

INDICE

Introduzione

Generalità sulla trombocitemia essenziale.....	pag 3
Criteri WHO	pag 4
Difetti molecolari: JAK2 (V617F) e MPL.....	pag 5
Terapia della trombocitemia essenziale.....	pag 5
Antiaggreganti e citoriduttivi.....	pag 7
Studio clinico.....	pag 10
Materiali e Metodi.....	pag 11
Risultati.....	pag 12
Discussione.....	pag 14
Conclusioni.....	pag 14
Bibliografia.....	pag 15

INTRODUZIONE

La **trombocitemia essenziale** (TE) è una neoplasia mieloide appartenente al gruppo delle malattie mieloproliferative croniche Philadelphia-negative [1] caratterizzata da iperplasia megacariocitica. La trombocitosi e la attivazione piastrinica rappresentano le caratteristiche bio-cliniche della TE [2]. La clinica della TE è prevalentemente trombotica per la iperfunzione piastrinica, più raramente emorragica quando la piastrinosi è eccessivamente elevata [3]. La trombosi trombotocitemica è caratterizzata da eventi macrovascolari (TIA, Ictus, IMA, TVP)[4] o microvascolari (cefalea, vertigini, acufeni, ronzio auricolare, disturbi del visus, parestesie). Questi ultimi configurano la sindrome eritromelalgica [5]. La TE può evolvere raramente in leucemia acuta (1%), più frequentemente in mielofibrosi [6]. La trasformazione mielofibrotica può essere monitorata mediante la misurazione delle cellule CD34+, utilizzando la tecnica citofluorimetrica, la cui percentuale è bassa o alta nella TE e nella mielofibrosi post-ET, rispettivamente [7].

La diagnosi di TE può essere sospettata dalla osservazione di una elevata conta piastrinica all'esame emocrocitometrico ($>450 \times 10^9/L$) [8]. Tuttavia, l'accuratezza diagnostica prevede la esclusione delle altre sindromi mieloproliferative croniche quali policitemia vera, leucemia mieloide cronica BCR/ABL-positiva e mielofibrosi idiopatica e di tutte

quelle condizioni cliniche che causano trombocitosi reattiva quali malattie neoplastiche o patologie infiammatorie, anemia sideropenia e splenectomia [9].

La malattia è più frequente nel sesso femminile (rapporto maschi/femmine 1 a 2), permette una lunga sopravvivenza ed il decorso è cronico-benigno[10].

Criteri diagnostici

I criteri WHO (World Health Organization) sono validati per la diagnosi della TE [11] e schematizzati secondo dati clinici e molecolari (Tabella 1).

Criteri WHO per la diagnosi di TE

- ✓ Conta piastrinica $> 450.000 \times 10^9/L$
- ✓ Iperplasia midollare megacariocitica caratterizzata da elementi morfologicamente grandi e maturi. Normale la granulopoiesi e la eritropoiesi
- ✓ Esclusione di policitemia vera, mielofibrosi primaria, leucemia mieloide cronica BCR-ABL-positiva o sindrome mielodisplastica
- ✓ Presenza della mutazione JAK2 (V617F) o di altre anomalie clonali. Se assenti, è necessario escludere la trombocitosi reattiva

Difetti molecolari

La JAK2 è una tirosin-chinasi coinvolta nel meccanismo di trasduzione del segnale mediato dal recettore trombopoietinico (MPL) [12-13]. La mutazione del gene JAK2 caratterizzata dalla sostituzione della valina in posizione 617 con la fenilalanina (V617F) si verifica nel sito autoinibitorio di JAK2 causandone la attivazione e la conseguente aumentata trasduzione del segnale mieloproliferativo [14].

La mutazione JAK2 (V617F) è presente in circa il 50% dei pazienti affetti da trombocitemia essenziale e non è mai stata rilevata in soggetti sani o in pazienti con trombocitosi reattiva [15].

In una minoranza di pazienti con TE (1%-5%) è descritta la mutazione del recettore trombopoietinico MPL, responsabile di attivazione della via di trascrizione e trasduzione JAK2/STAT, nelle sue varianti MPLW515L o MPLW515K il cui significato clinico è ad oggi incerto [16].

Terapia della TE

La scelta terapeutica citoriduttiva e/o antiaggregante è subordinata alla stratificazione del rischio trombotico o emorragico (Tabella 2), variando dal “watch and wait” per il basso rischio che prevede solo il trattamento antiaggregante, alla terapia combinata con il citoriduttore per l’alto rischio[17].

Categorie di rischio

Basso rischio

- età < 60 anni
- assenza di precedenti eventi trombotici o emorragici
- conta piastrinica < 1.500.000/ μ L
- assenza di fattori di rischio cardiovascolari

Intermedio rischio

- età < 60 anni
- assenza di precedenti eventi trombotici o emorragici
- conta piastrinica < 1.500.000/ μ L
- presenza di fattori di rischio cardiovascolari

Alto rischio

- età >60 anni
- presenza di precedenti eventi trombotici o emorragici
- conta piastrinica > 1.500.000/ μ L

Le linee guida attualmente in uso (European LeukemiaNet Guidelines, 2011) suggeriscono il trattamento citoriduttivo per i pazienti ad **alto rischio trombotico o emorragico e definiscono la risposta ematologica completa quando la conta piastrinica è < 400.000x10⁹/L** [18].

Antiaggreganti

L'utilizzo di acido acetilsalicilico (ASA) a basse dosi (100 mg) può essere utile nel controllare la iperfunzione piastrinica e la sintomatologia eritromelalgica benché alcuni studi riportino un aumentato rischio emorragico farmaco-indotto [19].

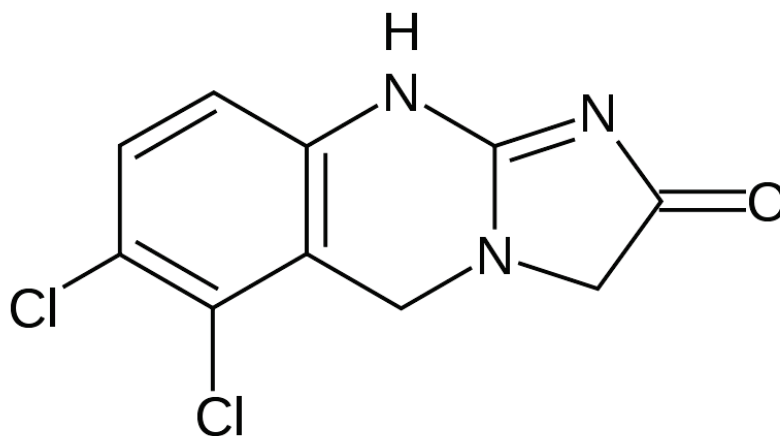
Nei casi resistenti ad ASA o in soggetti con precedenti eventi emorragici o con patologie gastrointestinali la scelta dell'antiaggregante è orientata ad altre molecole come indobufene, dipiridamolo o ticlopidina [20-21].

Citoriduttivi

Idrossiurea

L'idrossiurea (HU – capsule 500 mg) è il farmaco di prima linea nella terapia della TE [22]. E' un citostatico che inibisce la sintesi del DNA attraverso la inattivazione della ribonucleotide reductasi [23]. La HU è somministrata per via orale e consente un buon controllo della conta piastrinica. Tuttavia, la HU è leucemogena ed il suo uso è associato a numerosi eventi avversi quali depressione midollare (farmaco “non piatrino-specifico”) anemia emolitica, ulcere muco-cutanee [24].

Anagrelide



6,7-dichloro-1,5-dihydroimidazo (2,1-b)quinazolin-2(3*H*)-one

L'anagrelide (ANA - capsule da 0,5-1 mg) è un composto imidazoquinazolinico che sopprime selettivamente la megacariocitopoiesi midollare, interferendo con il processo di maturazione, e riduce la conta piastrinica senza influenzare la granulopoesi e la eritropoesi.

L'ANA, somministrata per os a dosi comprese tra 1 e 2 mg/die, raggiunge il picco plasmatico dopo circa 1 ora e successivamente è metabolizzata a livello epatico e renale. I pazienti con insufficienza renale (creatinina superiore o uguale a 2mg/dL) dovrebbero essere strettamente monitorati quando assumono ANA per la possibile tossicità renale, così come i pazienti con disfunzione epatica per la possibile tossicità epatica.

La ANA è un farmaco piastrino-specifico e non-leucemogeno [25]. Gli effetti collaterali sono di tipo cardiovascolare, in particolare palpitazione e tachicardia (effetto inotropo positivo) ed edema (vasodilatazione) [26]. Pertanto, è consigliabile una valutazione elettrocardiografia ed ecocardiografica prima del trattamento e successivamente ogni sei mesi [27].

L'ANA possiede anche attività antiaggregante per inibizione della fosfodiesterasi III cAMP-dipendente [28].

L'utilizzo di ANA è riservato alla terapia di seconda linea ed è rivolto ai pazienti resistenti o intolleranti al trattamento standard [29].

STUDIO CLINICO

Background

La trombocitemia essenziale (TE) è caratterizzata da attivazione piastrinica-coagulante-endoteliale responsabile del rilascio del **fattore di crescita fibroblastico-2** (FGF-2), una citochina inducente mieloproliferazione e fibrosi [30]

L'ANA è un farmaco piastrino-riducente che inibisce l'attivazione piastrinica. Pertanto, lo scopo dello studio è stato la valutazione dell'effetto di ANA su *marcatori di funzione piastrinica-coagulante-endoteliale* quali **PF4** (platelet factor 4), **TFPI** (Tissue Factor Pathway Inhibitor), **TF** (Tissue Factor), **vWF** (von Willebrand Factor) e su indici di mieloproliferazione e fibrosi quali **piastrine**, conta leucocitaria (**GB**), livello di emoglobina (**Hb**) e **FGF-2** e **reticolina midollare** [31], rispettivamente.

Materiali e Metodi

Sono stati arruolati 21 pazienti (13 maschi, 8 femmine, età media 52 anni) con diagnosi di TE secondo i criteri WHO. La durata media di malattia era 9 anni (range, 4.21 anni). Nessuno aveva splenomegalia né stato mutazionale o era portatore di trombofilia acquisita o ereditaria. La dose media di ANA era 2.1 mg/die. Tutti erano in trattamento antiplastrinico con ASA. La biopsia ossea era eseguita alla diagnosi e successivamente ogni 2 anni.

30 soggetti con trombocitosi reattiva rappresentavano il gruppo di controllo.

Le piastrine, la conta leucocitaria (GB) ed il livello di emoglobina (Hb) sono stati misurati mediante contaglobuli automatico.

PF4, TFPI, TF, vWF e FGF-2 sono stati misurati mediante tecnica ELISA ed immunoturbidimetrica, rispettivamente. Poiché l'FGF-2 è un rilasciato piastrinico, la concentrazione di FGF-2 era aggiustata per conta piastrinica (FGF^{PLT} pg/10⁶).

Tutte le misurazioni sono state eseguite prima e dopo terapia con ANA.

Il grado di reticolina midollare è stato valutato mediante biopsia ossea.

Risultati

Prima della terapia tutti i pazienti avevano trombocitosi ed mostravano parametri di attivazione piastrinica-coagulativa-endoteliale significativamente aumentati rispetto al gruppo controllo, mentre il vWF era diminuito per effetto consumo. Il grado di reticolina midollare era 1.2 (v. Tabella)

Tabella

	PRE-ANA	CONTROLLI	p
Plt ($\times 10^9/L$)	1005 \pm 314 (vn150-450)	510 \pm 25	<.0001
PF4(IU/ml)	127 \pm 45 (vn1-10)	4.1 \pm 2.4	<.0001
TFPI(ng/ml)	156 \pm 64 (vn 75-120)	94 \pm 10	<.0001
TF(pg/ml)	235 \pm 287 (vn 0-10)	4.4 \pm 2.7	<.0001
vWF(%)	23 \pm 7.8 (vn 50-160)	77 \pm 18	<.0001
FGF ^{Pt} (pg/ 10^6)	0.08 \pm 0.08 (vn 0.01-0.002)	0.01 \pm 0.001	<.0001
WBC($\times 10^9/L$)	10.5 \pm 2.4 (vn 5-6)	5.2 \pm 1.1	<.0001
Hb(g/dL)	14 \pm 1.4 (vn 12-12.5)	12 \pm 0.4	<.0001
Reticolina	1.2 \pm 0.1		

Dopo trattamento tutti i pazienti mostravano una completa risposta ematologica (piastrine $<400 \times 10^9/L$) e normalizzazione dei parametri di attivazione piastrinica-coagulante-endoteliale e normale vWF. La reticolina midollare era assente (v. Tabella dati bioclinici pre- post ANA)

Tabella. Dati bioclinici pre- e post-ANA

	Pre-ANA	Post-ANA
Plt ($\times 10^9/L$)	1005 \pm 314 (vn150-450)	386\pm55
PF4(IU/ml)	127 \pm 45 (vn1-10)	8.5\pm3
TFPI(ng/ml)	156 \pm 64 (vn 75-120)	100\pm49
TF(pg/ml)	235 \pm 287 (vn 0-10)	8.7\pm0.8
vWF(%)	23 \pm 7.8 (vn 50-160)	91\pm35
FGF ^{Plt} (pg/ 10^6)	0.08 \pm 0.08 (0.01-0.002)	0.01\pm0.0
WBC($\times 10^9/L$)	10.5 \pm 2.4 (vn 5-6)	7.4\pm1.4
Hb(g/dL)	14 \pm 1.4 (vn 12-12.5)	12.6\pm1.1
Reticolina	1.2 \pm 0.1	0

L'analisi statistica ha mostrato una positiva correlazione tra PF4 e piastrine ($p < .0001$), TFPI($p=0.005$), TF ($p=0.014$), vWF ($p < .0001$) e **FGF^{PLT} ($p < .0001$)**. Una significativa correlazione era osservabile tra TFPI e TF ($p=0.003$), vWF ($p < .0001$), e **FGF^{PLT} ($p < .0001$)**, e tra TF e **FGF^{PLT} ($p < .0001$)** e vWF e **FGF^{PLT} ($p < .0001$)**, e tra **FGF^{PLT}** e WBC ($p=0.002$), Hb ($p=0.004$) e reticolina ($p < .0001$).

Discussione

Mieloproliferazione e fibrosi rappresentano elementi prognostici che possono influenzare la morbilità e la mortalità della TE. La iperfunzione piastrinica svolge un ruolo primario poiché rilascia fattori di crescita mieloproliferativi e fibrotici, in particolare FGF-2. Pertanto, al fine di preservare il buon andamento clinico della TE è auspicabile l'utilizzo di farmaci a doppia valenza terapeutica citoriduttiva ed antiaggregante. I risultati del nostro studio mostrano che ANA può neutralizzare la iperfunzione piastrinica controllando lo stato mielofibrotico. Pertanto, ANA rappresenta un farmaco promettente che merita un posto di prima linea nella cura della TE.

Conclusioni

I risultati di questo studio mostrano che i pazienti con TE hanno attivazione piastrinico-coagulante-endoteliale responsabile di aumentata mieloproliferazione e fibrosi. ANA sembra un farmaco efficace nel controllo mieloide e fibrogenico migliorando la prognosi ed il decorso clinico della TE [32].

BIBLIOGRAFIA

1. H[^] Kutti J, Ridell B (2001). *Epidemiology of the myeloproliferative disorders: essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and idiopathic myelofibrosis*. Pathol Biol (Paris) **49** (2): 164–6. PMID 11317963.
2. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. J Cell Biol 2001; 154: 485-90.
3. Harrison, *Principi di Medicina Interna (16^a edizione)*, New York - Milano, McGraw-Hill, 2006. ISBN 88-386-2459-3.
4. Besses C. et al. Maior vascular complication in essential thrombocythemia: a study of the predictive factor in a series of 148 patients. Leukemia 1999;13:150-4[^] Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. (2005).
5. Institute of medicine, clinical praxis guidelines: directions for a new program. Washington DC; national academic press;1990.
6. Fabris F, Randi ML. Essential thrombocythemia: past and present. Intern Emerg Med. 2009 Oct;4(5):381-88.
7. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, et al. (2006). Granulocyte activation and constitutive mobilization of CD34-positive cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. Blood **107**: 3676-3682. DOI:10.1182/blood-2005-09-3826
8. Ronald Hoffman, Edward Benz, Sanford Shattil, Bruce Furie, Harvey Cohen, *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5^a ed., Churchill Livingstone, 2008.

9. Hayward SA, Wilson MC, Tunis SR, Bass EB, Guya HG. User's guide to the medical literature.VIII. How to use clinical practice guidelines. Are the recommendations valid? JAMA 1995;274:570-574. ISBN 0-443-06713-9
10. Robbins e Cotran, *Le basi patologiche delle malattie*, 7^a ed., Torino-Milano, Elsevier Masson, 2008. ISBN 978-88-85675-53-7
11. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA et al, The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes, *Blood* 2009; 114(5):937-951
12. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. (2005). *Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.* Cancer Cell 7 (4): 387-97. DOI:10.1016/j.ccr.2005.03.023. PMID 15837627.
13. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, et al. (2005). *A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.* N Engl J Med 352 (17): 1779-90. DOI:10.1056/NEJMoa051113. PMID 15858187
14. Cacciola E., institute of Ematology, Catania, Italy (P), Di Francesco E., institute of Hematology, Catania, Italy, Ferlito C. institute of Hematology, Catania, Italy, Pezzella F., institute of Hematology Catania, Italy, Cacciola R. institute of Hematology, Catania, Italy. *Janus kinase V617F mutation and inflammatory*

interleukins in patients with Essential Trombocitemia. ISEH-june 2010- Melbourn Australia.

15. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, *et al.* (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet **365** (9464): 1054–61. DOI:[10.1016/S0140-6736\(05\)71142-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71142-9). PMID 15781101.
16. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, *et al.* MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. Blood 2008; 112(1):141-149 □
17. Alvarez-Larran A, Cervantes F, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Perez-Andreu V, Hernandez-Boluda JC *et al.* Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. Blood 2010; 116: 1205-
18. Barbui T, Barosi G, Grossi A, Gugliotta L, Liberato LN, Marchetti M *et al.* Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. Haematologica 2004; 89: 215-232.
19. [Arch Intern Med - Abstract: Effect of Aspirin on Vascular and Nonvascular Outcomes: Meta-analysis of Randomized Controlled Trials, February 13, 2012, Seshasai *et al.* 172](#)
20. He J, Whelton PK, Vu B, Klag MJ. Aspirin and risk of hemorrhagic stroke. A meta-analysis of randomised controlled trials. JAMA 1998;280:1930-1935.

21. Hankey GJ, Sudlow CLM, Dunbabin DW. Thienopyridine derivatives (ticlopidine, clopidogrel) versus aspirin for preventing stroke and other serious vascular events in high vascular risk patients. In: The Cochrane Library, Issue 2, 2001. Oxford: Update Software. Search date 1999; primary sources Medline, Embase, Cochrane Stroke Group Register, Antithrombotics Trialists' database, authors of trials, and drug manufacturers.
22. Barbui T, Finazzi G. When and how to treat essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005; 353:85-86
23. Yabro JW. Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin Oncol* 1992; 92:1-10
24. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F et al. Hydroxyurea in the treatment of patients with essential thrombocythemia at high risk of thrombosis: a prospective randomized trial. *N Engl J Med* 1995; 332: 1132-1136.
25. Fruchtman SM, Pettit RM, Gilbert HS, Fiddler G, Lyne a; Anagrelide Study group. *Anagrelide: analysis of long-term efficacy, safety and leukemogenic potential in myeloproliferative disorders*. *Leuk Res.* 2005;29(5):481-91
26. Pescatore SL and Lindley C. [Anagrelide: a novel agent for the treatment of myeloproliferative disorders](#). *Expert Opin.*
27. *Pharmacother.* 2000; 1(3):537-546
28. Finazzi G, Xu M, Barbui T, Hoffman, R. Essential thrombocythemia. In: Hoffman R, Benz EJ jr., Shattil SJ, Furie

- B, Silberstein LE, McGlave P, Henslop H eds. Hematology. Basic principles and practice. Philadelphia: Churchill Livingstone 2009; 1149-66
29. Barosi G, Besses C, Birgegard G, Briere J, Cervantes F, Finazzi G et al. A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia* 2007; 21: 277-80.
30. Cacciola E., institute of Ematology, Catania, Italy(P), Di Francesco E., institute of Hematology, Catania, Italy, Ferlito C. institute of Hematology, Catania, Italy, Pezzella F., institute of Hematology Catania, Italy, Cacciola R. institute of Hematology, Catania, Italy. Anagrelide and fibroblast growth factor-2 levels in patients with essential thrombocythemia. EHA 15th congress- JUNE 10-13,2010 Barcellona.
31. Campbell PJ, Bareford D, Erber WN, et al.” Reticulin accumulation in essential thrombocythemia: prognostic significance and relationship to therapy”. (June 2009), *J.Clin. Oncol.* **27** (18):2991-9.
32. Cacciola E., Di Francesco E., Ferlito C., Pezzella F., Seria E., Cacciola R. Anagrelide and fibroblast growth factor -2 levels in essential thrombocythemia. 43^o congress of the Italian Society of Hematology. Napoli, Italy, October 16-19, 2011. ISSN 0390-6078.