



## **Busulfano ciclofosfamide e melphalan quale regime di condizionamento al trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche da donatore familiare per paziente pediatrico affetto da leucemia mieloide acuta**

Valentina Burzio, Paola Guerini, Maria Chiara Leoni, Gaia Ottonello,  
Roberto Raschetti, Marco Zecca, Franco Locatelli

*Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

---

### ***Busulfano ciclofosfamide e melphalan quale regime di condizionamento al trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche da donatore familiare per paziente pediatrico affetto da leucemia mieloide acuta***

Più dell'80% dei bambini affetti da leucemia mieloide acuta (LAM) insorta *de novo* raggiunge la remissione completa con una terapia di induzione basata sulla combinazione di farmaci chemioterapici attivi sui blasti mieloidi. Tuttavia, è il trattamento post-remissione a giocare un ruolo cruciale nell'*outcome* finale di questi pazienti. Negli ultimi anni numerosi gruppi di ricerca hanno dimostrato che, nei bambini affetti da LAM ad alto rischio (ovvero, non connotata da citogenetica favorevole), il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, seppur gravato da un maggiore rischio di complicanze terapia-correlate, offre risultati migliori in termini di sopravvivenza libera da malattia rispetto alle altre forme di trattamento post-remissionale. Il nostro studio dimostra come il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, effettuato dopo un regime mieloablativo basato sulla combinazione di 3 farmaci alchilanti, busulfano (BU), ciclofosfamide (CY) e melphalan (MEL), sia una modalità di trattamento post-remissionale caratterizzata da un buon profilo di tolleranza farmacologica, accettabile tossicità e buon effetto antileucemico e possa garantire elevate probabilità di cura per pazienti pediatriche affetti da LAM in prima RC di malattia.

### ***Busulfan, cyclophosphamide and melphalan as conditioning regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation from familiar donor for pediatric acute myeloid leukemia***

More than 80% of *de novo* pediatric acute myeloid leukaemia (AML) joins complete remission with an induction therapy based on a combined chemioterapic treatment targeted to myeloid cells. Nevertheless, it is the post-remission treatment to play a fundamental role for the final outcome of these patients. In last years different working groups have demonstrated that the stem cell transplantation is related to a better disease free survival than other therapeutic options, in children with high risk AML (without favourable cytogenetics). Our study would demonstrate that the hematopoietic stem cell transplantation, after the combination of busulfan (BU), cyclophosphamide (CY) and melphalan (MEL), is a post-remission treatment showing good pharmacologic tolerance, acceptable toxicity and anti-leukemic effect and it should be considered for conditioning regimen in children with high risk AML.

---

## Introduzione

### *La leucemia mieloide acuta*

Con il termine di Leucemia Acuta non-Linfoblastica (LANL), altrimenti definita Leucemia Mieloide Acuta (LAM) o Leucemia Mieloblastica Acuta, si identifica un gruppo eterogeneo di neoplasie con connotazioni biologiche e cliniche peculiari tali da comportare un approccio diagnostico e terapeutico differenziato [1]. Questa patologia origina a partire dalla cellula staminale emopoietica orientata in senso mieloide o da progenitori mieloidi; in relazione al tipo e grado di differenziazione del clone cellulare interessato si possono riconoscere diverse forme (mieloidi, promielocitiche, monocitiche, mielomonocitiche, eritroidi, megacariocitiche) di LAM che vengono classificate in relazione al citotipo interessato. Le LANL rappresentano il 15-20% delle leucemie acute dell'età pediatrica e sono il risultato di una trasformazione neoplastica in grado di alterare i meccanismi proliferativi e differenziativi della cellula staminale emopoietica orientata in senso mieloide. L'incidenza di LAM pediatrica è stimata essere tra 5 e 7 casi per milione di bambini per anno, con un picco di incidenza di 11 casi per milione nei primi 12-18 mesi di vita [2]. Non c'è differenza nei dati relativi alle incidenze di malattia nel sesso femminile e maschile [3]; tuttavia vi è evidenza di una più elevata incidenza nei bambini iberici, intermedia nei bambini neri (5.8 casi per milione) e leggermente inferiore nei bambini bianchi (4.8 casi per milione). Le LAM vengono distinte, sotto un profilo eziopatogenetico, in forme primarie (*de novo*) che compaiono acutamente in soggetti per i quali non è dimostrabile un'esposizione ad agenti leucemogeni e che rappresentano la maggior parte dei casi, e forme secondarie associate a fattori ambientali, condizioni ereditarie e disordini acquisiti predisponenti. In particolare tra le forme secondarie si annoverano:

- LAM che rappresentano l'evoluzione neoplastica di una precedente sindrome mielodisplastica;
- LAM associate all'esposizione ad agenti chemioterapici, radiazioni ionizzanti e prodotti chimici quali derivati del petrolio, solventi organici (benzene), erbicidi e pesticidi (organofosfati) [4];
- LAM correlate a condizioni ereditarie: sindrome di Down, anemia di Fanconi [5], neutropenia congenita severa (sindrome di Kostmann), sindrome di Shwachman-Diamond, sindrome di Diamond-Blackfan, neurofibromatosi di tipo 1, sindrome di Noonan, discheratosi congenita, disordine familiare delle piastrine con predisposizione a LAM (FDP/AML, *familial platelet disorder with a predisposition to acute myeloid leukaemia*), trombocitopenia congenita amegacariocitica, atassiatelengectasia, sindrome di Klinefelter, sindrome di Li-Fraumeni e sindrome di Bloom;
- LAM connesse a gravi condizioni acquisite comprendenti l'anemia aplastica [6], la trombocitopenia acquisita amegacariocitica e l'emoglobinuria parossistica notturna.

La LAM è il risultato di mutazioni genetiche distinte ma cooperanti che alterano i meccanismi di differenziazione, proliferazione e apoptosi della cellula staminale emopoietica orientata in senso mieloide, conferendole un vantaggio in termini di proliferazione e sopravvivenza. Questo meccanismo patogenetico *multistep* è supportato da studi effettuati in modelli murini [7], da analisi di patologia leucemica nei gemelli e da analisi di pazienti con sindrome FDP/AML [8]. Le mutazioni che predispongono allo sviluppo della LAM vengono distinte in due classi: la classe I comprende mutazioni che favoriscono la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali ma non alterano la differenziazione; tra queste si annoverano le mutazioni dei geni *FLT3*, *ALM*, *Ras* e *PTPN11*, e la formazione di geni ibridi di fusione quali *BCR/ABL* e *TEL/PDGFβR*; la classe II include invece mutazioni che alterano i processi di differenziazione e apoptosi, quali quelle determinanti i prodotti di fusione *AML/ETO* e *PML/RARα*, i riarrangiamenti a carico di *MLL*, le mutazioni in *CEBPA*, *CBF*, membri della famiglia *HOX*, *CBP/P300* e coattivatori di *TIF1*. La LAM si manifesta clinicamente quando il precursore ematopoietico acquisisce le anomalie genetiche appartenenti ad entrambe le classi. La presentazione clini-

ca della LAM dell'età pediatrica riflette i segni e i sintomi correlati all'infiltrazione leucemica del midollo osseo e dei siti extramidollari. L'insufficienza midollare che consegue alla sostituzione delle cellule emopoietiche da parte del clone neoplastico determina sviluppo di neutropenia, anemia e piastrinopenia. I bambini presentano comunemente le manifestazioni cliniche della pancitopenia, tra cui febbre, astenia, pallore, petecchie, ecchimosi, emorragie cutaneo-mucose, dolori ossei e infezioni. In particolare il quadro di presentazione clinica di qualsiasi sottotipo di LAM si può associare allo sviluppo di una coagulazione intravascolare disseminata, ma questa risulta essere più frequentemente osservata nella leucemia acuta promielocitica (in più del 90% dei casi). Questa complicanza è innescata dall'attività procoagulante dei granuli dei promielociti ed è frequentemente aggravata dall'iniziale citolisi indotta dalla chemioterapia. Deve essere ricordato che l'uso della terapia differenziante con acido all-trans-retinoico ha significativamente ridotto l'incidenza e la gravità dei fenomeni di coagulazione intravascolare disseminata dopo una diagnosi di leucemia acuta promielocitica. L'infiltrazione neoplastica di alcuni siti extramidollari può comportare sviluppo di linfadenopatia, epato-splenomegalia, noduli sottocutanei o lesioni definite a *blueberry muffin*, infiltrazione della gengiva, dell'orbita, dello spazio epidurale e raramente del testicolo, tumefazioni descritte come sarcoma granulocitico o cloroma (tipicamente associate a LAM con t(8;21) in assenza di apparente interessamento del midollo osseo) e interessamento del sistema nervoso centrale (che si verifica in circa il 15% dei casi alla diagnosi); la localizzazione extramidollare è più comune nei pazienti con LAM sotto i due anni d'età. I bambini che presentano una leucocitosi marcata possono sviluppare segni e sintomi di leucostasi, più frequentemente localizzati a livello di polmone e cervello. L'inquadramento del paziente prevede, primariamente, l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico, che nella maggior parte dei casi presenta leucocitosi associata ad anemia e piastrinopenia, ma può dimostrare anche anemia e piastrinopenia con leucociti nella norma o pancitopenia. Di fondamentale importanza è la valutazione dei parametri emocoagulativi (attività protrombinica, tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT), tempo di protrombina (PT), fibrinogeno e peptidi di degradazione del fibrinogeno (FDP)), al fine di individuare con tempestività l'eventuale presenza di una coagulazione intravascolare disseminata. Inoltre, per definire la diagnosi di LAM, occorre eseguire uno striscio di sangue periferico e un mieloaspirato, con valutazione morfologica della cellularità e quantificazione dei blasti (che devono essere maggiori o uguali al 20% della cellularità totale nel sangue o nel midollo osseo). Per la classificazione dei sottotipi di LAM e per la definizione della prognosi la diagnostica moderna prevede, in aggiunta, l'esecuzione su cellule midollari dell'analisi immunocitochimica, immunofenotipica, sulle quali si fonda la classificazione del gruppo *French-American-British* (FAB), e l'analisi citogenetica e molecolare, sulle quali invece è stata elaborata l'attuale classificazione WHO del 2008. Il riscontro di t(8;21), inv(16), t(16;16) o t(15;17) è diagnostico delle rispettive forme di leucemia anche se i blasti sono inferiori al 20%; allo stesso modo la presenza di un sarcoma mieloide pone diagnosi di LAM anche quando, a livello di sangue o midollo osseo, i blasti non siano elevati. In relazione a caratteristiche della patologia, tra cui le principali sono rappresentate dall'analisi citogenetica, molecolare e dalla risposta alla terapia, è possibile effettuare una distinzione, rilevante ai fini prognostici [10], tra le LAM definite ad alto rischio e quelle considerate a rischio favorevole, come si evince dalla tabella 1.

La stratificazione del rischio nei pazienti affetti da LAM, che prevede la distinzione essenziale in un gruppo di bambini ad alto rischio (HR, *high risk*) e un gruppo a rischio standard (SR, *standard risk*), influenza le strategie terapeutiche che possono essere adottate e, in particolare, è utilizzata per identificare i pazienti che potrebbero trarre beneficio da un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche [11]. In particolare, riprendendo quanto precedentemente detto, i bambini affetti da LAM a SR sono pazienti in remissione completa (RC) al ventunesimo giorno del primo ciclo di induzione e con anomalie citogenetiche isolate, quali t(8;21)(q22;q22) *AML1-ETO* e/o anomalie *CBFβ* [inv16(p13;q22) o t(16,16)(p13;q22)]; i bambini a HR rappresentano, pertanto, tutti i casi non SR. In

relazione ai protocolli 2002/01 dell'Associazione italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP), per la fascia SR non è prevista alcuna opzione di tipo trapiantologico in prima RC, ma un trattamento solo chemioterapico: due cicli intensivi di induzione (ICE, idarubicina (HD), citarabina, etoposide e citosinarabioside) seguiti da tre cicli di consolidamento comprendenti la somministrazione di citosinarabioside (ara-C) ad alte dosi (blocchi AVE, etoposide e ara-C, HAM, mitoxantrone e ara-C e HD/ara-C, ara-C ad alte dosi); per la fascia HR sono programmati gli stessi due cicli intensivi di induzione seguiti da due blocchi (AVE e HAM) prima della procedura trapiantologica: allotrapianto, in presenza di donatore familiare HLA-compatibile, o in alternativa, autotrapianto con purificazione, comunque preceduti da un regime di condizionamento basato sull'uso di tre agenti alchilanti quali busulfano (BU), ciclofosfamide (CY) e melphalan (MEL). Il cardine dell'approccio terapeutico della LAM, quindi, è rappresentato dalla somministrazione di una chemioterapia combinata. Il trattamento ottimale della LAM richiede il controllo della malattia sia nel midollo osseo, sia in altre sedi dell'organismo. Il trattamento è solitamente diviso in 2 fasi:

1. induzione (per ottenere la RC);
2. consolidamento post-remissionale.

La terapia della LAM è di solito associata ad uno stato di mielosoppressione protratta e severa e ad altre complicazioni; per questa ragione, i bambini affetti da LAM devono essere trattati in centri di onco-ematologia pediatrica altamente specializzati, soprattutto nella terapia di supporto (trasfusionale, anti-infettiva, nutrizionale). Con l'incremento della probabilità di sopravvivenza aumenta la necessità di porre attenzione agli effetti collaterali a lungo termine dei vari trattamenti; in particolare, per i bambini che ricevono la chemioterapia intensiva che comprende antracicline, è critico un attento e continuo monitoraggio della funzionalità cardiaca che deve essere proseguito nel tempo anche dopo la sospensione delle cure. La prognosi dei bambini affetti da LAM è, dunque, migliorata significativamente durante le ultime tre decadi, come si desume dai trials del *Medical Research Council* (figura 1) [12]. I tassi di completa remissione (RC) corrispondono attualmente all'80-90% e quelli di sopravvivenza complessiva al 60%. Il notevole miglioramento che si è riscontrato negli indici di sopravvivenza dei bambini affetti da LAM riflette l'uso di terapie chemioterapiche di induzione progressivamente più intense, seguite da un trattamento post-remissionale con antracicline e citarabina ad alte dosi o regimi mieloablativi seguiti da trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE, *hematopoietic stem cell transplantation*). Il TCSE rappresenta il trattamento curativo di maggior successo nella LAM: questa proprietà è legata al forte effetto *graft versus leukemia* (GVL) che il trapianto può produrre e al fatto che risulta efficace anche nei confronti della ricaduta di malattia. I dati dell'AIEOP-Gruppo LAM, nella figura 2, mettono in evidenza come la probabilità di sopravvivenza libera da malattia a 5 anni, secondo il metodo di Kaplan-Meier, vari in rapporto al trattamento, andando dal 67% per i pazienti trapiantati da donatore HLA compatibile in prima remissione completa, al 37% per i pazienti sottoposti a trapianto autologo e al 23% per i bambini sottoposti a consolidamento solo chemioterapico. Il TCSE allogeneico da fratello HLA identico sembra, dunque, rappresentare, per il bambino con LAM in prima remissione, il trattamento in grado di assicurare una migliore e più duratura sopravvivenza libera da malattia, se paragonata al tradizionale mantenimento chemioterapico.

### ***Il trapianto di cellule staminali emopoietiche***

L'obiettivo del trapianto allogenico di cellule staminali è quello di sostituire il compartimento alterato del paziente con un patrimonio di cellule staminali ottenuto da un donatore sano per ricostituire il sistema emopoietico e immunitario del ricevente. Il raggiungimento di questo obiettivo, che si identifica pertanto con la guarigione, dipende dalla realizzazione di tre fattori principali:

1. utilizzo di una terapia pre-trapianto (detta di condizionamento) il più possibile eradicante per “creare spazio” alle cellule staminali del donatore in sostituzione di quelle del ricevente e per eliminare cellule leucemiche presenti nel malato al momento della realizzazione della procedura trapiantologica.
2. Superamento, ai fini dell’attecchimento, della barriera immunologica rappresentata dalle cellule immunocompetenti del paziente che sono responsabili del rigetto.
3. Superamento della barriera immunologica, rappresentata dalle cellule immunocompetenti attive del donatore presenti nella sospensione di cellule staminali infuse, responsabili della malattia del trapianto contro l’ospite (*graft-versus-host-disease*, GVHD).

Quindi, nel trapianto allogenico di cellule staminali, a differenza di qualunque altro tipo di trapianto, la barriera immunologica da superare è doppia: del ricevente verso donatore (rigetto) e del donatore verso ricevente (GVHD) [13]. La sostituzione del compartimento staminale del paziente con le cellule del donatore determina la convivenza nello stesso individuo del patrimonio genetico di due soggetti differenti; il ricevente in questo caso diventa genotipicamente una chimera (termine mutuato dalla mitologia classica per definire una creatura con parti anatomiche derivate da individui differenti) [14]. Dopo l’infusione di cellule staminali allogeniche possono manifestarsi tre effetti immunomediati:

- il rigetto del trapianto;
- la *graft versus host disease*, ovvero la malattia da trapianto contro l’ospite;
- la *graft versus leukemia*.

Il fenomeno del rigetto si instaura allorché le cellule midollari del donatore, riconosciute come non proprie (*non self*), vengono colpite e distrutte dalle cellule immunocompetenti del ricevente. La profonda immunosoppressione indotta dalle alte dosi di chemioterapia pre-trapianto riduce, tuttavia, l’incidenza del rigetto nel TCSE allogenico non T depleto da donatore HLA compatibile all’1-2% dei casi. Il rigetto rappresenta un problema maggiore nei trapianti da donatore non familiare o nei trapianti non compatibili. La reattività delle cellule immunocompetenti allogeniche contro i tessuti dell’ospite determina l’effetto GVHD. La GVHD rappresenta a tutt’oggi una delle più frequenti complicanze del trapianto di cellule staminali allogeniche, particolarmente nei casi di trapianto incompatibile [14]. Dalle diverse casistiche, per il trapianto di midollo HLA identico, l’incidenza della GVHD corrisponde a circa il 30-50%; tale incidenza aumenta al 50-80% dei casi nei trapianti da donatore non correlato (MUD, *mached unrelated donor*) o da familiari HLA parzialmente compatibili. Inoltre, non solo il tipo di trapianto (il trapianto di sangue da cordone ombelicale correla con una più bassa probabilità di incidenza della GVHD) e il grado di compatibilità donatore-ricevente influenzano l’incidenza della GVHD, ma anche il regime di profilassi impiegato e numerosi altri fattori. L’esatta identificazione della popolazione cellulare responsabile della GVHD resta poco chiara ed esistono prove che sia i linfociti T CD4+ che CD8+ possano giocare un ruolo in questo fenomeno insieme a cellule NK, citochine, compreso l’interferone (IFN), il *tumor necrosis factor* (TNF) e il fattore stimolante le colonie granulocitiche-macrofagiche (GM-CSF). In particolare, nell’immediato post-trapianto gli alti livelli di citochine e molecole di adesione possono rendere maggiormente reattivi i linfociti T infusi verso gli antigeni HLA del ricevente e in tal modo contribuire al danno tessutale della GVHD. Questo fenomeno immunitario si ritiene venga stimolato e accentuato dal danno indotto dai regimi chemioterapici utilizzati nella preparazione al trapianto, primariamente localizzato a livello del tratto gastrointestinale [15]. Le dosi elevate dei regimi di condizionamento al trapianto danneggiano i tessuti, in particolare a livello dell’intestino, consentendo ai lipopolisaccaridi prodotti dai batteri di raggiungere i tessuti adiacenti e la circolazione sanguigna. La terza rilevante implicazione immunologica che si può verificare è rappresentata dalla GVL, risposta che può essere provocata dagli antigeni minori di istocompatibilità presenti sulla superficie delle cellule leucemiche [16]; infatti, le cellule T del donatore, reattive nei

confronti di tali antigeni, inibiscono la crescita delle cellule leucemiche e possono, inoltre, reagire contro proteine aberranti espresse dal clone neoplastico (per esempio, la proteinasi 3 nelle leucemie mieloidi) inibendo la sua crescita e preservando quella delle cellule normali. La cellula staminale multipotente infusa col trapianto ricostituisce nel ricevente un nuovo sistema emopoietico e immunitario. La ripresa funzionale di questi due sistemi non è immediata, in quanto le cellule trapiantate devono da un lato annidarsi nel microambiente midollare, proliferare e differenziarsi, dall'altro maturare in senso immunologico. Il paziente trapiantato attraversa, quindi, un periodo di aplasia midollare con pancitopenia e profonda depressione immunitaria.

La ripresa emopoietica dopo trapianto di cellule staminali allogeniche dipende da vari fattori quali: la malattia di base, il regime di condizionamento pre-trapianto, la profilassi della GVHD, la comparsa di eventuali infezioni virali (in particolare *Cytomegalovirus*, CMV), il numero di cellule infuse. L'attecchimento viene definito in relazione al valore dei polimorfonucleati (PMN), delle piastrine e dei reticolociti a livello del sangue periferico. Convenzionalmente l'attecchimento per la serie granulocitaria è definito dal numero dei PMN  $>500/\text{mm}^3$  per almeno tre giorni consecutivi, mentre per le piastrine da una conta superiore a  $50000/\text{mm}^3$ ; per la serie rossa da un numero di reticolociti superiore a  $25000/\text{mm}^3$  sempre su tre controlli consecutivi in tre giorni successivi. La perdita dell'attecchimento è definita dalla riduzione dei PMN al di sotto dei  $200/\text{mm}^3$  e dalla cellularità midollare  $<5\%$  dopo il raggiungimento di un normale attecchimento granulocitario. La ricostituzione del sistema immunitario è completa in uno o due anni, ma nei soggetti con GVHD cronica questa risulta ulteriormente ritardata. L'introduzione nella pratica clinica dell'uso di fattori di crescita (GM-CSF e G-CSF) dopo la procedura trapiantologica ha permesso di incrementare lo sviluppo e la differenziazione dei polimorfonucleati in grado, in questo modo, di espletare le loro funzioni ossidativa e chemiotattica.

#### ***I farmaci usati nel regime di condizionamento al trapianto per la leucemia mieloide acuta del paziente pediatrico: busulfano, ciclofosfamide e melphalan***

Le procedure trapiantologiche iniziali per la LMA erano, in passato, tutte condotte utilizzando regimi di condizionamento ad alte dosi in modo che fossero sufficientemente immunosoppressivi per assicurare l'attecchimento allogenico. La sempre più crescente consapevolezza che al successo del TCSE allogenico l'effetto immunologico del trapianto (*graft versus tumor*) mostra, in molti casi, un contributo maggiore rispetto all'intensità del trattamento pretrapianto, assieme all'evidenza che è possibile ridurre la tossicità peritrapiantologica tramite l'impiego di regimi definiti a intensità ridotta [17] hanno contribuito alla realizzazione di un cambiamento filosofico nella concezione del trapianto. Questo innovativo approccio trapiantologico prevede, quindi, l'impiego di terapie maggiormente improntate a mediare un'azione efficacemente immunosoppressiva ed è reso possibile, inoltre, dalla disponibilità di larghe dosi (megadosi) di cellule staminali emopoietiche (CSE) attraverso cui ottenere uno stabile attecchimento emopoietico; in quest'ottica si affida alle cellule immunocompetenti del donatore (eventualmente supportate da ulteriori infusioni di linfociti post-trapianto, *donor leukocyte infusion* o DLI), il compito non solo di mediare un effetto *graft versus tumor*, ma anche quello di eliminare progressivamente l'emopoiesi del ricevente, risparmiando significativa mortalità e morbilità peritrapiantologica [14]. Da numerosi anni il gruppo cooperatore pediatrico AIEOP-TMO impiega per i pazienti affetti da LMA e sottoposti a trapianto allogenico da donatore familiare HLA-compatibile un regime di condizionamento basato sull'uso di tre agenti alchilanti quali busulfano, ciclofosfamide e melphalan. L'associazione di tali farmaci era già stata proposta da Locatelli *et al.* [18] nel condizionamento al TCSE per le sindromi mielodisplastiche e, successivamente, per la leucemia mielomonocitica giovanile [19], mostrandosi in grado di ottenere un attecchimento nel 100% dei casi, una modesta tossicità, una maggiore sopravvivenza libera da malattia e una minore incidenza di ricaduta rispetto ai regimi di condizionamento con TBI. I primi dati sulla combinazione BU-CY-MEL usata in bambini affetti da

LMA ad alto rischio sono riportati in un report del 2008 da Veys *et al.* [20] e si sono dimostrati, nonostante il numero di pazienti limitato, promettenti dal punto di vista del miglioramento della sopravvivenza. BU, CY e MEL, in quanto agenti alchilanti polifunzionali, esercitano i loro effetti citotossici attraverso il trasferimento dei loro gruppi alchilici a vari costituenti cellulari. Le alchilazioni del DNA all'interno del nucleo rappresentano probabilmente il meccanismo prevalente con il quale inducono la morte cellulare [21]. Le loro proprietà generali si esplicano attraverso lo sviluppo di una ciclizzazione intramolecolare che determina la formazione di uno ione etilenimonio che, direttamente o attraverso la costituzione di un carbocatione, trasferisce un gruppo alchilico ad un costituente cellulare. Il principale sito per l'alchilazione del DNA è la posizione N7 della guanina e queste interazioni possono verificarsi su un singolo filamento di DNA o contemporaneamente su tutti e due (*cross-linking*), dal momento che i principali agenti alchilanti sono bifunzionali e posseggono, quindi, due gruppi reattivi. La alterazione della guanina può alterare la composizione del messaggio genetico attraverso la formazione di coppie anomale di basi (con la timina) ed escissione della guanina (depurinazione). Gli agenti alchilanti, sebbene non considerabili ciclo-specifici, esercitano il loro massimo effetto in cellule che si trovano nella parte finale della fase G1 del ciclo cellulare; pertanto, le cellule più sensibili a tali farmaci sono quelle in fase moltiplicativa [21]. I meccanismi con i quali si può sviluppare resistenza acquisita agli alchilanti sono: maggiore capacità di riparare i danni del DNA, diminuzione della permeabilità cellulare a questi farmaci, aumentata formazione di glutatione, che li inattiva attraverso una reazione di coniugazione oppure aumentata espressione della glutatione-S-transferasi, che di tale reazione di coniugazione è il catalizzatore.

Il BU è un agente ora ampiamente utilizzato nella terapia di condizionamento al TCSE in età pediatrica, come alternativa alla TBI [22]. Sotto il profilo farmacocinetico, nei pazienti pediatrici rispetto agli adulti, è stata dimostrata una significativa variabilità della *clearance* plasmatica del BU dopo somministrazione per *os*, probabilmente correlata a un alterato assorbimento intestinale del farmaco, a un effetto di primo passaggio epatico incrementato e a un volume di distribuzione più ampio. Per queste ragioni è fortemente raccomandato, soprattutto per i soggetti di età inferiore ai tre anni, il monitoraggio dei valori plasmatici del farmaco dopo somministrazione della prima dose. I valori di busulfanemia plasmatica che si sono dimostrati da un lato efficaci e dall'altro privi di rilevati effetti collaterali sono compresi tra i 700 e 900 ng/ml [23]. L'effetto terapeutico del trattamento con BU, al dosaggio e secondo la posologia consigliati, è quello di indurre una profonda mielosoppressione e immunosoppressione, osservabile nella totalità dei pazienti pediatrici; si sviluppano, quindi, grave granulocitopenia, trombocitopenia, anemia o una combinazione delle stesse e, per questo motivo, durante il trattamento e fino al recupero della funzione emopoietica, deve essere monitorata frequentemente la conta completa delle cellule ematiche con eventuale terapia profilattica o empirica anti-infettiva e di supporto. Sulla base della classificazione dell'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC), che ha definito il BU come carcinogeno per l'uomo, il paziente o chi ne fa le veci deve essere informato dall'aumentato rischio di induzione di un secondo tumore maligno che si ha con l'utilizzo di tale farmaco. Secondo il protocollo AIEOP LAM 2002/01 il farmaco deve essere somministrato per *os*, alla dose di 4 mg/Kg/*die* in 4 somministrazioni ogni sei ore per 4 giorni consecutivi, con una dose totale nei 4 giorni corrispondente a 16 mg/Kg. In caso di obesità si raccomanda di considerare il peso ideale e di prestare particolare attenzione al monitoraggio della busulfanemia. Si raccomanda in genere in tutti i pazienti, ma in particolare nei soggetti di età superiore ai 6 anni, di effettuare profilassi anti-comiziale in corso di somministrazione di BU; i farmaci ci possono essere impiegati a tale scopo sono l'acido valproico, la carbamazepina e il diazepam ai dosaggi usuali.

La CY è un agente come tale non attivo: esso deve essere attivato a composto citotossico da enzimi microsomiali epatici. Il sistema di ossidasi a funzione mista citocromo P-450-dipendente trasforma la CY in 4-idrossiciclofosfamide, in equilibrio con un altro composto, l'aldofosfamide. Si ritiene che

questi metaboliti vengano trasportati per via ematica ai tessuti normali e neoplastici dove si verifica una scissione non enzimatica dell'aldofosfamida in specie citotossiche come fosforamide mostarda e acroleina [21]. Dal momento che, dopo eliminazione nell'urina, i metaboliti della CY provocano alterazioni mucosali a livello di vescica e uretra, prima di iniziare il trattamento, è necessario eliminare o correggere le ostruzioni del tratto urinario efferente, cistiti e infezioni; un'adeguata terapia con uromitexan e una forte idratazione possono ridurre considerevolmente la frequenza e la gravità della tossicità del farmaco. È, inoltre, importante assicurarsi che il paziente svuoti la vescica ad intervalli regolari. Una forte mielosoppressione è da prevedere soprattutto nei pazienti che hanno precedentemente subito trattamenti chemioterapici e/o radioterapia o in pazienti con funzione renale compromessa; pertanto è opportuno che, durante il trattamento, tutti i pazienti eseguano un attento controllo ematologico con conta ematica eseguita regolarmente: in caso di febbre neutropenia e/o leucopenia è necessario somministrare una profilassi antibiotica e/o antimicotica. Dal momento che la CY è un potenziale mutageno e ha effetto genotossico, i pazienti maschi e femmine sessualmente attivi devono utilizzare metodi contraccettivi durante il trattamento e per sei mesi successivi; inoltre il paziente deve essere informato sul rischio incrementato, seppur verosimilmente modesto, di indurre una seconda neoplasia maligna. In linea con il protocollo AIEOP LAM 2002/01 la CY viene somministrata al dosaggio di 60 mg/Kg nei due giorni consecutivi la somministrazione di BU. Il farmaco viene somministrato in soluzione glucosata al 5% (250 ml/m<sup>2</sup>) in un'ora. In caso di obesità si raccomanda di considerare il peso ideale. È necessario prestare particolare attenzione a una condizione di sovradosaggio in quanto potrebbe determinare un possibile danno cardiaco con scompenso congestizio.

L'assorbimento di MEL per via orale è estremamente variabile sia in termini di tempo di comparsa del farmaco nel plasma, sia in termini di concentrazioni plasmatiche di picco; per questo motivo la somministrazione per via endovenosa può essere usata per ovviare al problema della variabilità del suo assorbimento. A livello plasmatico MEL è moderatamente legato alle proteine (con una percentuale variabile da 69% a 78%): il principale legame avviene con l'albumina sierica e con l'alfa-1-glicoproteina acida. Il farmaco ha dimostrato una limitata penetrazione attraverso la barriera ematoencefalica e il determinante principale della propria emivita è rappresentato dalla degradazione spontanea piuttosto che dal metabolismo enzimatico MEL è un agente citotossico attivo che deve essere impiegato sotto il diretto controllo di medici specialisti nella somministrazione di tali agenti. Poiché MEL è un potente agente mielosoppressivo, è essenziale che particolare attenzione venga posta nel monitorare la conta delle cellule ematiche. Deve essere presa in considerazione, per questo motivo, soprattutto nei pazienti che assumono alte dosi di farmaco, la somministrazione profilattica di agenti antifettivi e di derivati ematici. Prima dell'impiego di alte dosi di MEL deve essere garantito il mantenimento di un adeguato stato generale e funzionale degli organi, mentre durante il periodo immediatamente seguente la sua infusione è necessario il sostenimento di un filtrato glomerulare renale elevato mediante idratazione e diuresi forzata. Come gli altri agenti alchilanti MEL si è dimostrato un potenziale cancerogeno: sono stati, infatti, riportati casi di leucemia acuta in seguito a trattamento con MEL. MEL, secondo il protocollo AIEOP LAM 2002/01, viene somministrato per via endovenosa; la quantità da infondere, corrispondente a 140 mg/m<sup>2</sup>, va diluita in soluzione fisiologica (e non in soluzione glucosata) nel giorno seguente la somministrazione degli altri due farmaci BU e CY, ovvero in giornata -2 rispetto al giorno stabilito per il TCSE. L'infusione deve avere una durata corrispondente a venti minuti e il paziente deve essere adeguatamente idratato e monitorato. In caso di peso corporeo inferiore ai 12 kg, la dose di MEL deve essere corretta come segue: [peso (Kg) x dose (per m<sup>2</sup>)]/30. In relazione al protocollo AIEOP LAM 2002/01 è previsto un giorno di pausa tra la somministrazione chemioterapica e l'infusione di CSE, sia autologhe sia allogeniche, secondo lo schema riportato nella figura 3.



## Obiettivi dello studio

Più dell'80% dei bambini affetti da leucemia mieloide acuta insorta *de novo* raggiunge la remissione completa con una terapia di induzione basata sulla combinazione di farmaci chemioterapici attivi sui blasti mieloidi. Tuttavia, è il trattamento post-remissione a giocare un ruolo cruciale nell'*outcome* finale di questi pazienti. In quest'ottica, come già esposto nel capitolo precedente, le terapie di consolidamento post-remissionale possono includere una chemioterapia intensiva che includa preferibilmente la citosina arabinoside ad alte dosi, oppure il TCSE, autologo o allogenico. Negli ultimi anni numerosi gruppi di ricerca hanno dimostrato che, nei bambini affetti da LAM ad alto rischio (ovvero, come riferito nel primo capitolo, non connotata da citogenetica favorevole), il TCSE, seppur gravato da un maggiore rischio di complicanze terapia-correlate, offre risultati migliori in termini di sopravvivenza libera da malattia rispetto alle altre forme di trattamento post-remissionale. L'obiettivo di questo studio è quello di valutare la sicurezza e l'efficacia della combinazione di tre agenti alchilanti, busulfano, ciclofosfamide e melphalan, quale terapia di condizionamento al TCSE da donatore familiare in bambini affetti da forme *de novo* di LAM in prima RC ematologica (con l'esclusione del sottotipo FAB M3, per il quale i moderni trattamenti prevedono la combinazione di terapia differenziante con l'acido *all-trans* retinoico e di farmaci citostatici, in particolare antracicline).

## Pazienti e metodi

Sono stati arruolati nello studio settanta pazienti affetti da LAM *de novo*, in prima RC, riferiti ai centri dell'AIEOP per essere sottoposti a TCSE da donatore familiare. I bambini, 40 maschi e 30 femmine, sono stati trapiantati tra il 1992 e il 2002. Il grafico a barre riportato nella figura 4 mostra la distribuzione numerica dei bambini trapiantati in relazione all'anno di trapianto: il maggior numero di trapianti è stato effettuato nel 1999, il minor numero negli anni 1994 e 1998. I dettagli dei pazienti pediatrici arruolati e le loro caratteristiche sono riportati nella tabella 2. I genitori o i rappresentanti legali dei pazienti arruolati e dei rispettivi donatori hanno firmato un consenso informato scritto a questo studio, che è stato approvato da comitato etico da ogni singola Istituzione partecipante in accordo ai principi della dichiarazione di Helsinki. Il regime di condizionamento al trapianto si fondava sulla combinazione di: BU (dosaggio di 4 mg/kg/die per quattro giorni consecutivi), CY (alla dose di 60 mg/kg/die per due giorni) e MEL (alla dose di 140 mg/m<sup>2</sup> di superficie corporea, in singola dose). La tabella 3 mostra i dettagli dello schema di regime di condizionamento somministrato ai bambini, suddiviso nei diversi giorni precedenti l'infusione di CSE. Il dosaggio dei BU è stato corretto dopo studio farmacocinetico effettuato nei pazienti dopo la prima dose di farmaco, al fine di mantenere la sua concentrazione allo *steady state*, compresa tra 700 e 900 ng/ml. In 68 bambini (97% dei casi) le CSE sono state ottenute dal midollo osseo del donatore familiare, mentre solo in 2 casi (3%) è stato impiegato il sangue periferico come fonte di tali cellule. La mediana del carico cellulare midollare infuso è stata pari a  $4 \times 10^8$ /Kg di peso corporeo del ricevente (range 1.26-15.3). Nei 2 pazienti sottoposti a trapianto di CSE da sangue periferico la dose di cellule CD34+ infuse è stata invece rispettivamente di 10.5 e 12.5  $\times 10^6$ /Kg. La profilassi per la GVHD impiegata nei diversi pazienti ha previsto l'uso di schemi terapeutici differenti: nella maggior parte dei casi (88.8%) è stata effettuata una profilassi con la sola ciclosporina-A (CSA); nel restante 11.2% dei casi si è utilizzata l'associazione di CSA e di globulina anti-timocitaria (ATG) oppure la combinazione di CSA e methotrexate (MTX) o di CSA, MTX e prednisone (PDN) o di CSA e PDN.

## Risultati

Il regime di condizionamento impiegato nello studio è stato complessivamente ben tollerato e nessun paziente è deceduto per cause direttamente attribuibili al trattamento mieloablato. L'attecchimento si è verificato in tutti i pazienti arruolati nello studio: la conta dei granulociti neutrofili ha superato i 500 elementi/mm<sup>3</sup> a un tempo mediana di 13 giorni (range 7-28 giorni) dopo il trapianto; l'attecchimento piastrinico è avvenuto dopo una mediana di 21 giorni (range 13-115) dopo il trapianto. La GVHD acuta si è sviluppata nell'83% dei pazienti ad una mediana di 11 giorni dal trapianto (range 7-24): in 17 bambini si è manifestata come GVHD acuta di primo grado, in 31 di secondo grado, in 8 di terzo grado e in 2 di quarto grado. L'incidenza cumulativa di GVHD acuta di grado II-IV è risultata pari al 58% (limiti di confidenza al 95%, 48-71), mentre l'incidenza cumulativa di GVHD acuta di grado III-IV è stata del 14% (limiti di confidenza al 95% 8-25). La GVHD cronica è insorta nel 26% dei bambini: in 7 pazienti è risultata di forma limitata, in 11 di forma estesa. L'incidenza cumulativa totale di GVHD cronica è stata del 27% (limiti di confidenza al 95% 18-39), mentre quella della sola GVHD cronica estesa è stata del 16% (limiti di confidenza al 95% 9-28). Dodici dei 70 pazienti arruolati (17%) hanno presentato una recidiva leucemica di malattia, ad una mediana di 240 giorni dal trapianto (range 57 giorni-3.7 anni). I decessi per cause trapianto-correlate sono stati 5 (7%) e si sono verificati ad una mediana di 200 giorni (range 48 giorni-1.4 anni). Cinquantaquattro pazienti (77%) sono vivi al momento dell'ultimo *follow-up*, con un tempo mediano di osservazione di 8.9 anni dal trapianto (range 5-16 anni). Di questi 54 pazienti, 53 (76%) sono vivi ed in prima remissione completa di malattia, mentre 1 è vivo in seconda remissione, dopo un secondo TCSE allogenico. Come si evince dal grafico della figura 5, la sopravvivenza a dieci anni dal trapianto è risultata essere del 77%, mentre la sopravvivenza libera da malattia (DFS, *disease-free survival*) a dieci anni è stata del 76%. L'incidenza cumulativa di ricaduta è stata del 17% e quella di mortalità correlata al trapianto (TRM, *transplant-related mortality*) è stata pari al 7%, vedi anche figura 6.

Da quanto emerge dai dati raccolti nello studio si può osservare come vi sia un miglioramento dei risultati nel tempo: mentre la DFS corrispondeva al 59% nei bambini trapiantati prima del 31/12/1997, nei pazienti trapiantati dopo tale data è incrementata al 86%, con *P value* di 0.0027, pertanto statisticamente significativo. Questa evoluzione è dovuta, in particolare, a una riduzione importante della TRM, dal 19% allo 0% (*P*=0.0027). In analisi multivariata, l'anno di trapianto successivo al 1998 si è dimostrato un fattore prognostico favorevole, con un rischio relativo di fallimento del trapianto pari a 3.69 (limiti di confidenza al 95% 1.28-10.7) per i pazienti trapiantati fino al 1997 rispetto a quelli trapiantati dal 1998 in poi, come si evince dalla tabella 4. Sempre in analisi multivariata, nessuna variabile è risultata associata in maniera significativa ad un diverso rischio di ricaduta o di TRM (tabelle 5 e 6).

## Discussione

Sebbene più dell'80% dei bambini affetti da LAM *de novo* riesca a raggiungere una prima RC grazie ad un trattamento di induzione basato sulle moderne combinazioni di agenti chemioterapici, è il trattamento post-remissionale della malattia che gioca un ruolo cruciale nel determinare quello che è l'esito finale del trattamento per questo gruppo di pazienti. In quest'ottica, le possibili strategie di consolidamento della remissione includono cicli ripetuti di chemioterapia convenzionale ad alte dosi oppure il TCSE sia autologo che allogenico. Anche se nel corso degli ultimi anni numerosi gruppi di ricerca hanno dimostrato che, nei bambini affetti da LAM ad alto rischio (ovvero non connotata da citogenetica favorevole), il TCSE offre risultati migliori in termini di sopravvivenza rispetto alle altre

forme terapeutiche post-remissione, resta comunque limitato il numero di lavori condotti su una popolazione squisitamente pediatrica che abbiano valutato il reale impatto a lungo termine di questa procedura. Il nostro studio è stato condotto su un numero elevato di pazienti pediatriche affetti da LAM in prima RC (70). Inoltre, è degno di nota come il periodo di osservazione mediano, per i soggetti arruolati, sia particolarmente lungo, circa 9 anni, con un *follow-up* minimo di 5 anni ed un massimo di 16 anni. Un periodo di osservazione così lungo permette, quindi, di trarre informazioni conclusive su quelle che sono le reali possibilità di cura con questa procedura per i bambini affetti da LAM in prima RC e su quelli che possono essere i rischi di complicanze tardive d'esito fatale, quali la bronchiolite obliterante o la GVHD cronica.

Due punti appaiono particolarmente degni di nota tra i risultati ottenuti: in primo luogo, la buona tolleranza del regime di condizionamento. L'incidenza cumulativa di TRM è, infatti, risultata essere molto bassa e pari solo al 7%, valore riportato connotare più un trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche che uno allogenico. Inoltre, nessun caso di decesso in remissione è stato direttamente attribuibile alla tossicità secondaria alla combinazione di farmaci impiegati quale regime di condizionamento. Queste considerazioni appaiono di particolare rilievo se si considera che si è deciso di aggiungere un terzo farmaco alchilante, MEL, alla classica combinazione BU/CY, ormai da anni routinariamente impiegata quale regime mieloablattivo pre-trapianto. È ragionevole ipotizzare che l'aggiustamento delle dosi di BU in funzione dei livelli plasmatici del farmaco misurati dopo la prima somministrazione abbia significativamente contribuito a ridurre il rischio di complicanze gravi o addirittura fatali. Ancora di maggior rilievo è l'osservazione che nessun paziente è deceduto dal 1998 in poi. Quest'ultima osservazione fornisce grande supporto alla scelta di offrire, ogni qualvolta vi sia un germano HLA-compatibile, la procedura trapiantologica ad ogni paziente pediatrico con LAM *de novo* che non si connota per un basso rischio di ricaduta a ragione di una citogenetica favorevole. Questa riduzione significativa occorsa nel tempo del rischio di TRM può essere interpretabile alla luce di una sorta di effetto apprendimento/esperienza dei Centri ove i pazienti sono stati trattati.

Il secondo punto degno di nota è la buona attività anti-leucemica mostrata dalla combinazione di farmaci impiegati, attività anti-leucemica testimoniata da un'incidenza cumulativa di recidiva estremamente bassa, e pari a solo il 17%. A questo proposito, appare opportuno considerare come l'associazione di 3 agenti alchilanti potrebbe essere in grado di esercitare un efficace effetto anti-neoplastico anche nei confronti di cellule leucemiche in fase di quiescenza e di non attiva replicazione, e, quindi, potenzialmente meno sensibili all'azione di altri agenti chemioterapici (anti-metaboliti, epipodofillotossine, ecc). Deve essere, inoltre, sottolineato che nessuno dei pazienti inclusi in questo studio soffriva di leucemia acuta promielocitica e all'interno dei 44 pazienti per i quali erano disponibili dati sulla caratterizzazione citogenetica solamente 5 avevano alterazioni del complesso *CBF $\beta$* .

In conclusione, il nostro studio dimostra come il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, effettuato dopo un regime mieloablattivo basato sulla combinazione dei 3 farmaci BU, CY e MEL, sia una modalità di trattamento post-remissionale caratterizzata da un buon profilo di tolleranza farmacologica, accettabile tossicità e buon effetto antileucemico e possa garantire elevate probabilità di cura per pazienti pediatriche affetti da LAM in prima RC di malattia.

## Tabelle e figure

**Tabella 1. Potenziali fattori di rischio per la LAM pediatrica [10].**

Fattori prognostici	Rischio sfavorevole		Rischio favorevole	
	Accertati	In studio	Accertati	In studio
<i>Citogenetica</i>	Del(5q) Monosomia 5 o 7	Citogenetica complessa t(6;9) Anomalie cr 3	t(15;17) inv(16) t(8;21)	t(9;11)
<i>Mutazioni a livello del processo di trasduzione del segnale</i>	FLT3	c-Kit c-Fms Recettori VEGF N e K-Ras		Mutazioni CEPB Mutazioni NPM
<i>Risposta alla terapia</i>	Scarsa risposta alla terapia	Malattia minima residua	Risposta rapida alla terapia	
<i>Nuovi markers prognostici</i>		Elevata espressione di WT1, VEGF, BAALC Attività della telomerasi, profilo di espressione genica Proteomica		Profilo di espressione genica Proteomica
<b>Abbreviazioni:</b> cr, cromosoma; VEGF, fattore di crescita dell'endotelio vascolare; C-EBP $\alpha$ , CCAAT-enhancer binding protein alpha; NPM, gene della nucleofosmina; WT1, gene Wilms' Tumor 1; BAALC, <i>gene brain and acute leukaemia cytoplasmatic</i>				

**Tabella 2. Caratteristiche dei pazienti arruolati nello studio.**

<i>Numero di pazienti</i>	70 (100%)
<i>Sesso (rapporto maschi/femmine)</i>	40/30 (57%/43%)
<i>Età dei pazienti alla diagnosi (anni)</i>	6.6 (0.16-16.55)
<i>Classificazione FAB</i>	
• M0	2 (3%)
• M1	25 (22%)
• M2	17 (24%)
• M4	12 (17%)
• M5	21 (30%)
• M6	1 (1%)
• M7	2 (3%)
<i>Conta media dei leucociti alla diagnosi (<math>\times 10^9</math>/litro)</i>	18 (0.9-660)
<i>Anomalie citogenetiche</i>	
• t(8;21)	4 (6%)
• inv(16)	1 (1%)
• altre anomalie	12 (17%)

**Tabella 3. Dettagli del regime di condizionamento utilizzato.**

Giorni precedenti il trapianto di CSE	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
BU 4 mg/kg/die	•	•	•	•				
CY 60 mg/kg/die					•	•		
L-PAM 140 mg/m <sup>2</sup> /die							•	
Infusione di CSE								•

**Tabella 4. Analisi multivariata per la disease-free survival.**

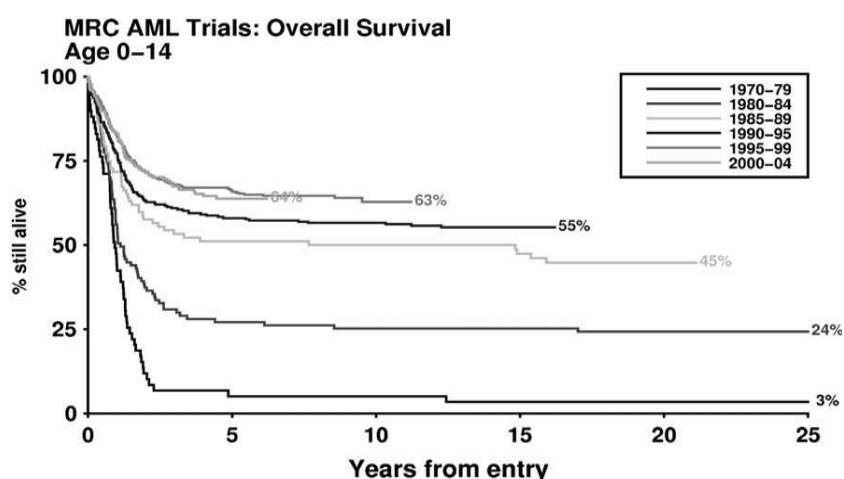
Variabile	Rischio relativo	(95% CI)	P
Giorni alla prima RC (≥42 vs <42)	2.88	(0.92-9.02)	0.0692
Anni del TCSE (1992-1997 vs 1998-2002)	3.69	(1.28-10.7)	0.0160
Cellule midollari infuse (x10 <sup>9</sup> /kg) (≥4 vs <4)	1.96	(0.67-5.72)	0.2155

**Tabella 5. Analisi multivariata per il rischio di ricaduta.**

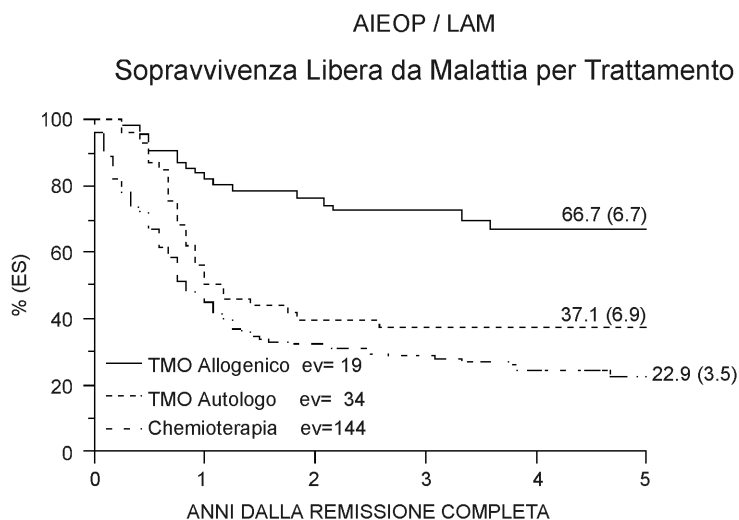
Variabile	Rischio relativo	(95% CI)	P
Conta leucocitaria alla diagnosi (x10 <sup>9</sup> /L) (≥20 vs <20)	2.97	(0.61-14.45)	0.1775
Cellule midollari infuse (x10 <sup>9</sup> /kg) (≥4 vs <4)	6.67	(0.82-54.48)	0.0745

**Tabella 6. Analisi multivariata per il rischio di mortalità trapianto-correlata.**

Variabile	Rischio relativo	(95% CI)	P
Anni del TCSE (1992-1997 vs 1998-2002)	5.84	(0.60-56.51)	0.1273
GVHD acuta (grado III-IV vs grado I-II)	1.03	(0.09-12.35)	0.9827
GVHD cronica (estesa vs assente/limitata)	5.50	(0.64-47.47)	0.1214



**Figura 1. Sopravvivenza complessiva di bambini di età inferiore ai 15 anni affetti da LAM e trattati secondo i trial MRC (Medical Research Council) durante le ultime tre decadi [12].**



Numero di pazienti a rischio:

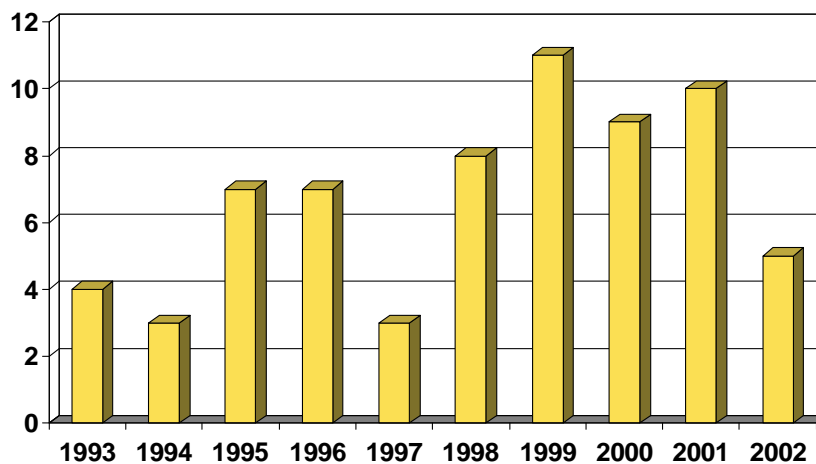
75	47	36	29	23	13	TMO Allogénico
63	24	18	15	14	12	TMO Autólogo
251	80	50	35	23	13	Chemioterapia

**Figura 2. Sopravvivenza libera da malattia per tipo di terapia post-remissionale nella LAM (con esclusione della leucemia promielocitica acuta) trattata presso i Centri AIEOP.**

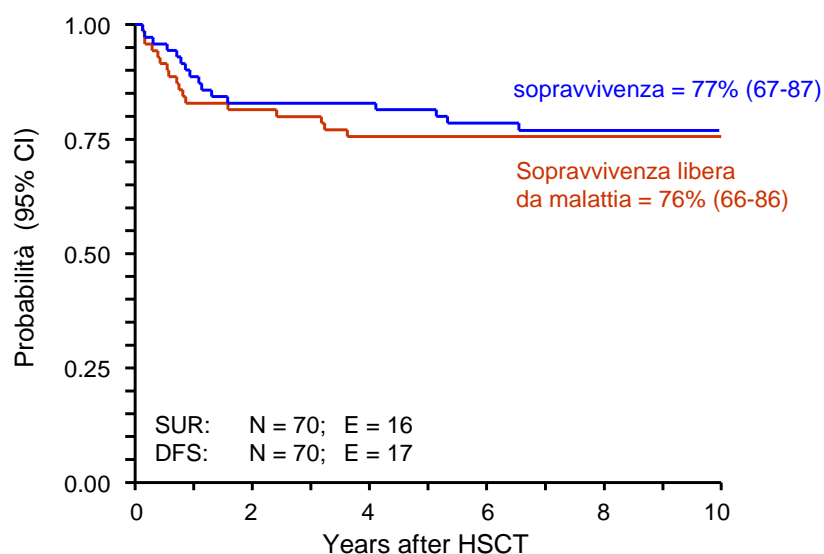
GIORNO	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
BU		■	■	■	■								
CY						■	■						
MEL								■					

BU 16 mg/kg = 4 mg/kg/die per 4 volte per 4 giorni (gg -8,-7,-6,-5)  
 CY 60 mg/kg/die per 2 giorni (gg -4,-3)  
 MEL 140 mg/m<sup>2</sup> in 1 giorno (g -2)

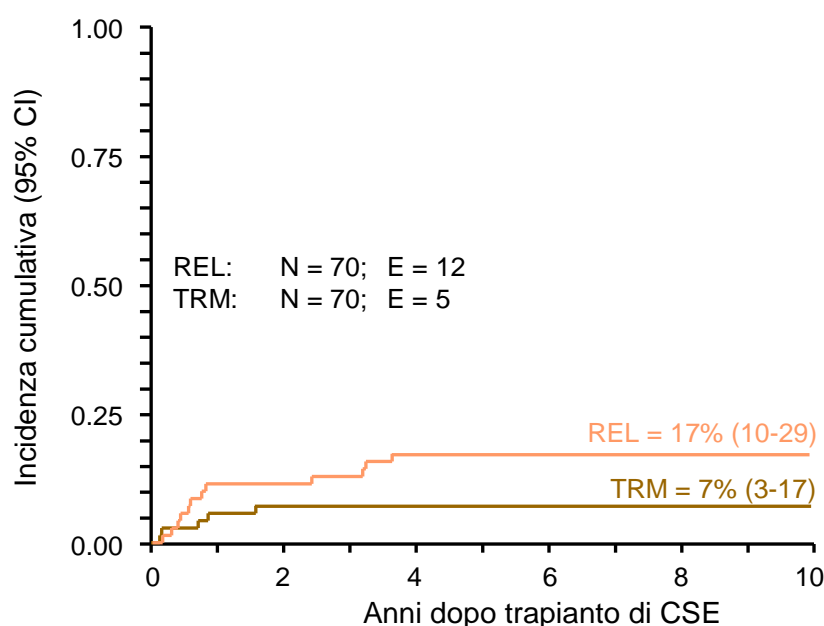
**Figura 3. Regime di condizionamento al TCSE secondo il protocollo AIEOP LAM 2002/01.**



**Figura 4. Numero di trapianti effettuati per anno, compresi tra il 1992 e il 2002.**



**Figura 5. Curva di sopravvivenza secondo l'analisi di Kaplan-Meier (Abbreviazioni: SUR = sopravvivenza a dieci anni; DFS = sopravvivenza libera da malattia a dieci anni; N = numero di pazienti a rischio; E = numero di eventi osservati, HSCT 0 TCSE).**



**Figura 6. Ricaduta e mortalità correlata al trapianto (Abbreviazioni: REL = incidenza cumulativa di ricaduta; TRM = mortalità correlata al trapianto).**

### Bibliografia

1. Ematologia e oncematologia pediatrica, collana Pediatria Politematica, © UTET S.p.a., Torino 2001.
2. Glave J, Goubin A, Auclerc MF et al. Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. *Eur J Cancer Prev* 2004;13:97-103.
3. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. *NIH Pub* 1999 Bethesda.
4. Mills PK, Zahm SH. Organophosphate pesticide residues in urine of farmworkers and their children in Fresno Country, California. *Am J Ind Med* 2001;40(5):571-577.
5. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* 2003;101(3):822-826.

6. Socie G, Henry-Amar M, Bacigalupo A et al. Malignant tumors occurring after treatment of aplastic anemia. European Bone Marrow Transplantation-Severe Aplastic Anemia Working Party. *N Engl J Med* 1993;329(16):1152-1157.
7. Arceci RJ, Maeshinchi S. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *The Oncologist* 2007;12:341-355.
8. Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P et al. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukaemia. *Cancer Cell* 2002;1(1):63-74.
9. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;23(2):166-175.
10. Arceci RJ, Maeshinchi S. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *The Oncologist* 2007;12:341-355.
11. Gibson BE, Wheatley K, Hann IM et al. Treatment strategy and long-term results in pediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* 2005;19(12):2130-2138.
12. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO et al. Acute myeloid Leukaemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2010;24:35-63.
13. Locatelli F, Burgio GR. Transplant of hematopoietic stem cells in childhood: where we are and where we are going. *Hematologica* 1998;83:550-563.
14. Edatologia. © Forum Service Editore s.c.a r.l., Roma 1998
15. Copelan EA. Hematopoietic stem cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354:1813-1826.
16. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 2004;4:371-380.
17. Diaconescu R, Flowers CR, Storer F et al. Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared to myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA matched related donors. *Blood* 2004;104:1550-1558.
18. Locatelli F, Zecca M, Niemeyer C et al. Role of allogeneic bone marrow transplantation for the treatment of myelodysplastic syndromes in childhood. The European Working Group on Childhood Myelodysplastic Syndrome (EWOG-MDS) and the Austria-Germany-Italy (AGI) Bone Marrow Transplantation Registry. *Bone Marrow Transplant* 1996;18(suppl. 2):63-68.
19. Locatelli F, Nollke P, Zecca M et al. European Working Group on Childhood MDS; European Blood and Bone Marrow Transplantation Group. Hematopoietic Stem Cell Transplantation (TCSE) in children with juvenile myelomonocytic leukaemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood* 2005;105:410-419.
20. Veys P, Bonannomi S, Connor P et al. Successful outcome of allo-SCT in high risk pediatric AML using chemotherapy-only conditioning and post transplant immunotherapy. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 42:253-257.
21. Principles and practice of Practice of Pediatric Oncology, 5<sup>th</sup> ed. *Lippincott Williams and Wilkins*, London 2005.
22. Ciurea SO, Andersson BS. Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:523-536.
23. Pession A, Testi AM, Locatelli F. Trattamento chemioterapico dei pazienti in età pediatrica con Leucemia Mieloide Acuta: risultati del Registro Italiano. *Riv Ital Pediatr* 1998;24:102-104.