

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



Elaborato scritto per la prova finale in

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
MEDICINA E CHIRURGIA**

**Classificazione genomica e prognosi della Leucemia
Mieloide Acuta trattata con CPX-351**

Relatore

Prof. Roberto Massimo Lemoli

Correlatore

Prof. Maurizio Miglino

Candidata

Elisa Granero

Anno accademico 2022-2023

*Ai miei nonni,
con cui ho avuto il privilegio di crescere.
Grazie per avermi insegnato il significato dell'amore.*

Sommario

1) CAPITOLO 1: LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	1
1.1) DEFINIZIONE	1
1.2) EPIDEMIOLOGIA	2
1.3) FATTORI DI RISCHIO	3
1.4) EZIOPATOGENESI	4
1.5) CLINICA	4
1.6) PROGNOSI	5
1.7) APPROCCIO DIAGNOSTICO	6
1.7.1) <i>Esami ematochimici e striscio di sangue periferico</i>	6
1.7.2) <i>Midollo osseo</i>	6
1.7.3) <i>Citochimica</i>	6
1.7.4) <i>Immunofenotipo</i>	6
1.7.5) <i>Indagini complementari</i>	7
1.8) CLASSIFICAZIONE FAB	7
1.9) STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO (ELN 2022)	11
2) CAPITOLO 2: CLASSIFICAZIONE GENOMICA	16
2.1) ANALISI DEL CARIOTIPO	16
2.2) DRIVER MUTATIONS	17
2.2.1) <i>Traslocazioni</i>	18
2.2.2) <i>Inversioni</i>	19
2.2.3) <i>Delezioni</i>	20
2.2.4) <i>Aneuploidie</i>	20
2.2.5) <i>NPM1</i>	21
2.2.6) <i>Mutazioni che interferiscono con la trasduzione del segnale</i>	21
2.2.7) <i>Mutazioni a carico dei modificatori epigenetici</i>	22
2.3) MUTAZIONI A CARICO DI GENI ONCOSOPPRESSORI	23
2.3.1) <i>WT1</i>	23
2.3.2) <i>TP53</i>	23
3) CAPITOLO 3: TRATTAMENTO	26
3.1) PAZIENTI GIOVANI (< 60-65 ANNI)	26
3.2) PAZIENTI TRA I 60-75 ANNI ELEGGIBILI A CHEMIOTERAPIA INTENSIVA	28
3.3) PAZIENTI > 75 ANNI O NON ELEGGIBILI A CHEMIOTERAPIA INTENSIVA	28
3.4) TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI	29
3.5) TERAPIA DI SUPPORTO	30
3.6) EFFETTI COLLATERALI DELLE TERAPIE	31

3.7) RICADUTE POST TERAPIA.....	34
3.8) TERAPIE DI II LINEA.....	35
4) ABSTRACT	38
5) CAPITOLO 4: LO STUDIO	40
5.1) BACKGROUND E SCOPO DEL LAVORO	40
5.2) MATERIALI E METODI	42
5.3) ANALISI STATISTICA.....	44
5.4) RISULTATI.....	45
5.5) DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	52
BIBLIOGRAFIA	54
RINGRAZIAMENTI.....	62

1) CAPITOLO 1: La Leucemia Mieloide Acuta

1.1) Definizione

Il termine “leucemia” deriva dal greco “*leukos*” e “*aima*”, che significano rispettivamente “bianco” e “sangue” poiché queste patologie frequentemente sono caratterizzate da un aumento dei globuli bianchi nel sangue periferico, definita con il termine tecnico di “leucocitosi”. (1)

Sono patologie neoplastiche del sistema emopoietico che originano da cellule staminali CD34+ residenti nel midollo osseo e che esordiscono con una clinica acuta e spesso drammatica; si sviluppano in seguito all’accumulo di mutazioni genetiche e aberrazioni cromosomiche che comportano:

- Differenziazione disregolata;
- Proliferazione eccessiva;
- Inibizione dell’apoptosi delle cellule neoplastiche (2).

Possiamo classificarle in base al precursore emopoietico interessato, distinguendo la Leucemia Acuta Linfoide, che si associa alla proliferazione di cellule progenitrici linfoidi, dalla Acuta Mieloide, derivante da cellule precursori della linea mieloide (2).

Le mutazioni genetiche alla base della Leucemia Mieloide Acuta comportano l’accumulo di cellule immature, chiamate blasti, che infiltrano il tessuto midollare provocando soppressione della fisiologica emopoiesi e di conseguenza una progressiva riduzione o scomparsa delle cellule mature; i blasti possono bloccarsi a diversi stadi di maturazione, risultando quindi più o meno indifferenziati, ed è proprio la loro presenza a definire una leucemia acuta, poiché la diagnosi è data da una presenza di essi > 20% nel midollo osseo oppure nel sangue periferico, dato che in alcuni casi è possibile osservare una diffusione leucemica nel sangue (3).

In talune situazioni è possibile anche una colonizzazione leucemica di “organi santuario” (1).

1.2) Epidemiologia

La Leucemia Mieloide Acuta è la leucemia più frequente nella popolazione adulta con un'incidenza stimata nel 2016 superiore ai 20.000 casi/anno negli Stati Uniti; costituisce circa l'1.2% dei casi di neoplasie maligne (4) ed il 50% di tutte le leucemie (5).

Può insorgere a qualunque età, ma è più comune nei pazienti anziani, con un'età media alla diagnosi di 67 anni (6).

Nella figura 1 è rappresentata l'incidenza in rapporto all'età.

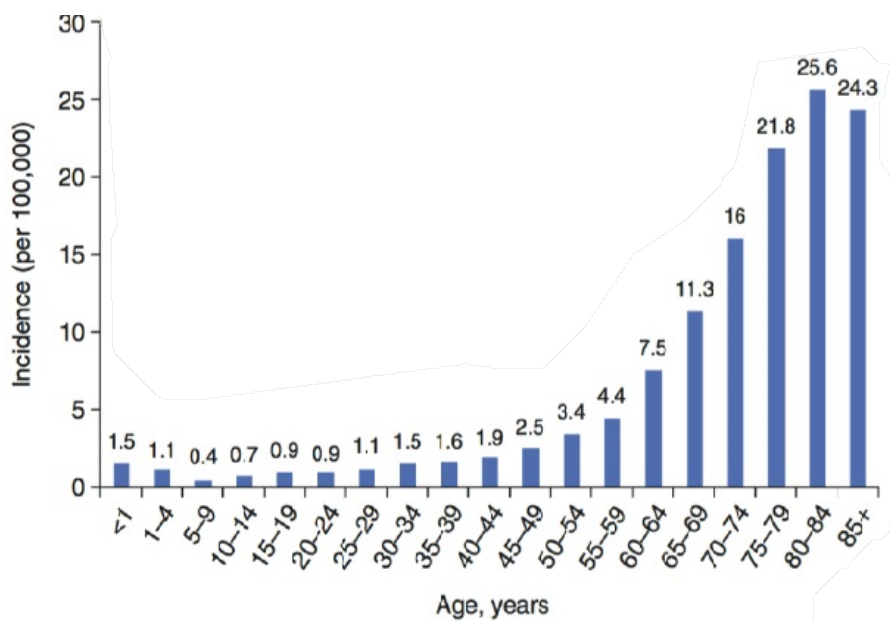


Figura 1: Tasso di incidenza di AML in rapporto all'età

Nonostante le nuove promettenti terapie, la sopravvivenza a lungo termine è rara, con solamente il 27% dei pazienti vivi a 5 anni dalla diagnosi. (6)

Per questo motivo, tra i fattori prognostici è sempre importante ricordare il ruolo svolto dall'età del nostro paziente.

Tra uomini e donne, l'incidenza risulta essere leggermente maggiore negli uomini.

1.3) Fattori di rischio

Nella complessità del quadro multifattoriale che ci si presenta davanti, siamo comunque in grado di delineare importanti fattori di rischio, tra cui in primis la predisposizione genetica; ricordiamo poi l'età avanzata, il fumo di sigaretta, l'esposizione ad agenti chimici quali chemioterapici, tra cui soprattutto gli agenti alchilanti e gli inibitori della Topoisomerasi II, radiazioni ionizzanti, anche di tipo iatrogeno, ed inquinanti ambientali come il fenilbutazone, il cloramfenicolo, il benzene, erbicidi e pesticidi (6).

Tra questi, il principale fattore di rischio risulta essere l'età del paziente, che però potrebbe essere sostituita da una misurazione della funzione degli organi. (7)

Nella figura 2 viene rappresentata, tramite curve di Kaplan-Meier, la sopravvivenza globale dei pazienti affetti da LAM in rapporto all'età.

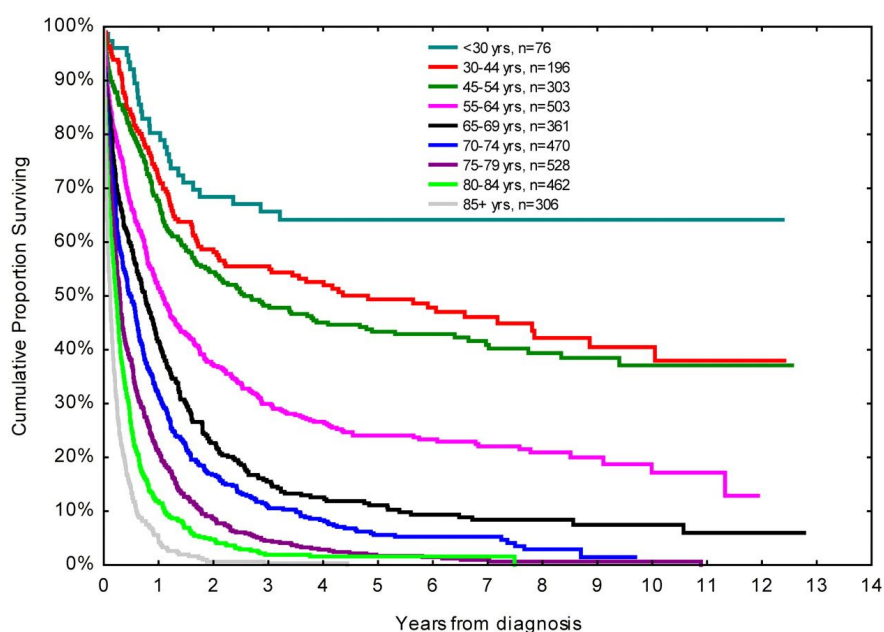


Figura 2: Sopravvivenza globale dei pazienti affetti da Leucemia Mieloide Acuta in rapporto all'età

Dal punto di vista genetico, vi sono alcune sindromi importanti da ricordare perché associate ad aumentata incidenza di LAM, tra cui l'anemia di Fanconi, la sindrome di Kostmann, la sindrome di Wiskott-Aldrich, la sindrome da atassia e teleangectasie, nonché alcune sindromi cromosomiche quali quelle di Down, Klinefelter e Patau (2).

Bisogna anche ricordare le forme secondarie evolute a partire da Sindromi mielodisplastiche o altri disordini ematologici, quali l'aplasia midollare, che quindi per questo motivo costituiscono un fattore di rischio.

1.4) Eziopatogenesi

La maggior parte delle Leucemie Acute Mieloidi sono classificabili come idiopatiche, in quanto quasi mai risulta identificabile un'eziologia ben definita (6).

Esistono una serie di mutazioni della linea germinale che sicuramente dobbiamo tenere a mente e che comprendono *GATA2*, *RUNX1*, *CEBPA*, *ANKRD26* e *ETV6* (8), ma tale elenco risulta essere parte di un database in costante aggiornamento.

A questo si associa l'esposizione ai fattori di rischio ambientali.

1.5) Clinica

La clinica della patologia è costituita dalle manifestazioni sistemiche della soppressa maturazione delle cellule staminali ematopoietiche, cioè correlate a anemia, trombocitopenia ed infezioni; in associazione all'anemia, il paziente presenterà pallore, astenia, tachicardia e possibile cefalea; per la trombocitopenia potremo osservare porpore, petecchie, ecchimosi e sanguinamenti, per esempio retinici o gengivali, mentre per le alterazioni della funzionalità leucocitaria riscontreremo un'aumentata suscettibilità alle infezioni.

In aggiunta a ciò, potremmo riscontrare calo ponderale, un sintomo classicamente associato a patologie neoplastiche ma altamente aspecifico, sudorazioni notturne e artralgie. (6)

All'esame obiettivo è frequente riscontrare l'infiltrazione di organi ematopoietici e non, con linfadenopatie diffuse, epatomegalia e splenomegalia nonché interessamento di cute e gengive; inoltre possiamo obiettivare febbre associata a un'infezione sottostante oppure alla produzione di citochine pro-infiammatorie tumore-mediata. (6)

Infine, è possibile lo sviluppo di insufficienza renale acuta sia per l'infiltrazione da parte di cellule leucemiche sia per il rilascio di lisozima, che media un danno tubulare tossico (1).

Una minor parte di pazienti, circa il 10%, ha in associazione anche iperleucocitosi e presenta un aumentato rischio di Sindrome da lisi tumorale (2); essa costituisce un'emergenza ematologica causata dalla rapida morte delle cellule tumorali, poiché questa comporta un rilascio massivo in circolo di acido urico, potassio e fosforo, con rischio elevato di danno acuto sia renale che cardiaco.

1.6) Prognosi

I fattori che determinano successo e fallimento terapeutico nella LAM, e quindi la prognosi, sono da un lato legati al paziente e dall'altro legati alla malattia.

Per quanto riguarda i fattori associati al paziente, ricordiamo l'età, direttamente proporzionale ai tassi di fallimento terapeutico, la presenza di comorbidità, che può influire sull'out-come ma anche su farmacocinetica e farmacodinamica e infine un limitato supporto sociale che può rendere più difficoltosa la gestione terapeutica.

Nonostante i pazienti più anziani presentino esiti peggiori rispetto ai giovani, tale fattore non dovrebbe essere motivo per scartare opzioni terapeutiche potenzialmente curative, dato che non risulta essere il fattore prognostico più importante per la resistenza alla terapia né per la mortalità. (9)

Per quanto riguarda invece i fattori legati alla malattia, vi sono profili citogenetici con caratteristiche prognosticamente sfavorevoli che aumentano la probabilità di resistenza ai trattamenti chemioterapici; è stato osservato come le anomalie citogenetiche avverse siano dal punto di vista epidemiologico più frequenti rispetto a quelle favorevoli nella popolazione anziana. (9)

L'efficacia della terapia, inoltre, può essere ridotta da una storia di precedenti malattie ematologiche mieloproliferative, di mielodisplasia o di pregresse terapie radio-metaboliche, probabilmente perché in questi pazienti la neoplasia insorge su un background già compromesso con danno o deplezione delle cellule staminali emopoietiche.

In definitiva si può notare come nei pazienti anziani la prognosi sia peggiore sia per una ridotta probabilità di risposta alla chemioterapia, sia per una maggior tossicità correlata al trattamento.

1.7) Approccio diagnostico

1.7.1) Esami ematochimici e striscio di sangue periferico

L'esame del sangue periferico rivela nella maggior parte dei casi una pancitopenia, cioè la presenza contemporanea di anemia, neutropenia e piastrinopenia, ma i leucociti in taluni casi possono essere aumentati per la presenza di uno iatus leucemico. Caratteristici della patologia sono i bastoncelli di Aurer nei blasti, ossia dei granuli a forma alterata di bastoncello, tipicamente singoli ad eccezione della leucemia promielocitica acuta, e indicativi dell'origine mieloide. (5)

1.7.2) Midollo osseo

La diagnosi di certezza di Leucemia Acuta richiede l'esecuzione di un aspirato di midollo osseo e uno studio morfologico utilizzando colorazioni quali May-Grunwald-Giemsa o Wright-Giemsa; il riscontro deve essere di un tessuto ipercellulato con almeno il 20% di blasti oppure più del 10% in presenza di alcune mutazioni genetiche ricorrenti; sono da considerarsi blasti a tutti gli effetti promielociti atipici, promonociti e monoblasti. (9)

Bisogna tenere presente come in alcuni casi la biopsia non sia eseguibile per la presenza di fibrosi o comunque resistenza all'aspirazione per l'eccessiva densità cellulare midollare; tale situazione prende il nome di "puntio sicca". (5) In questi casi è indicata l'esecuzione di una biopsia osteo-midollare.

1.7.3) Citochimica

È possibile, nonostante venga sfruttato solo in pochi laboratori, valutare la positività o meno alla Mieloperossidasi per identificare la linea cellulare di appartenenza, infatti le LAM sono tipicamente MPO+, mentre le Leucemie Linfoidi Acute (LAL) sono sempre MPO-; bisogna però tenere presente come l'assenza di questa non permetta di fare diagnosi di LAL dal momento che monoblasti e mieloblasti precoci possono esserne privi. (9)

1.7.4) Immunofenotipo

La citofluorimetria multiparametrica viene utilizzata per identificare l'immunofenotipo di ogni Leucemia Acuta neodiagnosticata, così da sapere quale linea cellulare sia andata incontro a proliferazione neoplastica; tutto ciò è possibile grazie al fatto che ogni linea

cellulare sia caratterizzata da specifici marcatori assenti invece nelle altre linee differenziative.

Tra questi marker possiamo ricordare:

- allo stadio di precursore: CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR;
- nei granulociti: CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, MPO citoplasmatica;
- nei monociti: esterasi non specifica (NSE), CD11c, CD14, CD64, lisosomi, CD4, CD11b, CD36, NG2 omologo;
- nei megacariociti: CD41 (glicoproteina IIb/IIIa), CD61 (glicoproteina IIIa), CD42 (glicoproteina 1b);
- negli eritrociti: CD235a (glicoporina A);
- nei linfociti T: CD3, CD4, CD5, CD8, CD2, CD7, TCR;
- nei linfociti B: CD19, CD20, CD22, FMC7, Immunoglobuline;
- nei linfociti NK: CD56. (9)

1.7.5) Indagini complementari

Nell'inquadramento del paziente, risultano importanti anche una serie di indagini non di pertinenza ematologica, in previsione delle complicanze sistemiche associate alla malattia stessa ma anche alla terapia a cui il paziente verrà successivamente sottoposto.

In primis è rilevante l'esecuzione di una visita cardio-oncologica completa con esecuzione di ecocolor Doppler e una valutazione infettivologica in caso di complicanze infettive concomitanti.

Nei pazienti più fragili, inoltre, va presa in considerazione una valutazione geriatrica; non esistono degli score specifici validati per i pazienti affetti da LAM, ma tale visita prevede, oltre all'anamnesi approfondita, una valutazione del performance status, del contesto sociale del paziente e del care-giver a cui si possa fare riferimento.

1.8) Classificazione FAB

La classificazione French-American-British (FAB) è stata elaborata da Bennet nel 1976 e successivamente aggiornata nel 1985; prevede una caratterizzazione sia della LAM che della LAL basandosi su criteri morfologici, citochimici e immunofenotipici.

Per quanto riguarda la LAM, sono state identificate 8 varianti, da M0 a M7, che si contraddistinguono per caratteristiche tipiche dei vari step dell'emopoiesi, per segni di maturazione e per la presenza di eritroblasti atipici o promielociti dismorfici.

In tutti i casi deve essere identificata una cellularità di blasti nel midollo osseo pari almeno al 30%, poiché tale cut-off costituisce l'elemento essenziale per distinguere una LAM da una sindrome mielodisplastica. (1)

- M0: blasti indifferenziati

Tale forma è difficile da differenziare da una LAL poiché risulta essere MPO-, per questo diventa fondamentale l'esecuzione dell'immunofenotipo così da dimostrare la presenza di antigeni mieloidi identificati mediante anticorpi specifici. Un'altra caratteristica importante da ricordare di questa forma è la resistenza alla chemioterapia senza però che sia stato identificato un modello citogenetico caratteristico, tranne in alcuni casi l'associazione con la Trisomia 13. (10)

Nella figura 3 sono apprezzabili i blasti indifferenziati che caratterizzano questa classe.

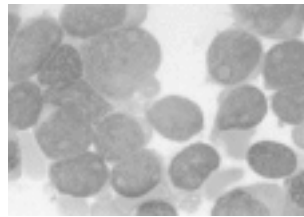


Figura 3: Blasti indifferenziati caratteristici della categoria M0 della classificazione FAB

- M1: blasti mieloidi senza segni di maturazione

Le caratteristiche tipiche di questo stadio sono nuclei tondi e a volte granuli citoplasmatici contenenti i bastoncelli di Auer, come osservabile nella figura 4.

Solo in minima parte permane la maturazione mieloida con meno del 10% di promielociti. (10)

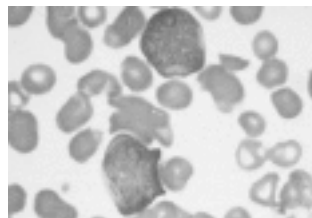


Figura 4: Blasti mieloidi senza segni di maturazione caratteristici della categoria M1 della classificazione FAB; in uno di questi sono visualizzabili i bastoncelli di Auer

- M2: blasti mieloidi con segni di maturazione

I segni di maturazione consistono nella presenza di promielociti e mielociti; i granuli e i bastoncini di Auer sono tendenzialmente ben visibili permettendone l'identificazione in modo sufficientemente agevole. Un esempio di ciò lo troviamo nella figura 5.

Dal punto di vista citogenetico sono frequentemente associati alla traslocazione t (8;21), tipicamente correlata anche allo sviluppo di sarcomi granulocitici extra-midollari.

Dal punto di vista epidemiologico tende ad interessare pazienti più giovani, intorno ai 30 anni, e si associa ad una prognosi positiva con risposta completa alla chemioterapia in più dell'85% dei casi, scarse recidive e sopravvivenza libera da malattia a lungo termine. (10)

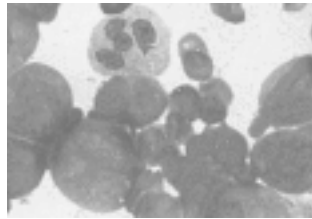


Figura 5: Blasti mieloidi con segni di maturazione caratteristici della categoria M2 della classificazione FAB

- M3: promielociti leucemici

Tale forma prende il nome di Leucemia Acuta Promielocitica; i blasti presentano nuclei tondi, nucleoli ben evidenti e granuli azzurrofilici citoplasmatici, come visualizzabile nella figura 6, nonostante esista una piccola parte di casi con promielociti ipogranulati, i cui granuli risultano talvolta visibili solamente al microscopio elettronico.

Tali granuli hanno la caratteristica di contenere sostanze pro-coagulanti ed è per questo possibile lo sviluppo di CID (Coagulazione Intravasale Disseminata) soprattutto in seguito alla lisi indotta dalla chemioterapia, con alta incidenza di mortalità in seguito a sanguinamenti, soprattutto emorragie intracraniche.

Per quanto riguarda l'epidemiologia, interessa pazienti giovani (30-40 anni) e fattori di rischio sono l'etnia caucasica e l'obesità.

La traslocazione caratteristica è t (15;17) ed è causa di formazione di una proteina di fusione inibente la trascrizione di geni controllati da *RARalfa* con rottura del cromosoma 17 a livello dell'introne del gene alfa del recettore dell'acido retinoico; per questo motivo il trattamento di prima linea si basa sulla somministrazione di quest'ultimo. (10)

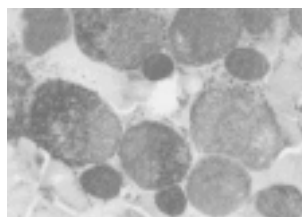


Figura 6: Blasti promielocitici granulati caratteristici della categoria M3 della classificazione FAB

- M4: blasti con maturazione granulocitaria e blasti monocitari

Altrimenti detta Leucemia Mielomonocitica, si caratterizza per un infiltrato monocitario >20%, le cui caratteristiche sono nuclei ripiegati e citoplasma grigiastro; un esempio è osservabile nella figura 7.

Dal punto di vista clinico, interessa una popolazione mediamente più anziana e sembra associarsi a iperleucocitosi ed a un aumentato coinvolgimento extra-midollare.

Nel 5% dei casi possiamo trovare una variante caratterizzata dalla presenza di eosinofili displastici a vari stadi di maturazione; in tali casi, sono tipicamente interessati pazienti più giovani e la prognosi tende ad essere ottima. Dal punto di vista citogenetico, queste leucemie si associano ad inversioni del cromosoma 16. (10)

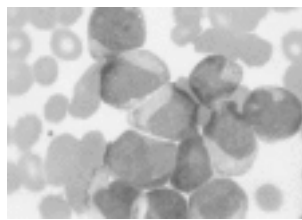


Figura 7: Blasti con maturazione granulocitaria e blasti monocitari caratteristici della categoria M4 della classificazione FAB

- M5: monociti e monoblasti

La forma monocitaria per definizione deve essere formata da almeno l'80% di blasti di origine monocitica, che possono essere senza (variante 5a) o con (variante 5b) differenziazione morfologica e che si colorano con esterasi non specifica. Può esserne osservato un esempio in figura 8.

Per quanto riguarda la clinica, sono caratteristiche l'iperleucocitosi e l'interessamento extra-midollare, soprattutto con lo sviluppo di ipertrofia gengivale, ma anche con il coinvolgimento del distretto gastroenterico, della congiuntiva e del sistema nervoso centrale.

La traslocazione più comune è la t(9;11).

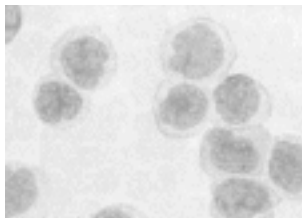


Figura 8: Monociti e monoblasti caratteristici della categoria M5 della classificazione FAB

- M6: eritroblasti leucemici e mieloblasti

Storicamente questa forma veniva chiamata Sindrome di Guglielmo; è caratterizzata da evidenti anomalie della linea eritropoietica, ma tutte e 3 le linee sono displastiche.

Le caratteristiche degli eritrociti sono osservabili nella figura 9 e consistono in megaloblastosi, nuclei multipli, carioressi e aumento dell'indice mitotico; inoltre, spesso sono presenti sideroblasti ad anello, associati a depositi di ferro, caratteristica che la accomuna alle mielodisplasie, così come la scarsa risposta alla terapia, anomalie del cariotipo simili, in particolare a carico dei cromosomi 5 e 7, e l'incidenza prevalente nella popolazione anziana. (10)

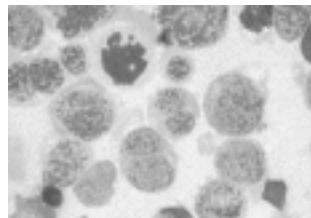


Figura 9: Eritroblasti leucemici caratteristici della categoria M6 della classificazione FAB

- M7: blasti megacariocitari

È caratterizzata da un'elevata variabilità intrinseca, infatti andiamo da forme ricche di cellule multinucleate a forme indifferenziate con citoplasma agranulare, difficili da distinguere da una forma M1 o da una LAL. Tale variabilità può essere visualizzata nella figura 10.

Per quanto riguarda la citogenetica, ci sono poche alterazioni caratteristiche, ma ricordiamo l'inv (3) e la traslocazione (1;22) (10).

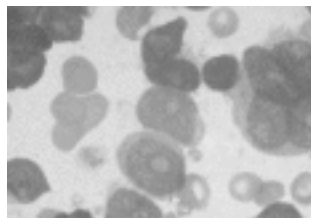


Figura 10: Blasti megacariocitari caratteristici della categoria M7 della classificazione FAB

1.9) Stratificazione del rischio (ELN 2022)

Nel settembre 2022 è stata delineata dall'International Consensus Classification of AML una nuova classificazione, aggiornamento della versione del 2017, basata sui profili citogenetici e mutazionali e caratterizzata da una gerarchia tra le varie categorie descritte. Per definire la diagnosi di LAM, è diventata sufficiente una occupazione del 10% del midollo osseo o del sangue periferico da parte dei blasti, se associata alle anomalie genetiche specifiche della malattia in questione, ad eccezione della forma caratterizzata da traslocazione (9;22), dove permane la necessità di avere almeno un 20% di blasti,

poiché altrimenti si rischierebbe una sovrapposizione con la Leucemia Mieloide Cronica avanzata.

Una novità introdotta dalla versione del 2022 consiste nell'eliminazione delle categorie correlate ad alterazioni tipiche della mielodisplasia e a precedenti terapie perché è stato dimostrato come la maggiore rilevanza nell'evoluzione biologica della patologia sia data dalla genetica.

Un'importante categoria è quella che include le anomalie genetiche ricorrenti, che è stata ampliata per includere anche traslocazioni quali *RAR α* , *KMT2A*, *MECOM*; tra tali anomalie è importante menzionare *CEBPA*, che sembra conferire un esito favorevole.

La più importante mutazione è quella a carico di *TP53*, che si associa a cariotipi complessi e ad una prognosi particolarmente sfavorevole e per questo costituisce un'entità a sé stante.

In assenza di mutazione di *TP53*, è identificabile la forma con “mutazioni genetiche legate alla mielodisplasia”, caratterizzata da mutazioni di *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* e *ZRSR2* e che risulta essere, per quanto il nome sia fuorviante, indipendente da una precedente storia di MDS. Tali mutazioni si associano a prognosi sfavorevole.

Le forme non mutate per *TP53* e prive di mutazioni genetiche correlate alla mielodisplasia possono rientrare nella categoria “anomalie citogenetiche legate alla mielodisplasia” e comprendono le forme che in passato venivano definite come “AML-MRC”.

Le forme rimanenti vengono classificate come “LAM non altrimenti specificata”.

Una rappresentazione grafica di tale classificazione è osservabile nella figura 11.

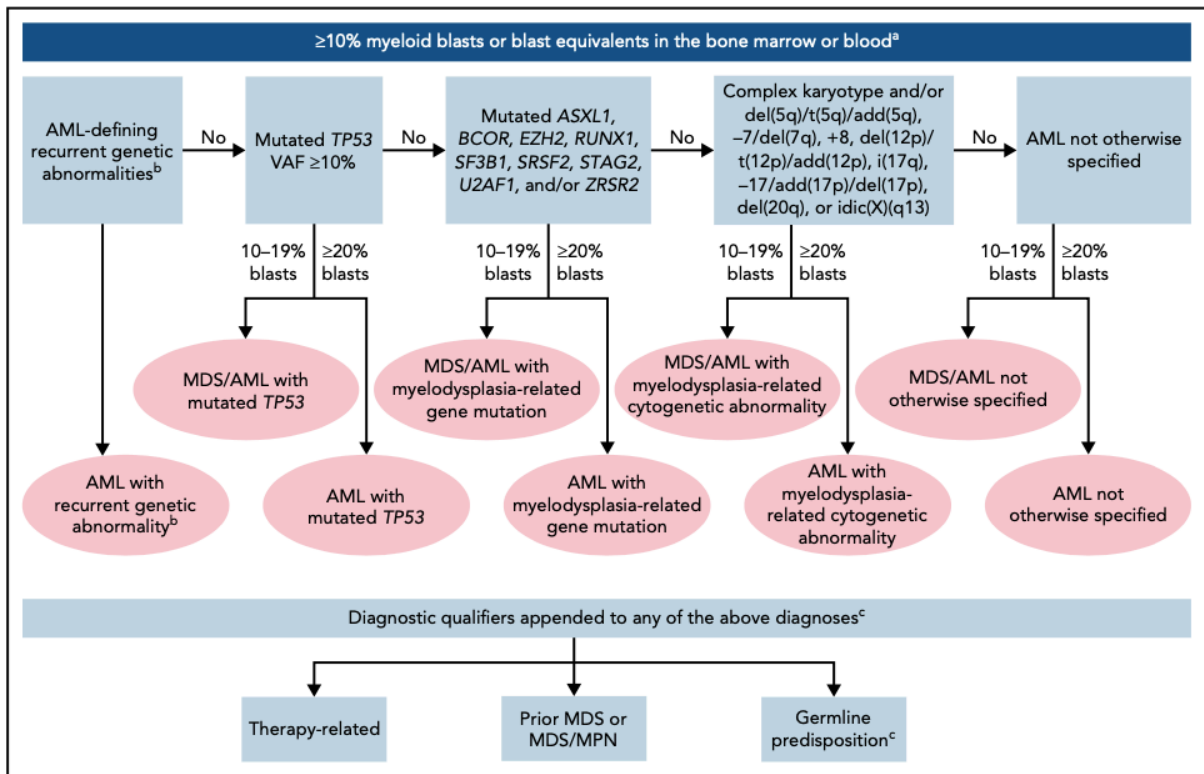


Figura 11: Rappresentazione gerarchica della "International Consensus Classification of AML"

È stata identificata un'aumentata incidenza di "LAM correlata alla terapia", ossia neoplasie caratterizzate da mutazioni indotte dalla chemioterapia o dalla radioterapia, da cloni resistenti che si sono selezionati per effetto dei farmaci citotossici (meccanismo di selezione positiva) o da anomalie indotte dagli inibitori della Topoisomerasi II. Il 75% di queste forme si presenta già 5-7 anni dopo l'esposizione all'agente tossico, spesso sono precedute da mielodisplasie e sono associate ad anomalie dei cromosomi 5 e/o 7, cariotipo complesso o mutazioni di *TP53*.

Oggi giorno viene considerata sempre più importante la predisposizione genetica alle neoplasie ematopoietiche, elemento rilevante sia per la gestione del paziente e dei familiari, sia se si considera il ruolo fondamentale che svolge il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche nel trattamento di queste patologie.

Nella figura 12 sono elencate le anomalie genetiche alla diagnosi contenute nella classificazione di rischio ELN 2022.

Risk category†	Genetic abnormality
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1†,‡ inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11†,‡ Mutated NPM1†,§ without FLT3-ITD bZIP in-frame mutated CEBPA
Intermediate	<ul style="list-style-type: none"> Mutated NPM1†,§ with FLT3-ITD Wild-type NPM1 with FLT3-ITD (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLL3::KMT2A†,¶ Cytogenetic and/or molecular abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	<ul style="list-style-type: none"> t(6;9)(p23.3;q34.1)/DEK::NUP214 t(v;11q23.3)/KMT2A-rearranged# t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1) t(3q26.2:v)/MECOM(EVI1)-rearranged -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype,** monosomal karyotype†† Mutated ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, and/or ZRSR2‡‡ Mutated TP53ª

Figura 12: Classificazione del rischio ELN 2022

Le varianti germinali possono essere classificate come:

- Patogene
- Probabilmente patogene
- Di significato incerto
- Probabilmente benigne
- Benigne

Le prime due sono considerate causa di malattia e vanno ricercate nei familiari.

Le sindromi coinvolte possono essere classificate a seconda che si associno o meno a determinate patologie.

Ricordiamo forme associate a disfunzioni piastriniche come le varianti di *RUNX1*, *ANKRD26* e *ETV6*; vi sono poi sindromi associate a disfunzioni d'organo come le varianti di *GATA2*, correlata a immunodeficienza, la sindrome di Shwachman Diamond, associata ad insufficienza del pancreas esocrino, la neutropenia congenita grave, l'anemia di Fanconi, le Sindromi del telomero corto, la Sindrome CBL, la Sindrome di Noonan e la Neurofibromatosi di tipo 1.

Infine, tra quelle non associate ad altro troviamo le varianti di *CEBPA*, *DDX41* e la Sindrome di Li Fraumeni.

La rilevanza delle varianti di *RUNX1* e *CEBPA* è tale da rendere proibitivo l'utilizzo di pazienti portatori come donatori di cellule staminali ematopoietiche.

Nella tabella 6 sono elencate le anomalie genetiche raggruppate a seconda del livello di rischio che determinano. Sono state apportate importanti modifiche rispetto alla versione precedente:

- Il rapporto allelico *FLT3-ITD* non viene più preso in considerazione;
- Le mutazioni genetiche e le anomalie citogenetiche correlate alla mielodisplasia rientrano nella categoria di rischio avverso;
- Le mutazioni in-frame di *CEBPA* determinano un esito favorevole indipendentemente dal numero di alleli interessati;
- I cariotipi iperdiploidi con trisomie multiple non rientrano più nel rischio avverso.

La classificazione europea del rischio del 2022 non tiene in considerazione solamente la genetica, cioè le caratteristiche alla diagnosi, ma prevede una rivalutazione in base alla risposta alla terapia e alla malattia minima residua (MDR).

Il monitoraggio della malattia residua risulta utile da più punti di vista; infatti, permette di stabilire un quadro di remissione più profondo così da definire il rischio di ricaduta ed identificare quest'ultima il più precocemente possibile e di conseguenza trattarla.

Per tale valutazione le tecniche utilizzate sono la citometria a flusso multiparametrica e la MRD molecolare. (9)

2) CAPITOLO 2: Classificazione genomica

2.1) Analisi del cariotipo

Lo studio del cariotipo è un'analisi essenziale in ambito ematologico, volto ad identificare eventuali anomalie cromosomiche nelle cellule neoplastiche; il tessuto protagonista, nel caso delle Leucemie Mieloidi Acute, è il midollo osseo, ossia quello interessato da malattia, e/o campioni di sangue periferico (11).

L'identificazione di caratteristiche traslocazioni, inversioni, delezioni, monosomie e trisomie sono state riportate in quasi il 55% dei casi di LAM, hanno contribuito in modo significativo alla comprensione scientifica della sua patogenesi molecolare (12), identificano sottogruppi di leucemie con un comportamento clinico e una prognosi diversa e sono quindi indispensabili per la corretta diagnosi; inoltre, recentemente queste vengono anche trattate con protocolli terapeutici distinti e la presenza di alcune anomalie specifiche comporta in alcuni casi la possibilità di utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare.

Storicamente è importante ricordare come nel 1972 “de la Chapelle et al.” avessero riportato una sola trisomia del cromosoma 8, e nel 1973, Janet D. Rowley avesse descritto una traslocazione reciproca $t(8;21)$ che sono, rispettivamente, anomalie numeriche e strutturali che in seguito si sono dimostrate essere tra le aberrazioni cromosomiche ricorrenti più frequenti e clinicamente rilevanti nella LAM (13).

Oggigiorno, invece, sono state identificate oltre 300 anomalie cromosomiche nei pazienti con LAM, anche se tendenzialmente lo sviluppo di una malattia conclamata è dato dall'acquisizione di diverse mutazioni perché una sola non risulta essere sufficiente. (11)

Approssimativamente, però, è anche da tenere in conto come il 40% dei pazienti con LAM presenti cariotipo normale senza anomalie citogenetiche identificabili con le moderne tecniche di citogenetica e con il metodo di ibridazione in situ (FISH). (14)

Un fondamentale passo in avanti nella comprensione di questa malattia è stato permesso dallo sviluppo di tecniche per il sequenziamento dell'intero genoma, che ha fatto emergere quanto la malattia sia complessa e dinamica. (15)

Sebbene la classificazione genomica non presupponga rilevanza clinica, la sua base su mutazioni causali potrebbe plausibilmente fornire un ponte dalle caratteristiche molecolari a quelle cliniche della malattia. (15)

2.2) Driver mutations

Il termine “driver mutations” si utilizza per identificare le alterazioni di sequenze nucleotidiche dei geni che fanno sì che le cellule interessate evolvano verso un fenotipo tumorale e, in quanto tali, inizino a proliferare in modo anomalo. (16)

Questo concetto è chiaramente comune a tutte le patologie neoplastiche, ma ragionamenti più specifici possono essere fatti nell’ambito della LAM; in questa patologia esistono numerosi geni che possono essere studiati, anche se la maggior parte sono raramente mutati, e i pazienti in genere presentano più di una mutazione driver.

Al riguardo sono stati svolti numerosi studi che hanno permesso di identificare almeno una driver mutation nel 96% dei campioni e 2 o più nell’86%; di queste, le mutazioni puntiformi rappresentavano il 73% e spesso erano più frequenti nei pazienti con LAM classificata come a rischio intermedio. (15)

La malattia tende poi ad evolvere nel tempo, con più cloni che coesistono in qualsiasi momento; sembrano esserci correlazioni anche con l’età del paziente, che risulta proporzionale al numero di driver mutations presenti; in particolare, pazienti al di sopra dei 60 anni presentano più frequentemente alcune mutazioni, quali quelle a carico di *RUNX1*, *TET2*, *IDH2*, *SRSF2*, *TP53*, *BCOR* e *SF3B1*, mentre più raramente presentano mutazioni di *WT1*. Questi dati contribuiscono alla comprensione delle differenze biologiche intrinseche della LAM tra pazienti giovani e anziani.

La struttura delle driver mutations identifica sottogruppi non sovrapposti di pazienti, consentendo una classificazione completamente genomica della LAM; si distinguono mutazioni driver frequentemente co-mutate, suggerenti un sinergismo funzionale, ma anche sottogruppi non sovrapposti e con esiti divergenti che probabilmente sono indicativi di percorsi di leucemogenesi differenti. (17)

Sebbene le conseguenze cliniche di molte alterazioni genetiche siano ancora in studio e non del tutto note, queste potrebbero diventare nel tempo marcatori molecolari utili per la diagnosi, la prognosi, la previsione della risposta al trattamento, nonché diventare possibili bersagli terapeutici. (17)

Recenti studi hanno anche valutato il fenomeno della emopoiesi clonale legata all’età (ARCH), ossia l’accumularsi di mutazioni ricorrenti della LAM nelle cellule staminali emopoietiche in individui sani durante l’invecchiamento. (18)

Lo scopo è quello di predire il rischio di sviluppare LAM de novo tramite un modello basato sulla presenza di mutazioni puntiformi, con l'obiettivo finale di identificare una popolazione ad elevato rischio su cui possa aver senso effettuare uno screening genetico mirato.

È stato riscontrato un numero più elevato di mutazioni ARCH-PD nei pazienti pre-LAM rispetto ai controlli, tra l'altro in pazienti significativamente più giovani; i geni più frequentemente interessati sono *DNMT3A* e *TET2*, mentre non sono state identificate mutazioni a carico di *NPM1*, *FLT3* e *CEBPA*, suggerendo come tali eventi tendano a presentarsi tardivamente nello sviluppo della malattia. (19)

Dal punto di vista quantitativo, la presenza di queste mutazioni comporta nel paziente un rischio raddoppiato di sviluppare LAM, con alcune eccezioni; infatti, *DNMT3A* e *TET2* mutati conferiscono un rischio minore di evoluzione, mentre *TP53* e *U2AF1* mutati un rischio maggiore. (19)

Lo stesso studio ha provato ad identificare un altro modello, incentrato invece su informazioni cliniche che vengano raccolte di routine nella pratica clinica e che risultino correlate ad aumentato rischio di sviluppare LAM; in particolare sono stati valutati come significativi una ridotta conta di monociti, piastrine, eritrociti e globuli bianchi; tale riduzione risulta essere sottosoglia, cioè non tale da far rientrare nella categoria di citopenie clinicamente rilevanti.

Un'altra associazione significativa identificata è stata quella con una maggior ampiezza di distribuzione dei globuli rossi (RDW), che risulta correlata a infiammazione, malattie cardiovascolari, eritropoiesi inefficace e sviluppo di LAM con esiti avversi. (19)

2.2.1) Traslocazioni

La traslocazione cromosomica è una mutazione caratterizzata da una parte o un intero cromosoma che si distacca per attaccarsi poi ad un cromosoma differente.

La traslocazione t(8;21) coinvolge la proteina AML1, detta anche *RUNX1*, e porta allo sviluppo di una proteina di fusione della AML1-ETO, che svolge un ruolo nello sviluppo, nella differenziazione e nella fusione delle cellule staminali ematopoietiche; (11) questa è identificabile nel 13% dei casi di LAM ed è particolarmente frequente nelle forme pediatriche. Per la sua rilevazione si utilizza la RT-PCR. (12)

La traslocazione t (15;17) porta alla formazione del gene *PML-RAR α* , che origina dalla fusione del recettore α dell'acido retinoico con il fattore di trascrizione PML; l'effetto è di inibizione della trascrizione dei geni bersaglio, impedendo la differenziazione dei promielociti; questa caratterizza infatti il 90% dei casi di leucemia promielocitica acuta. L'analisi che permette di dimostrarne la presenza è la FISH. (12)

In una piccola frazione (<1%) di questi pazienti, *RAR α* è fuso con geni diversi da *PML*, come risultato di riarrangiamenti tra il cromosoma 17 e i cromosomi 3, 4, 5 o 11. La determinazione dell'esatta fusione genica è essenziale perché informa il medico curante se il paziente possa rispondere ad una terapia con acido all-trans retinoico (ATRA) e/o triossido di arsenico (ATO). (11)

La traslocazione t (9;11) comporta lo sviluppo del gene di fusione *KMT2A-MLLT3* che induce un aumento della trascrizione del gene bersaglio, si associa ad una miglior prognosi qualora interessi la popolazione pediatrica e può essere identificata mediante analisi del cariotipo, FISH e RT-PCR. (12)

Più rara, infine, è la traslocazione t (6;9), che costituisce un sottotipo raro. (15)

2.2.2) Inversioni

Le inversioni sono aberrazioni cromosomiche in cui il cromosoma si rompe e ruota di 180° per poi riattaccarsi in sede di rottura.

Una delle più frequenti nella LAM è l'inv (16) che coinvolge il gene *CBFB*; essa impedisce l'azione di geni regolatori ed inibisce fattori di trascrizione. Risponde bene ad alte dosi di Citarabina, per questo si associa a prognosi favorevole.

Un'altra inversione da ricordare è l'inv (3), per quanto più rara, che porta alla formazione del trascritto *RPNI-EVII*, con la quale quest'ultimo viene attivato stimolando la proliferazione cellulare. Essa si associa a prognosi estremamente sfavorevole e tipicamente si presenta in pazienti adulti affetti da anemia.

Infine, vi è l'inv (8), che può essere l'unica aberrazione presente nella leucemia acuta monocitica o mielomonocitica. (12)

2.2.3) Delezioni

Le delezioni cromosomiche sono l'eliminazione di una o più parti dei cromosomi, che spesso portano a difetti di funzionamento degli oncosoppressori, agendo così da promotori della leucemogenesi.

Tra queste vi è la delezione 9q, considerata un fattore di rischio intermedio; recentemente è stato stabilito il riscontro frequente di altre aberrazioni concomitanti a questa, quali *RUNX1-RUNX1T1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *WT1*, *NPM1*, *NUP98*, t(15;17) e t(8;21).

Vi è poi la delezione 5q, comune anche nelle mielodisplasie ad alto rischio, che si associa a prognosi sfavorevole e ridotti tassi di remissione completa; la sua identificazione può avvenire mediante FISH o NGS.

Un'altra delezione importante, per quanto rara, è quella del 20q, correlata a prognosi favorevole in pazienti che tendono ad avere un basso livello di blasti nel midollo osseo ed un'elevata conta reticolocitaria. (12)

2.2.4) Aneuploidie

Le aneuploidie sono la perdita o il guadagno di un intero cromosoma correlato ad un difetto di segregazione durante la mitosi; esse sono correlate a prognosi sfavorevole.

La monosomia 7 è identificabile non solo nella LAM nel 5-7% dei casi ma anche nelle sindromi mielodisplastiche; spesso si sviluppa come anomalia secondaria in forme caratterizzate da inv (3), nelle quali si identifica una prognosi ancora peggiore. (12)

La trisomia 8 è l'aberrazione in assoluto più frequente nella LAM, dove costituisce il 9-15% dei casi; anche questa si può presentare come anomalia secondaria associata a t(8;21), t(9;11), t(15;17) e inv (16). (12)

Infine, un ruolo importante è svolto anche dalla trisomia 21, seconda per frequenza, soprattutto associata a leucemia megacarioblastica acuta con mutazioni di *GATA1*. (12)

2.2.5) *NPM1*

Un gene frequentemente mutato nella LAM è *NPM1*, alterato nel 30% dei pazienti. (20) Normalmente la proteina che deriva dal gene *NPM1* si trova nel nucleo, mentre quella *NPM1*-mutata è localizzata nel citoplasma, ed è per questo che viene anche chiamata “*NPM1c*”. Fisiologicamente *NPM1* viene coinvolta nello chaperon degli istoni, nella generazione dei ribosomi, nella duplicazione dei centrosomi e nella risposta al danno al DNA (21); la sua importanza in ambito oncologico è poi stata dimostrata mediante riposizionamento di *NPM1c* dal citoplasma al nucleo; questo, infatti, causa un completo arresto della crescita tumorale nell’arco di due settimane. (22)

Dal punto di vista prognostico, si associa ad elevati tassi di remissione in risposta a cicli di chemioterapia intensiva, in particolare in assenza di *FLT3-ITD* oppure in caso di rapporto allelico *FLT3-ITD* basso (23), soprattutto nei pazienti più anziani. (17)

2.2.6) Mutazioni che interferiscono con la trasduzione del segnale

Mutazioni a carico del fattore di crescita transmembrana correlato a *FMS Tirosin Chinasi 3 (FLT3)* si osservano nel 20-25% dei casi; (20) queste portano all’attivazione costitutiva di vie di segnalazione quali *RAS/MAPK*, *STAT5* e *PI3K/AKT/mTOR* (24).

I pazienti interessati sono frequentemente caratterizzati da leucocitosi, elevate percentuali di blasti nel midollo osseo e tipicamente la prognosi è sfavorevole, soprattutto in presenza di un alto carico allelico *ITD*, di *DNMT3A* oppure in assenza di *NPM1*.

Un importante aspetto da tenere presente è però la possibilità di effettuare una terapia mirata tramite inibitori di *FLT3*, che hanno ribaltato la pratica clinica. (20)

Un’altra importante mutazione, anche se più rara, ossia presente in meno del 10% dei pazienti, è quella a carico di *KIT* (detto anche CD117), che è una Tirosin Chinasi del recettore della glicoproteina transmembrana di tipo III; il suo effetto è di attivazione di vie di segnalazione, quali per esempio *JAK/STAT*, che favoriscono proliferazione e differenziazione cellulare. (25)

Mutazioni si possono anche verificare a carico di *RUNX1*, il principale fattore di trascrizione ematopoietico; questo si osserva nel 5-15% dei casi, più comunemente nei pazienti con citogenetica avversa, intermedia o non complessa, (17) sono mutualmente esclusive con quelle a carico di *NPM1* e *CEBPA* e si associano a ridotti tassi di remissione

completa e scarsa sopravvivenza globale (26), soprattutto in pazienti di età inferiore ai 60 anni, probabilmente perché in questi risulta più complesso il raggiungimento di una remissione completa. (17)

CEBPA è un fattore di trascrizione mutato nel 10% dei pazienti affetti da LAM, soprattutto giovani e si associa ad elevata chemio-sensibilità, per cui conferisce una prognosi favorevole. (20)

Infine, *GATA2* è un fattore coinvolto nella regolazione della differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche e si trova mutato in meno del 5% dei casi. (20)

2.2.7) Mutazioni a carico dei modificatori epigenetici

Esistono numerose alterazioni a carico di geni coinvolti nei processi di modificazione epigenetica; tra questi è importante ricordare la *DNA metiltransferasi 3A (DNMT3A)*, che troviamo alterata nel 30% dei casi, spesso in associazione a *NPM1* e *FLT3-ITD*, con le quali conferisce una prognosi infausta (27), soprattutto in pazienti di età inferiore ai 60 anni poiché, come nei casi di mutazione di *RUNX1*, risulta più complesso il raggiungimento di remissione completa. (17)

La sua importanza è relativa al fatto di conferire un papabile bersaglio terapeutico, attualmente oggetto di studio, essendo uno dei primi eventi della leucemogenesi. (28)

Anche mutazioni a carico delle *DNA Diossigenasi α -Chetoglutarato dipendenti (TET1-3)* sono riscontrabili in un'alta percentuale di pazienti, in particolare nel 20%, con il risultato di indurre un'inattivazione, essendo proteine con funzione di soppressore tumorale. (20)

Ulteriori varianti importanti da ricordare sono le mutazioni a carico dell'*Isocitrato Deidrogenasi 1 e 2 (IDH1-2)*, riscontrabili rispettivamente nel 5-10% e nel 15-20% dei pazienti, il cui ruolo è ancora ritenuto controverso, probabilmente perché influenzato da co-mutazioni quali quelle a carico di *NPM1*.

Esistono due farmaci, Ivosidenib e Enasidenib, che agiscono da inibitori enzimatici selettivi di *IDH1-2* e che sono stati approvati per pazienti affetti da LAM refrattaria o recidiva di malattia. (29) (30)

Nel 10-20% dei pazienti, prevalentemente anziani, si riscontra mutata la *Additional Sex Combs-like 1 (ASXL1)*; si correla a prognosi infausta, di solito in associazione alla mutazione di *RUNX1*, nonostante sia ancora oggetto di studi poiché non risulta ancora chiaro se tale mutazione comporti una perdita o un guadagno di funzione. (31)

Mutazioni più rare, ma comunque importanti da citare, sono quelle a carico del Potenziatore dell'Omologo *Zeste 2 (EZH2)* che presentano funzione soppressiva nella LAM e nelle sindromi mielodisplastiche, mentre nelle neoplasie linfoidi portano ad un guadagno di funzione. (20)

Infine, vi sono le mutazioni a carico del coespressore di *BCL6 (BCOR)* e del suo ligando (*BCORL1*) che si riscontrano solamente nel 4% dei casi e che comportano un rischio prognostico infausto. (32)

2.3) Mutazioni a carico di geni oncosoppressori

2.3.1) *WT1*

Il gene *WT1* codifica per un fattore di trascrizione mutato in meno del 10% dei pazienti e che comporta un deficit di differenziazione della linea cellulare ematopoietica. (33)

La sovra-espressione di *WT1* si osserva nella maggior parte dei pazienti alla diagnosi, ma scompare in caso di remissione completa post-chemioterapia, per cui viene considerato come potenziale biomarcatore per identificare un'eventuale malattia minima residua (MRD) post terapia. (34)

Complessivamente la mutazione a suo carico, in particolare il polimorfismo rs16754, si associa a miglior sopravvivenza, quindi costituisce un fattore prognostico favorevole. (35)

2.3.2) *TP53*

Il gene *TP53* si trova nel sito cromosomico 17p13 (36) e codifica per il fattore di trascrizione P53, un oncosoppressore frequentemente mutato nelle patologie oncologiche; la sua funzione è quella di controllare i checkpoint che regolano l'avvio

della replicazione del DNA e della mitosi, di conseguenza tale controllo sulla crescita cellulare viene a mancare in corso di neoplasia.

Per inattivare completamente un gene oncosoppressore servono due mutazioni poiché le cellule dei mammiferi sono diploidi, quindi devono essere interessati entrambi gli alleli; (6) nel caso di *TP53*, queste sono tipicamente mutazioni missenso che si localizzano principalmente a livello del sito di legame con il DNA, comportando un legame ridotto o assente con quest'ultimo; (37) la presenza di queste si esclude a vicenda con le mutazioni in *NPM1*, *RUNX1*, *FLT3-ITD* e *CEBPA*. (20)

Le mutazioni più comuni si trovano nei codoni 175, 220, 248 e 273. (38)

Molte mutazioni missenso portano ad una stabilizzazione della proteina, a differenza della wild-type che invece presenta un'emivita breve; quindi, questo ne rende possibile l'individuazione mediante tecniche di immunocistochemica. (39)

Nei tumori solidi le mutazioni di *TP53* sono più frequenti, soprattutto per quanto riguarda i tumori ovarici, dove l'incidenza risulta essere del 48%, seguiti poi da tumori colon-rettali, esofagei e del distretto testa-collo; (37) esiste anche una sindrome associata a mutazioni germinali di questo gene, che prende il nome di Li Fraumeni, ma nella quale si riscontrano casi di LAM sono nel 5% dei casi. (40)

Nei pazienti con LAM, invece, *TP53* si riscontra mutata nel 12,7% dei casi; (37) questi sono generalmente caratterizzati da instabilità genomica, motivo per cui tale condizione comporta una scarsa sensibilità alla chemioterapia ed una ridotta sopravvivenza globale, che mediamente si aggira sui 5-9 mesi (41) indipendentemente dall'età del paziente. (17) Le alterazioni strutturali a cui tipicamente si associa sono delezioni, soprattutto dei cromosomi 5, 7 e 17 ed eventi di cromotripsia. (37)

Frequentemente tali mutazioni si individuano in pazienti di età avanzata, con una ridotta conta di blasti, sia periferici che nel midollo osseo, cariotipo avverso ed esposizione precedente a chemioterapia; sono state osservate anche varianti di *TP53* in una piccola frazione di cellule prima dell'esposizione alla chemioterapia, quindi sembra che queste forniscano un vantaggio selettivo durante la pressione evolutiva indotta dalla terapia.

Nonostante si possano trovare in quasi tutti i sottotipi di LAM secondo la classificazione FAB, sono più frequenti nelle forme M6, ossia quelle ricche di eritroblasti, nelle quali è stato identificato un cross-talk diretto tra *TP53* e *GATA1*. (37)

Per quanto riguarda le opzioni terapeutiche, la chemioterapia non risulta particolarmente efficace a causa della resistenza all'apoptosi indotta da *TP53* stessa, ma d'altra parte i pazienti non trattati con chemioterapia hanno avuto esiti ancora peggiori. (42)

In diversi studi è stato valutato l'utilizzo di Decitabina con risposte iniziali coerenti, ma clearance delle mutazioni incomplete e ricadute frequenti, quindi sicuramente ulteriori studi dovranno essere svolti al riguardo. (43)

Il gene *TP53* esprime in realtà non solo una proteina P53, ma 12, dette isoforme, mediante l'utilizzo di splicing, promotori e start della trascrizione alternativi. (44)

La prima dimostrazione dell'attività biologica delle isoforme endogene di P53 risale agli esperimenti di silenziamento genico dopo l'iniezione di P53 morpholino in embrioni di zebrafish. (45)

È stato scoperto come tali isoforme possano predire il tipo di neoplasia, per esempio carcinoma a cellule squamose dell'esofago, della prostata, delle ovaie, del rene, della mammella e leucemia mieloide acuta. (46)

Sono in corso studi per valutare se alcune isoforme di P53 possano essere sfruttate come biomarcatori per prevedere la risposta alla terapia; in particolare è stato dimostrato in vitro che pazienti con elevati livelli di P53 full length e bassi livelli di P53 β/γ siano più sensibili al trattamento con Acido Valproico, (46) tuttavia queste informazioni dovranno essere in futuro confermate da studi più estesi.

Ulteriori studi hanno invece suggerito una prognosi sfavorevole correlata ad un alto rapporto di P53 full length rispetto alle isoforme; infatti, queste ultime sembrano correlarsi a migliori risposte alla chemioterapia ed aumento della sopravvivenza. (47) (48)

3) CAPITOLO 3: Trattamento

3.1) Pazienti giovani (< 60-65 anni)

Nei pazienti di giovane età l'obiettivo della terapia è quello di eradicare la malattia, per questo motivo è importante che questa venga iniziata subito dopo il completamento diagnostico, con il minor ritardo possibile.

Il trattamento viene suddiviso in due fasi, ossia l'induzione e il consolidamento; il primo è volto ad indurre in remissione completa la patologia, il secondo ad evitare che questa possa andare incontro a ricadute eliminando eventuali cellule leucemiche residue. (23)

- Terapia di induzione

Il cardine della chemioterapia intensiva è costituito da Antracicline e Citarabina con uno schema noto come 7+3, che prevede la somministrazione endovena (ev) in infusione continua per 7 giorni di 100 mg/m² di Citarabina e 40 mg/m² di Antracicline quali Daunorubicina o Idarubicina ai giorni 1, 3 e 5. (23)

A questo può essere associata la somministrazione di Gemtuzumab-Ozogamicin nei pazienti con rischio citogenetico favorevole o intermedio; questo farmaco è un anticorpo monoclonale IgG4 anti-CD33 umanizzato associato a Calicheamicina, una sostanza citotossica. (49)

Esiste anche la possibilità, oramai diventata uno standard nella pratica clinica, di associare Midostaurina, un farmaco inibitore delle chinasi, nei pazienti *FLT3*-mutati, poiché ha dimostrato un aumento della sopravvivenza globale a 4 anni del 7,1% (50).

Uno studio che ha randomizzato pazienti trattati con tale terapia vs placebo ha però identificato nel braccio trattato da Midostaurina un incremento di incidenza di rash e tossicità gastroenterica.

Attualmente sono in studio anche inibitori di *FLT3* potenzialmente più potenti. (50)

Una valida alternativa può essere la terapia con CPX-351, che è una formulazione liposomiale contenente un doppio farmaco, ossia Citarabina e Daunorubicina in rapporto fisso 5:1; questo è stato studiato in pazienti con LAM correlata a terapia, LAM evoluta a partire da mielodisplasie e forme de novo ma con anomalie citogenetiche correlate a mielodisplasia e ha portato ad un miglioramento della sopravvivenza globale del 20%

rispetto allo schema tradizionale 7+3. (51) D'altra parte, è da sottolineare come questa opzione terapeutica si associ ad un recupero ritardato di neutrofili e piastrine di circa 7 giorni ed un aumentato rischio di sanguinamenti, nonostante la mortalità precoce non ne sia inficiata. (23)

Si parla di remissione completa con incompleto recupero ematologico nei casi in cui i blasti midollari vengono ridotti < 5% nel midollo osseo ma senza che i neutrofili risultino > 1.000/ μ l o le piastrine > 10.000/ μ l; questa situazione si associa ad un out-come peggiore rispetto alla remissione completa vera e propria. (52)

- Terapia di consolidamento

La terapia di consolidamento si attua dopo il raggiungimento della remissione completa e si basa sulla somministrazione di Citarabina. (53)

Il dosaggio è variabile a seconda che il paziente sia candidato o meno ad allo-trapianto in base alla stratificazione del rischio e alla disponibilità di un donatore; in caso di pazienti non candidati a trapianto, sono previsti 3 cicli di consolidamento alla dose intermedia di 2.000 mg/m² * 2 somministrati ai giorni 1, 3 e 5, mentre nei pazienti da trapiantare si possono fare fino ad un massimo di 3 cicli, ma con l'obiettivo di effettuarne il minor numero possibile, ad un dosaggio di 2.000 mg/m² ai giorni 1 e 4; in questi pazienti deve trascorrere un periodo tra la ripresa dall'ultimo ciclo ed il trapianto di massimo 30 giorni. (54)

- Terapia di mantenimento

La terapia di mantenimento prevede la somministrazione di chemioterapici limitati nel tempo ed a tossicità ridotta rispetto ai cicli precedenti, sempre con l'obiettivo di ridurre la probabilità che il paziente vada incontro a recidive. Sono stati effettuati diversi studi in cui questa fase prevedeva l'assunzione di Azacitidina sia orale che sottocute, tuttavia sono limitati e presentano analisi ancora da approfondire. (55) (56)

Una possibile alternativa consiste nella somministrazione di Midostaurina in coloro che l'abbiano già utilizzata nella fase di induzione. (50)

3.2) Pazienti tra i 60-75 anni eleggibili a chemioterapia intensiva

L'età media di incidenza della LAM è di circa 67 anni per cui il trattamento dei pazienti in fascia d'età tra i 60 e i 75 risulta essere quello più importante dal punto di vista epidemiologico.

I pazienti anziani, inoltre, sono più frequentemente caratterizzati da comorbidità anche severe, citogenetica più sfavorevole e maggior resistenze ai farmaci. (57)

Una volta tutto questo portava a non trattare tali pazienti nel timore delle morbilità e mortalità correlate al trattamento, ma è stato invece dimostrato come la sopravvivenza globale sia migliore nei pazienti trattati sia rispetto ai non trattati (58) che rispetto a quelli che venivano trattati ma con terapie a ridotta tossicità. (59)

La terapia di prima linea è sovrapponibile a quella utilizzata nei pazienti al di sotto dei 60 anni con dosi aggiustate per età; lo schema utilizzato è il FLAI 4, che prevede la somministrazione di Citarabina 2.000 mg/m² e Fludarabina 30 mg/m² ai giorni 1 e 4 e Idrarubicina 10 mg/m² ai giorni 1, 2 e 4. (23)

I pazienti che meglio rispondono a tale chemioterapia sono risultati essere quelli con mutazioni di *NPM-1* in assenza di mutazioni di *FLT-3* con motivazioni però ancora da chiarire. (60)

Allo schema convenzionale possono essere anche associati Midostaurina o Gemtuzumab-Ozogamicin.

Un'alternativa a tale combinazione consiste nella somministrazione di CPX-351. (23)

3.3) Pazienti > 75 anni o non eleggibili a chemioterapia intensiva

Nei pazienti anziani al di sopra dei 75 anni o non eleggibili a cicli di chemioterapia intensiva, le opzioni terapeutiche sono fondamentalmente due, ossia l'utilizzo di sostanze ipometilanti associate o meno a Venetroclax oppure il Best Supportive Care; (57) questi trattamenti chiaramente si associano a tassi di remissione completa più bassi (10-20%). (61)

La terapia ipometilante consiste nella somministrazione di Azacitidina, come prima scelta, oppure Decitabina da riservare a casi eccezionali perché associata a tassi di remissione completa del 10% rispetto al 20% dell'Azacitidina.

La combinazione di questi farmaci con il Venetoclax, che è un inibitore di *BCL2*, ha portato ad un'aumentata incidenza di remissione completa ed un miglioramento della sopravvivenza globale. (62)

Nei pazienti in cui gli Ipometilanti non possano essere utilizzati, l'alternativa è costituita dall'associazione di Venetoclax e Citarabina a basso dosaggio. (63)

Un altro importante farmaco che trova applicazione in questi casi è l'Ivosidenib, un inibitore di *IDH1*, efficace nel migliorare la sopravvivenza nei pazienti mutati per tale gene, motivo per cui uno screening rapido di tale mutazione risulta essere sempre raccomandato. (64)

Il Best Supportive Care, invece, è indicato in quei pazienti con gravi comorbidità o molto anziani che non tollererebbero neanche cicli meno tossici di terapia; questo consiste nella somministrazione di terapie di supporto, quali trasfusioni e antibiotici, eventualmente associati a farmaci citoriduttivi, come per esempio Idrossiurea, 6-Mercaptopurina, Tioguanina o Melphalan. (57)

3.4) Trapianto di cellule staminali

Il trapianto allogenico è una procedura che consiste nell'infusione di cellule staminali ematopoietiche di un donatore sano in un ricevente precedentemente sottoposto ad un regime mieloablativo che tramite cicli di chemioterapia abbia indotto soppressione del sistema immunitario. Esso risulta però essere non scevro da rischi e per questo da mettere in atto solo nei pazienti in cui andrebbe a migliorare la Overall Survival, tenendo conto di rischi e benefici (65), anche perché le evidenze dimostrano un aumento della sopravvivenza nei regimi caratterizzati da dosi più elevate di chemioterapici. (66)

In particolare, dovrebbe essere preso in considerazione nei pazienti con LAM a rischio citogenetico avverso e nella maggior parte di quelli a rischio intermedio, in cui l'incidenza attesa di recidiva senza trapianto supera il 35%; nei pazienti a rischio favorevole si può valutare l'utilizzo di tale procedura solamente nel caso di persistenza di malattia residua post chemioterapia. (23)

Altri fattori da tenere in considerazione nella scelta sono il tipo di donatore a disposizione, le comorbidità, soprattutto al sopra dei 60 anni, e la volontà del paziente.

Uno strumento utile in questa scelta è lo score di rischio della “European Society of Blood and Marrow Transplantation” che tiene in considerazione i fattori di rischio della malattia in base alla citogenetica e allo stadio nonché i fattori di rischio del paziente. (67)

Attualmente esistono diversi metodi e fonti di cellule staminali ematopoietiche; per quanto riguarda le fonti, queste consistono in midollo osseo, sangue periferico, mediante la somministrazione di fattori di crescita ricombinanti che inducono mobilitazione delle cellule staminali, e sangue da cordone ombelicale; il tipo di trapianto può essere singenico in caso di gemelli omozigoti, aplo-identico in caso di fratelli o parenti compatibili oppure allogenico da donatore estraneo mediante banche dati.

Attualmente sono in corso studi che valutino opzioni terapeutiche da associare al trapianto per ridurre la probabilità che il paziente vada incontro a recidive, poiché questa risulta essere la causa principale di morte, seguita come frequenza dalla Graft Versus Host Disease (GVHD) cronica. (68)

Secondo lo studio Ernest non sembrano essere significativi l'età del paziente, la fonte di cellule staminali né la corrispondenza di HLA tra donatore e ricevente. (69)

Non è stata dimostrata l'utilità di cicli aggiuntivi di chemioterapia pre-trapianto oltre ai 2 cicli classicamente previsti, mentre sembra che sia vantaggioso l'utilizzo di inibitori di *FLT3*, in particolare il Sorafenib, nei pazienti caratterizzati da mutazione di tale gene. (70)

Dopo lo sviluppo di recidive, invece, è dimostrato che questi pazienti rispondano bene ad un altro inibitore di *FLT3*, Glitertinib, che comporta un miglioramento della sopravvivenza in modo equivalente rispetto a schemi di chemioterapia intensiva. (71)

3.5) Terapia di supporto

Affinché la terapia oncologica sia efficace, essa deve essere affiancata ad una terapia di supporto di cui il paziente necessita sia per la condizione di base da cui è affetto, sia per i regimi di chemioterapia a cui viene sottoposto.

Sono essenziali trasfusioni sia piastriniche che di globuli rossi per mantenere una conta che sia rispettivamente di almeno 10.000 piastrine/ μ l e 8 g/dl di emoglobina; questi cut-

off sono validi in assenza di episodi di sanguinamento o CID, nei quali casi andrebbero aumentati per soddisfare le esigenze dell'organismo.

Nei pazienti affetti da LAM tutti gli emoderivati somministrati devono sempre essere stati precedentemente irradiati così da prevenire episodi di GVHD.

Per quanto riguarda invece lo stato di neutropenia, risulta essenziale una terapia profilattica poiché le complicanze infettive costituiscono la principale fonte di mortalità e morbilità durante la somministrazione di chemioterapia.

In tutti i pazienti vengono somministrati antibiotici ad ampio spettro, come ad esempio i fluorochinoloni, ed antifungini, come il Flucanazolo, mentre gli antivirali sono indicati solamente nei pazienti sieropositivi per Herpes Simplex Virus e/o Virus della Varicella Zoster.

Esiste anche la possibilità di utilizzare fattori di crescita ricombinanti delle cellule ematopoietiche, ma il loro utilizzo è limitato nella LAM e di sicuro sconsigliato nei pazienti sottoposti a regimi di trattamento palliativo.

Nonostante i protocolli di profilassi, episodi febbrili si sviluppano nella maggior parte dei pazienti e solo nella metà dei casi vengono documentate infezioni dal punto di vista laboratoristico; all'esordio dei sintomi deve essere iniziata una terapia antibiotica empirica ad ampio spettro che comprenda una copertura per ceppi GRAM- tenendo conto dell'epidemiologia delle resistenze del proprio ospedale. A questa, vanno anche associati antifungini nel caso in cui la febbre persista per 4-5 giorni dopo l'inizio dell'antibiotico.

(6)

3.6) Effetti collaterali delle terapie

La chemioterapia classica presenta un'attività citotossica poco selettiva, per cui tende a danneggiare sia le cellule neoplastiche che quelle normali, in particolare quelle con elevato indice proliferativo come le cellule ematopoietiche e quelle della mucosa gastroenterica. (72)

La tossicità ematologica nei pazienti affetti da LAM è particolarmente grave perché si associa alle alterazioni indotte dai blasti che proliferano occupando lo spazio dei precursori midollari; è importante trattarla precocemente perché condiziona sia la dose

che l'intervallo tra due cicli contigui di trattamento, quindi può compromettere la prognosi del paziente.

Il primo elemento che tende a presentarsi è la neutropenia, non perché i globuli bianchi siano più sensibili alla citotossicità, che risulta invece intaccare ugualmente tutte e tre le linee ematopoietiche, ma perché sono gli elementi a emivita più breve.

La riduzione massima delle cellule, definita nadir, si sviluppa tipicamente 7-10 giorni dopo la chemioterapia.

Esiste uno strumento che ci permette di quantificare il grado di severità della tossicità, suddividendo in 4 gradi in base a livelli cut-off di neutrofili, piastrine ed emoglobina e prende il nome di Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE).

Il grado 1 si identifica per:

- Numero di neutrofili al di sopra o pari a 1.500/ μ l;
- Numero di piastrine al di sopra o pari a 75.000/ μ l;
- Emoglobina al di sopra o pari a 10 g/dl.

Il grado 2 si determina per:

- Numero di neutrofili compresi tra 1.000 e 1.500/ μ l;
- Numero di piastrine compresi tra 50.000 e 75.000/ μ l;
- Emoglobina compresa tra 8 e 10 g/dl.

Il grado 3 è definito per:

- Numero di neutrofili compresi tra 500 e 1.000/ μ l;
- Numero di piastrine compresi tra 25.000 e 50.000/ μ l;
- Emoglobina compresa inferiore a 8 g/dl.

Infine, il grado 4 presenta:

- Numero di neutrofili inferiori a 500/ μ l;
- Numero di piastrine inferiori a 25.000/ μ l;
- Emoglobina inferiore a 6,5 g/dl, che costituisce una condizione a rischio di vita.

Si parla di neutropenia quando i neutrofili circolanti scendono al di sotto di 2.000/ μ l e di neutropenia febbrile quando riscontriamo neutrofili al di sotto di 500/ μ l associati ad una temperatura di almeno 38,5°C per almeno un'ora; nei casi in cui il paziente sia ad alto rischio per neutropenia febbrile oppure a rischio intermedio ma con fattori predisponenti l'infezione, come un'età al di sopra dei 65 anni o un alterato performance status, è

indicata la profilassi primaria con G-CSF 24-72 h dopo la chemioterapia. In caso di neutropenia G4, i G-CSF vengono invece utilizzati come terapia.

Si parla di trombocitopenia, invece, quando le piastrine scendono al di sotto di 150.000/ μ l; in questo caso non esistono fattori di crescita quindi il trattamento prevede, quando si scende al di sotto di 20.000/ μ l, la trasfusione di concentrati piastrinici.

L'anemia, infine, è l'alterazione ematologica più frequente poiché si sviluppa in seguito alla citotossicità del chemioterapico, all'infiltrazione midollare da parte dei blasti e all'effetto inibitorio di citochine infiammatorie.

Essa è definita per valori di emoglobina al di sotto di 14 g/dl nell'uomo e 12 g/dl nella donna; i sintomi a cui si correla possono essere blandi come astenia e pallore di mucose e cute, ma anche più severi come dispnea, palpitazioni, soffi cardiaci, angina da discrepanza e letargia.

Il trattamento si basa principalmente su trasfusioni di emazie quando l'emoglobina scende al di sotto di 8 g/dl, ma in taluni casi possono essere anche utilizzati fattori eritropoietici o supplementi marziali o di vitamine. (73)

Parlando invece di tossicità gastroenterica, in primis va ricordata l'emesi, che si associa frequentemente alla chemioterapia; il meccanismo fisiopatologico alla base di questo fenomeno è complesso e si basa principalmente sulla stimolazione di due strutture che sono il centro del vomito, localizzato a livello del bulbo, e la chemoreceptor trigger zone, situata in corrispondenza del quarto ventricolo.

Il trattamento si può avvalere di diversi farmaci, somministrabili anche in profilassi, quali corticosteroidi, antidopaminergici, antiserotoninergici e antagonisti dei recettori NK1.

Si possono classificare diversi tipi di emesi in base alle caratteristiche temporali con cui insorgono:

- Emesi acuta, che si sviluppa entro 24 h dalla somministrazione della chemioterapia;
- Emesi ritardata, che si sviluppa invece dopo 24 h;
- Emesi anticipatoria, che si verifica prima della somministrazione del chemioterapico e si associa a meccanismi psicologici correlati al ricordo del malessere insorto dopo la precedente somministrazione;

- Emesi breakthrough, che insorge entro 5 giorni dalla somministrazione della chemioterapia in pazienti sottoposti a profilassi anti-nausea;
- Emesi refrattaria, che non risponde alla somministrazione di farmaci antiemetici.

L'effetto tossico della chemioterapia sulle mucose gastroenteriche porta a fenomeni comunemente definiti come mucositi, che comprendono stomatiti, esofagiti, enteriti e proctiti; queste tendono a presentarsi dopo circa 7 giorni dalla somministrazione della terapia e permangono per una o due settimane.

La mucosa danneggiata diventa più suscettibile a infezioni batteriche e fungine, favorite a loro volta dallo stato di immunodepressione; per questo motivo è essenziale una corretta igiene orale tramite sciacqui di soluzioni alcalinizzanti. La terapia poi si basa su anestetici ed antimicotici. (74)

Considerando l'aumento della sopravvivenza dei pazienti grazie alle nuove terapie sempre più innovative, parlando di tossicità non si può evitare un accenno agli effetti tardivi che questi farmaci comportano; tra questi, i più rilevanti sono sicuramente le seconde neoplasie e la LAM risulta essere il tumore secondario più frequentemente associato a chemioterapia, soprattutto per trattamenti effettuati durante l'età pediatrica.

3.7) Ricadute post terapia

La recidiva della malattia rappresenta il principale ostacolo alla guarigione (75) e consiste nella ricomparsa dopo trattamento di almeno un 5% di cellule leucemiche nel midollo osseo, in almeno due campioni di sangue periferico prelevati a distanza di almeno una settimana l'uno dall'altro oppure l'interessamento di organi extra-midollari. (23)

Questa condizione va differenziata dalla malattia refrattaria, che consiste nel mancato raggiungimento della remissione completa dopo chemioterapia intensiva. (76)

Dal punto di vista epidemiologico, la ricaduta in seguito a trapianto di cellule staminali ematopoietiche interessa il 40-50% dei pazienti giovani e la maggior parte dei pazienti anziani; (77) inoltre, nel 90% dei casi questo si verifica entro due anni. (23)

Esistono una serie di parametri che possono aiutarci a predire l'out-come dei pazienti che sono andati incontro a recidiva; tra questi ricordiamo un'età avanzata, una citogenetica sfavorevole al momento della diagnosi, una durata della fase di remissione completa

inferiore ai 12-18 mesi ed un precedente trapianto di cellule staminali ematopoietiche. (78)

Le strategie che si possono applicare sono di due tipi: profilassi o prevenzione; la prevenzione si basa sull'intervento precoce nel momento in cui, mediante marcatori specifici, venga identificata una ricaduta, mentre la prevenzione interviene in una fase precedente trattando il paziente nonostante non vi sia un riscontro di malattia, per eliminare eventuali cloni leucemici non rilevabili con le tecniche attuali. (79)

Lo studio prospettico RELAZA ha valutato una terapia preventiva mediante DNMTi (DNA methyltransferase-1 inhibitors), ma le conclusioni sono ancora controverse per limitate dimensioni del campione analizzato; d'altra parte, il loro uso combinato con Venetoclax ha dimostrato un aumento della Overall Survival dando spunti interessanti per la ricerca sicuramente da approfondire in futuro. (80)

Per quanto riguarda invece le opzioni terapeutiche di mantenimento, sembra essere efficace l'utilizzo di *FLT3* inhibitors, utilizzabili nei pazienti *FLT3* mutati, che ammontano all'incirca al 30% di quelli affetti da LAM. (79)

Le evidenze per quanto riguarda altre opzioni terapeutiche sono invece ancora limitate.

3.8) Terapie di II linea

Nei casi in cui si presenti una recidiva post trattamento, non esiste uno standard di cura a cui sottoporre il paziente, ma bisogna valutare il singolo paziente; ad ogni modo, i casi di remissione completa post recidiva sono scarsi, quindi l'obiettivo del futuro sarà quello di prevenire la recidiva tramite terapie più efficaci nell'impostazione iniziale. (81)

La prima scelta, se disponibile in base alle caratteristiche del paziente stesso e della sua malattia, è il trial clinico. Affinché i pazienti possano essere arruolati, è necessario lo screening rapido dei biomarcatori che permette la partecipazione agli specifici trial clinici in base alla sottopopolazione di LAM a cui appartengono. (23)

Per i pazienti fit a rischio favorevole, un'opzione consiste nella chemioterapia intensiva seguita da allotrapianto; lo schema più utilizzato è il MEC, che prevede la somministrazione di Mitoxantrone 6 mg/m², Etoposide 80 mg/m² e ARA-C 1 g/m². (82)

È importante che al ciclo farmacologico segua sempre, se possibile nello specifico paziente, il trapianto allogenico.

Per quanto riguarda i pazienti in recidiva dopo trapianto, è ancora in dubbio se sottoporli o meno a secondo trapianto allogenico; in particolare il dato più importante da tenere in considerazione in questi casi è la durata di remissione completa post trapianto, poiché se inferiore a 12 mesi, la prognosi è talmente infausta da rendere consigliabile il ricorso a terapie sperimentali; (83) nei pazienti con recidiva più tardiva, invece, si può valutare il secondo trapianto, tenendo presente che non è stato dimostrato un vantaggio nel cambiare donatore da un trapianto al successivo. (77)

Un altro possibile schema chemioterapico è il FLAG-IDA, che prevede la somministrazione di Fludarabina 30 mg/m², Citarabina 2 g/m², Idarubicina 10 mg/m² e il fattore stimolante le colonie dei granulociti (G-CSF) 5µg/kg; tale regime porta a remissione completa il 50% dei pazienti che vi si sottopongono. (77)

Nei casi in cui vi sia mutazione di *FLT-3* nella variante ITD, una possibilità è la terapia con Gilteritinib, che è un inibitore potente e selettivo di questo gene. (84) Tale mutazione è instabile, quindi è possibile che venga persa o insorga de novo dopo recidiva, perciò è importante andarla a ricercare. (77)

Altre terapie target applicabili in queste situazioni sono valutabili nel caso in cui il paziente presenti mutazioni di *IDH1* e *IDH2*, che si presentano nel 6-12% dei casi, i cui farmaci inibitori, quali Ivosidenib e Enasidenib, prevedono la somministrazione per os e hanno dimostrato risultati superiori in sopravvivenza rispetto alle terapie standard (77)

In quei casi in cui il paziente sia stato sottoposto a chemioterapia intensiva e non presenti bersagli molecolari aggredibili, una possibile terapia è quella che prevede la somministrazione di Agenti Ipometilanti (HMAs) in regimi off-label; questi farmaci svolgono un duplice effetto, intervenendo sia nella metilazione del DNA che nei meccanismi di immunomodulazione.

Tra questi ricordiamo Azacitidina e Decitabina, indicati soprattutto in pazienti anziani non candidabili ad allotrapianto, cioè in quella categoria di pazienti in cui risulta importante privilegiare una buona qualità di vita, (77) perché i tassi di remissione

completa raggiunta con questi farmaci, rispetto alla chemioterapia standard, sono inferiori. (81)

Sicuramente saranno necessari ulteriori studi prospettici che valutino la qualità di vita di questi individui, ma dai primi studi è stata evidenziata una ridotta incidenza di eventi infettivi, e di conseguenza di ospedalizzazione, sicuramente anche grazie alle profilassi antibiotiche e antimicotiche messe in atto; questo chiaramente ha influito in senso positivo sulla qualità di vita. (85)

In quei casi in cui la terapia di prima linea non abbia previsto l'utilizzo di Venetoclax, un inibitore selettivo di BCL2, è stata anche dimostrata come favorevole la somministrazione di questo in associazione agli Agenti Ipometilanti. (77)

Un'altra possibile associazione del Venetoclax è con Citarabina ad alto o basso dosaggio oppure con Idasanutlin, che è un inibitore di *MDM2* (*Mouse Double Minut 2*).

Nei pazienti anziani ed unfit, le opzioni terapeutiche sono molto limitate per cui, in seguito ad attenta analisi del rapporto rischi/benefici attesi, è possibile che la scelta migliore risulti la sola citoriduzione della massa neoplastica tramite somministrazione di Idrossiurea o basse dosi di Citarabina (LDAC) o addirittura il Best Supportive Care, basato fondamentalmente su trasfusioni ripetute e terapie antinfettive. (77)

4) Abstract

The Acute Myeloid Leukemia (AML) is an extremely heterogeneous hematopoietic tumor due to its mutational pattern; the prognostic impact of these mutations is so important that in 2022 a new genomic risk classification (ELN) has been created.

In AML the therapeutic algorithm is based on one or two cycles of chemotherapy in order to induce complete remission (CR) followed by a consolidation therapy to prevent a relapse.

In the high risk forms the best consolidation therapy is Haematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT).

This concept is especially relevant in secondary Leukemias, arising from a previous myelodysplastic syndrome (s-AML) or subsequently to chemotherapy (t-AML), in which the amount of mutations is bigger than AML “de novo”.

However, most of the scientific data available so far came from clinical trials that include only patients treated with conventional 3+7 chemotherapy, introduced in 1970. In this perspective, CPX-351 is a new drug recently introduced specifically for treatment of t-AML and s-AML.

The aim of this study was to assess the prognostic impact of mutational burden, a single high risk mutation and minimal residual disease (MRD) in a cohort of elderly s-AML or t-AML patients receiving CPX-351 induction chemotherapy.

It has been demonstrated that MRD assessment after the first induction cycle (TP1) has a strong prognostic value because it is associated with an increased survival.

CPX-351, regardless of the mutational burden or the single high risk mutation, resulted in high CR rate with deep MRD responses, allowing a high number of elderly AML patients to proceed to Haematopoietic Stem Cell Transplantation; patients proceeding to HSCT had a significantly better outcome with increased survival and lower risk of relapse.

Abstract

La Leucemia Mieloide Acuta (LAM) è una neoplasia emopoietica resa estremamente eterogenea dal pattern mutazionale; l'impatto di codeste mutazioni sulla prognosi è tale per cui nel 2022 è stata elaborata una nuova classificazione genomica del rischio (ELN). Nella LAM, l'algoritmo terapeutico prevede uno o due cicli chemioterapici allo scopo di indurre remissione completa (CR) e una terapia successiva di consolidamento per prevenire la recidiva. Nelle forme ad alto rischio la terapia di consolidamento preferita è il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCT).

Questi concetti sono particolarmente rilevanti nelle forme di Leucemia secondarie, che siano esse correlate ad una precedente sindrome mielodisplastica (s-LAM) o a precedente chemioterapia (t-LAM), nelle quali l'incidenza di mutazioni ad alto rischio è maggiore rispetto alla LAM "de novo".

La maggior parte dei dati scientifici finora disponibili derivano, tuttavia, da trial clinici che prendono in considerazione solamente pazienti trattati con regime chemioterapico convenzionale "3+7", introdotto nel 1970. In quest'ottica, CPX-351 è un nuovo farmaco recentemente introdotto specificamente per il trattamento di t-LAM e s-LAM.

Lo scopo dello studio proposto è stato valutare l'impatto prognostico del carico mutazionale, delle singole mutazioni ad alto rischio e della malattia minima residua (MRD) in una coorte di pazienti anziani affetti da s-LAM o t-LAM e sottoposti a trattamento di induzione con CPX-351.

È stato dimostrato come il più alto valore predittivo indipendente derivi dall'ottenimento di MRD negativa dopo il 1° ciclo di induzione, poiché correla con un aumento della sopravvivenza.

Indipendentemente dal carico mutazionale o dalle singole mutazioni, l'utilizzo di CPX-351 ha consentito di ottenere elevate percentuali di CR e MRD negative, permettendo a buona parte dei pazienti di procedere al consolidamento tramite HSCT, garantendo una miglior sopravvivenza e un minor rischio di ricadute.

5) CAPITOLO 4: Lo studio

5.1) Background e scopo del lavoro

La Leucemia Mieloide Acuta è una patologia caratterizzata da numerose mutazioni che la rendono estremamente eterogenea; l'impatto di queste mutazioni è tale per cui nel 2022 è stata elaborata una nuova classificazione del rischio (classificazione European Leukemia Net, ELN) basata proprio sul pattern mutazionale, riconoscendone quindi l'importanza.

Tale classificazione riconosce tre distinti gruppi di rischio, in base alle alterazioni geniche o citogenetiche riscontrate. In particolare, sono state riconosciute come ad alto rischio le mutazioni a carico di *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2* e *TP53*.

Nei pazienti con profilo citogenetico e mutazionale ad alto rischio, l'unica terapia potenzialmente curativa è rappresentata dal trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (Allo-SCT). Tale procedura, tuttavia, è efficace solo se effettuata dopo l'ottenimento di una remissione completa di malattia (CR) con la chemioterapia di induzione. Sfortunatamente, in presenza di tali mutazioni, la probabilità di ottenere una CR è grandemente ridotta.

Nelle forme di Leucemia secondarie, che siano esse correlate ad una precedente sindrome mielodisplastica (s-LAM) o a precedente chemioterapia (t-LAM), inoltre, l'incidenza delle mutazioni ad alto rischio è sostanzialmente maggiore rispetto alla LAM de novo.

La maggior parte dei dati finora disponibili sull'impatto prognostico delle mutazioni ad alto rischio derivano, tuttavia, da trial clinici che prendono in considerazione solamente il regime di trattamento convenzionale "3+7", introdotto negli anni '70 e da allora sostanzialmente immutato.

In quest'ottica, negli ultimi anni sono stati introdotti diversi nuovi farmaci per il trattamento della LAM.

In particolare, nell'ambito delle t-LAM e delle s-LAM, è stato recentemente approvato da FDA ed EMA il CPX-351; questo farmaco è costituito da una formulazione liposomiale particolare a preferenziale uptake midollare di Daunorubicina e Citarabina, in rapporto molare fisso di 1:5, e ha dimostrato in uno studio randomizzato un'attività superiore rispetto al "3+7" nelle t-LAM e nella s-LAM.

Tuttavia, non sono ad oggi disponibili dati sull'impatto delle mutazioni di recente descrizione nei pazienti trattati con CPX-351.

Questo studio si è proposto di valutare l'impatto del carico mutazionale sulla prognosi in una coorte di pazienti anziani con s-LAM o t-LAM trattati con chemioterapia di induzione CPX-351.

5.2) Materiali e metodi

In questo studio sono stati inclusi 61 pazienti anziani, ossia al di sopra dei 60 anni, con diagnosi di Leucemia Mieloide Acuta secondaria a sindrome mielodisplastica (s-LAM) o correlata alla terapia (t-LAM) secondo i criteri WHO 2016, trattati nel centro ematologico dell'Ospedale San Martino di Genova con CPX-351.

Per quanto riguarda le caratteristiche dei pazienti, l'età era compresa tra i 60 e i 77 anni, con una mediana di 68 anni. Nell'80% dei casi sono state identificate delle comorbidità severe, di cui in primis quelle cardiache nel 26% (16/61 pazienti); a seguire è stato riscontrato diabete mellito non controllato dalla terapia nel 20% (12/61) e patologie polmonari nell'11% (7/61).

È stato calcolato il Performance Status Scale ECOG per valutare l'impatto della patologia sulle attività di vita quotidiana ed è risultato ≥ 2 nel 29% dei pazienti (18/61), livello che indica un paziente deambulante e capace di prendersi cura di sé, ma senza essere in grado di svolgere attività lavorative di alcun tipo.

Dal punto di vista dei parametri laboratoristici, il livello di globuli bianchi (WBC) alla diagnosi era compreso tra 230 e 327.000/mm³, con una mediana di 4.300/mm³, mentre i blasti midollari erano in un range compreso tra 20% e 95%, con una mediana di 35%.

L'analisi del genoma dei pazienti è stata effettuata mediante tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) tramite il pannello "Myeloid Solution" di SHOPiA Genetics che copre le regioni codificanti, le regioni fiancheggianti la sequenza e le Internal Tandem Duplications (ITDs) di 30 geni associati a Sindromi Mielodisplastiche, Neoplasie Mieloproliferative e Leucemie, permettendo di identificare 34 mutazioni geniche critiche. I campioni sono stati elaborati sulla piattaforma Illumina MiSeq e l'analisi è stata svolta con il software SHOPiA DDM®.

Per la valutazione della Malattia Minima Residua (MRD), analizzata nei pazienti che hanno raggiunto la remissione completa, è stata invece utilizzata la citometria a flusso multicolore, utilizzando sia una strategia "leukemia-associated phenotype" che una strategia "different from normal". Sono stati acquisiti almeno 200.000 eventi per campione, con una soglia di positività allo 0.1%.

In base alle indagini citogenetiche, secondo lo score di rischio internazionale MRC, i pazienti sono stati suddivisi in High Risk (HR) ed Intermediate Risk (IR), che sono risultati rispettivamente essere il 66% (40/61) e il 33% (21/61). Nessun paziente è risultato essere a rischio citogenetico favorevole.

Tra i 40 pazienti classificati come HR, 27 presentavano un cariotipo complesso, 6 la del (7q), 5 la del (5) e 2 la inv (3).

Combinando i dati provenienti dall'analisi del cariotipo e dalla biologia molecolare, i pazienti sono stati inoltre stratificati in classi di rischio secondo le nuove linee guida ELN 2022, per le quali la classe 1 identifica un rischio favorevole (LR), la classe 2 un rischio intermedio (IR) e la classe 3 un rischio sfavorevole (HR); sono risultati rispettivamente essere il 5% (3/61), il 44% (27/61) e il 51% (31/61). Tra questi, tutti i pazienti classificati con LR erano caratterizzati da *NPM1* mutato e *FLT3-ITD* negativo.

La terapia con il CPX-351, che è una formulazione liposomiale contenente un doppio farmaco, ossia Citarabina e Daunorubicina in rapporto fisso 5:1, prevede come primo step l'induzione, che consiste nella somministrazione di Daunorubicina (44 mg/m²) e Citarabina (100 mg/m²) ripetute ai giorni 1, 3 e 5.

Una seconda induzione con la stessa dose di farmaci può essere somministrata nei giorni 1 e 3 in quei pazienti che non raggiungano la remissione completa o presentino un incompleto recupero della funzionalità midollare dopo il primo ciclo.

Per il consolidamento sono previsti fino a due cicli di CPX-351, con Daunorubicina (29 mg/m²) e Citarabina (65 mg/m²) ripetuti ai giorni 1 e 3.

5.3) Analisi statistica

La remissione completa (RC) è stata definita secondo le linee guida internazionali (ELN 2022) come $< 5\%$ di blasti nel midollo osseo, conta assoluta dei neutrofili $> 1 \times 10^9/l$, conta piastrinica $> 100 \times 10^9/l$ e indipendenza dalle trasfusioni di sangue. La remissione completa ma con recupero incompleto (RCi) si presenta nel caso in cui i blasti midollari siano $< 5\%$ ma non vi sia un recupero di neutrofili, piastrine e globuli rossi, mentre è stata definita come risposta parziale (RP) la riduzione di almeno il 50% della conta dei blasti midollari rispetto al baseline ma con conta assoluta compresa tra il 5% e il 25%.

Negli altri casi, i pazienti sono stati classificati come non responder (NR).

La Overall Survival (OS) è stata calcolata dalla data della diagnosi di LAM al decesso, sia esso avvenuto per la patologia oncologica o per altre condizioni concomitanti.

La sopravvivenza libera da malattia (DFS) è stata calcolata dalla diagnosi al momento di mancato ottenimento della risposta o al momento della ricaduta o di morte per causa diversa dalla ricaduta, a seconda di quale evento sia avvenuto prima.

Le variabili dicotomiche sono state confrontate con il test del Chi quadrato, o, laddove necessario, il test esatto di Fisher.

Le variabili continue sono state confrontate con il test T di Student, o, laddove non potesse essere confermata la distribuzione normale, con il test dei ranghi di Wilcoxon.

Le curve di sopravvivenza sono state create in base al metodo Kaplan-Meier e l'analisi univariata della sopravvivenza è stata effettuata con il test del rango logaritmico.

Per valutare l'impatto del trapianto allogenico sulla sopravvivenza è stato costruito un modello di analisi landmark, includendo solamente i pazienti vivi ed in remissione completa al giorno 60 post trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

L'analisi multivariata della sopravvivenza è stata effettuata con un modello a rischi proporzionali di Cox, inserendo unicamente le variabili che rispettassero il criterio di proporzionalità del rischio.

Tutte le p a due code < 0.05 sono state considerate statisticamente significative.

Tutte le analisi sono state effettuate con il programma IBM SPSS® v22.

5.4) Risultati

In questo studio sono stati inclusi 61 pazienti di età compresa tra i 60 e i 77 anni, con una mediana di 68, trattati nel centro ematologico dell'Ospedale San Martino di Genova con CPX-351.

In ogni paziente sono state identificate dalle 2 alle 8 mutazioni, con una mediana di 4.

Le mutazioni più frequenti identificate sono state a carico di *RUNX1* in 24 pazienti (40%), *ASXL1* in 21 pazienti (35%), *TP53* in 18 pazienti (30%), *IDH1* in 12 pazienti (20%), *IDH2* in 9 pazienti (15%), *DNMT3A* in 7 pazienti (12%) e *TET2* in 5 pazienti (9%).

Sono state anche identificate altre mutazioni ma in percentuali minori, quali *CBL* in 3 pazienti (5%), *NPM1* in 3 pazienti (5%), *FLT3-ITD* in 3 pazienti (5%) e infine *SFR3B1* in 2 pazienti (3%).

Nel grafico sottostante sono visualizzabili le principali mutazioni identificate con le rispettive percentuali.

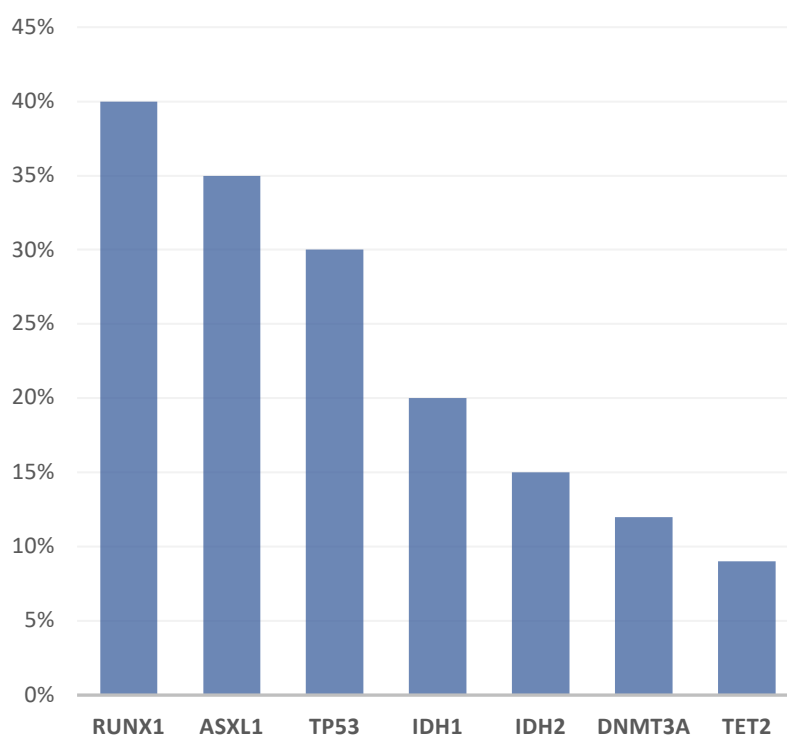


Figura 13: Mutazioni più frequenti

La prima rivalutazione della risposta (TP1) è stata effettuata dopo il primo ciclo di induzione, ma 3/61 pazienti (5%) sono morti prima che questo potesse avvenire, due a

causa di infezioni sopraggiunte nella fase di immunodepressione post chemioterapia, uno per sanguinamenti a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC).

Per quanto riguarda il resto dei pazienti, l'81% (50/61) è andato incontro a remissione completa (RC), mentre il 14% (8/61) non ha risposto alla terapia (NR); tra i pazienti in RC, il 50%, ossia il 41% dei pazienti sottoposti a trattamento, è risultato MRD negativo. È stata effettuata una seconda rivalutazione della risposta (TP2) dopo il secondo ciclo di trattamento, in seguito al quale i pazienti in RC sono risultati essere pari all'85% (52/61), di cui il 58% MRD negativa, mentre il 7% (4/61) è risultato NR; nei primi 60 giorni dopo tale ciclo di chemioterapia sono deceduti 5/61 pazienti (8%), di cui quattro per infezioni e uno per sanguinamenti a livello del SNC.

Sono stati successivamente sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche 21 pazienti, ossia il 34% del totale e il 40% di quelli che hanno raggiunto CR a TP2; di questi, 11/21 (52%) lo hanno effettuato entro 3 mesi dall'ottenimento della CR.

Nel grafico sottostante sono evidenziabili le probabilità di andare incontro a CR e MRD negativa dopo la prima e la seconda rivalutazione.

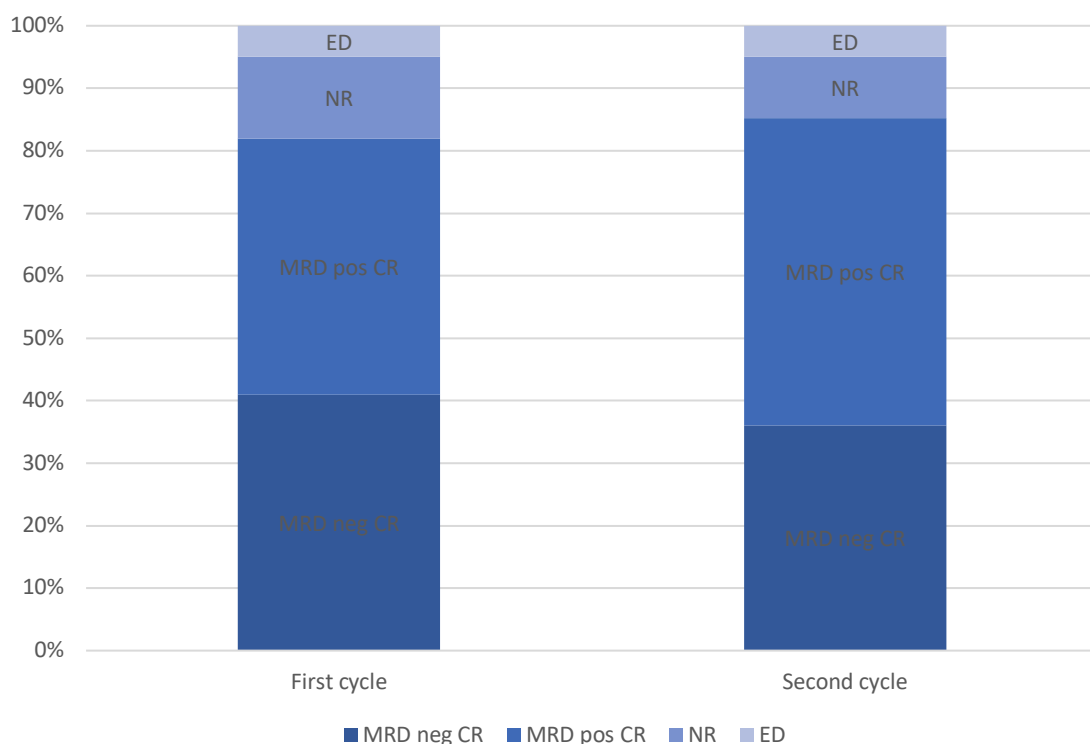


Figura 14: Probabilità di CR e di MRD negatività ai due TP

È stato valutato, inoltre, se vi fosse un impatto statisticamente significativo sulla CR di una serie di fattori quali l'età al di sopra o al di sotto dei 70 anni, la classe di rischio ELN 2022, la citogenetica sfavorevole, mutazioni di *RUNXI*, *ASXLI*, *TP53*, la presenza di più di una mutazione HR o la presenza di almeno 4 mutazioni, ma nessuno di questi è risultato essere impattante; allo stesso modo, nessuno di questi fattori è risultato essere statisticamente significativo. Similmente, nessuna di queste variabili ha mostrato un significativo valore predittivo sulla probabilità di ottenere CR e MRD negativa dopo terapia.

Il follow-up mediano dello studio è stato di 34 mesi (CI 95%; 21,7-46,3 mesi).

Il fallimento terapeutico si è osservato nel 31% dei casi (19/61); 15/61 (29%) sono i pazienti in CR al TP2 che sono andati incontro a recidiva, mentre la mancata risposta al trattamento è stata verificata in 4/61 pazienti (7%).

La sopravvivenza libera da malattia (DFS) mediana è stata calcolata essere di 14 mesi (CI 95%; 11,3-39,2 mesi).

L'analisi del rischio di recidiva e della DFS hanno mostrato come il mancato ottenimento di MRD negativa al TP1 fosse il principale predittore indipendente sia di rischio di recidiva che di breve DFS. Infatti, i pazienti MRD positivi al TP1 hanno presentato un rischio di ricaduta molto superiore rispetto ai pazienti MRD negativi allo stesso istante (Hazard Ratio 3.6 se MRD positiva, $p < 0.05$).

Nella curva di Kaplan-Meier sottostante, sono rappresentati tutti i pazienti in DFS e l'andamento temporale delle ricadute.

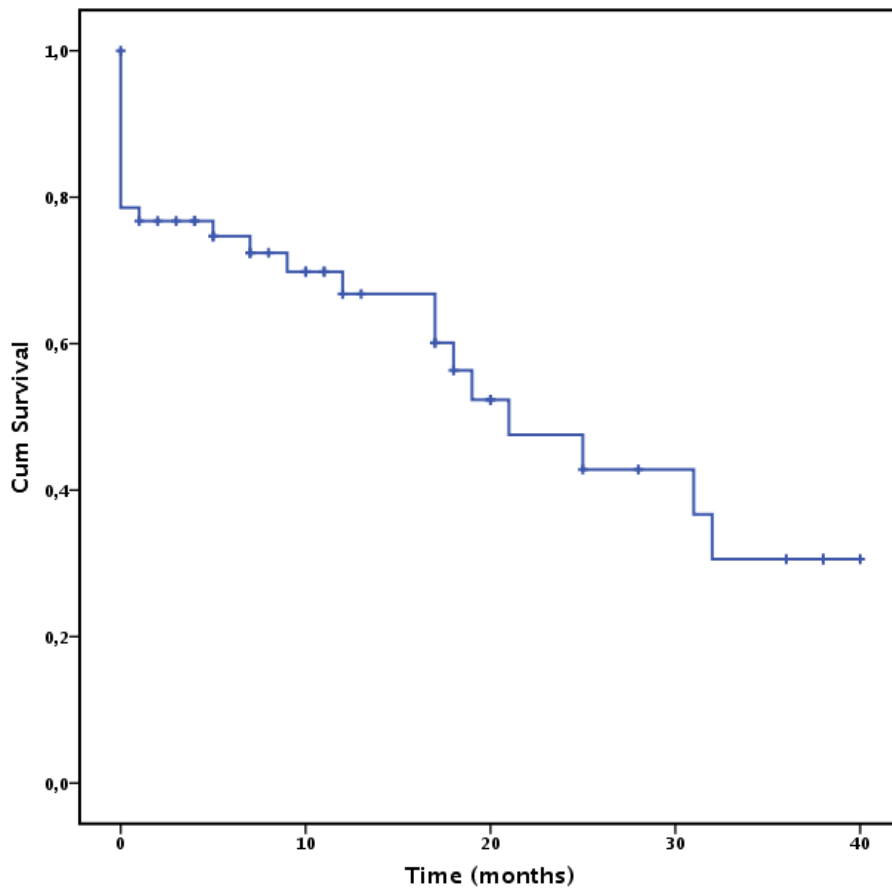


Figura 15: Andamento della DFS in tutti i pazienti

Sono deceduti 35/61 pazienti, di cui 19 per recidiva di malattia o mancata risposta alla terapia, 5 prima che potesse essere rivalutata la patologia, di cui 4 per infezione e 1 per sanguinamento del SNC, e 11 in remissione senza recidiva ma deceduti per altre cause, di cui 5 per morte correlata al trapianto, 3 per infezione da SARS-COV2, 2 per eventi ischemici e 1 in seguito ad incidente stradale.

La sopravvivenza globale (OS) mediana è risultata essere 17 mesi (CI 95% 13-21 mesi), mentre a 2 anni si è attestata al 25%.

È stato valutato se vi fosse un impatto statisticamente significativo di una serie di fattori quali l'età al di sopra o al di sotto dei 70 anni, la classe di rischio ELN 2022, la citogenetica sfavorevole, mutazioni di *RUNX1*, *ASXL1*, *TP53*, la presenza di più di una mutazione HR, la presenza di almeno 4 mutazioni o la MRD al TP1 e TP2 ed il fattore

con più alto valore predittivo indipendente è risultato essere l'ottenimento di MRD negativa al TP1 poiché correla con la migliore sopravvivenza ($p < 0,05$).

Nel grafico sottostante è visualizzabile la differenza di OS a seconda che la MRD sia positiva o negativa.

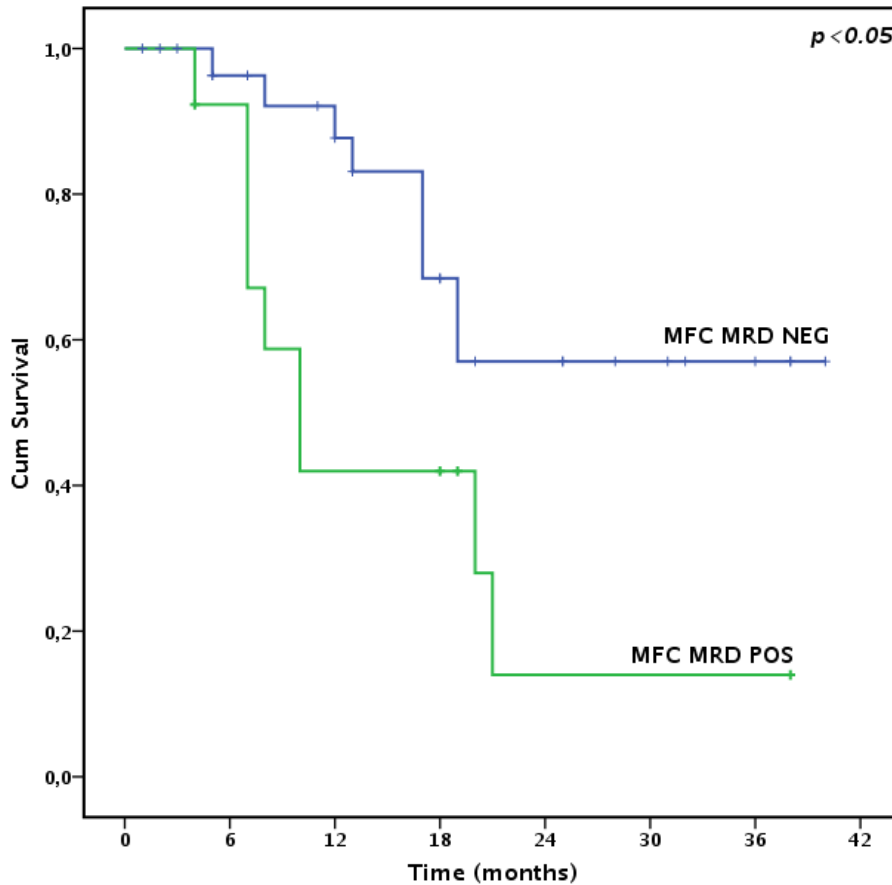


Figura 16: OS in base alla MRD

Come si può evincere dalla successiva curva di Kaplan-Meier, invece, non è stato dimostrato alcun impatto significativo in base al burden mutazionale, dal momento che la OS a 2 anni è risultata essere del 28,1% e del 27,3% rispettivamente nei pazienti presentanti più o meno di 4 mutazioni.

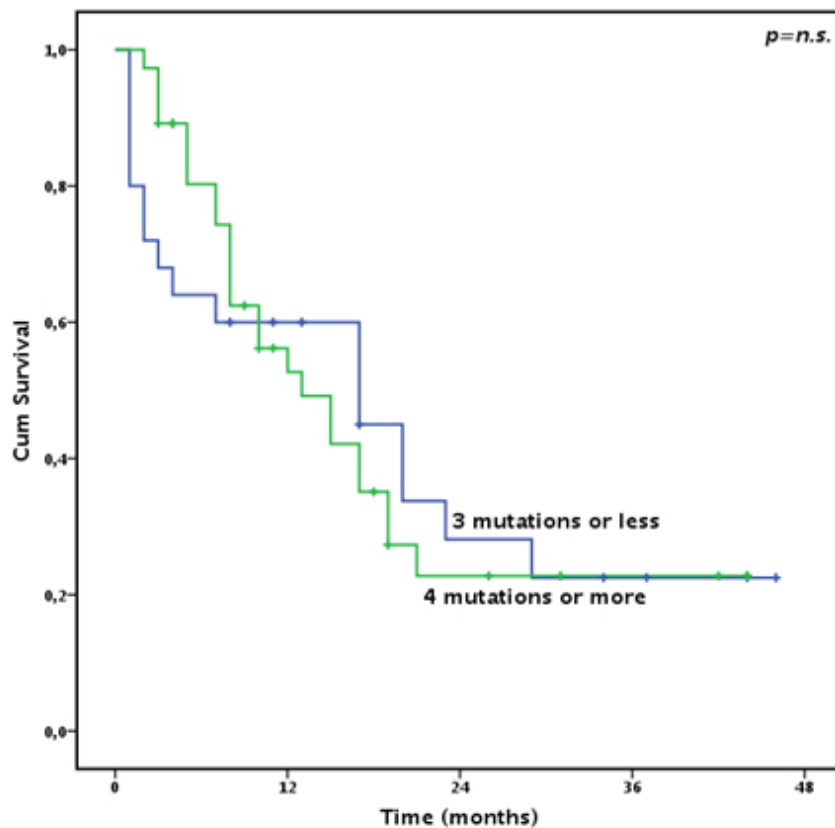


Figura 17: Impatto del burden mutazionale sulla OS

Infine è stato valutato l'impatto del trapianto allogenico tramite modello di analisi a landmark includendo solo i pazienti vivi e in CR a 90 giorni.

In questo modello, il trapianto allogenico, se effettuato entro 3 mesi dall'ottenimento della CR, è risultato essere il fattore prognostico più importante.

La sopravvivenza a 2 anni dei pazienti trapiantati entro 3 mesi dall'ottenimento della CR è risultato essere dell'83,5%, rispetto al 32,4% dei pazienti non sottoposti a trapianto o trapiantati dopo 3 mesi dall'ottenimento di CR ($p < 0,03$).

Nel grafico sottostante si può osservare la differenza di OS tra i pazienti trapiantati entro 3 mesi e quelli non trapiantati o trapiantati più tardivamente.

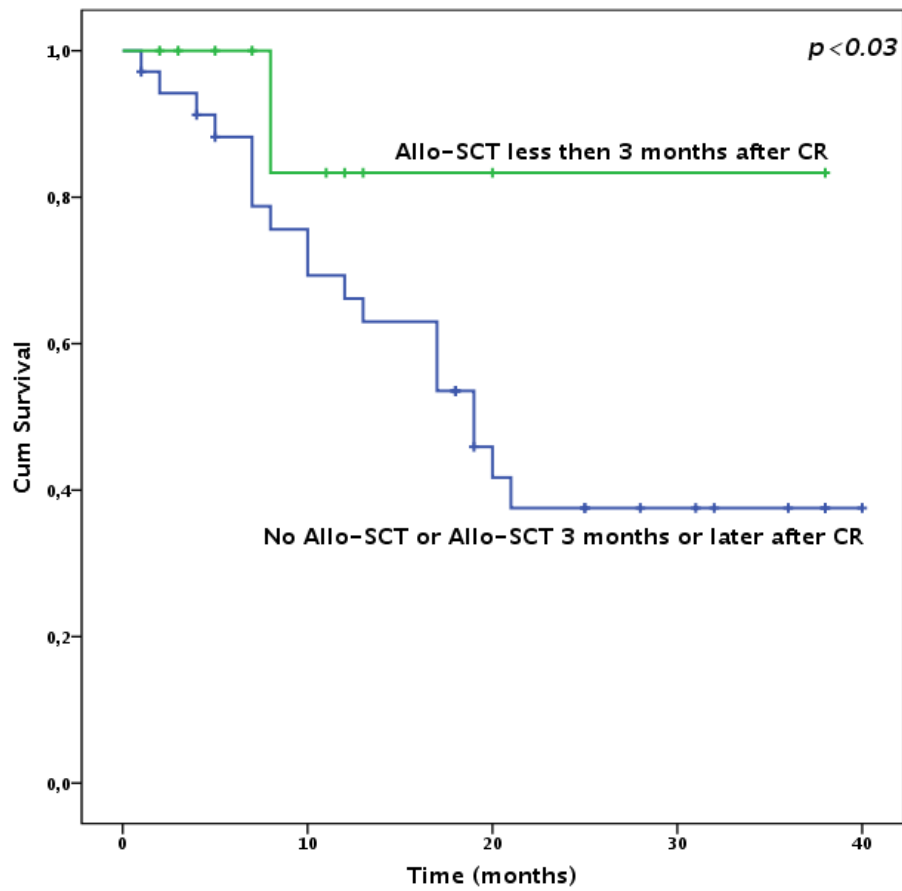


Figura 18: OS in base al trapianto allogenico

5.5) Discussione e Conclusioni

La maggior parte dei dati sull'impatto prognostico delle diverse anomalie citogenetiche e molecolari nei pazienti affetti da LAM derivano da studi clinici in cui veniva utilizzato il trattamento convenzionale "3+7", introdotto negli anni '70 e da allora sostanzialmente immodificato.

Tuttavia, negli ultimi 5 anni, diversi farmaci sono stati approvati per la LAM, tra cui CPX-351 (51), Venetoclax in combinazione con agenti ipometilanti (86) (87) e Midostaurina in associazione a chemioterapia intensiva (50).

La nuova classificazione del rischio ELN 2022 ha parzialmente tenuto conto di questo, riducendo rispetto all'edizione del 2017 l'impatto prognostico della mutazione di *FLT3-ITD*, stante l'introduzione dell'inibitore Midostaurina (50). Tuttavia, nonostante la dimostrata attività soprattutto nei pazienti ad alto rischio, non vi sono attualmente dati sull'impatto dell'utilizzo di CPX-351 sulle mutazioni ad alto rischio.

Infatti, sia nello studio registrativo (51) che nello studio italiano di uso compassionevole (88) che negli studi real life francese (89) e tedesco (90), non sono stati analizzati in modo sistematico questi dati.

La probabilità di acquisire MRD negatività è stata analizzata in particolare sia nello studio francese di Chiche et al. in NGS (89) che in MFC nello studio italiano di Guolo et al. (88), confermando l'efficacia di tale chemioterapico nei pazienti affetti da forme di Leucemia secondarie, con raggiungimento di elevati tassi di CR con bassi livelli di MRD.

Tuttavia, in entrambi questi studi non è stato valutato l'impatto delle singole mutazioni ad alto rischio e del burden mutazionale né sulla sopravvivenza né sulla probabilità di ottenere MRD negatività.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'impatto del carico mutazionale e della malattia minima residua sulla prognosi e ha permesso di dimostrare come il più alto valore predittivo indipendente si ottenga tramite l'ottenimento di MRD negativa al TP1, poiché correla con la migliore sopravvivenza in una coorte di pazienti anziani affetti da s-LAM o t-LAM.

Indipendentemente dal carico mutazionale, l'utilizzo di CPX-351 ha consentito di ottenere elevate percentuali di CR e MRD negativa, consentendo a buona parte dei pazienti di procedere al consolidamento tramite trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

La possibilità di andare incontro a trapianto entro 3 mesi dall'ottenimento di CR è risultato altresì essenziale, consentendo una miglior sopravvivenza e un minor rischio di ricadute.

Questi dati confermano come CPX-351 sia un'ottima terapia di preparazione al trapianto nei pazienti anziani affetti da LAM ad alto rischio, suggerendo inoltre come questa procedura debba essere intrapresa non appena ottenuta la remissione completa.

L'impatto positivo del consolidamento con trapianto allogenico conferma i risultati sia dello studio registrativo (51) che delle esperienze real-life.

Nei pazienti in cui il trapianto non sia fattibile per età, comorbidità o mancanza di donatore, una possibile alternativa potrebbe essere la somministrazione ai pazienti in remissione completa di terapia di mantenimento mediante Azacitidina, recentemente approvata con questa indicazione nei pazienti anziani, dimostrando un aumento significativo della sopravvivenza, in particolare nei pazienti con MRD positiva dopo chemioterapia intensiva (91).

In conclusione, CPX-351 permette di ottenere un elevato tasso di CR in pazienti anziani affetti da LAM con malattia ad alto rischio, senza che tale probabilità sia significativamente influenzata dal profilo mutazionale. Molte di queste CR sono profonde, con MRD negatività, configurando quindi una situazione ideale per effettuare un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche di consolidamento, che rimane l'unica opzione curativa nel setting delle LAM ad alto rischio.

Bibliografia

1. *Manuale di malattie del sangue*. **Bosi, Alberto**. s.l. : Elsevier, 2012.
2. **Kantarjian, Hagop M. e Robert A. Wolff**. *The MD Anderson Manual of Medical Oncology*. 2016.
3. *Malattie del sangue e degli organi emopoietici*. **Castoldi, Liso**. s.l. : Mc Geaw Hill, 2013.
4. *Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update*. **De Kouchkovsky, M Abdul-Hay**. s.l. : Blood Cancer Journal, 2016.
5. *Hematologia Clinica*. **Sans-Sabrafen, J. Besses, Vives JL**. s.l. : Elsevier, 2006.
6. *Harrison Principi di Medicina interna*. **Jameson, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Loscalzo**. s.l. : CEA Casa Editrice Ambrosiana, 2021.
7. *Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed*. **Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt AS, Hagberg O, Höglund M e Group., Swedish Acute Leukemia Registry**. s.l. : Blood, 2012.
8. *Myeloid Neoplasm with Germline Predisposition*. **Gao J, Chen Y, Sukhanova M**. s.l. : WHO classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2022.
9. *Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN*. **Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Röllig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien HF, Wang J, Wierzbowska A, Lö**. s.l. : Blood, 2022.
10. *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition*. **Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al.,.** s.l. : BC Decker, 2003.
11. *Molecular cytogenetics in acute myeloid leukemia in adult patients: practical implications*. **Bloomfield, Clara D**. 2022.
12. *Cytogenetics analysis as the central point of genetic testing in acute myeloid leukemia (AML): a laboratory perspective for clinical applications*. **Rosli, Aliaa Arina**. s.l. : Clinical and Experimental Medicine, 2022.
13. *linical sig- nificance of cytogenetics in acute myeloid leukemia*. **Mrózek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD**. s.l. : Semin Oncol., 1997.

14. *Acute myeloid leukemia with normal cytogenetics*. **Raya Mawad, Elihu H Estey**. s.l. : Current Oncology Reports, 2012.
15. *Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia*. **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, D**. s.l. : New England Journal Of Medicine, 2016.
16. *Driver mutations in oncogenesis*. **Morjaria, Shruti**. s.l. : International Journal of Molecular and Immuno Oncology, 2020.
17. *Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia*. **Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, Schneider S, Konstandin NP, Dufour A, Bräundl K, Ksienzyk B, Zellmeier E, Hartmann L, Greif PA, Fiegl M, Subklewe M, Bohlander SK, Krug U, Faldum A, Berdel WE, Wörmann B, Büchn**. s.l. : Blood, 2016.
18. *Age-related clonal hematopoiesis*. **Shlush, LI**. s.l. : Blood, 2018.
19. *Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals*. **Abelson, S., Collord, G., Ng, S.W.K. et al**. s.l. : Nature, 2018.
20. *Driver mutations in acute myeloid leukemia*. **Ashwin Kishtagaria, b, Ross L. Levinec,d, Aaron D. Vinyc,d**. s.l. : Current Opinion in Hematology, 2020.
21. *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. **Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al**. s.l. : New Engl J Med, 2005.
22. *Mutant NPM1 Maintains the Leukemic State through HOX Expression*. **Brunetti L, Gundry MC, Sorcini D, Guzman AG, Huang YH, Ramabadran R, Gionfriddo I, Mezzasoma F, Milano F, Nabet B, Buckley DL, Kornblau SM, Lin CY, Sportoletti P, Martelli MP, Falini B, Goodell MA**. s.l. : Cancer Cell, 2018.
23. *Diagnosis and management of AML in adults*. **Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al**. s.l. : Blood, 2022.
24. *Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia*. **Meshinchi S, Appelbaum**. s.l. : Clinical Cancer Res, 2009.
25. *Clinical implications of c-Kit mutations in acute myelogenous leukemia*. **Malaise M, Steinbach D, Corbacioglu S**. s.l. : Curr Hematol Malig Rep, 2009.
26. *RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and*

- MicroRNA expression signatures.* **Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, et al.** s.l. : J Clin Oncol, 2012.
27. *Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia.* **Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, et al.** s.l. : J Clin Oncol, 2012.
28. *The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia.* **Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al.** s.l. : Cell, 2012.
29. *Enasidenib in mutant IDH2 relapsed and or refractory acute myeloid leukemia.* **Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, et al.** s.l. : Blood, 2017.
30. *Durable remissions with ivosidenib & in IDH1-mutated relapsed or refractory AML.* **DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, et al.** s.l. : New Engl J Med, 2018.
31. *ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category.* **Metzeler KH, Becker H, Maharry K, et al.** s.l. : Blood, 2011.
32. *Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype.* **Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, et al.** s.l. : Blood, 2011.
33. *Wilms tumor 1 mutations in the patho-targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal pro- genesis of acute myeloid leukemia.* **Rampal R, Figueroa ME.** s.l. : Haematologica, 2016.
34. *Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study.* **Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, et al.** s.l. : J Clin Oncology, 2009.
35. *The Wilms Tumor-1 (WT1) rs16754 polymorphism is a prognostic factor in acute myeloid leukemia (AML): a meta-analysis.* **Jianting Long, Shi Fang, Qiangsheng Dai, Xiaolian Liu, Wanshou Zhu and Shenming Wang.** s.l. : Oncotarget, 2016.
36. *TP53 mutation in newly diagnosed acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome.* **Niparuck P, Police P, Noikongdee P, Siriputtanapong K, Limsuwanachot N, Rerkamnuaychoke B, Chuncharunee S, Siriboonpiputtana T.** s.l. : Diagn Pathol., 2021.
37. *Patterns of mutations in TP53 mutated AML.* **JS., Welch.** s.l. : Best Pract Res Clin Haematol., 2018.

38. *Surfing the p53 network*. **Vogelstein B, Lane D, Levine AJ**. s.l. : Nature, 2000.
39. *Mutant p53 in cancer: Accumulation, gain-of-function, and therapy*. **Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W**. s.l. : J Mol Biol, 2017.
40. *Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome*. **Amadou A, Waddington Achatz MI, Hainaut P**. s.l. : Curr Opin Oncol, 2018.
41. *The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases*. **Stengel A, Kern W, Haferlach T, et al**. s.l. : Leukemia, 2017.
42. *TP53 mutations in older adults with acute myeloid leukemia*. **Yanada M, Yamamoto Y, Iba S, Okamoto A, Inaguma Y, Tokuda M, et al**. s.l. : Int J Hematol, 2016.
43. *TP53 and decitabine in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes*. **Welch JS, Petti AA, Miller CA, Fronick CC, O’Laughlin M, Fulton RS, et al**. s.l. : N Engl J Med, 2016.
44. *p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor?* **Khoury MP, Bourdon JC**. s.l. : Genes Cancer, 2011.
45. *p53 isoform delta113p53 is a p53 target gene that antagonizes p53 apoptotic activity via BclxL activation in zebrafish*. **Chen J, Ng SM, Chang C, et al**. s.l. : Genes Dev., 2009.
46. *p53 Protein Isoform Profiles in AML: Correlation with Distinct Differentiation Stages and Response to Epigenetic Differentiation Therapy*. **Haaland, I., et al**. s.l. : Cells, 2021.
47. *Correlation analysis of p53 protein isoforms with NPM1/FLT3 mutations and therapy response in acute myeloid leukemia*. **Ånensen, N., et al**. s.l. : Oncogene, 2011.
48. *High p53 protein expression in therapy-related myeloid neoplasms is associated with adverse karyotype and poor outcome*. **Cleven, A.H.G., et al**. s.l. : Mod. Pathol., 2014.
49. *Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials*. **RK Hills, S Castaigne, FR Appelbaum, et al**. s.l. : Lancet Oncol, 2014.
50. *Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation*. **RM Stone, SJ Mandrekar, BL Sanford, et al**. s.l. : N Engl J Med., 2017.

51. *CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) liposome for injection vs conventional cytarabine plus daunorubicin in older patients with newly diagnosed secondary acute myeloid leukemia.* **JE Lancet, GL Uy, JE Cortes, et al.** s.l. : J Clin Oncol., 2018.
52. *Effect of complete remission and responses less than complete remission on survival in acute myeloid leukemia.* **Walter RB, Kantarjian HM, Huang X, Pierce SA, Sun Z, Gundacker HM, Ravandi F, Faderl SH, Tallman MS, Appelbaum FR, Estey EH.** s.l. : J Clin Oncol., 2010.
53. *Condensed vs standard schedule of high-dose cytarabine consolidation therapy with pegfilgrastim growth factor support in acute myeloid leukemia.* **S Jaramillo, A Benner, J Krauter, et al.** s.l. : Blood Cancer J., 2017.
54. *Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission.* **JJ Cornelissen, D Blaise.** s.l. : Blood, 2017.
55. *Azacitidine maintenance after intensive chemotherapy improves DFS in older AML patients.* **Huls G, Chitu DA, Havelange V, et al.** s.l. : Blood, 2019.
56. *FDA approval summary: oral azacitidine for continued treatment of adults with acute myeloid leukemia unable to complete intensive curative therapy.* **Jen EY, Wang X, Li M, et al.** s.l. : Clin Cancer Res., 2022.
57. *Treating acute myeloid leukemia in older adults.* **ES., Wang.** s.l. : Hematology Am Soc Hematol Educ Program., 2014.
58. *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry.* **Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, et al.** s.l. : Blood, 2009.
59. *Treatment decision-making for older patients with high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: problems and approaches.* **Deschler B, de Witte T, Mertelsmann R, Lubbert M.** s.l. : Haematologica, 2006.
60. *Effect of NPM1 and FLT3 mutations on the outcomes of elderly patients with acute myeloid leukemia receiving standard chemotherapy.* **Daver N, Liu Dumlao T, Ravandi F, et al.** s.l. : Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2013.
61. *Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia.* **Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, et al.** s.l. : J Clin Oncol., 2012.
62. *Azacitidine and venetoclax in previously untreated acute myeloid leukemia.* **DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, et al.** s.l. : N Engl J Med., 2020.

63. *Venetoclax plus LDAC for newly diagnosed AML ineligible for intensive chemotherapy: a phase 3 randomized placebo-controlled trial.* **Wei AH, Montesinos P, Ivanov V, et al.** s.l. : Blood, 2020.
64. *Ivosidenib and azacitidine in previously untreated IDH1-mutated acute myeloid leukemia.* **Montesinos P, Recher C, Vives S, et al.** s.l. : N Engl J Med., 2022.
65. *Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia.* **Takami, A.** s.l. : Int J Hematol , 2018.
66. *Myeloablative vs reduced-intensity hemato- poietic cell transplantation for acute mye- loid leukemia and myelodysplastic syndromes.* **Scott BL, Pasquini MC, Logan BR, et al.** s.l. : J Clin Oncol., 2017.
67. *Application of machine learning algorithms for clinical predictive modeling: a data-mining approach in SCT.* **Shouval R, Bondi O, Mishan H, Shimoni A, Unger R, Nagler A.** s.l. : Bone Marrow Transplant, 2014.
68. *Outcome of allogeneic bone marrow transplant for IRAQI patients with acute myeloid leukemia.* **Naji AS, Gata AK, Hamodi LE, Abass M, Yousif FS.** s.l. : Wiad Lek. , 2021.
69. *Survival and prognostic factors in Malaysian acute myeloid leukemia patients after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.* **Manganting E., Naing N.N., Norsadiah B., Azlan H.** s.l. : Japanese journal of hematology, 2013.
70. *Sorafenib maintenance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia with FLT3-internal tandem duplication mutation.* **Burchert A, Bug G, Fritz LV, et al.** s.l. : J Clin Oncol., 2020.
71. *Gilteritinib or chemotherapy for relapsed or refractory FLT3-mutated AML.* **Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, et al.** s.l. : N Engl J Med., 2019.
72. *Manuale di Oncologia Medica.* **Massimo, Aglietta.** s.l. : Edizioni Minerva Medica, 2022.
73. *Gestione della tossicità ematopoietica in oncologia.* **al., Danova M. et.** s.l. : Linee Guida AIOM, 2019.
74. *Systemic treatment-induced gastrointestinal toxicity: incidence, clinical presentation and management.* **Boussios S., Pentheroudakis g., Katsanos K. et al.** s.l. : Ann Gastroenterol, 2012.
75. *How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia.* **Thol F, Schlenk RF, Heuser M, Ganser A.** s.l. : Blood, 2015.

76. *2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party.* **Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, et al.** s.l. : Blood, 2021.
77. *Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia.* **Thol, F., Ganser, A.** s.l. : Curr. Treat. Options in Oncol., 2020.
78. *Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse.* **Breems DA, Van Putten WL, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Verdonck LF, Vellenga E, De Greef GE, Jacky E, Van der Lelie J, Boogaerts MA, Löwenberg B.** s.l. : J Clin Oncol. , 2005.
79. *Detecting and preventing post-hematopoietic cell transplant relapse in AML.* **Austin, Anne E e Byrne, Michael.** s.l. : Current Opinion in Hematology, 2021.
80. *he use of venetoclax-based salvage therapy for posthematopoietic cell transplantation relapse of acute myeloid leukemia.* **Byrne M, Danielson N, Sengsayadeth S, et al.** s.l. : Am J Hematol, 2020.
81. *Relapsed or primary refractory AML: moving past MEC and FLAG-ida.* **Koenig, K. e Mims, A.** s.l. : Current Opinion in Hematology, 2020.
82. *Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure.* **Duval M, Klein JP, He W et al.** s.l. : J Clin Oncol. , 2010.
83. *Prevention and treatment of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic stem cell transplantation.* **Oran B, de Lima M.** s.l. : Curr Opin Hematol. , 2011.
84. *Gilteritinib: potent targeting of FLT3 mutations in AML.* **Levis M, Perl AE.** s.l. : Blood, 2020.
85. *Hypomethylating Agents (HMAs) as Salvage Therapy in Relapsed or Refractory AML: An Italian Multicentric Retrospective Study.* **Lessi F, Laurino M, Papayannidis C, Vitagliano O, Grimaldi F, Lazzarotto D, Gottardi M, Crisà E, Riva M, Reda G, Ermani M, Semenzato G, Trentin L, Ferrara F.** s.l. : Biomedicines, 2021.
86. *Phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of venetoclax combined with azacitidine versus azacitidine in treatment-naïve patients with acute myeloid leukemia.* **Jalaja Potluri, Tu Xu, Wan-Jen Hong, and Mack H. Mabry.** s.l. : Journal of Clinical Oncology, 2017.
87. *Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia.* **DiNardo, Courtney D et al.** s.l. : Blood, 2017.

88. *CPX-351 treatment in secondary acute myeloblastic leukemia is effective and improves the feasibility of allogeneic stem cell transplantation: results of the Italian compassionate use program.* **Guolo, Fabio et al.** s.l. : Blood cancer journal, 2020.
89. *Real-life experience with CPX-351 and impact on the outcome of high-risk AML patients: a multicentric French cohort.* **Chiche, Edmond et al.** s.l. : Blood advance, 2021.
90. *Real-world experience of CPX-351 as first-line treatment for patients with acute myeloid leukemia.* **Rautenberg, Christina et al.** s.l. : Blood cancer journal, 2021.
91. *Azacitidine maintenance after intensive chemotherapy improves DFS in older AML patients.* **Huls, Gerwin et al.** s.l. : Blood, 2018.
92. *Genetic characteristics and outcomes by mutation status in a phase 3 study of CPX-351 versus 7+3 in older adults with newly diagnosed, high-risk/secondary acute myeloid leukemia (AML).* **Lindsley RC, Gibson C, Murdock M, et al.** s.l. : Blood, 2019.

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Roberto Massimo Lemoli e il Prof. Maurizio Miglino per l'opportunità che mi è stata concessa collaborando con Loro per la stesura di questo elaborato.

Ringrazio di cuore Prof. Fabio Guolo per il sostegno, le correzioni e gli insegnamenti che mi sono stati essenziali per arrivare preparata a questa giornata.

Ora arrivano i ringraziamenti alle persone che amo e che mi sono state accanto in tutto questo percorso e penso di non stupire nessuno ammettendo di aver pianto scrivendo queste parole.

In primo luogo non posso non parlare della mia famiglia: mamma, papà e Gabri, so che non è stato facile supportarmi e sopportarmi per questi 6 lunghi anni, ma senza di voi non sarei arrivata da nessuna parte. Abbiamo attraversato momenti difficili, altri sicuramente saranno alle porte, ma non lo abbiamo mai dovuto fare da soli e qui non voglio solo cogliere l'occasione per ringraziarvi per non aver lasciato da sola me quando pensavo di affogare, ma voglio promettervi che altrettanto sarò pronta a fare io, sempre e per sempre. Voglio ringraziare anche nonni, zii e cugini che mi sono accanto oggi, perché il bene che vi voglio è immenso; grazie anche a chi avrebbe profondamente voluto esserci, ma che per forze maggiori non ha potuto; soprattutto grazie a chi non c'è più, ma che, mai come oggi, sento accanto ugualmente.

Non so neanche da dove iniziare per ringraziare il mio ragazzo, Osmar, perché vi assicuro che se pensate di avermi vista nei momenti peggiori, insopportabili, noiosa e permalosa, non è davvero niente rispetto a quello a cui ha assistito lui; nonostante tutto, anche quando io non trovavo le forze per affrontare la giornata, non mi hai mai lasciata andare, con molta più fiducia in me di quanto io ne avessi in me stessa. In 9 anni di relazione siamo cresciuti e cambiati tanto, ma non è mai cambiato il significato che abbiamo l'uno per l'altra; sei e sarai sempre il mio "posto felice". Non sappiamo cosa ci riserverà il futuro, ma con la consapevolezza di avere sempre il tuo supporto, questo non mi fa più paura.

Di amiche da ringraziare ne ho tante, alcune nuove, altre invece che ci sono sempre state.

Con quelle che ci sono sempre state, oramai superiamo i 10 anni di amicizia: Alice, Alice, Caterina e Elisa, non dimenticherò mai la prontezza di risposta ad un messaggio di aiuto, una parte del mio cuore vi appartiene.

Poi ci sono le amiche nuove, anche se oramai nuove mica tanto! Benedetta, Giorgia e Sara oltre che amiche sono state compagne di avventura, nessuna come voi può capire quello che abbiamo affrontato in questi 6 anni; è stata una scalata che definire faticosa è troppo riduttivo, ma la vista da quassù è stupenda e sono davvero grata di poterla vedere abbracciata a voi.

Le mie coinquiline una citazione la meritano a parte, perché per me definirle tali è dire qualcosa di più che amiche.

Camilla, sei stata la prima persona con cui mi sono sentita a casa anche se fuori dalle quattro mura di Borgio e mi ha insegnato come “casa” e “famiglia” siano indipendenti dal tetto sotto al quale viviamo; ovunque mi trovi, con te, sento il profumo di casa.

Giorgia e Ioana, voi mi avete insegnato tantissimo sulla vita e siete riuscite a strapparmi un sorriso nei momenti più tragici; mio fratello dice che sono nata vecchia, grazie a voi però, forse, ora lo sono un po' di meno.

In nessuna di queste categorie avrei potuto far rientrare Chiara.

Come dovrei definirti? Migliore amica? Sorella? Anima gemella? Forse tutte queste cose insieme rendono l'idea.

Tu la tua tesi me l'hai dedicata e io non so in quale modo fare altrettanto senza risultare banale.

Hai capito prima di chiunque altro che qualcosa che non andasse, mi hai aiutata ad affrontare la realtà e a trovare il coraggio di chiedere aiuto; senza di te, qui davvero non ci sarei mai arrivata. Non so se sarò mai in grado di ricambiare tutto quello che hai fatto e fai tuttora per me, ma ho intenzione di passare la vita a provarci.