

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Dipartimento di Medicina e Chirurgia



Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Tesi di laurea**

**in**

**Ematologia**

**Titolo**

**Impatto del fenotipo genico sulla prognosi della leucemia mieloide acuta.**

***Relatore:* Chiar.mo Prof ROBERTO LEMOLI**

***Correlatore:* Chiar.mo Prof MAURIZIO MIGLINO**

**Candidato:**

**DANIELE BRUZZONE**

**Anno Accademico 2020 – 2021**



# INDICE

CAPITOLO I: INTRODUZIONE	4
I.I CLASSIFICAZIONE ED EZIOPATOGENESI DELLE LEUCEMIE	4
I.I.I. EZIOPATOGENESI	5
I.I.II CRITERI DI CLASSIFICAZIONE DELLE SINDROMI MIELOPROLIFERATIVE	6
I.II LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	7
I.II.I. PATOGENESI	7
I.II.II. EZIOLOGIA	9
I.II.III. ANOMALIE GENETICHE RICORRENTI	10
I.II.IV. CLINICA	13
I.II.V. DIAGNOSI	14
I.II.VI. CLASSIFICAZIONE	17
I.II.VII. DESCRIZIONE DELLE PRINCIPALI FORME DI LAM	23
I.II.VIII. DECORSO E PROGNOSI	31
I.II.IX. TERAPIA	36
CAPITOLO II: OBIETTIVI	41
CAPITOLO III: METODI	42
CAPITOLO IV: RISULTATI	49
CAPITOLO VI: CONCLUSIONI	50
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	53
RINGRAZIAMENTI	55

# **I: INTRODUZIONE**

## **I.I: CLASSIFICAZIONE ED EZIOPATOGENESI DELLE LEUCEMIE**

Le leucemie sono malattie neoplastiche monoclonali, ovvero patologie oncologiche che provengono da un unico clone di cellule. La cellula staminale colpita dall'evento neoplastico può trovarsi a vari livelli differenziativi dell'emopoiesi. In particolare essa può essere:

- Una cellula pluripotente, non ancora differenziata, in grado di dare origine in vitro a colonie mieloidi e linfoidi;
- Una cellula multipotente già differenziata per la mielopoiesi o per la linfopoiesi.

A seconda del realizzarsi dell'una o dell'altra delle condizioni sopra riportate, la popolazione leucemica potrà avere differenti caratteristiche fenotipiche sia morfologiche, sia immunologiche sia molecolari. Si parlerà pertanto di: leucemie mieloidi o sindromi mieloproliferative, se le cellule leucemiche esprimono caratteristiche fenotipiche proprie della mielopoiesi, come la presenza delle classiche granulazioni citoplasmatiche o degli antigeni cellulari associati a questa linea differenziativa; qualora siano invece riscontrabili caratteri morfologici, immunofenotipici, molecolari propri della linea linfoide, si riscontreranno al contrario leucemie linfoidi o sindromi linfoproliferative .

Esiste, inoltre, la possibilità di trovarsi di fronte a leucemie definite ibride, in cui le cellule leucemiche esprimono contemporaneamente caratteristiche fenotipiche mieloidi e linfoidi.

Le leucemie, sia mieloidi sia linfoidi, si suddividono inoltre in croniche ed acute in base alla capacità maturativa e differenziativa della cellula trasformata. Nel primo caso, la leucemia è caratterizzata dalla proliferazione di cellule con caratteristiche fenotipiche mature, mentre la leucemia acuta si esprime morfologicamente con un accumulo nel midollo osseo e frequentemente anche nel sangue periferico di cellule immature o blastiche.

Momento critico nell'insorgenza e sviluppo di una leucemia è l'acquisizione di un vantaggio proliferativo del clone neoplastico nei confronti della normale mielopoiesi. I meccanismi molecolari responsabili di questo processo sono, ad oggi, almeno in parte noti e vanno fondamentalmente ricondotti ai seguenti eventi:

1. Trasformazione di un proto-oncogene in oncogene, a seguito di una o più mutazioni puntiformi o di una traslocazione cromosomica responsabile o della formazione di un gene ibrido che codifica la sintesi di una proteina anomala o di una iperespressione del gene normale. La classificazione dei geni coinvolti si schematizza in base alla loro funzione: trasduzione dalla membrana al nucleo di segnali di controllo della proliferazione cellulare; attivazione della trascrizione; controllo della differenziazione cellulare; regolazione dello splicing dell'RNA; regolazione epigenetica; induzione della morte cellulare programmata;
2. Inattivazione di geni oncosoppressori per mutazioni, con la perdita della loro funzione nel controllo della proliferazione cellulare.

### *1.1.1. Eziopatogenesi*

Gli agenti capaci di danneggiare il DNA sono quindi associati alla patogenesi delle leucemie. Tra questi si ritrovano:

- Agenti fisici come le radiazioni ionizzanti specie ad alte dosi e per breve tempo. Ad esempio è stata notata un'incidenza più alta nelle popolazioni sopravvissute ad incidenti nucleari. Anche le radiazioni utilizzate per la cura di altre patologie tumorali possono essere connesse, in relazione però anche all'età del paziente, a dosi superiori a 20 Gy e in associazione a chemioterapia;
- Abitudini voluttuarie come il fumo, che è sicuramente associato al danno del DNA, con un aumento del rischio dell'80% nelle persone fumatrici;
- Agenti chimici con un'esposizione annuale superiore a 10 p.p.m.;
- Farmaci come i chemioterapici, specialmente gli agenti alchilanti quali il melphalan, la mecloretamina e le epipodofillotossine in modo dipendente dalla dose e dalla modalità di somministrazione;

- Virus come il retrovirus HTLV1 che causa linfomi/leucemie a cellule T dell'adulto specie nei Caraibi e in Giappone.

### *I.I.II. Criteri di classificazione delle sindromi mieloproliferative.*

Le sindromi mieloproliferative si possono distinguere in acute, subacute e croniche. Questa distinzione si riferisce al decorso e alla durata delle diverse malattie, ma corrisponde anche a caratteristiche biologiche differenti. Nelle forme croniche le cellule del clone neoplastico differenziano e maturano come le loro controparti normali, presentando quindi una iperproduzione di granulociti o piastrine o eritrociti. Nelle forme acute invece la maturazione è abortiva, caratterizzata pertanto da accumulo di cellule blastiche mieloidi con difettiva produzione di granulociti, piastrine ed eritrociti. Se l'accumulo è meno notevole e il difetto maturativo meno pronunciato, si può parlare di sindrome subacuta. Queste distinzioni sono però difficili da operare e spesso non si riscontra una chiara differenziazione. Va inoltre considerato il fatto che le forme subacute e croniche con il tempo tendono a diventare acute, mentre le acute non cronicizzano mai.

Nel 2017 la WHO ha stilato una nuova classificazione delle sindromi mieloproliferative che distingue le neoplasie in: neoplasie mieloproliferative croniche; neoplasie mieloidi/linfoidi con eosinofilia e riarrangiamento di PDGFRA, PDGFRB o FGFR1, o con PCM1-JAK2; neoplasie mielodisplastiche/mieloproliferative; leucemie acute mieloidi e neoplasie relate e neoplasie plasmocitoidi a cellule dendritiche. Ogni categoria è poi stata ulteriormente suddivisa in base alle caratteristiche morfologiche, integrate con quelle citogenetiche e molecolari.

## **I.II: LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA .**

Con il termine leucemia acuta mieloide si intende un gruppo eterogeneo di patologie tumorali a carico dei precursori delle cellule ematopoietiche, che perdono la capacità di differenziarsi e maturare, acquisendo al tempo stesso una capacità proliferativa incontrollata. Questo porta all'accumulo di un numero abnorme di cellule mieloidi immature nel midollo e nel sangue periferico chiamate blasti, che interferiscono con la normale funzione emopoietica del midollo osseo. La conseguenza di questo processo è lo sviluppo di citopenie ed un'evoluzione sintomatica rapida e fatale nella maggior parte dei casi, in assenza di trattamento.

La leucemia acuta mieloide (d'ora in poi LAM) è la più frequente leucemia acuta nell'adulto, ma rimane comunque un tumore raro, con un'incidenza di 3-4 casi per 100.000 abitanti per anno. L'età mediana di insorgenza è di 65 anni e l'incidenza va aumentando con l'avanzare dell'età. È una patologia che colpisce maggiormente i maschi con rapporto di 5:3.

### ***I.II.I Patogenesi***

La LAM insorge come conseguenza di mutazioni genetiche ed epigenetiche a carico di cellule con capacità di auto-rinnovamento. Quindi la cellula di origine può essere una cellula staminale ematopoietica, oppure una cellula committed in senso mieloide che riacquisisce proprietà staminali. La trasformazione neoplastica porta ad un'alterazione dei meccanismi che regolano la proliferazione e la differenziazione della cellula staminale impedendo la maturazione della sua progenie. Come conseguenza si avrà un accumulo nel midollo e poi nel sangue periferico e in altri organi e tessuti di cellule blastiche. Queste sono totalmente o parzialmente incapaci di dare origine a cellule mature ma mantengono alcune caratteristiche morfologiche, citochimiche e immunofenotipiche proprie della controparte normale, che permettono di stabilire l'appartenenza ad una linea differenziativa della mielopoiesi. Tra la cellula staminale leucemica e il resto della popolazione leucemica (blasti) possono esistere differenze funzionali e fenotipiche: si ritiene che un ristretto pool di cellule staminali leucemiche sia più immaturo della popolazione blastica visibile e che questa sia responsabile delle recidive di malattia dopo apparente remissione, perché meno chemiosensibile.

Le anomalie genetiche alla base della LAM sono state a lungo studiate. Si ritiene che il 50% dei casi presenti anomalie ricorrenti come traslocazioni bilanciate, trisomie e delezioni cromosomiche. Nel restante 50% dei casi il cariotipo è normale e l'evento trasformante è ritenuto essere o una mutazione o un'inserzione o delezione di un oncogene o un oncosoppressore. Classicamente le lesioni generiche identificate nella LAM si suddividono in lesioni di I classe, che danno un vantaggio proliferativo (come la mutazione di FLT3), e lesioni di II classe, che causano invece un blocco maturativo (come la mutazione bi-allelica di CEBPA). Nuove evidenze hanno portato a riconsiderare questa suddivisione alla luce di alcune mutazioni non ascrivibili a nessuno dei due gruppi. Tuttavia si ritiene valida l'ipotesi secondo la quale il modello patogenetico sia in più fasi, con molteplici mutazioni che da sole non bastano a causare la patologia.

Recentemente, l'introduzione di tecniche di sequenziamento ad alta risoluzione, come l'NGS (next generation sequencing), ha permesso di identificare nuovi meccanismi patogenetici delle neoplasie mieloidi. Il Cancer Genome Atlas Acute Myeloid Leukemia sub study ha caratterizzato 200 casi di LAM de novo mediante sequenziamento whole genome e whole exome. Sono stati identificati 23 geni comunemente mutati e altri 237 mutati in due o più casi, che possono comparire contemporaneamente o essere mutualmente esclusivi. I geni sono classificati in 9 gruppi diversi:

- Fusioni con fattori trascrizionali;
- NPM1, geni oncosoppressori;
- Geni correlati alla metilazione del DNA;
- Geni del signaling;
- Geni implicati nella modificazione della cromatina;
- Geni che codificano per fattori di trascrizione della linea mieloide;
- Geni del complesso delle coesine;
- Geni del complesso dello spliceosoma.

### ***1.II.II Eziologia***

Il microambiente ha un ruolo chiave nell'insorgenza, nella progressione ma soprattutto nelle recidive delle LAM. Le cellule leucemiche si espandono nella nicchia sfruttando il sostentamento che sarebbe rivolto alle cellule staminali normali e creando un microambiente permissivo alla loro proliferazione. È noto infatti che le cellule leucemiche sono in grado di modificare il microambiente midollare che sostiene le cellule normali andando ad esempio a distruggere e modificare la vascolarizzazione necessaria al sostentamento. Questa distruzione, insieme a quella degli osteoblasti, favorisce l'espansione delle cellule leucemiche. Questa zona che risulta ipossica determina anche la chemioresistenza delle cellule leucemiche e favorisce l'evasione dal sistema immunitario e nel contempo la loro sopravvivenza tramite dei meccanismi, come la via del segnale PI3K/AKT/mTOR, che favoriscono l'adattamento cellulare energetico e metabolico. Altri meccanismi e segnali del rimodellamento del microambiente sono riconducibili al rilascio di microparticelle e all'infiammazione che vengono create dalle cellule neoplastiche. Infine si ritiene che anche un microambiente invecchiato possa favorire l'espansione di un singolo clone mutato.

Nell'eziopatogenesi bisogna altresì ricordare come le LAM si possono suddividere in primarie, dette anche de novo, che sono la maggior parte, in cui non è riscontrabile l'esposizione a particolari agenti leucemogeni e secondarie all'esposizione ad agenti leucemogeni, come i casi che insorgono come secondo tumore dopo una prima neoplasia trattata con chemioterapia e/o radioterapia; ad esse vanno infine aggiunte le LAM secondarie ad una precedente malattia ematologica come una sindrome mielodisplastica o una sindrome mieloproliferativa cronica.

Lo sviluppo di LAM dopo terapia è una possibilità purtroppo abbastanza frequente. Nel caso di terapie con agenti alchilanti, la t-LAM si sviluppa con una latenza di 3-5 anni spesso passando per una sindrome mielodisplastica. In questi casi il cariotipo è complesso con frequenti delezioni dei cromosomi 5 e 7 e inattivazione dell'oncogene TP53. Antracicline e inibitori topoisomerasi-II causano LAM dopo circa 12-18 mesi senza passare per t-MDS e con ricorrenti anomalie sul gene MLL. Per quanto riguarda la radioterapia, se questa viene utilizzata da sola il rischio leucemico è basso o nullo, se invece è associato a chemioterapia, specie ad alte dosi, il rischio di t-LAM aumenta. Il rischio invece per l'uso di radiazioni ionizzanti a scopo diagnostico non è del tutto noto

perché non ci sono dati convincenti. Infine l'esposizione a sostanze come il benzene o altri idrocarburi aumenta il rischio di MDS e forse anche LAM.

In ultima analisi bisogna ricordare quei rari casi di leucemie secondarie ad una predisposizione genica come si può denotare da quei pochi casi di famiglie con un'incidenza più elevata di LAM rispetto alla popolazione generale. In alcuni casi la predisposizione alla LAM rientra nel contesto di una forma sindromica come nell'anemia di Fanconi o la sindrome di Li-Fraumeni. Altre volte ad essere trasmesso è un rischio specifico di sviluppare MDS e LAM, quando l'allele di rischio interessa geni coinvolti nella maturazione mieloide come RUNX1, GATA2 o CEBPA.

### ***I.II.III Anomalie genetiche ricorrenti***

Dallo studio dei casi di LAM si stima che circa il 96% dei casi mostri mutazioni ricorrenti di uno o più geni implicati nella patogenesi, oltre ad un eccesso di mutazioni non ricorrenti considerate come passenger, ovvero non causali dello sviluppo della malattia. I geni più frequentemente mutati sono FLT3 (28%), NPM1 (27%), DNMT3A (26%), IDH1 o IDH2 (20%), NRAS o KRAS (12%), RUNX1 (10%), TET2 (8%), TP53 (8%), CEBPA (5%). Alcune di queste mutazioni si possono raggruppare in categorie funzionali: metilazione del DNA, oncosoppressori, mediatori del segnale, fattori epigenetici, fattori di trascrizione, geni delle coesine, fattori di splicing; a queste va aggiunte la nucleofosmina (NPM1), il cui ruolo nello sviluppo della LAM è certo mentre ne rimane ancora ignoto il meccanismo. Si riscontra un pattern di ricorrenza di alcune mutazioni di categorie diverse e di mutua esclusività tra mutazioni della stessa categoria. La fine regolazione della metilazione del DNA è un processo epigenetico fondamentale per la differenziazione cellulare: un gene ipermetilato non è espresso, e la disregolazione del processo porterebbe ad una espressione di geni non richiesti, e un silenziamento di geni necessari allo stadio differenziativo della cellula. Tra le mutazioni frequenti nella LAM abbiamo DNMT3A (una metilasi) e TET2 (una de-metilasi). Vi rientrano anche IDH1 e IDH2 che sono mutazioni che alterano la funzione del ciclo di Krebs portando alla produzione di un onco-metabolita, l'idrossiglutarato, che inibisce TET2. La loro identificazione porta all'utilizzo di terapie specifiche.

L'oncosoppressore più frequentemente alterato delle LAM è TP53, la cui inattivazione avviene per mutazione, inserzione, microdelezione, oppure in seguito alla delezione di una vasta regione del braccio corto del cromosoma 17. Le cellule con TP53 mutato sono tolleranti a sviluppo di danni al DNA e aberrazioni cromosomiche, quindi spesso si ritrovano cariotipi complessi con maggior chemioresistenza. Altri oncosoppressori che si possono ritrovare mutati e inattivati sono NF1, WT1 e PTPN11.

Tra le mutazioni a carico dei mediatori di segnale abbiamo soprattutto quelle a carico di geni che codificano per tirosin-chinasi. Il gene più frequentemente coinvolto è FLT3, una tirosin-chinasi recettoriale che può diventare ad attività indipendente dal ligando, se mutata. Ci sono inoltre casi di mutazioni in NRAS e KRAS, mediatori a monte del pathway della MAP-chinasi, che spesso vengono acquisite tardivamente nel processo leucemico e che rappresentano un fattore prognostico e terapeutico importante.

Fattori epigenetici spesso mutati sono ASXL1 e EZH2, la cui de regolazione porta ad anomalie nella metilazione degli istoni, con alterazione del normale controllo della trascrizione.

Fattori di splicing come SF3B1, SRSF2, U2AF1 sono spesso mutati nelle LAM da evoluzione di MDS e in LAM dell'anziano. Il meccanismo con cui queste mutazioni portano al processo leucemogeno non è del tutto chiaro: si possono però mostrare per esempio alcune evidenze, come SRSF2 mutato che porta ad alterazione dello splicing e down-regolazione di EZH2.

Mutazioni dei geni delle coesine (STAG2, RAD21) sono coinvolte in alterazioni della segregazione cromosomica alla mitosi e in alterazioni della trascrizione.

Anche le traslocazioni sono importanti nelle LAM e risultano quasi sempre nella creazione di una proteina di fusione per la formazione di un breakpoint all'interno della regione codificante di due geni. Spesso sono coinvolti geni codificanti di fattori di trascrizione necessari all'emopoiesi. Geni frequentemente coinvolti sono i componenti del core binding factor (CBF). La prima traslocazione ad essere evidenziata è stata la t(8;21) tra il gene RUNX1, codificante per sub unità  $\alpha$  del CBF, e RUNX1T1, presente nel 7% delle LAM alla diagnosi. Questo porta a conseguenze pleiotropiche per la trascrizione e repressione di alcuni geni target di RUNX1 e una funzione negativa sull'allele residuo di RUNX1.

Nell'inv (16) o t(16;16) invece ad essere coinvolto è CBF $\beta$  traslocato con MYH11 nel 5% dei casi. Anche in questo caso l'effetto è negativo sulla trascrizione di geni necessari all'emopoiesi. Le traslocazioni dei geni del CBF sono associate ad una buona risposta alla citosina arabinoside e a buona prognosi.

Meritano menzione particolare le traslocazioni che coinvolgono il gene codificante la sub unità  $\alpha$  del recettore dell'acido retinoico RAR $\alpha$  sul cromosoma 17, che si associano al tipo di leucemia detta acuta promielocitica. La traslocazione più comune si ha con PML sul cromosoma 15, ma sono descritte traslocazioni meno frequenti anche con altri geni. RAR $\alpha$  è un fattore trascrizionale che forma un eterodimero con RXR, e in assenza dell'acido retinoico recluta un corepressore nucleare, N-COR, silenziando la trascrizione di geni bersaglio specie coinvolti nello sviluppo mieloido. La presenza dell'acido retinoico invece permette la normale trascrizione per il distacco di N-CoR. Con la t(15;17) c'è minor sensibilità all'acido retinoico e quindi non si ha la trascrizione dei fattori utili alla maturazione causando così il blocco della cellula allo stadio di promielocita. In questo frangente l'acido retinoico ad alte dosi porta alla guarigione nella maggior parte dei casi.

Il gene KMT2A (anche detto MLL) è coinvolto in traslocazioni con numerosi partner nel 6% delle LAM dell'adulto, quasi sempre associandosi ad un'età giovane e a cattiva prognosi. In questi casi si hanno marcatori di linea ambigui e si riscontra spesso in t-LAM. Il gene codifica per una istone-metiltransferasi che regola la trascrizione con meccanismi epigenetici. Le proteine di fusione con KMT2A riprogrammano la normale trascrizione della cellula, inducendo iperespressione di geni caratteristici della cellula staminale ematopoietica, e inibendo checkpoints trascrizionali.

### *I.II.IV Clinica*

La sintomatologia delle LAM dipende da:

1. Insufficiente e difettiva produzione di cellule ematiche mature ovvero eritrociti, piastrine e granulociti neutrofili;
2. Infiltrazione di tessuti ed organi non emopoietici da parte delle cellule leucemiche;
3. Liberazione di mediatori chimici come le citochine, che sono responsabili dei sintomi generali quali febbre, dolori, calo ponderale, sudorazioni profuse.

La mancanza di eritrociti si manifesta con i classici sintomi dell'anemia ovvero astenia, facile faticabilità, cardiopalmo e dispnea anche per piccoli sforzi. La piastrinopenia invece si manifesta con episodi emorragici con petecchie, porpore, ecchimosi, epistassi, gengivorragie, disturbi del visus per emorragie retiniche, ipermenorrea, metrorragie mentre meno frequentemente si hanno macroematuria, sanguinamenti gastro-intestinali e emorragie nel SNC. La difettiva produzione di neutrofili si manifesta invece con infezioni soprattutto batteriche specie al cavo orale, all'orofaringe, all'apparato respiratorio e alla cute.

Come detto poi si possono associare i sintomi di infiltrazione extra-midollare e del rilascio di mediatori come dolori ossei e muscolari, sudorazioni profuse, astenia non giustificata dal grado di anemia e la febbre, non per forza dovuta ad un processo infettivo. Meno dell'1% dei casi si presentano con infiltrazione di organi o sedi extra-midollari senza un coinvolgimento midollare sistemico e vengono definiti sarcomi mieloidi e trattati come LAM.

Un caso particolare è la leucemia acuta promielocitica che si può presentare con una sindrome emorragica legata ad un processo di coagulazione intravasale disseminata, CID, che può essere fatale se non riconosciuta e trattata velocemente.

All'esame obiettivo si riscontrano segni di anemia, di eventuali infezioni cutanee e di manifestazioni emorragiche. Raro è il ritrovamento di infiltrazione cutanea da parte delle cellule leucemiche, che nel caso determinano la formazione di noduli e papule di colore rosso-violaceo. È altresì raro il coinvolgimento del sistema nervoso centrale e dei

nervi cranici. Si possono trovare invece in alcuni casi epatomegalia, splenomegalia e linfadenomegalie.

### ***I.II.V Diagnosi***

Oltre ai sintomi e ai segni evidenziati alla clinica e all'esame obiettivo la diagnosi di basa innanzitutto sugli esami ematochimici. Possiamo infatti andare a riscontare sia leucocitosi sia leucopenia anche se più raramente. Possiamo anche trovarci di fronte ad un'anemia che di solito è normocromica normocitica dovuta a ridotta eritroblasto genesi e possiamo anche mettere in luce una condizione di trombocitopenia. Possiamo avere anomalie metaboliche dovute al rapido turnover dei blasti con ipokaliemia e acidosi lattica, ma per la lisi tumorale spontanea possiamo anche ritrovare iperkaliemia, iperfosfatemia e iperuricemia, ipocalcemia e insufficienza renale. Bisogna eseguire anche i test della coagulazione perché una sua alterazione può far sospettare una CID in corso di leucemia promielocitica.

L'esame del liquor non è un esame utilizzato di routine, anche se viene fatto in caso di sintomi neurologici insieme ad esami radiologici.

Dopo il ritrovamento di alterazioni agli esami ematochimici il test diagnostico di primo livello che viene effettuato è l'esame morfologico dello striscio di sangue periferico. Con questa analisi possiamo vedere l'eventuale presenza di blasti che hanno l'aspetto di cellule grandi, con elevato rapporto nucleo-citoplasma, cromatina lassa e nucleolo ben evidente, citoplasma basofilo. Granuli citoplasmatici possono essere presenti o meno in base allo stadio maturativo della cellula, così come i bastoncelli di Auer, strutture allungate di colore rosa-viola composti da lisosomi fusi.

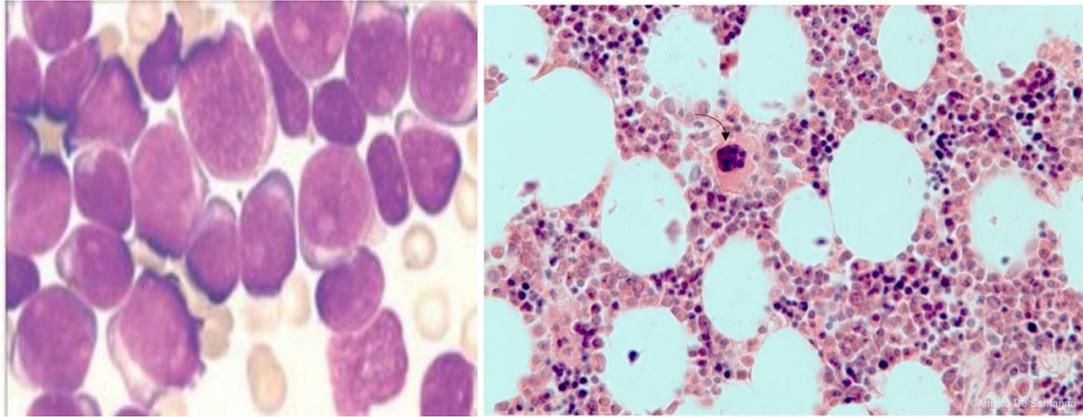
Una volta ritrovati questi blasti nel sangue periferico, l'esame diagnostico per eccellenza prevede l'analisi del midollo osseo. Questo è preferibile farlo mediante un agoaspirato che consente una precisa quantificazione e la valutazione morfologica dei blasti midollari, nonché il prelievo di campioni su cui fare analisi citochimiche, citofluorimetriche, citogenetiche e molecolari. Tramite colorazioni specifiche di citochimica come quella per perossidasi o il Sudan Black ma anche determinando l'immunofenotipo possiamo determinare la linea di origine della leucemia. Molto utili sono altresì le tecniche citogenetiche e molecolari, come il cariotipo, FISH, PCR e

NGS, per identificare anomalie genetiche che hanno valore diagnostico, prognostico e terapeutico. Ci sono casi in cui però serve la biopsia ossea per confermare la diagnosi come ad esempio quando si riscontra un midollo privo di cellule, o in presenza di fibrosi o necrosi. Questo esame consente una valutazione architetturale del midollo e di avere un'idea sull'infiltrazione midollare e anche alcune analisi immunoistochimiche.

La diagnosi si pone quando si riscontra un'infiltrazione superiore al 20% di blasti e bisogna verificare la provenienza mieloide di questi blasti con studi morfologici, citochimici, immunofenotipici. Secondo le più recenti linee guida basta anche una percentuale inferiore di blasti in presenza di traslocazioni ricorrenti come la t(8;21), inv(16), t(16;16) e t(15;17).

In diagnosi differenziale entrano: la crisi blastica in corso di leucemia mieloide cronica, che si tratta con inibitori delle tirosin-chinasi; il blocco maturativo eritroide e mieloide in corso di deficit di vitamina B12; la MDS ad alto rischio con percentuale di infiltrazione midollare vicina al 20%; la leucemia acuta di classificazione ambigua con fenotipo misto mieloide-linfoide; l'infiltrazione midollare da parte di tumori solidi come il carcinoma a piccole cellule del polmone.

La caratterizzazione immunofenotipica delle leucemie acute, mediante citofluorimetria a flusso, consente di valutare nello stesso momento diversi antigeni (di membrana e intracellulari) associati ad un particolare citotipo leucemico, che vengono riportati in tabella 1, e risulta di particolare utilità, per la sua elevata sensibilità e rapidità, sia nella fase diagnostica sia nel monitoraggio della terapia e nella valutazione della malattia minima residua al termine del programma terapeutico.



*Fig. 1: Immagine che mette a confronto un midollo con cellule leucemiche (a sinistra) e un midollo fisiologico (a destra).*

<b>Cellula riconosciuta</b>	<b>Antigeni di superficie che ne permette il riconoscimento</b>
Precursori	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Marcatori granulocitari	CD65, MPO citoplasmatica
Marcatori monocitari	CD14, CD36, CD64
Marcatori megacariocitari	CD41 (glicoproteina IIb/IIIa), CD61 (glicoproteina IIIa)
Marcatori eritroidi	CD235a (glicoforina A), CD36

*Tabella 1: nella tabella vengono riportati gli antigeni cellulari che permettono la distinzione delle varie linee differenziate nella linea mieloide.*

### ***I.II.VI Classificazione***

Il sistema classificativo classico delle LAM, ormai datato, si fonda sulle caratteristiche morfologiche delle cellule blastiche ed è denominato sistema FAB(Franco-Americano-Britannico). Si identificano differenti sottotipi di LAM in base alla linea differenziativa della popolazione leucemica e alla completa o parziale soppressione della capacità maturativa del clone neoplastico. La classificazione viene riportata in tabella 2.

<b>Linea differenziativa</b>	<b>Frequenza (%)</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Citochimica</b>	<b>Immunofenotipo di membrana</b>
M1 mieloblastica senza maturazione	18	Blasti (tipo I e II) > 90%	Perossidasi o Sudan B (> 3% di blasti positivi)	CD13, CD33, MPO7, (CD14)
M2 mieloblastica con maturazione	35	Blasti (tipo I e II) < 90%  PMC, MC, MMC e PMN >10%  Cellule monocitarie <20%	Perossidasi o Sudan B (> 20% blasti positivi)	CD13, CD33, MPO7
M3 promielocitica tipica	9	Blasti ipergranulati tipo PMC, con numerosi bastoncelli di Auer		CD13, CD33, MPO7
M3 microgranulare	1	Blasti con nuclei fogliacei bi- o multilobati, con fini granuli. Rari blasti ipergranulati	Perossidasi o Sudan B	CD13, CD33, MPO7

M4 mielomonoblastica	20	Blasti (tipo I e II) e altre cellule granulocitarie più mature <80%	Perossidasi o Sudan B Nasde NaF parzialmente resistenti, Anae	CD13, CD33, CD14
M5 mieloblastica M5a- senza maturazione	7	Monoblasti >80%	Nasde-NaF-sensibili, Anae	CD14, CD13, CD33
M5b-con maturazione	6	Monoblasti, pro monociti e monociti > 80%	Nasde-NaF-sensibili, Anae	CD14, CD13, CD33
M6 eritroblastica	3	Eritroblasti >50% e blasti (tipo I e II) >30% delle cellule non eritroidi	Pas (eritroblasti), Perossidasi, Sudan B	CD42
M7 megacarioblastica	1	Blasti (tipo I e tipo linfoide) >30%, marcata mielofibrosi	Perossidasi piastrinica	CD41

*Tabella 2: riporta la classificazione FAB delle LAM dove per blasti tipo I e II si intendono rispettivamente quelli senza e quelli con granulazioni citoplasmatiche. Anae:  $\alpha$ -naftil acetato esterasi; Nasde: naftolo AS-D acetato esterasi; NaF: sodio-fluoruro; Pas: acido periodico di Shiff.*

LAM M1, Leucemia acuta mieloide senza maturazione. Sul piano immunofenotipico i blasti che appartengono a questo sottotipo mostrano reattività per antigeni mieloidi come CD13, CD33 (anche se in minor misura rispetto a CD13), per la mieloperossidasi citoplasmatica e per CD34; i blasti M1 manifestano di solito elevata

reattività per CD38 e per antigeni HLA-DR, mentre non è inusuale la positività per CD7 e, talvolta, per CD11b.

LAM M2, leucemia acuta mieloide con maturazione. Presenta blasti con più alta complessità strutturale e qualche granulazione citoplasmatica. Corredo immunofenotipico comune è con positività per MPO, CD13, CD33, CD117, HLA-DR e con minor frequenza CD11b, CD15, CD38, CD65 e per CD7 e l'antigene pan-B CD19, frequentemente associato a t(8;21)(q22;q22).

LAM M3, leucemia acuta mieloide promielocitica. Questo sottotipo di solito associato alla t(15;17) (q22;q11-12), presenta, rispetto ai precedenti maggior omogeneità di espressione di CD13 e CD33 mentre debole o assente per CD34, ma la differenza più significativa è la negatività per HLA-DR. Questi blasti sono positivi per CD117 e MPO, si solito anche per CD15 e talvolta per CD2 e CD9. Non rara per CD56.

LAM M4, leucemia acuta mieloide mielomonocitica. Presenta elementi che dal punto di vista immunofenotipico sono positivi per CD15 (linea granulocitaria) e CD14 (monocitaria). Alcuni elementi più immaturi sono positivi per CD34, mentre quelli più immaturi sono positivi per CD14 e CD64.

LAM M5a e M5b, leucemia acuta monoblastica e monocitica. Fenotipicamente sono associabili alla linea monocitaria con positività al CD33; spesso assente CD14. Molto comune anche la positività per CD64, CD4, CD11b e il lisozima. Più modesta la positività per CD13, CD15, CD65 e CD117.

LAM M6, leucemia acuta eritroblastica. La revisione della classificazione delle neoplasie mieloidi fatta dalla WHO nel 2017 ha portato a calcolare la presenza di mieloblasti come percentuale su tutte le cellule del midollo osseo. Questo ha portato alla cancellazione del sottotipo leucemia eritroide acuta (LAM M6a) che veniva definito con la presenza di almeno il 50% di precursori eritroidi e almeno il 20% di blasti quando enumerati sul totale di cellule non eritroidi. Questa tipologia viene ora classificata come sindrome mielodisplastica se la percentuale di precursori eritroidi è almeno il 50% e la conta dei blasti è inferiore al 20%. Parliamo invece di LAM sottotipo non eritroide se la percentuale di precursori eritroidi è oltre il 50% e quella dei blasti supera il 20%. La leucemia eritroide acuta rimane nella classificazione in quei casi in cui nel midollo osseo ci siano oltre l'80% di precursori eritroidi di cui almeno il 30% proeritroblasti. I

blasti mieloidi sono di solito positivi a CD13, CD33, CD34, CD117, MPO mentre gli eritroblasti sono positivi a glicoforina A, CD71 e CD36. La prognosi di solito è sfavorevole con una sopravvivenza mediana intorno ai 6 mesi. Alterazioni molecolari frequenti in questo gruppo sono: la mutazione biallelica di TP53, mutazioni in geni coinvolti nella metilazione del DNA (DNMT3A e TET2), in regolatori epigenetici (BCOR e ASXL1), in fattori trascrizionali (WT1, GATA1, RUNX1) ed in geni coinvolti nel pathway RAS. Fusioni di geni come NUP98 e KDM5A, sono ricorrenti nei bambini con leucemia acuta eritroide e sono associati a prognosi sfavorevole.

LAM M7, leucemia acuta mieloide megacarioblastica. In questa forma più del 50% dei blasti presenta assetto immunofenotipico caratteristico della filiera megacariocitaria con positività per CD41, CD61 e CD36. I marcatori mieloidi CD13 e CD33 non sempre sono positivi mentre negativa è la mieloperossidasi.

Questa classificazione più recentemente è stata soppiantata da una nuova suddivisione fatta dalla WHO sulla base delle caratteristiche sia cliniche, sia morfologiche, sia immunofenotiche, sia molecolari. Questa classificazione del 2016 quindi si basa sulle caratteristiche citogenetiche e molecolari con cui i pazienti vengono suddivisi, sia alla diagnosi sia alla possibile recidiva, al fine di identificare e iniziare il trattamento più adeguato. Questa classificazione identifica 9 sottotipi di LAM all'interno del gruppo di LAM con alterazioni genetiche ricorrenti e comprende due entità provvisorie. La classificazione per intero viene riportata in tabella 3.

### Classificazione WHO delle Leucemie Mieloidi Acute

LAM con anomalie genetiche ricorrenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LMA con t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1</li> <li>• LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22)CBFB-MYH11</li> <li>• LPA con PML-RAR-<math>\alpha</math></li> <li>• LMA con t(9;21)(p21.3; q23.3); MLLT3-KMT2A</li> <li>• LMA con (6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214</li> <li>• LMA con inv(3)(q21.3; q26.2) o t(3;3)(q21.3; q26.2); GATA2, MECOM</li> <li>• LMA (megacarioblastica) con t(1;22)(p13.3;q13.3) RBM15-MKL1</li> <li>• LMA con NPM1 mutato</li> <li>• LMA con mutazione biallelica di CEPBA</li> <li>• Entità provvisoria: LMA con BCR-ABL1</li> <li>• Entità provvisoria: LMA con mutazione RUNX1</li> </ul>
LAM con alterazioni mielodisplastiche	
LAM secondarie a terapia (t-LAM)	
LAM non altrimenti specificate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LMA con differenziazione minima</li> <li>• LMA senza maturazione</li> <li>• LMA con maturazione</li> <li>• Leucemia mielomonocitica acuta</li> <li>• Leucemia mieloblastica/monocitica acuta</li> <li>• Leucemia eritroide pura</li> <li>• Leucemia megacarioblastica acuta</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia basofila</li> <li>• Panmielosi acuta con mielofibrosi</li> </ul>
Sarcoma mieloide	
Proliferazioni mieloidi associate alla Sindrome di Down	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mielopoiesi transitoriamente anormale (TAM)</li> <li>• Leucemia mieloide associata a sindrome di Down</li> </ul>
Neoplasie a cellule dendritiche blastiche plasmacitoidi	
Leucemia acute con ambiguità di linea	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia indifferenziata acuta</li> <li>• Leucemia acuta a fenotipo misto (MPAL) con t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1</li> <li>• MPAL con t(v;11q23.3); KMT2A riarrangiato</li> <li>• MPAL, B/mieloide, non altrimenti specificata</li> <li>• MPAL, T/mieloide, non altrimenti specificata</li> </ul>

*Tabella 3: classificazione WHO delle LAM.*

### ***I.II.VII Descrizione delle principali forme di LAM***

#### ***LAM con $t(8;21)(q22;q22.1)$ ; RUNX1-RUNX1T1***

Colpisce il 7-10% (fig. 2) dei pazienti con LAM ed è la più frequente alterazione citogenetica dell'età pediatrica. Ha un picco di insorgenza tra i 25 e i 30 anni. Il 90% dei pazienti con questa traslocazione è affetto dalla M2 secondo FAB, mentre gli altri da M4. Il 30% dei pazienti con M2 riporta questa traslocazione. Il breakpoint associato alla traslocazione è stato clonato e così si è potuto identificare il trascritto prodotto dal gene di fusione, denominato RUNX1-RUNX1T1, che porta all'attivazione di geni target che interferiscono con il normale differenziamento cellulare e con la morte cellulare programmata, favorendo la leucemogenesi. Morfologicamente le cellule si presentano con bastoncelli di Auer, citoplasma basofilo e nucleo indentato; spesso è presente eosinofilia midollare e occasionalmente anche splenomegalia. La prognosi è favorevole nella popolazione adulta in termini di elevata percentuale di remissioni complete dopo programmi di chemioterapia convenzionale, spesso consolidato poi con trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche. In uno studio effettuato su 5876 pazienti con LAM de novo, i 421 casi con la traslocazione citata mostravano un tasso di remissione completa al 97% e una sopravvivenza a 10 anni del 61%, mentre nei pazienti con cariotipo normale le percentuali erano rispettivamente al 90% e al 38%.

#### ***LAM con $inv(16)(p13.1q22)$ o $t(16;16)(p13.1;q22)$ ; CFBF-MYH11***

Con l'inversione del 16 (p13q22) si genera il gene di fusione CFBF-MYH11 e si associa al sottotipo citologico M4 con incremento degli eosinofili. È presente in circa l'8% di tutti i pazienti con LAM (fig.2) e nel 25% dei casi si associa ad M4. Presenta un'ottima risposta alla sola chemioterapia, senza di solito necessitare di trapianto di midollo osseo allogenico. Le mutazioni del gene KIT si osservano nel 6% dei casi con LAM de novo, in circa il 20-30% dei casi con  $t(8;21)$  o  $inv(16)$ . Alcuni studi indicano un impatto prognostico negativo in termini di rischio di ricaduta e sopravvivenza globale dei pazienti con  $inv(16)$ ; altri sostengono abbia impatto negativo solo nei pazienti con  $t(8;21)$ .

### *Leucemia acuta promielocitica con PML-RARA*

La traslocazione t(15;17)(q22;q11-12) è la mutazione che più frequentemente si associa al sottotipo FAB M3 e si riscontra nel 13% dei casi di LAM di nuova diagnosi (fig. 2). Questa traslocazione genera il trascritto PML-RARA. Il punto di rottura si trova nel cromosoma 17 all'interno del recettore  $\alpha$  per l'acido retinoico e sul 15 invece nel nuovo gene detto PML. Dal punto di vista morfologico, ha caratteristiche uniche: infiltrazione midollare da parte di pro mielociti con nucleo bilobato o reniforme e citoplasma granulato ricco di bastoncelli di Auer. È un'emergenza medica a causa dell'elevata mortalità precoce dovuta ad eventi emorragici nel quadro di iperfibrinolisi che si sviluppa all'esordio della patologia. Le cellule leucemiche però sono estremamente sensibili all'acido all-trans-retinoico (ATRA) che induce il differenziamento dei pro mielociti ed è quindi di estrema importanza porre la giusta diagnosi e cominciare la terapia con ATRA. A questo vengono associate le antraci cline come chemioterapico con ottimi risultati in termini di remissioni completa e sopravvivenza. Un nuovo approccio si basa sull'associazione con triossido di arsenico, evitando quindi la chemioterapia. Sono state descritte alcune varianti rare come la t(5;17) e la t(11;17) che coinvolgono oltre a RARA anche i geni NPM1 e ZBTB16.

### *LAM con t(9;11) (p21.3;q23.3); KMT2A-MLLT3*

La t(9;11) determina la formazione del gene di fusione KMT2A-MLLT3. Si può trovare in persone di tutte le età, in quanto si ritrova con frequenza 9-12% nei bambini e 2% negli adulti (fig. 2). Tali leucemie possono presentarsi con coagulazione intravascolare disseminata e con possibile sarcoma mieloide extramidollare e/o infiltrazione tessutale. Il gene KMT2A è frequentemente coinvolto in traslocazioni non solo nella LAM, di solito in età pediatrica nel sottotipo M4, M5, M6, ma anche nella leucemia acuta linfoblastica nei bambini con traslocazione t(4;11) suggerendo che il prodotto del gene sia coinvolto nell'alterazione dei processi di differenziamento di entrambi i lineage cellulari. I riarrangiamenti di KMT2A si associano spesso a casi di LAM post-chemioterapia trattati con epipodofillotossina. In uno studio che ha coinvolto 1590 casi di LAL e LAM pediatriche e dell'adulto con riarrangiamento KMT2A sono stati identificati 121 diversi partner genetici. Tali traslocazioni coinvolgono, oltre a KMT2A, quattro gruppi di geni partner con funzioni differenti:

- Proteine nucleari AFF1, MLLT3, MLLT10, MLLT1 e OCEL1, che legano il DNA;
- CREB binding protein e EP300, istone acetil-transferasi;
- FOXO e MLLT4, che contengono i domini oligomerizzazione;
- SEPT2, SEPT5, SEPT6, SEPT9, SEPT11, che interagiscono con i filamenti del citoscheletro durante la mitosi cellulare.

In generale le leucemie che coinvolgono riarrangiamenti della banda 11q23 presentano una prognosi sfavorevole, tranne se è presente la traslocazione t(9;11) nell'età pediatrica, che ha più alti tassi di remissioni complete e di sopravvivenza.

*LAM con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214*

Questa traslocazione si trova nei pazienti con M2 e M4 in circa l'1% dei casi. Si presenta di solito con basofilia, pancitopenia e displasia uni- o multilineare. Può esserci anche nel sottotipo M1 e nelle sindromi mielodisplastiche. Di solito colpisce i giovani adulti e all'immunofenotipo le cellule blastiche presentano i marcatori CD13, CD33, CD38, CD45 e HLA-DR. Nello stesso momento si associano anche molto spesso (71% dei casi) mutazioni ITD del gene FLT3. La traslocazione in questi pazienti porta alla giustapposizione di DEK sul cromosoma 6 con NUP214 sul cromosoma 9. Questo porta alla creazione di una proteina di fusione, nucleoporina, che agisce come fattore di trascrizione. Questo sottotipo di LAM presenta una prognosi sfavorevole in quanto i pazienti sono praticamente chemio resistenti.

*LAM con t(3;3)(q21.3;q26.2) o inv(3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM.*

Le t(3;3) e inv(3) sono circa l'1% dei casi di LAM (fig. 2). Queste alterazioni citogenetiche si associano a trombocitosi nel sangue periferico e ad un incremento di megacariociti atipici nel midollo osseo. Si ritrova molto spesso in pazienti con sindromi mielodisplastiche o con LAM precedentemente trattati con chemioterapia per altri tumori. In uno studio su 6515 pazienti adulti affetti da LAM, le alterazioni a carico del cromosoma 3 erano nel 4,4% dei casi. La conta piastrinica mediana era di

144000/mm<sup>3</sup>. I tassi di risposta completa, sopravvivenza globale e sopravvivenza libera da malattia erano rispettivamente al 31%, 6% e 4% sottolineando quindi un sottotipo di LAM a pessima prognosi. In questo tipo di LAM le alterazioni molecolari portano all'attivazione di MECOM, che codifica per un fattore di trascrizione che interagisce con molti altri portando a proliferazione incontrollata e inibizione del differenziamento eritroide. Inoltre si ha aploinsufficienza di GATA2.

#### *LAM megacarioblastica con t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1*

Questo tipo di LAM con riarrangiamento RBM15-MKL1 è un'entità rara essendo riscontrabile in meno dello 0.5% dei casi di LAM di nuova diagnosi (fig. 2). Si osserva di solito nei neonati, può presentare localizzazione extramidollare. Il ruolo della proteina chimerica che si forma è ancora da chiarire, tuttavia si pensa che possa interferire con i meccanismi di differenziamento cellulare regolati dalla famiglia dei geni HOX. Essendo molto rara è difficile stimarne l'impatto prognostico.

#### *LAM con BCR-ABL1*

È un'entità provvisoria nella classificazione della WHO 2017. È una LAM de novo in cui i pazienti non mostrano i segni di una pregressa leucemia mieloide cronica. La distinzione con una crisi blastica di leucemia mieloide cronica non è semplice senza adeguate informazioni cliniche, però l'identificazione del trascritto di fusione che risponde ad una specifica terapia ne giustifica l'inserimento nella classificazione. Probabilmente l'identificazione di delezioni in particolari geni come IGH, TCR, IKZF1 e CDKN2A supporta la diagnosi di LAM de novo. È un tipo aggressivo con scarsa risposta alla chemioterapia convenzionale e alla ionoterapia con inibitori delle tirosin-chinasi.

### *LAM con NPM1 mutato*

Questo gene che codifica per la nucleofosmina è localizzato sul cromosoma 5 nella banda q35.1. È una fosfoproteina ubiquitaria che agisce come proteina di trasporto tra nucleo e citoplasma; ha un ruolo chiave nella biogenesi dei ribosomi, nel mantenimento della stabilità genomica, nel controllo della riparazione del DNA e della duplicazione del centrosoma durante la mitosi e nella regolazione dell'oncosoppressore ARF. Alterazioni di NPM1 si osservano nel 25% delle LAM de novo (fig. 2) e, in particolare, nel 50% delle LAM a cariotipo normale. Quando è mutata la nucleofosmina non rientra nel nucleo e rimane nel citoplasma come si evidenzia in immunohistochimica su biopsia ossea. Questa mutazione in presenza di cariotipo normale sembra conferire una prognosi favorevole, con incrementata sopravvivenza dopo buona risposta alla chemioterapia, in assenza di mutazione ITD del gene FLT3. In particolare se abbiamo cariotipo normale, NPM1 mutato, FLT3 wild type e bassi livelli di ERG si ha prognosi molto favorevole con sopravvivenza libera da progressione a due anni del 70% dopo trattamento di induzione con citarabina, daunorubicina ed etoposide, seguito da alte dosi di citarabina o trapianto di cellule staminali autologhe. I pazienti anziani con NPM1 mutato hanno un incremento dell'outcome. Quindi alla diagnosi bisogna andare a studiare sia NPM1 sia FLT3.

### *LAM con mutazioni bialleliche di CEBPA*

Il gene CEBPA codifica per un fattore trascrizionale essenziale ed è localizzato sul cromosoma 19 a livello della banda q13. Le mutazioni di CEBPA sono uno dei due tipi di mutazioni conosciute come associate a leucemie familiari. Le mutazioni bialleliche sono mutazioni somatiche acquisite che si associano ad una mutazione germinale monoallelica. Si ritrovano nel 10% dei pazienti con LAM di nuova diagnosi e sono mutualmente esclusive con mutazioni di NPM1 (fig. 2). Il 13-19% con LAM e cariotipo normale presenta mutazioni di CEBPA. Questi pazienti hanno una sopravvivenza mediana totale, soprattutto in assenza di mutazioni ITD di FLT3 e R140 di IDH2.

### *LAM con RUNX1 mutato*

Viene inserito solo provvisoriamente nella classificazione WHO 2017. Ha prognosi sfavorevole ed una frequenza del 4-16% nelle LAM (fig. 2), spesso associata a precedente sindrome mielodisplastica e ad esposizioni a radiazioni e/o chemioterapia.

### *LAM con perdita o acquisizione di cromosomi, cariotipo complesso e monosomico*

Oltre alle traslocazioni finora analizzate, nei pazienti affetti da LAM si osservano spesso perdite o acquisizioni di interi cromosomi o parti di essi. Tra queste, le anomalie più comuni consistono nell'acquisizione del cromosoma 8 (trisomia 8, 13% dei casi), nella perdita o delezione del cromosoma 7 (9%), e nella perdita o delezione del cromosoma 5 (6%) (fig. 2). Le anomalie a carica dei cromosomi 5 e 7 si riscontrano soprattutto nei casi di LAM secondaria a pregressa chemioterapia o radioterapia.

### *LAM con cariotipo monosemico*

Il cariotipo monosemico è definito dalla presenza di due o più monosomie dei cromosomi autosomici o di una singola monosomia associata ad almeno un'alterazione citogenetica strutturale. È associato a prognosi sfavorevole.

Il cariotipo si definisce complesso quando sono presenti tre o più alterazioni cromosomiche numeriche e/o strutturali, e si osserva soprattutto in LAM evoluta da pregressa sindrome mielodisplastica o mieloproliferativa cronica, specialmente in età avanzata. Nel 70% dei casi di cariotipo complesso si riscontra alterazione del gene oncosoppressore TP53, che contribuisce a rendere la prognosi sfavorevole, con alto rischio di ricadute.

### *LAM correlata a mielodisplasia e neoplasie mieloidi da terapia*

LAM con anomalie relate a mielodisplasia e neoplasie mieloidi relate alla terapia. Sotto questa definizione si raggruppano le forme che si sviluppano da sindrome mielodisplastica e quelle in seguito all'esposizione terapeutica, professionale ed

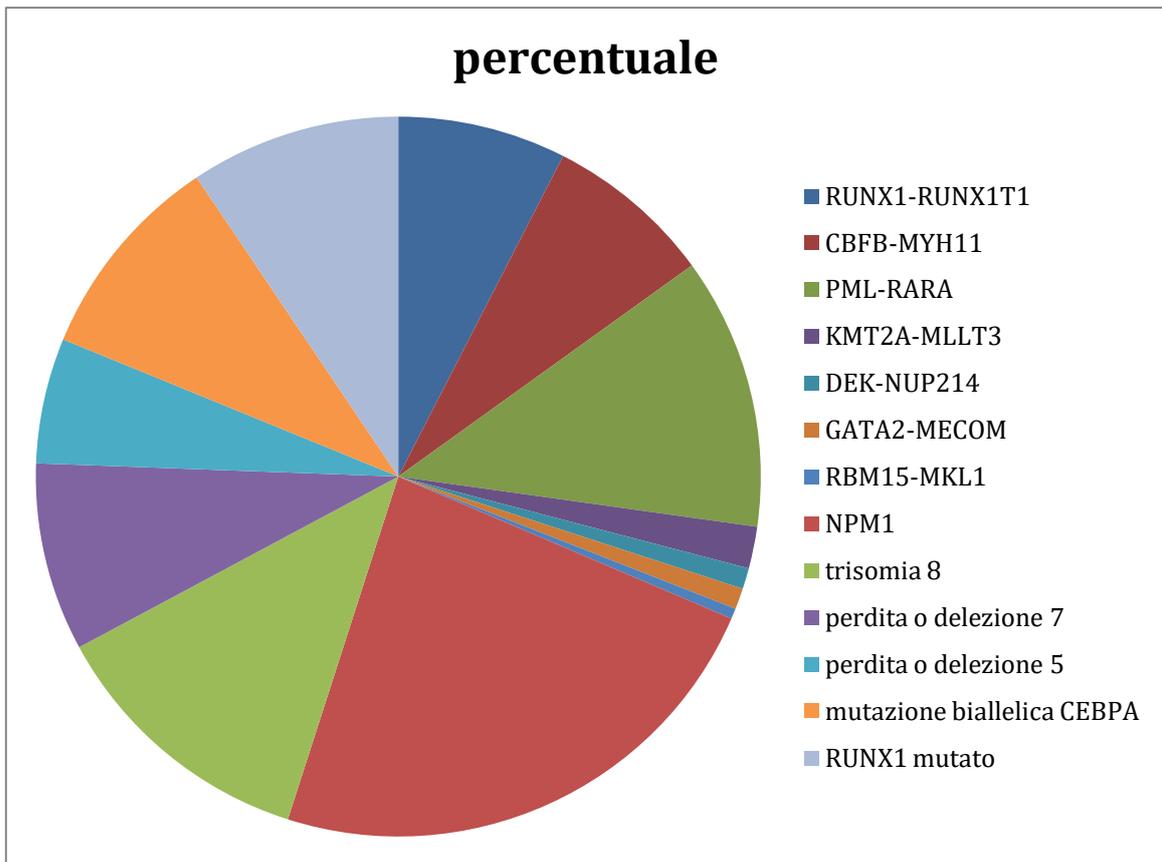
occasionale ad agenti leucemogeni fisici e/o chimici. Queste leucemie hanno un esordio di solito subacuto, per cui la malattia è preceduta da mesi di anemia, piastrinopenia e leucopenia con fibrosi e displasia del midollo. Si osserva quasi sempre citopenia, i caratteri fenotipici sono ibridi o atipici e il genoma è grossolanamente alterato, con numerose e complesse delezioni e traslocazioni. Il successo post-terapia ha un tasso inferiore rispetto alle forme de novo, sia per maggior tasso di decessi in induzione sia per la maggior resistenza ai farmaci antileucemici, per l'esteso rimaneggiamento genico.

### *Leucemie acute di linea ambigua*

In almeno 1/5 dei casi di LAM si ritrovano blasti con fenotipo mieloide e linfoide. Queste LAM si definiscono:

- Biclionali, quando sono presenti blasti mieloidi e linfoidi morfologicamente e immunofenotipicamente diversi tra loro;
- Bifenotipiche, se caratterizzate dalla presenza di un singolo clone leucemico che coesprime sia antigeni linfoidi sia mieloidi.

L'esistenza di queste leucemie ibride non deve meravigliare, perché le LAM prendono origine da cellule staminali pluripotenti e perché anche normalmente esistono cellule staminali comuni alle due linee. Clinicamente non hanno caratteristiche particolari, sul piano citomorfologico presentano scarsa o assente maturazione. Sono state ampiamente descritte ma i dati sulla loro frequenza e sul loro significato prognostico sono molto diversi e contrastanti. Alcuni tipi hanno particolari alterazioni genomiche come la  $t(9;22)(q34;q11)$  che si può presentare sia con fenotipo puramente linfoide, sia puramente mieloide, sia ibrido. Un altro tipo è con  $t(4;11)(q21;q23)$  che ha caratteri ibridi bi fenotipici, con blasti con markers linfoidi e monocitari assieme. Questi due tipi hanno una prognosi sfavorevole.



*Fig. 2: grafico che riporta la frequenza delle principali forme di LAM.*

### ***I.II.VIII Decorso e prognosi.***

La prognosi delle LAM è molto eterogenea perché dipende da molti fattori, sia clinici sia biologici, che vengono valutati alla diagnosi.

I fattori prognostici clinici delle LAM sono riferibili all'età del paziente, al performance status, al tipo di risposta al ciclo di chemioterapia di induzione, alla primitività o secondarietà della LAM (a ciclo chemioterapico o precedente mielodisplasia), al numero di leucociti trovati alla diagnosi (soprattutto numero di cellule blastiche nel sangue periferico) ed alla presenza/assenza di localizzazioni extramidollari;

I fattori prognostici biologici sono invece: cariotipo, immunofenotipo, presenza/assenza di riarrangiamenti o mutazioni di geni che codificano per fattori di trascrizione (RUNX1, CEBPA) e per recettori di tirosin-chinasi (FLT3, KIT), per proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina (TET2, ASXL1 e ASXL2) e nel metabolismo (IDH1 e 2), assenza/presenza di mutazioni del gene N-RAS e duplicazione di una parte del gene MLL, ipo/iperespressione del gene associato al tumore di Wilms (WT-1), assenza/presenza di mutazioni del gene nucleofosmina (NPM1), assenza/presenza di mutazione del gene oncosoppressore TP53, presenza di mutazioni del gene DNMT3A.

Nell'ambito dei fattori prognostici clinici, l'età del paziente superiore a 65 anni, il non ottenimento di una risposta completa dopo l'induzione e la presenza di una LAM secondaria sono i più importanti. I pazienti oltre i 65 anni spesso hanno una malattia con fattori biologici sfavorevoli, tollerano meno la chemioterapia e, per la loro età e le concomitanti comorbidità (valutate con indici di performance status ECOG e Karnofsky), spesso non possono accedere a schemi di trattamento ad alte dosi e al trapianto di cellule staminali. In questi pazienti la sopravvivenza è stimata essere intorno ai 6 mesi, invece dei 12 mesi prevedibili nei pazienti più giovani. I pazienti che rispondono solo parzialmente al primo ciclo di induzione così come quelli portatori di una forma secondaria, sono di solito portatori di una forma chemio resistenti e quindi a prognosi peggiore. Vi è invece una discussione maggiore circa il significato della blastosi alla diagnosi (cellule blastiche in periferia > 30000/mm<sup>3</sup>) e riguardo all'impatto prognostico di una localizzazione extramidollare, come una epato/splenomegalia. Si ritiene comunque che questi due siano indice di una patologia

più importante dal punto di vista quantitativo e di conseguenza potenzialmente più aggressiva.

I fattori biologici comprendono il cariotipo e le alterazioni molecolari. I fattori prognostici vengono riassunti nella tabella 4.

<b>Fattori prognostici nella LAM</b>		
	Favorevoli	Avversi
Età	<60 anni	>65 anni
Insorgenza LAM	De novo	Secondaria
Leucociti	<30000/mm <sup>3</sup>	>30000/mm <sup>3</sup>
Coinvolgimento extra-midollare	Assente	Presente
FAB	M3, M4	M5a, M5b, M6, M7
Cariotipo	T(15;17), inv (16), t(8;21)	11(q23), anomalie dei cromosomi 3, 5, 7, cariotipo complesso
Biologia molecolare	Mutazione NPM1 e la mutazione biallelica CEBPA	Mutazione FLT3-ITD, overespressione WT-1, BAALC, mutazione TP53
Fenotipo	CD34-	CD34+

Fibrosi midollare	Assente	Presente
Citoriduzione midollare	Rapida	Lenta
Cicli di terapia necessari per avere una remissione completa	Uno	Più di uno

*Tabella 4: fattori prognostici delle LAM.*

Sulla base dell'analisi citogenetica e della presenza o meno delle principali alterazioni molecolari finora identificate e che hanno mostrato un impatto prognostico, le LAM si stratificano, sulla base della classificazione dell'European Leukemia Net, in tre categorie di rischio genetico: favorevole, intermedio e sfavorevole (tabella 5).

Appartengono al gruppo delle favorevoli quelle LAM con t(15;17), t(8;21), inv(16), cariotipo normale in associazione a mutazioni del gene NPM1 e assenza o bassa carica allelica di mutazione del gene FLT3-ITD, e mutazione biallelica del gene CEBPA. Le LAM con anomalie del cromosoma 3 nell'ambito del gene MECOM, con monosomia o delezione delle braccia q del cromosoma 5, con monosomia del 7, con riarrangiamenti della banda 11q23, con cariotipo complesso e monosomico, con t(6;9), con t(9;22), con mutazioni di RUNX1, ASXL1 e TP53, con NPM1 wild-type associato a mutazioni ad alta carica allelica di FLT3-ITD rientrano nella categoria sfavorevole. Al gruppo intermedio invece afferiscono le LAM con NPM1 mutato e FLT3-ITD ad alta carica allelica, NPM1 wild-type senza mutazioni di FLT3 o con bassa carica allelica, con t(9;11) e con alterazioni citogenetiche non classificate come favorevoli o sfavorevoli.

Recentemente, l'utilizzo di tecniche di sequenziamento dell'intero genoma, ha consentito l'identificazione di mutazioni somatiche del gene isocitrato deidrogenasi 1 e 2 (IDH1 e IDH2) nel 5-10% dei pazienti. In questo modo si ha produzione e accumulo dell'oncometabolita R(2)-2-idrossiglutarato (2HG). Di solito queste mutazioni si

ritrovano nell'ambito di un cariotipo normale, con mutazioni di NPM1 e mutazioni di FLT3-ITD con un significato prognostico non chiaramente determinato per pareri discordanti.

Mutazioni addizionali sono state identificate nel gene TET2, nel 12-17% dei casi di LAM, determinando un impatto prognostico negativo nei pazienti con NPM1 mutata, e nei geni ASXL1 e 2, coinvolti nel rimodellamento della cromatina e richiesti per l'emopoiesi, la cui incidenza aumenta nei pazienti di età superiore a 60 anni in associazione a prognosi sfavorevole. Altre mutazioni si possono trovare nei geni DNMT3A, sul braccio corto del cromosoma 2, che codifica per l'enzima DNA metiltransferasi 3A, che prognosticamente ha un significato non chiarito. Altro marcatore molecolare predittivo di prognosi infausta è WT-1 che, se presenta alti livelli alla diagnosi, e soprattutto se rimane a valori elevati dopo la chemioterapia di induzione e/o consolidamento, ha appunto un impatto negativo. Anche lo studio dell'immunofenotipo è importante ai fini della prognosi nella LAM. L'espressione di antigeni di superficie come CD34 e CD56, la co-espressione di antigeni di linee differenziative diverse (mieloide e linfoide) e l'iperespressione di proteine correlate alla resistenza ai farmaci, che fungono da canali ATP-dipendenti per l'estruzione dei farmaci dall'ambiente intracellulare, sono elementi importanti che condizionano la probabilità di ottenimento della remissione completa e, di conseguenza, di guarigione.

<b>Stratificazione genetica ELN (European Leukemia Net 2017)</b>	
Categoria di rischio	Anomalia genetica
Favorevole	<p>T(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1</p> <p>Inv(16) (p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11</p> <p>Mutazione di NPM1 senza mutazione FLT3-ITD o con FLT3-ITD a bassa carica allelica</p> <p>Mutazione biallelica di CEBPA</p>
Intermedio	<p>Mutazione di NPM1 e FLT3-ITD ad alta carica allelica</p> <p>NPM1 wild type senza mutazione FLT3-ITD o con FLT3-ITD a bassa carica allelica</p> <p>T(9;11)(p21.3; q23.3); MLLT3-KMT2A</p> <p>Anomalie citogenetiche non classificate come favorevoli né avverse</p>
Sfavorevole	<p>T(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214</p> <p>T(v;11)(v;q23.3); KMT2A riarrangiato</p> <p>T(9;22)(q34.1; q11.2); BCR-ABL</p> <p>Inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM</p> <p>-5° del(5q); -7; -17/anomalie (17p)</p> <p>Cariotipo complesso, cariotipo monosomico</p> <p>NPM1 wild type e mutazione FLT3-ITD ad alta carica allelica</p> <p>Mutazione RUNX1</p> <p>Mutazione ASXL1</p> <p>Mutazione TP53</p>

Tabella 5: classificazione prognostica dell'European Leukemia Net.

### ***I.II.IX Terapia.***

#### *Terapia chemioterapica*

La terapia delle LAM si basa innanzitutto sull'età del paziente, sulle sue condizioni cliniche ed eventuali comorbidità (fitness) e sulla categoria di rischio genetico-molecolare. Tutti i pazienti più giovani, indicativamente sotto i 65 anni, che non presentano comorbidità che ne controindichino l'utilizzo, vengono sottoposti a programmi di polichemioterapia. Vengono di solito somministrati, infatti, la citosina arabinoside, sia a dosi standard di 200mg/m<sup>2</sup>/die sia a dosi medio-alte di 1-2 gr/m<sup>2</sup> ogni 12-24 ore per un totale di 6-12 dosi, e le antracicline o farmaci simili come daunomicina, adriamicina, idarubicina, mitoxantrone.

Lo schema classico utilizzato è il 3/7 in cui la antraciclina viene somministrata per tre giorni mentre la citosina arabinoside in perfusione continua per 7 giorni. Questo è uno schema detto di induzione che di solito viene ripetuto 1 o 2 volte per raggiungere la remissione. Bisogna ricordare che è fondamentale, prima di iniziare la terapia, uno studio molecolare volto a riconoscere alcune mutazioni particolari che possono far variare il programma terapeutico di prima linea. Esempio ne è il possibile ritrovamento di FLT3 mutato, che giova dell'utilizzo di midostaurina come inibitore orale di FLT3, in combinazione con la chemioterapia convenzionale, oppure l'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-CD33, il gemtuzumab-ozogamicina, nei casi CD33 positivi a prognosi favorevole o intermedia. L'obiettivo che si vuole raggiungere è la remissione, ovvero arrivare a quella condizione per cui si ha la scomparsa delle cellule leucemiche e la normalizzazione del quadro ematologico periferico e midollare. Bisogna però ricordare che la remissione non equivale ad una completa guarigione, ossia la riduzione al minimo della malattia residua, risultato che si cerca di raggiungere con una ripetizione dello schema terapeutico uno o due volte; tale ripetizione viene definita consolidamento o intensificazione.

Al termine di questa fase, i pazienti fit vengono avviati a differenti trattamenti in base alla prognosi e ai fattori identificativi delle forme di Lam:

- Trapianto di cellule staminali autologhe, per quei pazienti che hanno una LAM a rischio genetico favorevole e per quelli a rischio intermedio che abbiano raggiunto una remissione completa molecolare al termine dei cicli di consolidamento: la

durata media di remissione è superiore ai 24 mesi; il 30-50% dei casi sopravvive più di 5 anni e può guarire. È fondamentale dunque una valutazione prospettica, dopo ogni ciclo di chemioterapia, della quantità di malattia residua minima (MDR), per identificare coloro i quali sono MDR-negativi e quindi candidabili al trapianto.

- Trapianto di cellule staminali allogeniche, per i pazienti ad alto rischio citogenetico e per quelli a rischio intermedio che hanno una persistente ma minima traccia di malattia identificabile alla biologia molecolare: il 10-20% dei casi muore a causa del trapianto; la durata media di remissione è superiore a 24 mesi; il 30-60% dei casi restanti sopravvive più di 5 anni e può guarire;
- Nessuna terapia per i pazienti che abbiano sviluppato tossicità o eventi avversi che controindichino l'esecuzione di una procedura trapiantologica.

La terapia del paziente che alla diagnosi è anziano o unfit per la chemioterapia convenzionale, si avvale dell'utilizzo di agenti ipometilanti, come decitabina e 5-azacitidina. Questi farmaci consentono di arrivare ad una risposta completa nel 20% dei casi, con riduzione della trasfusione dipendenza del 40% e con buon profilo di tollerabilità. Tuttavia la sopravvivenza mediana non supera i 12 mesi. Recentemente, studi di combinazione dei farmaci ipometilanti con inibitori di BCL2, come venetoclax, hanno dimostrato un miglioramento nei tassi di risposta completa e di sopravvivenza, portando quindi a pensare che questo tipo di terapia potrà essere in futuro l'approccio di prima linea nei pazienti con LAM all'esordio non candidabili a chemioterapia standard, per età avanzata o unfit.

Nei pazienti giovani refrattari all'approccio con i farmaci chemioterapici tradizionali, si possono mettere in atto procedure trapiantologiche di salvataggio di tipo sperimentale, come il trapianto di cellule staminali da cordone ombelicale o da donatore aploidentico, che offrono però una percentuale di successo e di lungo sopravvivenza in solo il 10-15% dei casi. Per questo, se sono disponibili trattamenti all'interno di protocolli clinici sperimentali con farmaci innovativi, finalizzati al raggiungimento di una remissione completa, che possano consentire l'esecuzione di un trapianto di cellule staminali da donatore, i pazienti vengono valutati e poi avviati a tali protocolli. Tra questi programmi rientrano:

- Gli inibitori del gene FLT3, in pazienti con mutazione ITD del gene, come gilteritinib e quizartinib;
- Gli inibitori del gene MDM2 come idasanutlin, in pazienti senza mutazioni di TP53, con lo scopo di riattivare la funzione pro-apoptotica dell'oncosoppressore;
- Gli inibitori dei geni IDH1 e 2 come ivosidenib ed enasidenib.

La terapia di un paziente con ricaduta di malattia si stabilisce in base alla durata della precedente remissione completa, oltre che sulla base delle condizioni cliniche. Se la ricaduta avviene a breve distanza dal trattamento chemioterapico, sarà difficile ottenere una nuova remissione con lo stesso programma terapeutico. Per questo si tenterà un approccio con programma sperimentale, andando precedentemente a valutare dal punto di vista molecolare se sono presenti le mutazioni che possono essere il target terapeutico, e infine facendo una procedura trapiantologica di salvataggio. Se invece la ricaduta avviene a più di 12 mesi di distanza, se le condizioni cliniche lo permettono, si può prediligere un approccio con chemioterapia da consolidare con un trapianto di cellule staminali. Oppure si può valutare di scegliere una terapia sperimentale, previa una valutazione dei possibili target a livello molecolare. Se un paziente ricade dopo il trapianto, si applica lo stesso metodo di scelta detto finora: se le condizioni cliniche lo permettono, si intraprende un ulteriore percorso terapeutico, con farmaci convenzionali o sperimentali, per raggiungere una nuova remissione, da consolidare con un altro trapianto, di solito da un donatore differente. Se le condizioni cliniche invece non permettono ancora una terapia ulteriore, si applica una terapia di supporto, a scopo palliativo.

Nella terapia della LAM un caso a parte è quello della APL, la leucemia acuta promielocitica. Il cardine del trattamento è rappresentato dall'acido all-trans-retinoico (ATRA), che può essere associato al triossido di arsenico (ATO) oppure a basse dosi di chemioterapia con idarubicina. Oltre alla CID. in questo particolare tipo di LAM, è molto pericoloso anche il trattamento per il rischio di creare una sindrome da lisi tumorale e una sindrome da differenziamento, in cui i promielociti leucemici si differenziano in neutrofilo portando a iperleucocitosi e ad una sindrome da rilascio citochinico potenzialmente letale. Le recidive sono rare e di solito rispondono bene ad un secondo ciclo di ATRA e ATO, talora associati a citosina arabinoside. Si procede al trapianto allogenico solo in caso di persistenza di malattia dopo terapia di salvataggio.

In generale la APL è curabile in più del 95% dei casi se si riesce a supportare il paziente attraverso le complicanze delle prime fasi di malattia.

#### *Terapia di supporto.*

La terapia di supporto ha due scopi: proteggere e curare il paziente dall'anemia, dalle infezioni e dalle emorragie, per cui è parte integrante di tutti i programmi chemioterapici dall'induzione al trapianto; può inoltre essere l'unica arma nei pazienti che per età o per condizioni cliniche non possono accedere a protocolli chemioterapici o a terapie sperimentali. Più la terapia antileucemica è intensiva, più la terapia di supporto deve essere sofisticata e intensiva.

La terapia di supporto dell'anemia si avvale di trasfusioni di unità di globuli rossi concentrati. La concentrazione emoglobinica deve rimanere sopra 8 g/dL e durante le fasi di terapia intensiva sopra i 10 g/dL.

La terapia di supporto delle infezioni si avvale innanzitutto dell'isolamento del paziente con associate misure igieniche e ambientali che lo proteggano dal contrarre infezioni: riduzione della carica batterica e micotica del tubo digerente con chemioterapici orali; disinfezione e trattamento antibatterico e antimicotico delle aree periorificali e del cavo orale; polichemioterapia antibiotica o antimicotica guidata dal laboratorio in caso di infezioni o di febbre. Se vi è una prolungata agranulocitosi e/o gravi complicazioni infettive utile può essere accelerare la ripresa con fattori di crescita. La trasfusione di granulociti trova indicazione nei pazienti con aspettativa di un lungo periodo di granulocitopenia e con infezioni batteriche localizzate.

La terapia di supporto delle emorragie prevede: trasfusioni di piastrine, ottenute per aferesi da donatore unico (di solito bastano 2-3 aferesi settimanali). Si possono usare anche i concentrati piastrinici, di cui mediamente ne occorrono 7-8 due/tre volte la settimana, da donatori multipli, che si caratterizzano per minor efficacia, maggior probabilità di reazioni e maggior rischio di trasmissione di infezioni virali. Nei casi con coagulazione intravascolare disseminata il supporto piastrinico deve essere intensivo e giornaliero e il controllo della CID può essere completato utilizzando eparina a basse dosi per inibire la coagulazione e con acido tranexamico per ridurre l'iperfibrinolisi. Tra le misure di profilassi e supporto sono importanti anche i mezzi per il controllo del bilancio dei fluidi e degli elettroliti per evitare sovraccarico del circolo durante

l'iperidratazione avvalendosi dei diuretici. Utile è anche l'utilizzo di farmaci che facilitino l'eliminazione degli acidi urici, come rasburicasi, o ne impediscano la formazione, come allopurinolo, riducendo le complicanze da lisi tumorale.

## II: OBIETTIVI

Come si nota dal capitolo introduttivo della presente tesi, lo studio della Leucemia Mieloide Acuta è in continuo divenire: le recenti scoperte hanno permesso di ampliare l'orizzonte della ricerca medica per il trattamento di questa patologia andando nel tempo a definire in maniera sempre più puntuale e raffinata le caratteristiche peculiari di ogni tipologia di questa patologia. Basti pensare all'importanza ricoperta dalla nuova classificazione della malattia approvata nel 2016 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, che suddivide le leucemie mieloidi acute in base alle loro caratteristiche citogenetiche e molecolari permettendo di indirizzare la scelta della terapia in modo molto più accurato rispetto anche solo a pochi anni fa. Le ricerche sul trattamento della Leucemia Mieloide Acuta continuano pertanto a maturare: grazie agli studi clinici condotti anche in Italia recentemente sono stati approvati dagli enti regolatori europei e americani nuove categorie di farmaci per la LMA tra cui gli inibitori tirosin-chinasici (anti FLT3) e gli anticorpi monoclonali diretti contro molecola di superficie (CD33), il cui uso nella terapia di prima linea consente di migliorare la prognosi della malattia.

È per questi motivi che diventa di fondamentale importanza il soffermarsi su ulteriori analisi in merito ai dati raccolti sulle diverse tipologie di trattamenti applicati e sulle percentuali di sopravvivenza alla malattia in funzione sia delle mutazioni presenti nei casi studiati sia degli approcci adottati, di modo da avanzare considerazioni che fruttino un nuovo indirizzamento più preciso nella scelta delle terapie in fase di applicazione.

Il presente studio retrospettivo si pone quindi l'obiettivo di costituire un gradino in più verso una conoscenza più approfondita della malattia nella molteplicità delle sue forme e mutazioni a partire dall'analisi puntuale dei dati raccolti, nella piena consapevolezza di non essere un punto di arrivo, quanto più un punto di partenza per ulteriori ricerche volte alla definizione di strategie di intervento sempre più precise e mirate.

Si procederà quindi a prendere in considerazioni più tipologie di Leucemia Mieloide Acuta andando ad evidenziare i benefici terapeutici e le percentuali di sopravvivenza ai differenti approcci adoperati.

### III: METODI

Il presente lavoro si costituisce di uno studio retrospettivo che prende in considerazione i pazienti in cui è stata diagnosticata una leucemia mieloide acuta presso l'Ospedale Policlinico San Martino di Genova negli ultimi 10 anni. In questo lasso di tempo sono stati presi in considerazione 20 pazienti affetti da questa malattia con differenti mutazioni, con l'intento precipuo di creare uno spaccato abbastanza vario sulle possibili casistiche della patologia stessa. A tale scopo si è proceduto ad analizzare le cartelle cliniche, sia cartacee sia informatizzate, dei suddetti pazienti permettendo così di ricostruirne la storia clinica, collegandola con le caratteristiche genetiche (tabelle 6 e 7). In tal modo si è cercato quindi di trovare delle possibili correlazioni tra il decorso della malattia, le terapie somministrate e le varianti geniche.

All'interno del nostro campione i pazienti si suddividono in 10 maschi e 10 femmine. Le diverse mutazioni di cui sono portatori i pazienti sono state identificate mediante studi di ricerca genetici e molecolari come la Next Generation Sequencing (NGS) e sono riportate nella tabella. Quest'ultima è una tecnica di sequenziamento massicciamente parallela che offre rendimento, scalabilità e velocità estremamente elevati. La suddetta tecnologia viene utilizzata per determinare l'ordine dei nucleotidi in interi genomi o regioni mirate di DNA o RNA.

Questa metodologia ha portato quindi a importanti vantaggi e a nuove opportunità come:

- Sequenziare rapidamente interi genomi
- Sequenziare in profondità le regioni target
- Utilizzare il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) per scoprire nuove varianti di RNA e siti di giunzione o quantificare gli mRNA per l'analisi dell'espressione genica
- Analizzare fattori epigenetici come la metilazione del DNA a livello di genoma e le interazioni DNA-proteina
- Raccogliere sequenze in campioni di cancro per studiare rare varianti somatiche, subcloni tumorali e altro ancora

- Studiare in maniera più approfondita il microbioma umano
- Identificare nuovi agenti patogeni

Paziente	Sesso	Età	Mutazioni significative	Polimorfismi
1	M	79	<b>CBL</b> p.R420Q <b>KRAS</b> p.G13D <b>SF3B1</b> p.K700E	<b>KIT</b> p.M541L <b>SETBP1</b> p.P1130T <b>TET2</b> p.l1762V <b>TP53</b> p.P72R
2	M	57	Delezione cromosoma 7 <b>HRAS</b> p.Q61H <b>SF3B1</b> p.K700E	<b>KIT</b> p.M541L <b>SETBP1</b> p.V231L <b>TET2</b> p.l1762V e p.G355D <b>TP53</b> p.P72R
3	M	61		<b>SETBP1</b> p.V1101l e p.A1221P <b>TET2</b> p.V1718L e p.L1721W <b>TP53</b> p.P72R
4	M	66	LMC con t(5;12) (TEL/PDGFRB) Riarrangiamento MLL	
5	F	42		
6	F	51	<b>MPL</b> p.V114M <b>SETBP1</b> p.V1101l <b>TET2</b> p.l1762V	<b>MPL</b> p.V114M <b>SETBP1</b> p.V1101l <b>TET2</b> p.l1762V <b>TP53</b> p.P72R
7	M	48	<b>CBL</b> p.C.404Y <b>RUNX1</b> p.R166X <b>SETBP1</b> p.D868N	<b>JAK2</b> p.L393V <b>KIT</b> p.M541L <b>SETBP1</b> p.V1101l e p.P1130T <b>TP53</b> p.P72R
8	F	56	<b>TP53</b> p.C141Y	<b>SETBP1</b> p.V1101l <b>TET2</b> p.G355D, p.L1721W e p.l1762V <b>TP53</b> p.P72R
9	M	47	<b>TET2</b> p.Y867H <b>TP53</b> p.R273H	<b>SETBP1</b> p.V231L e p.V1101l <b>TET2</b> p.l1762V e p.H1778R <b>TP53</b> p.P72R
10	F	52	<b>RUNX1</b> p.S222Pfs*15	<b>MPL</b> p.V114M <b>KIT</b> p.M541L <b>SETBP1</b> p.V1101l <b>TET2</b> p.l1762V e p.L1721W <b>TP53</b> p.P72R
11	F	60	<b>EZH2</b> p.l744Ffs*25 <b>NRAS</b> p.G12D	<b>CEBPA</b> p.H195_P196dup <b>SETBP1</b> p.V231L e p.P1130T <b>TET2</b> p.P363L, p.L1721W e p.l1762V <b>TP53</b> p.P72R
12	M	21	Mutazione biallelica <b>CEBPa</b>	
13	F	79	Monosomia cromosoma 7	
14	F	66		
15	F	58		

16	M	62		
17	M	54		
18	M	81		
19	F	62		
20	F	75	JAK2	

*Tabella 6: vengono riportate le età e il sesso dei pazienti e le mutazioni riscontrate*

<b>Paziente</b>	<b>Terapia</b>	<b>Remissione</b>	<b>Ricaduta</b>	<b>Trapianto midollo</b>	<b>Risultato</b>
1	Luglio 2020 Chemioterapia schema CPX-351 quindi daunorubicina e citarabina	Novembre 2020: remissione raggiunta		Dicembre 2020: dopo condizionam ento con tiotepa, fludarabina e busulfano più terapia per profilassi GVHD (micofenolat o mofetile, ciclofosfamid e e ciclosporina)	Giugno 2021: il paziente rimane in remissione e il trapianto ha avuto buon esito
2	Dicembre 2018: chemioterapia di induzione con schema FLAI5 (citarabina, fludarabina, idarubicina)	Non raggiunta			Nel gennaio 2019 si constatava il decesso
3	Febbraio 2014: schema F- MACHOP (vincristina, metilprednisolone , ciclofosfamide, 5-fluorouracile, citarabina, adriblastina, metotrexato). Marzo 2014: primo ciclo di induzione con schema FLAI-5. Aprile 2014: si avviava	Raggiunta al termine della terapia		Programmato per luglio 2014	Buon esito vista la remissione completa raggiunta dopo la terapia

	consolidamento con citarabina e idarubicina.				
4	Dicembre 2013: Crisi blastica mieloide in LMC inizialmente trattata con dasatinib. Si inizia in seguito chemioterapia con schema FLAI5 e in seguito consolidamento con alte dosi di citarabina e idarubicina.	Raggiunta		Programmato	Buon risultato ma sospensione e dasatinib per tossicità ematologica riscontrata nel paziente
5	Maggio 2012: si avvia terapia di induzione con schema FLAI5. Giugno 2012: si avvia terapia di consolidamento con alte dosi di citarabina e idarubicina	Remissione completa già dopo il ciclo di induzione.		Effettuato da fratello aploidentico dopo primo consolidamento	Buon risultato.
6	Marzo 2019: si avvia terapia di induzione con schema FLAI5 ma si hanno numerose complicanze da terapia. In seguito di inserisce dasatinib per presenza della traslocazione BCR-ABL p.190. questo viene prima sospeso per edema polmonare acuto e poi ripreso. Aprile 2019: II induzione con citarabina e idarubicina. Luglio 2019: consolidamento	Raggiunta dopo II induzione e consolidamento		In attesa di tipizzazione figlio per trapianto	Buon risultato

	con alte dosi citarabina				
7	Giugno 2017: terapia con azacitidina nel sospetto di leucemia mielomonocitica cronica ma peggioramento e allora tramite ritrovamento di delezione nel cromosoma 7 coinvolgente MLL e con rivalutazione midollare si arriva a diagnosi LMA. Terapia di induzione secondo schema FLAI5 e si prevede procedura allotrapiantologica in prima remissione.	Raggiunta		Effettuato	Buon esito
8	Marzo 2018: si avvia terapia con schema FLAI5	Raggiunta		Luglio 2018: dopo condizionamento con tiotepa, fludarabina e busulfano e profilassi GVHD con ciclosporina, ciclofosfamida e micofenolato.	Non buono perché la paziente accusa complicanze del trapianto come mucosite e addominalgie. Inoltre l'aspirato midollare mette in mostra il 13% di blasti. Si propone terapia con Vidaxa ma la paziente preferisce proseguire

					la terapia presso ematologia di Savona.
9	Giugno 2019: si avvia terapia con schema FLAI5, seguita poi a luglio da seconda terapia con citarabina e idarubicina.	Raggiunta		Eseguito a settembre 2019	Buon esito
10	Agosto 2015: si inizia terapia con schema FLAI5. settembre-ottobre: prosecuzione terapia con citarabina e idarubicina.	Raggiunta		Effettuato ad inizio 2016	Buon esito
11	Novembre 2016: si inizia terapia con schema FLAI5 proseguita poi a dicembre con seconda induzione con alte dosi di citarabina e idarubicina. Febbraio 2017: si somministra terapia di consolidamento con dosi intermedie di citarabina.	Raggiunta		Effettuato a giugno 2017	Buon esito
12	Novembre 2019: si inizia terapia di induzione con schema 3+7+ mylotarg. A dicembre 2019 primo consolidamento con daunorubicina, citarabina e Mylotarg ripetuto a febbraio 2020. Viene poi effettuato ad	Raggiunta remissione completa ad aprile 2020	Gennaio 2021: ricaduta, quindi re induzione con schema MEC4 (mitoxantrone, etoposide, citarabina e azacitidina). A marzo	Aprile 2021: viene effettuato il trapianto dopo condizionamento con tiotepa, fludarabina e busulfano e con terapia di profilassi da GVHD.	In evoluzione

	aprile un terzo consolidamento con alte dosi di citarabina.		2021 ricovero per consolidamento con citarabina.		
13	Giugno 2021: si avvia terapia con azacitidina e venetoclax				In evoluzione
14					
15					
16					
17					
18	Settembre 2019: si inizia terapia con azacitidina e ferro chelazione poi sospesa per problemi renali. Ad agosto 2020 non essendoci stato risultato si sospende anche l'azacitidina, dando solo supporto trasfusionale.				Dicembre 2020: si constata il decesso per emorragia cerebrale.
19	Inizialmente la paziente necessitava di 2-3 trasfusioni alla settimana con ferro chelazione. Nel 2020 eseguita splenectomia con riduzione della necessità di trasfusioni. Terapia con idrossiurea 2 compresse al dì				In evoluzione ma in miglioramento
20					

*Tabella 7: viene riportato un resoconto della storia clinica dei pazienti.*

## **IV: RISULTATI**

I dati riguardano uno studio pilota che si è svolto presso il Laboratorio di diagnostica molecolare ematoloncologica dell'Università di Genova e saranno registrati nel registro italiano Leukemia net in prossima apertura. Il quadro risulta estremamente interessante in quanto solo sporadiche sono le analisi precedenti di studio NGS in quadri di LAM de novo all'esordio. Ovviamente, dato l'esiguo numero dei pazienti analizzati non è possibile un'analisi statistica precisa.

Come da tabella 6 in tutti i pazienti analizzati, eccetto due, sono state rinvenute in NGS più di una mutazione in modo del tutto indipendente dalle caratteristiche citogenetiche, citofluorimetriche e molecolari (con metodiche PEC o Real-time-PCR) della LAM in esame. Le mutazioni che ricorrono più frequentemente sono quelle che coinvolgono P53 e TET2. Le altre mutazioni di accompagnamento si presentano in maniera del tutto casuale. Inaspettatamente si sono dimostrate come non ricorrenti le mutazioni a carico degli oncogeni della famiglia RAS. In nessun caso è stato dimostrato il coinvolgimento di DNMT. In solamente due dei pazienti analizzati non sono state dimostrate mutazioni in NGS, quasi a dimostrare che queste fossero forme particolari di LAM. In nessun caso poi è stata dimostrata una sola alterazione genica.

## V: CONCLUSIONI

Per lungo tempo si è considerata la LAM come patologia del tutto omogenea. Il danno a carico di una cellula staminale precoce della linea mieloide da una parte faceva acquisire vantaggio proliferativo al clone anomalo (da ora leucemico), dall'altra ne determinava il blocco maturativo in uno stadio precoce, portando all'occupazione totale dello spazio midollare determinandone insufficienza funzionale. Fu con l'acquisizione delle tecniche di citogenetica che si iniziò a capire che esistevano forme a se stanti, il cui esempio più lampante è la leucemia acuta promielocitica. Questa da allora venne considerata a parte e l'atteggiamento terapeutico, in precedenza del tutto omogeneo, iniziò a vacillare. La promielocitica dopo l'avvento delle tecniche di biologia molecolare dimostrò essere caratterizzata dal coinvolgimento del gene che codifica per il recettore della Vitamina A e si dimostrò responsiva alla forma *trans* di detta vitamina. Si dimostrò, e allora il fatto sembrò sensazionale, che la somministrazione di acido trans retinoico era in grado di rimuovere il blocco maturativo allo stadio di promielocita e che era capace di indurre remissione di malattia. Oggi giorno con l'associazione dapprima fra chemioterapia e acido trans retinoico e in seguito fra Triossido di Arsenico e acido trans retinoico quasi il 90% dei pazienti guarisce definitivamente senza necessità di procedure trapiantologiche.

Le accresciute capacità di studiare il genoma umano, di sequenziarlo, di riconoscere dove mappano i geni, di conoscere oncogeni e antioncogeni ha portato a successive acquisizioni. Da classificazioni delle LAM basate sulla sola morfologia, si è passati a successivi modelli classificativi che cercavano di includere il rischio prognostico fondato su criteri, dapprima su sola base citogenetica, in seguito su base molecolare. Nell'ultima classificazione delle LAM queste sono suddivise in gruppi di rischio sulla base del tipo eventuale di mutazione genica o citogenetica evidenziata alla diagnosi. Curare oggi giorno una LAM senza avere a disposizione più o meno rapidamente queste informazioni equivale a over- o sub-trattare i pazienti. Sugli antichi testi veniva spesso menzionata genericamente la cura migliore delle LAM e per anni non c'è stato alcun progresso. Ancora oggi i protocolli terapeutici sono basati sugli stessi farmaci che venivano usati cinquanta anni fa. Solo il miglioramento del supporto trasfusionale, antibiotico, antivirale, antifungino e delle procedure trapiantologiche ha indotto il miglioramento della prognosi delle LAM di cui tanto si parla oggi.

L'avvento delle più moderne tecniche di biologia molecolare permette di studiare più geni contemporaneamente, di valutare mutazioni in maniera precisa, di studiarne l'espressione, di valutarne l'eventuale perdita di zigosità e immette nuovo vigore nella ricerca sulla biologia delle LAM.

È acquisizione oramai condivisa l'idea che sotto uno stesso nome vengano comprese diverse realtà di patologia che, peraltro, si manifestano con caratteristiche fenotipiche omogenee.

È in questo ambito che si pone questa tesi, che rappresenta i primi dati genovesi che si andranno a integrare con quelli italiani e in seguito europei. Si potranno trarre conclusioni solo da una analisi su larghi numeri. Probabilmente si dimostrerà che esistono diverse facce della stessa medaglia fenotipica.

Nei dati presentati due sono i geni che più frequentemente risultano coinvolti: TET2 e P53. Ora TET2 è un gene che notoriamente è coinvolto nella genesi di emopoiesi clonale tipica dell'anziano che viene considerata, forse in maniera non del tutto comprensibile, fisiologica dai più. P53 è un antioncogene notoriamente coinvolto nel processo di progressione neoplastica (non solo ematologica) e di acquisizione di resistenza alla terapia. Queste considerazioni ci riportano al modello di oncogenesi multi step proposto da Knudson alcuni decenni or sono secondo cui una cellula staminale acquisisce vantaggio proliferativo (sinonimo di clonalità) e instabilità genica. L'instabilità genica determina successivamente l'acquisizione di ulteriori mutazioni e ciò determina la progressione della malattia. Su queste basi i due pazienti che non presentano mutazioni alla diagnosi dovrebbero rappresentare lo stadio iniziale della malattia (*ipso facto* a miglior prognosi) e gli altri, in cui sono evidenziate mutazioni casuali, in aggiunta a quelle di TET2 e P53, stadi successivi con minore probabilità di successo terapeutico. Questa stessa affermazione va, tuttavia, confermata, essendo possibile anche la perdita di zigosità.

In maniera del tutto interessante sarebbe, poi, da evidenziare negli studi a venire se questo stesso modello *multi-step* può essere applicato alle forme già considerate a se stanti come come la promielocitica e le *core-binding leukemia*.

Un ultimo aspetto va segnalato: da ormai venti anni l'efficacia della terapia effettuata, ove possibile e cioè in presenza di un marcatore molecolare correlato

alla patologia in esame, va valutata sulla base del parametro della malattia minima residua (MRD). Tutte le patologie per cui esista un marcatore molecolare specifico e analizzabile in modo sensibile, vengono trattate sulla base di questo strumento. Lo stesso discorso, già largamente in uso nella gestione terapeutica della promielocitica, della leucemia mieloide cronica e, ove possibile, anche delle LAM, torna utile nella gestione terapeutica delle leucemie mieloidi acute. Evidenziare precocemente la malattia, cioè quando sono presenti pochissime cellule leucemiche, consente di instaurare terapie precoci destinate ad avere successo.

In conclusione questo lavoro si pone come l'inizio di un discorso che, se proseguito, spero possa portare ad aprire nuovi orizzonti di conoscenza biologica e terapeutica riguardo questa patologia.

## BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Medicina interna E. Storti, U. Torelli, E. Ascari Ematologia diretta da Carlo Zanussi UTET (1983)
- Manuale di ematologia P. Corradini, R. Foà et al III edizione di Minerva Medica (2020)
- Corso di malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici S. Tura, M. Cavo, P. L. Zinzani a cura di Alessandro Broccoli. Società editrice Esculapio (2020)
- <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/leucemia-mieloide-acuta>
- Next-Generation Sequencing (NGS) | Explore the technology (illumina.com)
- Microsoft Word - REL AML completa feb 2017.docx (rel-lombardia.net)
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016 Jun 9;374(23):2209-2221. doi: 10.1056/NEJMoa1516192. PMID: 27276561; PMCID: PMC4979995.
- Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Mendelson Cohen N, Niemeyer E, Barda N, Zuzarte PC, Heisler L, Sundaravadanam Y, Luben R, Hayat S, Wang TT, Zhao Z, Cirlan I, Pugh TJ, Soave D, Ng K, Latimer C, Hardy C, Raine K, Jones D, Hoult D, Britten A, McPherson JD, Johansson M, Mbabaali F, Eagles J, Miller JK, Pasternack D, Timms L, Krzyzanowski P, Awadalla P, Costa R, Segal E, Bratman SV, Beer P, Behjati S, Martincorena I, Wang JCY, Bowles KM, Quirós JR, Karakatsani A, La Vecchia C, Trichopoulou A, Salamanca-Fernández E, Huerta JM, Barricarte A, Travis RC, Tumino R, Masala G, Boeing H, Panico S, Kaaks R, Krämer A, Sieri S, Riboli E, Vineis P, Foll M, McKay J, Polidoro S, Sala N, Khaw KT, Vermeulen R, Campbell PJ, Papaemmanuil E, Minden MD, Tanay A, Balicer RD, Wareham NJ,

Gerstung M, Dick JE, Brennan P, Vassiliou GS, Shlush LI. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*. 2018 Jul;559(7714):400-404. doi: 10.1038/s41586-018-0317-6. Epub 2018 Jul 9. PMID: 29988082; PMCID: PMC6485381.

- Cai SF, Levine RL. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis. *Semin Hematol*. 2019 Apr;56(2):84-89. doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.001. Epub 2018 Aug 22. PMID: 30926095.

- Infante MS, Piris MÁ, Hernández-Rivas JÁ. Molecular alterations in acute myeloid leukemia and their clinical and therapeutical implications. *Med Clin (Barc)*. 2018 Nov 9;151(9):362-367. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2018.05.002. Epub 2018 Jun 9. PMID: 29895422.

# **RINGRAZIAMENTI**

Alla fine di questa lunga esperienza universitaria ci tengo a fare alcuni doverosi ringraziamenti.

Prima di tutto vorrei ringraziare la mia famiglia, che è stata fondamentale in questo percorso perché mi ha sempre incoraggiato, sostenuto e aiutato e senza la quale probabilmente oggi non sarei qui.

Ringrazio poi i miei amici e la mia ragazza che mi hanno sempre dato il loro supporto sia dal punto di vista morale sia da quello emotivo. Un ringraziamento speciale va a Francesca e Riccardo che nella mia vita genovese si sono rivelati un importantissimo aiuto e con cui è nato e cresciuto un profondo legame.

Infine un ringraziamento va anche ai professori Roberto Massimo Lemoli e Maurizio Miglino per i loro consigli e il loro aiuto.