977; 49: 511-533.
3. Miano M, Labopin M, Hartmann O, Angelucci E, Cornish J, Gluckman E, et al. Paediatric diseases working party of the european group for blood and marrow transplantation. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 39: 89-99.
4. Di Persio JF, Stadtmayer EA, Nademanee A, Micallef IN, Stiff PJ, Kaufman JL, et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2009; 113: 5720-6.
5. Steinberg M, Silva M. Plerixafor. A chemokine receptor-4 antagonist for mobilization of hematopoietic stem

- cells for transplantation after high-dose chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *Clin Ther.* 2010; 32: 821-43.
6. Pession A, Rondelli R, Basso G, Rizzari C, Testi AM, Fagioli F, et al. on behalf of the AML Strategy & Study Committee of the Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica. Treatment and long-term results in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP AML protocols. *Leukemia.* 2005; 19: 2043-53.
  7. Suciu S, Mandelli F, de Witte T, Zittoun R, Gallo E, Labar B, et al. for the EORTC and GIMEMA Leukemia Groups. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial. *Blood.* 2003; 102: 1232-40.
  8. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, et al., for the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45: 219-34.
  9. Dini G, Philip T, Hartmann O, Pinkerton R, Chauvin F, Garaventa A, et al. Bone marrow transplantation for neuroblastoma: a review of 509 cases. *EBMT Group. Bone Marrow Transplant.* 1989; 4: 42-6.
  10. Dini G, Lanino E, Garaventa A, Rogers D, Dallorso S, Viscoli C, et al. Myeloablative therapy and unpurged autologous bone marrow transplantation for poorprognosis neuroblastoma: report of 34 cases. *J Clin Oncol.* 1991; 9: 962-9.
  11. Philip T, Ladenstein R, Lasset C, Hartmann O, Zucker JM, Pinkerton R, et al. 1070 myeloablative megatherapy procedures followed by stem cell rescue for neuroblastoma: 17 years of European experience and conclusions. *European Group for Blood and Marrow Transplant Registry Solid TumourWorking Party. Eur J Cancer.* 1997; 33: 2130-5.
  12. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *Children's Cancer Group. N Engl J Med.* 1999; 341: 1165-73.
  13. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 1007-13.
  14. Ladenstein RL, Poetschger U, Luksch R, et al. Busulphan melphalan as a myeloablative therapy (MAT) for high-risk neuroblastoma: results from the HR-NBL1/SIOPEN trial. [Abstract]. *J Clin Oncol.* 2011; (Suppl.) 29.
  15. Kushner BH, Meyers PA. How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and a literature review. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 870-80.
  16. Ladenstein R, Pötschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, et al. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 3284-91.
  17. Presson A, Moore TB, Kempert P. Efficacy of high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplant for recurrent Wilms' tumor: a meta-analysis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010; 32: 454-61.
  18. Peinemann F, Kröger N, Bartel C, Grouven U, Pittler M, Erttmann R, et al. High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation for metastatic rhabdomyosarcoma - a systematic review. *PLoS One.* 2011; 6: e17127.
  19. Lorch A, Kleinhans A, Kramar A, Kollmannsberger CK, Hartmann JT, Bokemeyer C, et al. Sequential versus single high-dose chemotherapy in patients with relapsed or refractory germ cell tumors: long-term results of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 800-5.
  20. Cheuk DK, Lee TL, Chiang AK, Ha SY, Chan GC. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for high-risk brain tumors in children. *J Neurooncol.* 2008; 86: 337-47.
  21. Gajjar A, Pizer B. Role of high-dose chemotherapy for recurrent medulloblastoma and other CNS primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54: 649-51.
  22. Park JE, Kang J, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Lim do H, et al. Efficacy of high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in patients with relapsed medulloblastoma: a report on the Korean Society for Pediatric Neuro-Oncology (KSPNO)-S-053 study. *J Korean Med Sci.* 2010; 25: 1160-6.
  23. Gilman AL, Jacobsen C, Bunin N, Levine J, Goldman F, Bendel A, et al. Phase I study of tandem high-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell rescue for children with recurrent brain tumors: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Pediatr Blood Cancer.* 2011; 57: 506-13.
  24. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, et al., for the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplantation.* 2010; 45: 219-34.
  25. Stenger EO, Turnquist HR, Mapara MY, Thomson AW. Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. *Blood.* 2012; 119: 5088-103.
  26. Lanino E, Sacchi N, Peters C, Giardino S, Rocha V, Dini



- G, on behalf of the EBMT Paediatric, Acute Leukemia Working Parties and Eurocord. Strategies of the donor search for children with second CR ALL lacking a matched sibling donor. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 41: S75-S79.
27. Beatty PG, Anasetti C, Hansen JA, Longton GM, Sanders JE, Martin PJ, et al. Marrow transplantation from unrelated donors for treatment of hematologic malignancies: effect of mismatching for one HLA locus. *Blood*. 1993; 81: 249-53.
28. Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG, et al. The significance of HLADRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 1995; 86: 1606-13.
29. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood*. 2004; 104: 1923-30.
30. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*. 2001; 98: 2043-51.
31. Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, Beatty PG, Champlin R, Filipovich A, et al. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N Engl J Med*. 1993; 328: 593-602.
32. Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, Martin PJ, Smith AG, Mickelson EM, et al. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood*. 1998; 92: 3515-20.
33. Giebel S, Giorgiani G, Martinetti M, Zecca M, Maccario R, Salvaneschi L, et al. Low incidence of severe acute graft versus-host disease in children given hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors prospectively matched for HLA class I and II alleles with high resolution molecular typing. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31: 987-94.
34. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution of a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA identical sibling. *N Engl J Med*. 1989; 32: 1174-8.
35. Bertolini F, Battaglia M, De Iulio C, Sirchia G. Placental blood collection: effects on newborns. *Blood*. 1995; 85: 3361-62.
36. Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, Grafakos S, et al. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood*. 2003; 101: 2137-43.
37. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, et al. Outcomes among 562 recipients of placental blood transplants from unrelated donor. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1565-77.
38. Bizzetto R, Bonfim C, Rocha V, Socié G, Locatelli F, Chan K, et al. Eurocord and SAA-WP from EBMT. Outcomes after related and unrelated umbilical cord blood transplantation for hereditary bone marrow failure syndromes other than Fanconi anemia. *Haematologica*. 2011; 96: 134-41.
39. Rocha V, Wagner Jr JE, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*. 2000; 342: 1846-54.
40. Rocha V, Cornish J, Sievers EL. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*. 2001; 97: 2962-71.
41. Eapen M, Rubinstein P, Zhang M, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukemia: a comparison study. *Lancet*. 2007; 369: 1947-54.
42. Frasson F, Valardo R, Gualandi F, Bacigalupo A, Sambucetti G, Sacchi N, Podestà M. The intra-bone marrow injection of cord blood cells extends the possibility of transplantation to the majority of patients with malignant hematopoietic diseases. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010; 23: 237-44.
43. Rocha V, Crotta A, Ruggeri A, Purtil D, Boudjedir K, Herr AL, et al. Double cord blood transplantation: extending the use of unrelated umbilical cord blood cells for patients with hematological diseases. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010; 23: 223-9.
44. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukaemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3447-54.
45. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002; 295: 2097-100.
46. Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol*. 2002; 23: 438-44.
47. Parth P, Kennedy RS, Lane NE, Dunlap WP, Ordry JM. Motor and cognitive testing of bone marrow transplant patients after chemo-radiotherapy. *Percept Mot Skills*. 1989; 68: 1227-41.
48. Giorgiani G, Bozzola M, Locatelli F, Picco P, Zecca M, Cisternino M, et al. Role of busulfan and total body irradiation on growth of pre-pubertal children receiving bone marrow transplantation and results of treatment with recombinant human growth hormone. *Blood*. 1995; 86: 825-31.



49. Casper J, Wilhelm S, Steiner B, Hammer U, Hanner U, Wegener R, et al. Treosulfan and fludarabine conditioning for allogeneic blood stem cell transplantation. [Abstract]. Bone Marrow Transplant. 2000; 25 (Suppl. 1): S129.
50. Casper J, Knauf W, Kiefer T, Wolff D, Steiner B, Hammer U, et al. Treosulfan and fludarabine: a new toxicity-reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2004; 103: 725-731.
51. Kröger N, Shimoni A, Zabelina T, Schieder H, Panse J, Ayuk F, et al. Reduced-toxicity conditioning with treosulfan, fludarabine and ATG as preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) in elderly patients with secondary acute myeloid leukemia (sAML) or myelodysplastic syndrome (MDS). Bone Marrow Transplant. 2006; 37: 339-44.
52. Fichtner I, Becker M, Baumgart J. Antileukemic activity of treosulfan in xenografted human acute lymphoblastic leukemias (ALL). Eur J Cancer. 2003; 39: 801-7.
53. Munkelt D, Koehl U, Kloess S, Zimmermann S-Y, El Kalaa R, Wehner S, et al. Cytotoxic effects of treosulfan and busulfan against leukemic cells of pediatric patients. Cancer Chemotherapy Pharmacol. 2008; 62: 821-30.
54. Lanvers-Kaminsky C, Bremer A, Dirksen U, Jürgens H, Boos J. Cytotoxicity of treosulfan and busulfan on pediatric tumor cell lines. Anticancer Drugs. 2006; 17: 657-62.
55. Wachowiak J, Chybicka A, Boruczkowski D, Gorczynska E, Kalwak K, Leda M, et al. Intravenous treosulfan in conditioning before allogeneic HSCT from MSD in children with high risk of toxic complications related to conventional preparative regimen. [Abstract]. Bone Marrow Transplant. 2002; (Suppl. 1): S12.
56. Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondón G, Anderlini P, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. Blood. 1997; 89: 4531-6.
57. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases. Blood. 1998; 91: 756-63.
58. Shimada A, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Ismael O, Narita A, et al. Excellent outcome of allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia using fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimen. Int J Hematol. 2012; 95: 675-9.
59. Stepensky P, Shapira MY, Balashov D, Trakhtman P, Skorobogatova E, Rheingold L, et al. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia using fludarabine-based conditioning. Biol Blood Marrow Transplant. 2011; 17: 1282-8.
60. Peinemann F, Grouven U, Kröger N, Pittler M, Zschorlich B, Lange S. Unrelated donor stem cell transplantation in acquired severe aplastic anemia: a systematic review. Haematologica. 2009; 94: 1732-42.
61. Andreani M, Nesci S, Lucarelli G, Tonucci P, Rapa S, Angelucci E, et al. Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 2000; 25: 401-4.
62. Ortega M, Escudero T, Caballin MR, Olive T, Ortega JJ, Coll MD. Follow-up of chimerism in children with hematological diseases after allogeneic hematopoietic progenitor cell transplants. Bone Marrow Transplant. 1999; 24: 81-7.
63. de Ru MH, Boelens JJ, Das AM, Jones SA, van der Lee JH, Mahlaoui N. Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. Orphanet J Rare Dis. 2011; 6: 55.
64. Muenzer J, Wraith JE, Clarke LA, International Consensus Panel on Management and Treatment of Mucopolysaccharidosis I: Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. Pediatrics. 2009; 123: 19-29.
65. Cohen A, Rovelli A, Van Lint MT, Bacigalupo A. Final height of patients who underwent bone marrow transplantation during childhood. Arch. Dis. Child. 1996; 74: 437-40.
66. Afify Z, Shaw PJ, Clavano-Harding A, Cowell Ct. Growth and endocrine function in children with acute myeloid leukaemia after bone marrow transplantation using busulfan/cyclophosphamide. Bone Marrow Transplant. 2000; 25: 1087-92.
67. Zhao D, Cui D, Wang B, Tian F, Guo L, Yang L, et al. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. Bone Marrow Transplant. 2012; 50: 325-30.