



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

**IL TRATTAMENTO DELLE  
LEUCEMIE ACUTE LINFOIDI NELL'ERA  
DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA:  
L'ESPERIENZA DEL CENTRO  
DI ANCONA**

Relatore: Chiar.mo  
**Dott. Lorenzo Brunetti**

Tesi di Laurea di:  
**Camilla Pannacci**

Correlatore: Chiar.ma  
**Dott.ssa Erika Morsia**

A.A. 2022/2023

<b>1. Introduzione alla Leucemia Acuta Linfoide.....</b>	<b>4</b>
1.1 Generalità.....	4
1.2 Epidemiologia e Prognosi.....	4
1.3 Presentazione clinica e di laboratorio.....	6
1.4 Diagnosi della malattia.....	7
1.5 Classificazione delle LAL (WHO e ICC).....	15
1.6 Linee generali di Trattamento e Principali Linee Terapeutiche.....	20
1.6.1 Standard terapeutico: protocolli di prima linea, ITK e Trapianto allogenico.....	20
1.6.2 Nuove opzioni e prospettive terapeutiche.....	26
1.7 Stratificazione in base ai Fattori di Rischio.....	29
1.8 Rivalutazione della malattia e MRD (Minimal Residual Disease).....	38
1.8.1 Introduzione allo studio della Malattia Minima Residua .....	38
1.8.2 Principali metodiche di rivalutazione e nuove prospettive a confronto.....	39
1.8.3 Significato e principali impieghi dell'MRD nella pratica clinica.....	49
<b>2 Obiettivi dello studio.....</b>	<b>51</b>
<b>3 Materiali e Metodi.....</b>	<b>52</b>
3.1 Pazienti e criteri di inclusione.....	52
3.2 L'esperienza del centro di Ancona.....	52
3.2.1. Timing, Metodi e studi centralizzati nella rivalutazione della MRD.....	52
3.2.2. Criteri e definizioni.....	56
3.2.3 Metodi e studio statistico.....	58
<b>4 Dati raccolti e Risultati.....</b>	<b>60</b>
4.1 Statistica descrittiva .....	60

4.2	Statistica “time-to-event” .....	68
4.2.1	Panoramica iniziale. 3 principali fenotipi di LAL a confronto.....	69
4.2.2	Analisi dei singoli fattori prognostici e loro impatto sulla sopravvivenza.....	72
<b>5</b>	<b>Discussione dei risultati ottenuti.....</b>	<b>86</b>
5.1	Lineage ed Immunofenotipo.....	86
5.2	Impatto degli aspetti clinici: genere, età e diffusione di malattia.....	88
5.3	Pattern genetico e citogenetico.....	93
5.4	CR, NR, MRD + e –.....	95
<b>6</b>	<b>Limiti dello studio.....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>108</b>

# **1. Introduzione alla Leucemia Acuta Linfoide**

## **1.1 Generalità**

La Leucemia Acuta Linfoide o Linfoblastica (LAL, o ALL in inglese) è una complessa patologia neoplastica, caratterizzata da una anomala proliferazione clonale di progenitori staminali ematopoietici della linea linfoide, di tipo B (B-ALL) o T (T-ALL) <sup>1</sup>, bloccati ad uno stadio precoce del loro processo differenziativo <sup>2</sup>.

Le LAL, pur accomunate da un'eziopatogenesi e delle caratteristiche cliniche di base comuni, si contraddistinguono per una spiccata eterogeneità, in prima istanza nelle differenze in quanto a: epidemiologia, biologia e risposta alla terapia riscontrabili da paziente a paziente e, soprattutto, in relazione all'età del soggetto in cui la malattia si presenta. Definiremo "pediatriche" le LAL che interessano i soggetti fino al compimento dei 18 anni di età, per differenziarle da quelle dell'adulto quando insorgono in soggetti di età superiore.

## **1.2 Epidemiologia e Prognosi**

L'incidenza e prevalenza delle LAL è significativamente differente nella popolazione a seconda delle fasce d'età. Nel complesso, circa un 80% del totale dei casi si presenta nella popolazione pediatrica, mentre solo il restante 20% insorge nell'età adulta, in maniera diametralmente opposta a quanto accade per il corrispettivo Mieloide. Le LAL rappresentano infatti le neoplasie più frequenti in assoluto in ambito pediatrico, in cui costituiscono il 15% della globalità delle diagnosi di cancro in età infantile sotto i 15 anni <sup>3,4,5</sup>.

Al di sotto dei 18 anni, le Leucemie Acute nel loro complesso (LAL e LAM) si collocano epidemiologicamente al primo posto (seguite da tumori solidi del SNC e Linfomi), e fra queste, i 3/4 sono in effetti diagnosi di Leucemie Acute Linfoidi.

Più nello specifico, il massimo picco di incidenza si riscontra nella fascia 1-4 anni (fino a raggiungere gli 81 casi per milione di soggetti in questa fascia di popolazione<sup>3</sup>), per poi diminuire progressivamente fino al raggiungimento della maggiore età e durante la prima fase della vita adulta, raggiungendo il tasso minimo di incidenza tra

i 25 e i 45 anni <sup>2,6,7</sup>. Secondo le più recenti statistiche statunitensi, l'incidenza di LAL è stimata a 40 casi per milione di soggetti tra 0 e 14 anni e approssimativamente 21 casi per milione di soggetti tra i 15 e i 19 anni<sup>8</sup>. In totale, il numero di casi diagnosticati ogni anno di ALL pediatrica è ad oggi stimato a 100.000 circa, con prevalenza maschile lievemente maggiore, specie per quanto riguarda le T-ALL<sup>5</sup>.

Le LAL dell'adulto invece mostrano una incidenza di 1,5 casi per 100.000/persone/anno con notevoli differenze a seconda della fascia di età (0,5 casi tra 45-54 anni, 1 tra 55-74 anni, 1,5 tra 75-99 anni) <sup>1</sup>.

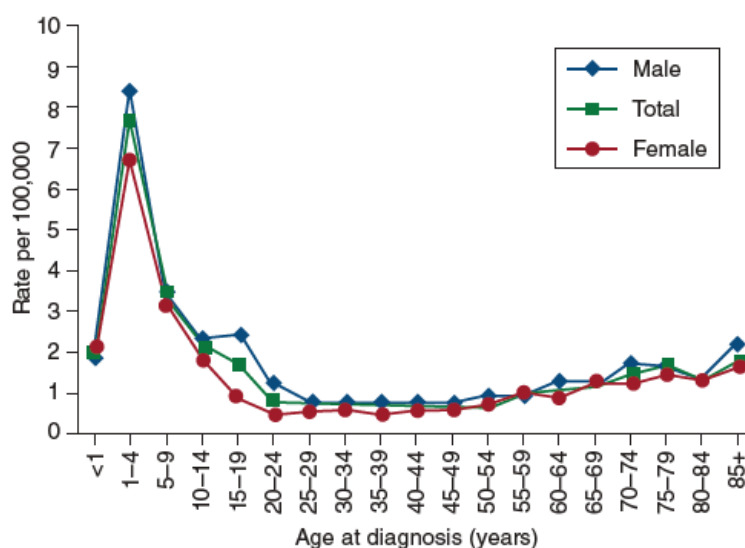


Figura 1. Incidenza LAL per fasce d'età (Fonte: Williams Hematology, 9th Edition)

Le differenze in base all'età alla diagnosi risultano quanto mai evidenti anche in merito alla prognosi. Se considerata globalmente, quest'ultima è migliorata considerevolmente negli ultimi anni, con un incremento di OS (Overall Survival, ovvero di sopravvivenza globale) a 5 anni dal 31% nel 1975 al 70% nel 2009<sup>2</sup>. Ciò è però vero soprattutto per la popolazione pediatrica in cui ad oggi si registra un tasso di guarigione superiore all'80% <sup>9, 10, 11</sup>.

Al contrario, un simile successo terapeutico non è riscontrabile se prendiamo in esame le LAL dell'adulto, in cui la sopravvivenza stimata a 5 anni resta circa del 25% nei

pazienti con età superiore ai 50 anni alla diagnosi <sup>2,12</sup>, ed in cui quindi in generale la malattia continua ad avere un impatto ed una prognosi ben più pesanti, costituendo a tutt'oggi una notevole sfida nel management di questi pazienti.

È pertanto sulle LAL dell'adulto che si concentra il presente lavoro di ricerca, proponendosi di approfondire i principali aspetti di una patologia ad oggi nota ma per la quale ancora molto resta da indagare, concentrandoci in seguito sulla casistica del centro dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche.

### **1.3 Presentazione clinica e di laboratorio**

Da un punto di vista clinico, il quadro di presentazione di una Leucemia Acuta, ed in questo caso di una Leucemia Acuta Linfoide, può risultare notevolmente eterogeneo a seconda del soggetto e delle caratteristiche della malattia stessa. È tuttavia possibile identificare aspetti generali comuni alla maggioranza di suddetti quadri specifici.

In primo luogo, una LAL è per definizione una proliferazione clonale di cellule maligne (Linfoblasti) che tende ad espandersi ed occupare progressivamente il midollo osseo da cui tendenzialmente origina, sostituendosi quindi alle cellule progenitrici fisiologicamente deputate all'ematopoiesi delle diverse linee cellulari che costituiscono la parte corpuscolata del sangue.

Ciò si estrinseca spesso in un quadro aspecifico di astenia e sproporzionata intolleranza allo sforzo, cui possono aggiungersi segni quali pallore, tachicardia e tachipnea, definendo nel loro complesso un quadro da sindrome anemica; il deficit della piastrinopoiesi giustifica invece la riduzione dell'efficienza del processo coagulativo e la conseguente comparsa di microemorragie a livello mucocutaneo, con sanguinamenti gengivali, porpore e petecchie più o meno diffuse, talvolta fino a quadri francamente emorragici; particolarmente critico è poi il quadro imputabile alla immunocompromissione da inadeguata poiesi della serie bianca, soprattutto legata alla neutropenia, che si ripercuote nell'aumentata suscettibilità ad infezioni e ridotta capacità dell'organismo di rispondere ad esse.

La malattia tuttavia, specie quando particolarmente aggressiva, potrebbe presentarsi fin dall'esordio con un quadro molto più conclamato e drammatico, legato alla presenza di blasti in sede extramidollare con sintomi e segni clinici più specificamente legati alla compromissione delle diverse aree anatomiche: scadimento delle condizioni generali con febbre e sudorazione profusa, adenomegalie superficiali e profonde, epato-splenomegalia; dolori intensi e profondi provocati dall'infiltrazione di segmenti ossei e periostio; tumefazioni anche a carico di organi fisiologicamente ed anatomicamente protetti, cosiddetti "santuari immunologici", quali gonadi o SNC. In quest'ultimo caso, le manifestazioni indicative di una invasione da parte dei blasti e/o meningiosi leucemica saranno: vomito a getto, cefalea intensa, vertigini, papilledema da ipertensione endocranica, rigidità nucale, alterazione dello stato di coscienza etc. In particolare, l'interessamento del SNC è testimoniato in circa il 5-10% dei casi all'esordio (motivo per cui alla diagnosi è sempre indicata l'esecuzione di una rachicentesi per escluderlo o confermarlo in caso di riscontro di una quota di leucociti per definizione  $> 5/\text{mmc}$ ), oltre a costituire una importante sede di eventuale recidiva, rappresentando un importante fattore prognostico negativo <sup>1</sup>.

#### **1.4 Diagnosi della malattia**

Il processo diagnostico di una LAL è frutto dell'integrazione di metodi differenti ciascuno caratterizzante la malattia da un diverso punto di vista: morfologico, immunofenotipico, molecolare (genetico e citogenetico).

L'iniziale work-up diagnostico si prefigge i seguenti obiettivi<sup>29</sup>:

- Confermare la diagnosi di LAL;
- Differenziare le LAL a precursori B, da quelle a precursori T;
- Identificare le LAL Burkitt-type;
- Distinguere le LAL Philadelphia positive (Ph+) da quelle negative (Ph-).

A questa prima fase di diagnosi vera e propria, faranno poi seguito approfondimenti tramite indagini più specifiche finalizzate a studiare e classificare la malattia in maniera più rigorosa e dettagliata, ma soprattutto a stratificarla da un punto di vista

prognostico, aspetto quanto mai determinante nell'ottica della definizione del rischio e di conseguenza del percorso terapeutico più adeguato.

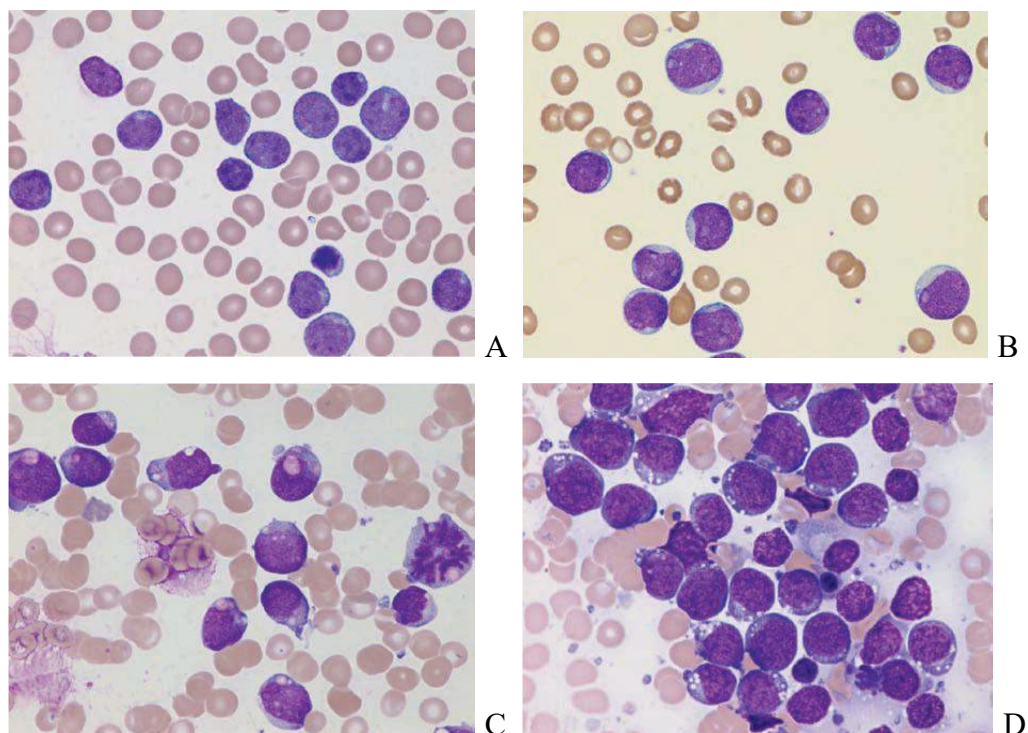
- **DIAGNOSI MORFOLOGICA**

Un approccio basilico ed iniziale ma imprescindibile è quello rappresentato dall'osservazione microscopica di campioni biologici: in primo luogo uno striscio di sangue periferico e, successivamente al ricovero, un agoaspirato midollare. Entrambi i campioni, preparati con colorazione di May-Grunwald-Giemsa, vengono studiati al microscopio ottico per individuare una presenza di cellule indifferenziate, o meglio "blasti", e valutarne quindi l'aspetto morfologico appunto. La necessità di procedere ad un aspirato midollare e non limitarsi allo striscio di sangue periferico consegue al fatto che circa un 10% dei pazienti manca di blasti circolanti alla diagnosi, oltre al fatto che le cellule midollari si prestano meglio agli steps successivi di indagine immunofenotipica e genetica<sup>13</sup>. Esistono poi esigenze specifiche, nelle quali neppure l'aspirato midollare consente di ottenere un campione adeguato alla diagnosi: è ciò che accade ad esempio in caso di spiccata fibrosi midollare; in questi casi è necessario ricorrere dunque ad una metodica più invasiva, una vera e propria biopsia del midollo osseo.

Si considerano diagnostiche percentuali di blasti maggiori o uguali al 20% secondo le Linee Guida WHO e maggiori o uguali al 30% secondo agli ormai desueti criteri FAB.

In questo contesto è opportuno introdurre una precisazione: la Leucemia Acuta Linfoide è comunemente identificata con il Linfoma Linfoblastico, a tal punto che ci si riferisce ad essi come alla medesima patologia. Per essere più rigorosi tuttavia, pur rappresentando in effetti estrinsecazioni dello stesso processo patologico, le due definizioni non sono tra loro interscambiabili: parliamo più correttamente di LAL nel contesto di un primitivo interessamento del midollo osseo da cui i blasti possono eventualmente andare incontro a leucemizzazione, ovvero immissione dei blasti nel circolo periferico; il termine LL invece, o Linfoma Linfoblastico, è da preferirsi quando la sede primitiva di estrinsecazione sia localizzata primariamente in un linfonodo e/o altre sede extranodali.





*Figura 2* Differenti morfologie delle LAL allo striscio periferico, 1000x  
 (Fonte: Williams Hematology, 9th Edition)

Tipicamente, i linfoblasti tendono ad essere relativamente piccoli (fino ad un massimo di un diametro doppio rispetto a quello di un linfocita normale), con scarso citoplasma, tendenzialmente azzurro-violaceo. Il nucleo appare rotondo o leggermente dentellato e i nucleoli sono spesso indistinti o comunque poco appariscenti (A).

In alcuni casi tuttavia, è possibile riscontrare una commistione tra cellule neoplastiche “tipiche” -come quelle pocanzi descritte- e blasti di dimensioni maggiori, con citoplasma ancora più ridotto e nucleoli prominenti (B).

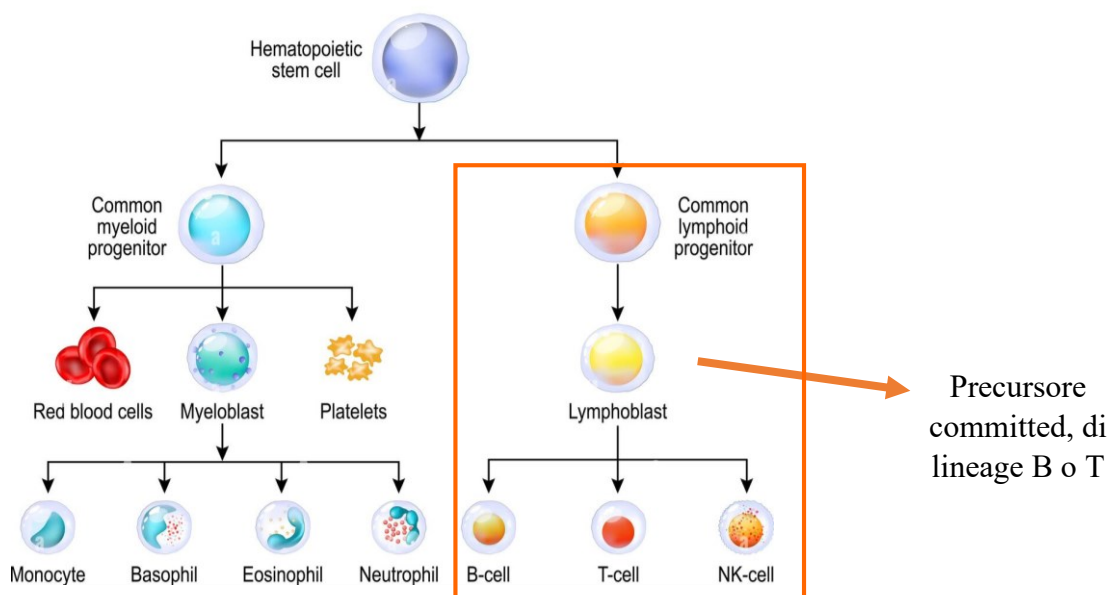
Alcuni blasti presentano poi una anomala granulazione che potrebbe condurre ad una erronea classificazione come mieloblasti. I granuli sono però in questo caso di solito anofili e di colore rosa intenso, al contrario di quelli mieloidi primari tipicamente viola scuro; peraltro, ad uno studio più approfondito risulterebbero negativi per la MPO (mieloperossidasi, marker tipico mieloide) (C).<sup>13</sup>

Infine, relativamente all’ultimo degli aspetti rappresentati in *Figura 2*, si sottolinea che la definizione di “Leucemia Burkitt-type” o “LAL L3” è ormai superata, rappresentando il Burkitt una malattia linfomatosa i cui blasti (tipicamente di

grandi dimensioni e regolari, caratterizzati da citoplasma basofilo intenso, nuclei prominenti e evidente vacuolizzazione citoplasmatica) possono eventualmente andare incontro a leucemizzazione, costituendo dunque un'entità clinica da considerare nell'ambito di una diagnostica differenziale (D).

- **DIAGNOSI IMMUNOFENOTIPICA**

Lo studio dell'immunofenotipo, ovvero dei marcatori specifici che identificano il clone neoplasma cellulare, rappresenta a tutt'oggi il Gold Standard nel lineage assessment e prima classificazione della LAL. Tramite uno studio con tecnica citofluorimetrica (*NdR si veda il paragrafo 1.8 per una descrizione più esaustiva dell'aspetto tecnico*), le cellule midollari vengono studiate tramite panels di anticorpi specifici fluoromarcati in grado di riconoscere e legare specifici antigeni di superficie (CD ovvero "clusters of differentiation") che si associano a differenti stadi maturativi della cellula andata incontro alla mutazione clonale (in *Figura 3* sono rappresentati i principali steps di tale processo di differenziazione a cui questa può occorrere). In altre parole, tramite lo studio dei marcatori espressi dalla cellula possiamo risalire alla tappa maturativa a cui si è arrestato il processo di differenziamento linfoide (*Figure 4 e 5*).<sup>9, 14</sup>



*Figura 3. Processo fisiologico di differenziamento della linea cellulare linfoide. (<https://www.alamy.it/emopoiesi-ematopoiesi-umana-illustrazione-vettoriale-leucociti-e-linfociti-tabella-didattica-poster-per-uso-scientifico-image438394656.html>)*

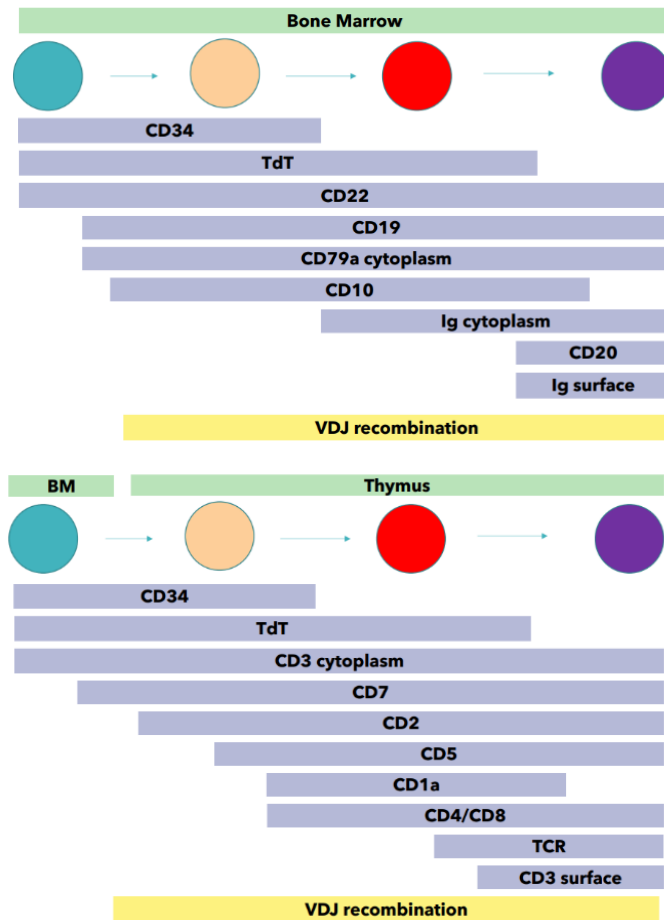


Figure 4 e 5. Marcatori linfoidi B e T nei diversi stadi maturativi

In definitiva rappresentano markers di lineage B il CD19, CD22, CD20 (associato a fenotipo più maturo), CD79a, CD10; appartengono al lineage T invece CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD2, CD1.

A questi si aggiungono markers associati ad un fenotipo maggiormente immaturo, tipici della stessa cellula staminale o addirittura di lineage mieloide che caratterizzano linfoblasti maggiormente indifferenziati e a prognosi peggiore (LAL Early-T precursor<sup>9,13</sup>. *Si veda Paragrafo 1.7*).

In genere, i panels precostituiti che vengono impiegati per l'analisi dell'immunofenotipo contengono anticorpi specifici per almeno un marcatore ad elevata sensibilità (CD19 per precursore di lineage B e CD7 per lineage T) e anticorpi rivolti contro almeno un marker ad elevata specificità (CD79a e CD22 per il lineage B e CD3 per T).<sup>13, 15</sup>

A seconda delle positività risultanti dallo studio citofluorimetrico, le LAL possono essere distinte quindi in B e T e ulteriormente classificate in diversi sub-fenotipi come segue:

LAL a fenotipo B								
	TdT	CD19	CD79	cCD22	CD10	clgμ	slgμ	sk/λ
Pro-B	+	+	+	+	-	-	-	-
Common	+	+	+	+	+	-	-	-
Pre-B	+	+	+	+	+/-	+	-	-
B-mature	-	+	+	+	-	+	+	+

LAL a fenotipo T								
	TdT	cCD3	CD7	CD2	CD5	CD1a	sCD3	γ/δ oppure α/β
Pro-T	+	+	+	-	-	-	-	-
Pre-T	+	+	+	+	+	-	-	-
T-corticali	+	+	+	+	+	+	+/-	-
T-mature	+/-	+	+	+	+	-	+	+/-

Figura 6. Sub-fenotipi B e T secondo classificazione Immunofenotipica (<https://www.ematologiainprogress.it/leucemia-acuta-linfoide/>)

Da non dimenticare infine che il metodo immunologico avrà un ruolo fondamentale nell'“assessment” dei marcatori di superficie caratteristici del clone neoplastico, successivamente impiegati nella rivalutazione della MRD o Minimal Residual Disease, che consiste di fatto nella persistenza seppur minima di cellule maligne nonostante il raggiungimento della Remissione Completa di malattia, la cui positività correla pertanto con un aumento dell'incidenza di recidive ed insuccessi terapeutici (*per una trattazione più approfondita ed esaustiva si rimanda al paragrafo 1.8*).

- **DIAGNOSI CITOGENETICA E MOLECOLARE**

Attualmente, lo studio molecolare e citogenetico rappresentano gli imprescindibili strumenti di classificazione (come da nuove Linee Guida WHO e ICC) e stratificazione prognostica delle LAL.

Le principali metodiche di cui consta questo aspetto diagnostico sono rappresentate da:

- STUDIO DEL CARIOTIPO.

La tecnica di cui si avvale lo studio del cariotipo è quella convenzionale del “Giemsa (G)-banding”<sup>16,17</sup> che, tramite l’identificazione di specifiche porzioni cromosomiche, permette uno studio complessivo del corredo cromosomico della cellula: è possibile dunque apprezzare simultaneamente anomalie legate ad esempio a sovrannumero o riduzione rispetto alla ploidia standard (46, XX o XY), mutazioni cromosomiche quali: traslocazioni, delezioni, inversioni ed altri riarrangiamenti significativi. Si tratta sicuramente di una metodica consolidata e tutt’oggi considerata valida per uno screening iniziale, dato anche il vantaggio della sua economicità; essa presenta tuttavia alcune limitazioni che rendono necessario il suo affiancamento o sostituzione con metodiche più all’avanguardia. Ad esempio, talvolta le bande risultanti dalla tecnica Giemsa risultano scarsamente distinguibili le une dalle altre; in altri casi i cromosomi non risultano disponibili per eseguire l’analisi a causa del fallimento della coltura cellulare che rappresenta un requisito indispensabile; infine, alcuni riarrangiamenti o traslocazioni più complesse, tra le quali ETV6-RUNX1 (riconosciuta nell’ambito della classificazione WHO del 2022)<sup>22</sup>, sono di più difficile identificazione.<sup>16, 18, 19</sup>

- FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization).

Questo tipo di metodica è sempre più impiegata, accanto o al posto della precedente, potendo contare su una maggiore precisione e affidabilità.<sup>20</sup> Essenzialmente, la tecnica consiste nell’utilizzo di sonde a DNA o RNA, marcate con fluorocromi, ossia molecole in grado di emettere una fluorescenza a seguito dell’appaiamento con il loro target specifico. I target, e dunque le sonde loro complementari, possono consistere di tratti cromosomici più o meno estesi, fino a semplici sequenze nucleotidiche ripetute o polimorfismi specifici.

La FISH è fondamentale in primo luogo nello studio molecolare preliminare, volto a rilevare ad esempio la presenza o meno del gene di fusione BCR-ABL1: esso consegue alla traslocazione reciproca t(9;22)(q34;q11) che classifica la LAL come “Philadelphia positiva” (come precedentemente accennato, la distinzione tra LAL “Philadelphia negative” o “Ph-” e “Philadelphia positive” o “Ph+” è una priorità nell’ambito dell’approccio diagnostico iniziale ad un nuovo caso di Leucemia

Acuta Linfoblastica. La positività della FISH per BCR-ABL1 avvierà il paziente ad un successivo protocollo diagnostico e terapeutico del tutto particolare e specifico, mirato per le caratteristiche peculiari di tale condizione. Primo fra tutti, l'impiego di terapie di prima linea differenti, essenzialmente gli ITK, *si veda Paragrafo 1.6*); analogamente, altre anomalie cromosomiche più frequenti sono ricercate in questa fase diagnostica iniziale, ad esempio ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1 etc.

In seguito poi, la FISH potrà essere impiegata per un più approfondito studio nell'ambito degli steps successivi dell'iter diagnostico della malattia.

- STUDIO MOLECOLARE.

A differenza del bandeggio Giemsa e della FISH sopra menzionate, che consentono uno studio su base citogenetica, ovvero a livello cromosomico, le nuove tecnologie, sviluppate su base molecolare, consentono di identificare la presenza di ulteriori anomalie altrimenti non individuabili.<sup>21</sup> Le tecniche che rientrano in questo capitolo sono ultraspecialistiche e non diretto oggetto del presente elaborato, ricordiamo però tra queste sicuramente la RT-PCR, attualmente Gold Standard nella caratterizzazione definitiva della malattia e cruciale nella rivalutazione della MRD nel tempo (*si veda paragrafo 1.8*).

Ancora più sofisticate poi le indagini tramite sequenziamento genico NGS (Next Generation Sequencing), che tuttavia non si è ancora in grado di proporre su larga scala a tutti i pazienti a causa di costi e requisiti tecnici al di sopra di quelli disponibili nella maggior parte dei casi; lo stesso dicasi per lo studio degli SNPs arrays (polimorfismi di singolo nucleotide), che hanno permesso in ambito di ricerca una più approfondita conoscenza delle anomalie genetiche, e non solo cromosomiche, alla base dei differenti fenotipi LAL, così come l'identificazione dei geno/fenotipi più recentemente introdotti dalle ultime classificazioni (*Paragrafo 1.5*).

## 1.5 Classificazione delle LAL (WHO e ICC)

<<Una classificazione della malattia evidence-based è fondamentale per il trattamento del singolo paziente, il monitoraggio dell'incidenza globale della patologia, e per investigare tutti gli aspetti eziologici, prognostici e terapeutici>><sup>22</sup>.

A questo proposito, al 2022 risale la quinta e più recente classificazione delle Leucemie Acute Linfoidi: “WHO-HAEM5”, esito della revisione della precedente “HAEM4R” datata 2017. Gli autori presentano la nuova come una <<evoluzione sistematica delle classificazioni precedenti>> in cui sono riconosciuti “criteri essenziali”, indispensabili per poter porre diagnosi di un determinato fenotipo di LAL, e criteri “desiderabili”, aggiuntivi, che aiutano nella conferma della diagnosi stessa.

Il criterio di base su cui si fonda la classificazione è sostanzialmente gerarchico, prevedendo quindi una divisione dei differenti fenotipi sulla base di livelli crescenti di differenziamento cellulare, correlando quindi in linea generale con l'aggressività della neoplasia: passando dalle più indolenti per giungere alle più rapidamente progressive.

Rispetto alle precedenti, classicamente incentrate su aspetti più prettamente morfologici e pattern di espressione immunofenotipico, in questa ultima revisione grande peso è attribuito all'aspetto citogenetico e molecolare, ormai sempre più determinante nell'ambito del processo diagnostico e di stratificazione del rischio dei diversi pazienti. Tuttavia, per garantire continuità alla pratica clinica e ai trials già in atto, è proposto un approccio relativamente conservativo nell'introduzione di modificazioni nella nomenclatura<sup>22</sup>.

Alcune novità degne di nota sono rappresentate dall'introduzione di un nuovo sottogruppo costituito da condizioni non neoplastiche o “*Tumor-like lesions*”, che rappresentano quadri patologici in grado di mimare clinicamente una patologia linfoproliferativa acuta e/o di costituire quindi una importante diagnosi differenziale rispetto alla stessa. Altri capitoli introdotti sono quelli relativi alle sindromi più frequentemente associati a neoplasie linfoidi, tra cui l'atassia teleangectasia (AT) con mutazione del gene ATM e la Nijmegen-Breajikage syndrome con mutazione di NBN, la cui identificazione non solo permette di facilitare la diagnosi di LAL/LL in

quanto “*AT- o NBS- related*”, ma anche di calibrare l’iter terapeutico secondo comorbidità e tossicità attese<sup>22</sup>.

- B –ALL

Per quanto riguarda la classificazione delle Leucemie Acute Linfoidi di tipo B, esse sono categorizzate nella “famiglia/classe” delle proliferazioni Linfoidi e Linfomi B-cellulari, tramite criteri essenziali di tipo morfologico e immunofenotipico. Come già accennato tuttavia, la sub-fenotipizzazione è subordinata alla determinazione molecolare. In merito a quest’ultima, la maggior parte dei fenotipi resta concorde con quelli individuati nella quarta classificazione WHO-HAEM4R in virtù del proposito degli Autori di non stravolgere radicalmente la nomenclatura; tuttavia quest’ultima è ora completata da ulteriori “refinements” da un punto di vista prettamente molecolare, con l’introduzione di nuove mutazioni e riarrangiamenti specifici neo-individuati.

È da notare inoltre che un accento particolare è posto proprio sulle indagini diagnostiche molecolari di PCR e sequenziamento, piuttosto che sulle più convenzionali analisi citogenetiche volte allo studio del cariotipo, ed è su queste che si orienta specialmente la nomenclatura stessa.

Precursor B-cell neoplasms	
<b>B-cell lymphoblastic leukaemias/lymphomas</b>	
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma, NOS	(Same)
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with high hyperdiploidy	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with hyperdiploidy
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with hypodiploidy	(Same)
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with iAMP21	(Same)
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>BCR::ABL1</i> fusion	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>BCR::ABL1</i> -like features	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma, <i>BCR-ABL1</i> -like
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>KMT2A</i> rearrangement	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> -rearranged
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>ETV6::RUNX1</i> fusion	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>ETV6::RUNX1</i> -like features	<i>Not previously included</i>
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>TCF3::PBX1</i> fusion	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>IGH::IL3</i> fusion	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.1); <i>IGH/IL3</i>
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>TCF3::HLF</i> fusion	<i>Not previously included</i>
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with other defined genetic abnormalities	(Same)

Figura 7 Classificazione delle Leucemie Acute Linfoblastiche/Linfomi Linfoblastici di tipo B (Fonte: The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms.)



Osservando la classificazione, vediamo che la maggior parte delle neoplasie B-cellulari è identificata da anomalie in termini di ploidia (ipo- iper- ploidia) o piuttosto riarrangiamenti drivers ben noti ed identificati già nel corso delle precedenti revisioni (iAMP21, BCR-ABL1, ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1 etc.).

A questi genotipi e fenotipi associati, sono aggiunti però alcuni di recente identificazione: ad esempio, la rara B-ALL caratterizzata dal gene di fusione TCF3-HLF, differenziato ora da quelle esprimenti TCF3-PBX1 a cui precedentemente erano associate e caratterizzate da un comportamento particolarmente aggressivo<sup>22, 23, 24</sup>.

Un altro fenotipo ora riconosciuto come identità nosologica indipendente (presentata in precedenza solo come fenotipo “provisional”, provvisorio) è la “*BCR-ABL1 like*”, così definita in quanto caratterizzata da un profilo simile a quello tipico di una LAL Ph+ senza presentare tuttavia la tipica traslocazione t(9;22). Evidenze dimostrano che la prevalenza di questa LAL sia tutt’altro che trascurabile, costituendo nel suo complesso fino ad un 15-20% della casistica, e che sia caratterizzata da una marcata riduzione in termini di outcomes prognostici (secondo un primo studio è riportato un OS a 5 anni del 59.5%, comparato con un 84,4% di altri geno-fenotipi B-ALL<sup>25</sup>; un secondo report, concordemente, dimostra una riduzione dell’OS a 5 anni dal 49.3% al 22.5%<sup>26</sup>).

Infine, un’ultima “novità” della revisione 2022, è l’introduzione di una classe eterogenea in cui sono comprese tutte le LAL-B che presentino mutazioni di recente identificazione per le quali tuttavia non sono ancora presenti sufficienti evidenze per poterle classificare come entità singole: “*B-ALL with other defined genetic abnormalities*” (DUX4, MEF2D, ZNF384, NUTM1, fusione IG-MYC etc.)

- T-ALL

Di fatto, anche in questo caso viene sostanzialmente mantenuta la classificazione WHO-HAEM4R comprendente la Leucemia Linfoblastica/Linfoma T-cellulare, e la LAL/LL a precursore “*early-T*” associata ad un fenotipo particolarmente indifferenziato, addirittura caratterizzato dall’espressione di marcatori propri della cellula staminale (CD34) e/o marcatori mieloidi, associato per naturale

conseguenza ad una prognosi peggiore. Una novità in questa famiglia è l'eliminazione della categoria provvisoria individuata nella precedente classificazione WHO delle "LAL/LL-NK", a seguito di una carenza di evidenze scientifiche e affidabili criteri diagnostici <sup>22</sup>.

Precursor T-cell neoplasms	
<i>T-lymphoblastic leukaemia/lymphoma</i>	
T-lymphoblastic leukaemia / lymphoma, NOS	T-lymphoblastic leukaemia/lymphoma
Early T-precursor lymphoblastic leukaemia / lymphoma	Early T-cell precursor lymphoblastic leukaemia
(Entity deleted)	NK-lymphoblastic leukaemia/lymphoma

*Figura 8 Classificazione delle Leucemie Acute Linfoblastiche/Linfomi Linfoblastici di tipo T (Fonte: The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms)*

Per completezza, si ritiene necessario menzionare un secondo sistema classificativo, ovvero quello dell'ICC (*International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias*), per lo più concorde con quello WHO 2022, ma che presenta tuttavia alcune peculiarità rispetto ad esso.

Come gli Autori infatti tendono a sottolineare l'International Consensus Classification (ICC) si propone un obiettivo ancora più ambizioso se possibile: unificare cioè i diversi gruppi di ricerca e di studiosi che hanno partecipato alla stesura delle principali classificazioni di disturbi mielo- e linfo- proliferativi con il fine del raggiungimento di uno sguardo ancora più completo e generale e un miglioramento significativo nella pratica clinica: <<questa nuova classificazione rappresenta una revisione maggiore della precedenti classificazioni ed include molti degli Autori delle precedenti edizioni WHO ma non è più affiliata ad essa [...] una collaborazione tra WHO, la Society of Hematopathology, e la European Association for Haematopathology>>. <sup>27</sup>

<p><b>B-ALL</b></p> <p>B-ALL with recurrent genetic abnormalities</p> <p>B-ALL with t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 with lymphoid only involvement</p> <p>B-ALL with t(v;11q23.3)/KMT2A rearranged</p> <p>B-ALL with t(12;21)(p13.2;q22.1)/ETV6::RUNX1</p> <p>B-ALL, hyperdiploid</p> <p>B-ALL, low hypodiploid</p> <p>B-ALL, near haploid</p> <p>B-ALL with t(5;14)(q31.1;q32.3)/IL3::IGH</p> <p>B-ALL with t(1;9)(q23.3;p13.3)/TCF3::PBX1</p> <p>B-ALL, BCR::ABL1-like, ABL-1 class rearranged</p> <p>B-ALL, BCR::ABL1-like, JAK-STAT activated</p> <p>B-ALL, BCR::ABL1-like, NOS</p> <p>B-ALL with iAMP21</p> <p>B-ALL with MYC rearrangement</p> <p>B-ALL with DUX4 rearrangement</p> <p>B-ALL with MEF2D rearrangement</p> <p>B-ALL with ZNF384(362) rearrangement</p> <p>B-ALL with NUTM1 rearrangement</p> <p>B-ALL with HLF rearrangement</p> <p>B-ALL with UBTF::ATXN7L3/PAN3, CDX2 ("CDX2/UBTF")</p> <p>B-ALL with mutated IKZF1 N159Y</p> <p>B-ALL with mutated PAX5 P80R</p> <p>Provisional entity: B-ALL, ETV6::RUNX1-like</p> <p>Provisional entity: B-ALL, with PAX5 alteration</p> <p>Provisional entity: B-ALL, with mutated ZEB2 (p.H1038R)/IGH::CEBPE</p> <p>Provisional entity: B-ALL, ZNF384 rearranged-like</p> <p>Provisional entity: B-ALL, KMT2A rearranged-like</p> <p>B-ALL, NOS</p>
<p><b>T-ALL</b></p> <p>Early T-cell precursor ALL with BCL11B rearrangement</p> <p>Early T-cell precursor ALL, NOS</p> <p>T-ALL, NOS</p> <p>Provisional entities (see supplemental Table 7)</p>
<p><b>Provisional entity: natural killer cell ALL</b></p>

Una differenza rilevabile rispetto a quanto visto per WHO-HAEM5, è la sotto-classificazione delle LAL BCR-ABL1 + (Ph +) in due classi distinte, una di esse maggiormente correlata alla degenerazione a partire da una LMC (Leucemia Mieloide Cronica)<sup>28</sup>, l'altra invece non associata a tale fenotipo e non dipendente da crisi linfoblastica su LMC, bensì LAL Ph+ in prima istanza. Anche in questo caso inoltre, particolare rilevanza è attribuita al fenotipo *BCR-ABL-like*, che viene associato ad una ampia pletora di mutazioni, tra cui spiccano quelle della linea JAK-STAT, e tra queste in particolare il riarrangiamento di CRFL2.

Figura 9. Classificazione delle Leucemie Acute Linfoblastiche/Linfomi Linfoblastici B e T. (Fonte: ICC classification)

Per quanto riguarda le nuove mutazioni identificate, esse corrispondono per lo più a quanto già messo in evidenza dalla classificazione WHO 2022 nell'ambito dell'ultima classe sopra menzionata ("*B-ALL with other defined genetic abnormalities*").

Anche per quanto concerne le LAL/LL T-cellulari, i due sistemi sono fondamentalmente concordi, se non che le Neoplasie NK vengono in questo caso mantenute come entità a sé stante, seppur "*provisional*".

## 1.6 Linee generali di Trattamento e Principali Linee Terapeutiche

Non è semplice parlare in termini generali delle principali linee di trattamento delle Leucemie Acute Linfoidi, poiché le opzioni e iter terapeutici ne riflettono la complessità. Da un punto di vista generale, è tuttavia possibile affermare che praticamente la totalità dei protocolli impiegati nel trattamento delle LAL consta di quattro fasi che si attuano nel corso di 2 o 3 anni di terapia in media<sup>29, 30, 31, 32</sup>.

### 1.6.1 Standard terapeutico: protocolli di prima linea, ITK e Trapianto allogenico

#### a) *Induzione*

La prima è la fase di “Induzione”, iniziale e aggressivo approccio polichemioterapico che mira all’eradicazione del “burden” ovvero del carico complessivo di malattia e al raggiungimento della cosiddetta “Remissione Completa o RC”. Questa condizione si identifica con il netto miglioramento del quadro clinico ed ematologico, fino al ripristino delle condizioni generali del paziente, la normalizzazione del suo emocromo con risalita dei polimorfonucleati al di sopra dei 1.000/mm<sup>3</sup> e delle piastrine sopra le 100.000/mm<sup>3</sup>, con scomparsa di blasti a livello del sangue periferico e riscontro di una percentuale inferiore al 5% a livello midollare.

A questo scopo, il regime terapeutico consta quindi di una potente combinazione chemioterapica, in genere includendo Vincristina, Ciclofosfamida, L-asparaginasi e Antracicline, cui si aggiungono generalmente Allopurinolo o Rasburicase per prevenire la sindrome da lisi tumorale, oltre ad una premedicazione con Glucocorticoidi sistemici di circa una settimana<sup>2</sup>. Il razionale della premedicazione è quello di avviare il “debulking” della malattia, ovvero ridurre il carico di cellule neoplastiche sfruttando l’effetto citotossico dello steroide ad alte dosi. In merito a quale sia lo steroide da preferire, la letteratura scientifica si esprime a favore di una maggiore efficacia del Desametasone rispetto al Prednisone, sia in termini di risposta a livello di un coinvolgimento del SNC sia in aumento della sopravvivenza libera da eventi (EFS).<sup>33, 34, 35, 36</sup> Tuttavia il Desametasone sembra essere associato ad un aumento significativo degli eventi avversi connessi al trattamento, specie a dosi elevate, e sottende quindi la necessità

della valutazione del singolo rapporto rischio/beneficio per il paziente, considerando che non sono invece riscontrati esiti rilevanti in quanto a riduzione della sopravvivenza globale (OS).<sup>37,38</sup>

Per quanto riguarda invece la L-Asparaginasi, essa era in precedenza impiegata maggiormente nell'ambito delle LAL pediatriche, ma al netto delle evidenze di successo terapeutico, è stata introdotta anche nei protocolli dell'adulto, specie quelli "pediatric-like" applicati nei pazienti più fit e giovani, soprattutto nella sua forma pegilata (PEG-Asp). Necessaria una cautela ulteriore nei confronti di eventuali reazioni immunogene che a questa possano essere imputate, ovvero formazione di anticorpi anti-asparaginasi, che ridurrebbero l'efficacia della terapia aumentando piuttosto gli effetti collaterali (pancreatiti, epatotossicità, disordini della coagulazione), giustificando quindi la necessità di monitoraggio dell'attività del farmaco periodicamente.<sup>39,40</sup>

#### *Inibitori TirosinKinasici*

Una trattazione a sé stante meritano le LAL Ph<sup>+</sup> esprimenti il BCR-ABL1. Epidemiologicamente, la prevalenza del "cromosoma Ph" aumenta con l'età: è presente in circa un 2-5% nei bambini e adolescenti, un 22% nei pazienti adulti di età compresa tra 21-50 anni, fino al 50% nei pazienti di età superiore a 50 anni.<sup>41</sup> Questo peculiare fenotipo citogenetico è da sempre stato correlato ad una prognosi infausta, tanto che, fino a non molti anni fa, per i pazienti sottoposti alla sola chemioterapia standard, la sopravvivenza a lungo termine non superava globalmente il 10% a causa di tassi di recidiva elevati e frequente sviluppo di resistenza ai farmaci<sup>42,43</sup>. L'unica reale possibilità di guarigione era offerta dalla candidabilità del paziente a trapianto di cellule staminali<sup>44,45</sup>.

Oggi tuttavia le prospettive sono state del tutto rivoluzionate a seguito dell'introduzione di una terapia mirata al meccanismo molecolare alla base dell'acquisizione del vantaggio proliferativo del clone neoplastico, ovvero quella con ITK o Inibitori delle Tirosin-Kinasi, di fatto riconosciuti come la più grande innovazione terapeutica nella terapia delle LAL nell'ultimo decennio<sup>46,47,48</sup>. Il primo ad essere stato impiegato è l'Imatinib (*Glivec*®), il cui meccanismo d'azione inibisce selettivamente la TirosinKinasi mutata derivante dalla fusione dei geni

BCR e ABL1, e che per la prima volta è risultato in grado di determinare il raggiungimento della RC nel 90% dei pazienti. Purtroppo però elevati tassi di recidiva a livello del SNC continuavano ad essere registrati con questo farmaco.<sup>49, 50, 51.</sup> Per questo, sono stati successivamente introdotti ITK di seconda: Dasatinib (*Sprycel*®) e Nilotinib (*Tasigna*®) e terza linea: Ponatinib (*Iclusig*®), in grado di penetrare più efficacemente a livello centrale mantenendo gli elevati tassi di RC.<sup>52</sup> Addirittura, evidenze mostrano che ben il 47% dei pazienti non responsivi neppure a ITK di seconda linea, hanno invece risposto a terapia con Ponatinib.<sup>53</sup>

Per quanto concerne il loro utilizzo nella fase di Induzione di diversi protocolli, due principali modalità di impiego emergono dalla letteratura scientifica.

In alcuni studi, gli ITK vengono somministrati in Induzione associati alla chemioterapia convenzionale: i tassi di risposta si dimostrano globalmente soddisfacenti ma a prezzo di una non trascurabile tossicità, specie nei soggetti più un-fit, con tassi di mortalità fino al 5%.<sup>54, 55</sup>

Altri gruppi di ricerca invece, tra cui GIMEMA, propongono l'Imatinib in associazione ai soli steroidi, ottenendo comunque una RC in tutti i pazienti >60 anni, ma in assenza di riscontro di tossicità maggiori.<sup>56</sup> Anche in questo caso comunque è sottolineata la assoluta necessità di un trattamento chemioterapico nell'ottica di una riduzione delle recidive e della rilevazione della MMR (*paragrafo 1.8*), che verrà però somministrato in fase di consolidamento.<sup>57, 58</sup>

Una opzione ulteriore è quella scelta dal gruppo PETHEMA, in cui l'Imatinib è associato sì ad un regime chemioterapico, ma ad intensità ridotta rispetto allo standard, riportando comunque il 100% di RC in una coorte di 29 pazienti ed un miglioramento dell'EFS a 2 anni dal 37 al 63%.<sup>59</sup>

In merito al Dasatinib, è stato detto in precedenza che rappresenta teoricamente la seconda linea di trattamento per i pazienti recidivanti, no responders e/o coloro che continuano a presentare una MMR positiva in terapia con Imatinib; tuttavia, evidenze suggeriscono la sua notevole efficacia anche impiegato come terapia di prima linea in combinazione con steroidi. Si veda in particolare lo studio anche in questo caso del gruppo GIMEMA, effettuato su pazienti adulti e anziani, che ha riportato fino al 100% di RC, mantenendo una buona tollerabilità e nessun decesso registrato nella fase di Induzione.<sup>47</sup>

Infine, sono emersi risultati promettenti persino per il Ponatinib in prima linea, associato a chemioterapia intensiva, in pazienti con importante carico di malattia. Il gruppo dell'MD Anderson Cancer Center ha riportato esiti significativi nel raggiungimento di remissione di malattia e miglioramento degli outcomes nelle statistiche time-to-event.<sup>60</sup>

Ricordiamo infine che il trattamento con Inibitori delle Tirosin-Kinasi proseguirà poi nelle fasi post-Induzione successivamente elencate, in combinazione con farmaci e dosi variabili a seconda dei differenti protocolli, ma sempre includenti una chemioterapia ad elevata intensità; tale regime potrà inoltre costituire una terapia “ponte” in vista di un successivo trapianto allogenico, soprattutto in pazienti più giovani.<sup>61</sup>

#### *b) Consolidamento*

Il secondo step del protocollo prevede l'impiego di altri chemioterapici, in cicli brevi ripetuti a distanza di circa due settimane l'uno dall'altro per un totale di 12 settimane.

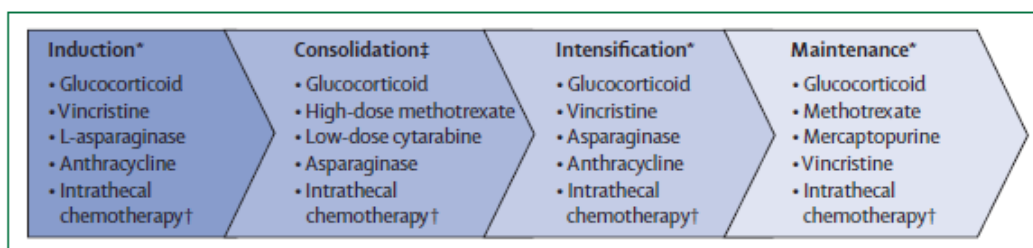
I farmaci somministrati sono in questo caso Citarabina, Metotrexate a dosi elevate (seguito da rescue folinico per ridurre tossicità e aumento del rischio di recidiva associati a livelli eccessivi di metotrexatemia<sup>62</sup>), Vincristina, Mercaptopurina e anche in questo caso Glucocorticoidi.<sup>2</sup>

#### *c) Intensificazione*

Il termine deve il suo nome al fatto che sono reimpiegati farmaci di fatto analoghi a quelli della fase *a*), responsabili perciò di una cosiddetta “Re-Induzione”, con lo scopo di sterilizzare ulteriormente il midollo e le eventuali ulteriori sedi di malattia dall'invasione del clone neoplastico.

#### *d) Mantenimento*

Tendenzialmente, la quarta ed ultima fase è quella protratta più a lungo, nei successivi 2 o 3 anni post-Induzione, con Mercaptopurina quotidianamente, Metotrexate con o senza Vincristina settimanalmente, e cicli di steroide ogni 1-3 mesi.<sup>2, 63</sup>



**Figure 1: Front-line treatment of acute lymphoblastic leukaemia**

\*Tyrosine kinase inhibitors are given during each phase of treatment in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. †Intrathecal chemotherapy consists of methotrexate alone or combined with cytarabine and hydrocortisone. ‡Allogeneic haemopoietic cell transplantation is optional after consolidation.

*Figura 10. Riepilogo dei principali farmaci impiegati nelle diverse fasi di trattamento.*

*(Fonte: ALL Review The Lancet, 2020)*

Alcune precisazioni si rendono a questo punto necessarie.

### *Profilassi del SNC*

Accanto alla somministrazione del regime steroideo e polichemioterapico di base, è indispensabile per una adeguata gestione della LAL una profilassi/trattamento più specificamente mirato al coinvolgimento del SNC. Per questo, ad ogni fase del protocollo si aggiungono una profilassi di routine nei pazienti che non mostrano alla diagnosi coinvolgimento centrale, basata su ripetute somministrazioni intratecali di farmaci chemioterapici (punture lombari mediate di MTX, con o senza Citarabina, e Idrocortisone).<sup>64</sup>

In precedenza infatti la profilassi era eseguita con regimi di irradiazione cranica (12-24 Gy) frazionata, protocollo poi abbandonato per la significativa incidenza di eventi indesiderati gravi quali: endocrinopatie, effetti neurocognitivi e persino secondi tumori e aumento della mortalità.<sup>65</sup> Al contrario, l'irradiazione cranica trova impiego a scopo terapeutico nei pazienti che presentano interessamento del Sistema Nervoso Centrale al momento della diagnosi.<sup>66</sup>

Tali evidenze comunque sono molto più forti in ambito pediatrico rispetto alle LAL dell'adulto, nelle quali il Gold Standard resta la profilassi tramite punture lombari mediate con MTX.



### *Trapianto allogenico di cellule staminali*

Un'ulteriore aspetto degno di essere menzionato è quello relativo al trapianto allogenico di cellule staminali (allo-SCT) da donatore compatibile (familiare nel 30% circa dei casi, in alternativa: donatore non consanguineo o addirittura da sangue di cordone ombelicale). Questa è l'opzione più intensiva e potenzialmente efficace di cui si disponga attualmente.

Considerate però le pesanti ripercussioni in termini di morbilità e mortalità di una simile proposta terapeutica, essa viene riservata generalmente a pazienti altamente selezionati: fit e con età in linea di massima inferiore ai 65 anni, affetti da LAL ad alto rischio con fenotipo sfavorevole e/o resistente e/o con positività di Malattia Minima Residua (*si veda paragrafo 1.8*) nonostante la remissione completa.

Oggi, grazie ai progressi nella terapia di supporto, profilattica di infezioni e complicanze (soprattutto la GVHD, Graft Versus Host Disease, una peculiare e severa forma di rigetto) e all'impegno nella riduzione delle tossicità connesse al trapianto, il tasso non trascurabile di mortalità non legato a recidiva ma allo stesso allo-SCT è andata riducendosi significativamente.<sup>67</sup>

Il trapianto nel paziente candidabile è eseguito a seguito del regime di consolidamento, quindi in terza fase.

Di fatto, la pratica clinica lo propone addirittura come Gold Standard terapeutico, laddove possibile nel paziente Philadelphia+, e come valida opzione nelle LAL standard Ph- che presentino MRD+ a seguito di 3 o 4 cicli di Induzione e Consolidamento.<sup>68,69</sup>

È comunque cruciale cercare di raggiungere il miglior status del paziente e il miglior controllo della malattia possibili nell'immediato pre-trapianto, in quanto una positività consistente di MRD rilevata prima di eseguire lo stesso, è risultata correlata in maniera evidente ad una riduzione della sopravvivenza libera da recidiva a seguito dell'allogtrapianto.<sup>70,71</sup>

## 1.6.2 Nuove opzioni e prospettive terapeutiche

Nell'arco degli ultimi anni, sempre più attenzione è stata posta alla cosiddetta “target therapy”, una terapia cioè mirata e in un certo senso “costruita” sulle specificità della singola LAL, con l'intento di rispondere da un lato ai risultati terapeutici non sempre soddisfacenti, e di farlo dall'altro sfruttando l'eterogeneità propria delle cellule tumorali.<sup>72, 73, 74, 75</sup>

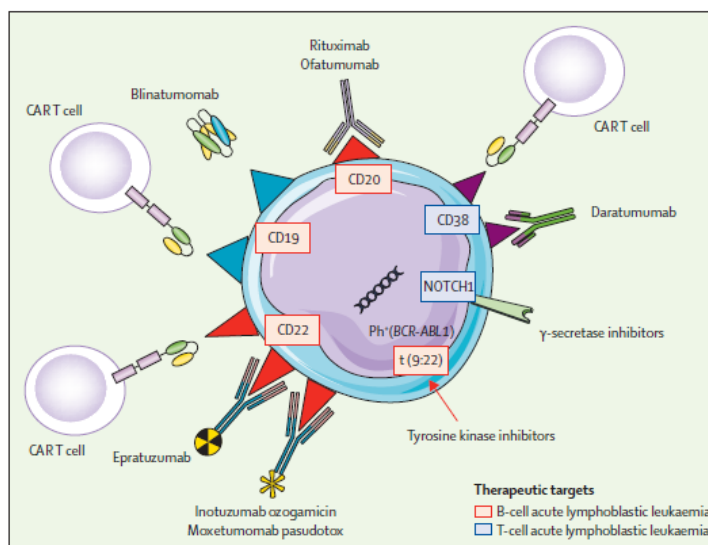


Figura 11. Panoramica sui nuovi bersagli e farmaci “target” disponibili nel trattamento delle LAL. (Fonte: ALL Review The Lancet, 2020)

- Rientrano a pieno titolo delle nuove terapie mirate gli ITK di cui si è trattato in precedenza, ed accanto ad essi, altri inibitori TirosoKinasi tra cui Ruxolitinib (inibitore selettivo delle Janus Kinasi JAK1 e JAK2) e Tofacitinib (inibitore selettivo di JAK3).
- Annoveriamo poi il Venetoclax (*Venclyxto*®): un BH3 mimetico inibitore selettivo di BCL2, proteina antiapoptotica normalmente iperattivata nella cellula tumorale. Pur essendo approvato ed indicato in principio nelle LLC e LMA, il suo impiego nelle LAL, specie le forme più immature di LAL-T e recidivanti, ha dimostrato esiti promettenti.<sup>76, 77</sup>
- Inibitori di NOTCH1, γ-secretasi inhibitors (GSI).
- Anticorpi monoclonali (AcMo) che sfruttano i marcatori di superficie di cui si è parlato in merito all'iter diagnostico della malattia. Alcuni di essi infatti,

caratteristicamente espressi da sub-set di cloni neoplastici, permettono non solo di identificarli, ma di essere utilizzati come targets per terapie specifiche che in questo modo risultano in grado di bersagliare in maniera ultrasensitiva le cellule maligne. Essi possono essere impiegati in associazione alla chemioterapia standard, oppure come singoli agenti, pre- o post- trapianto e come opzione nel paziente MRD+. <sup>74, 75</sup>

Ricordiamo:

- Rituximab, anticorpo chimerico anti-CD20. Il suo utilizzo è ormai inserito nei protocolli delle precedentemente definite “LAL Burkitt-type” fin dall’esordio, ma anche nelle LAL pre-B, purché l’espressione del CD20 sia riscontrata superiore al 20%. <sup>78</sup>

È stata inoltre proposta una combinazione Rituximab-hyper CVAD (regime costituito da CF, Vincristina, Doxorubicina e Desametasone) ed un suo impiego nei regimi pediatric-like, associandosi ad un miglioramento nell’OS ed EFS, così come ad una riduzione dei tassi di recidiva. <sup>79</sup>.

Risultati simili sono stati riportati anche con Ofatumumab, nuovo anticorpo anti-CD20. <sup>80</sup>

- Blinatumomab (*Blinicyto*®) è un AcMo bispecifico anti-CD19 e anti-TCR: riconosce e lega in questo modo tanto i linfociti B quanto quelli T e, tramite uno specifico meccanismo di azione, induce le cellule T a promuovere una risposta infiammatoria e citolitica delle cellule B.<sup>2</sup> L’impiego del farmaco è quindi riservato a LAL-B in RC ematologica ma MMR positiva e/o nei pazienti recidivati, tanto adulti quanto pediatrici.<sup>81, 82</sup> Uno studio di fase 2 ha dimostrato che il 43% di 189 pazienti affetti da LAL Ph- hanno riportato miglioramenti significativi a seguito del trattamento con Blinatumomab e, di questi, l’82% ha mostrato MMR negativa.<sup>83</sup> Anche il trial di fase 3 “*Tower*” ha riportato concordi risultati positivi con un 44% di risposta nel braccio di trattamento con Blinatumomab rispetto a quello di chemioterapia di salvataggio standard, con possibilità di sottoporre poi i pazienti responders a allo-SCT.<sup>84</sup> Una importante novità da aggiungere poi, è quella presentata al meeting annuale dell’ASH, tenutasi ad Orlando nel 2019, in occasione della

quale sono stati presentati gli aggiornamenti sullo studio di fase 2 GIMEMA LAL2116 (D-ALBA). Sono stati reclutati in questo caso pazienti affetti da LAL Ph+ di nuova diagnosi, a cui è stato somministrato un regime completamente chemo-free costituito da Dasatinib associato a Blinatumomab. I risultati si sono rivelati davvero notevoli, con risposte molecolari in più del 60% dei pazienti e tassi di OS a 18 mesi pari al 95,2 %. <sup>85</sup>

- Inotuzumab ozogamicin (INO) è un AcMo anti-CD22 coniugato a caliceamina, in grado di legare i linfociti B che esprimono questo marcatore in stadi precoci dello sviluppo, determinando a loro carico danni irreparabili al DNA ed apoptosi. Sono state registrate risposte in più della metà della coorte di pazienti affetti da LAL-B recidivate o resistenti, molti dei quali si sono successivamente dimostrati eleggibili per trapianto allogenico, dimostrando un ruolo importante anche come possibile terapia “bridge” ad allo-SCT. <sup>86</sup>

Addizionali farmaci anti-CD22 più recentemente introdotti sono: Epratuzumab, Mozetumomab pasudotox e Combotox<sup>2</sup>.

- Terapia a cellule CAR (Chimeric Antigen Receptor)-T. Le cellule CAR-T sono linfociti T del paziente, prelevati e ingegnerizzati in modo che esprimano un TCR specifico contro un antigene tumore-associato (nella maggior parte dei casi il CD19, associato a quasi il 90% delle LAL-B). Milioni di cellule modificate vengono a questo punto re-infuse nel paziente. La terapia, inizialmente indicata nella LLC e nei Linfomi, è stata quindi proposta nel trattamento di LAL-B recidivante o refrattaria riportando esiti sorprendenti.

In uno studio pilota di fase 1-2, le cellule CAR-T sono state somministrate a 30 pazienti pediatrici e adulti con Leucemia refrattaria o in recidiva, raggiungendo nel 90% della coorte la RC e una negativizzazione della MMR nell'88%.<sup>87</sup> Anche nello studio successivo, condotto su una più ampia numerosità campionaria di pazienti (53) pediatrici e giovani adulti, il tasso di RC è stato registrato pari al 83% e tutti con MRD negativa<sup>88</sup>.

Ad oggi, la terapia con CAR-T è approvata dall'EMA e l'FDA per il trattamento di bambini e pazienti di età inferiore ai 25 anni affetti da LAL recidivata o refrattaria dopo due linee di trattamenti alternativi o trapianto allogenico. I risultati sono senza dubbio più che incoraggianti, ma non vanno

trascurati i pesanti eventi avversi correlati a questo trattamento: a partire da una severa neurotossicità, potenzialmente fatale, e una potente sindrome da rilascio citochinico. Per questa ultima complicanza è risultato utile e ben tollerato l'impiego di Tocilizumab (anti-IL6).<sup>89</sup> Per il management della neurotossicità invece sono indicate elevate dosi di steroide.<sup>90</sup> Utile infine, l'infusione di Ig polivalenti per ridurre la aplasia ematologica severa conseguente alla distruzione massiva della popolazione linfocitaria B.

### 1.7 Stratificazione in base ai Fattori di Rischio

Fare diagnosi di Leucemia Acuta Linfoide non è però sufficiente. Di fondamentale rilevanza risulta a questo punto stratificare i pazienti in diverse “categorie di rischio” sulla base dei numerosi ed eterogenei aspetti che caratterizzano nel suo complesso il quadro in analisi. Ciò sarà fondamentale nell’ottica di una valutazione prognostica del paziente, ma soprattutto determinante nella definizione del percorso terapeutico e di follow-up per lui più appropriato.

I principali fattori considerati per eseguire questa stratificazione sono riassunti nell’immagine a seguire.

	Favourable factor	Adverse factor
<b>Demographic and clinical features</b>		
Age	1 year to <10 years	<1 year or ≥10 years
Sex	Female	Male
Race and ethnicity	White, Asian	Black, Hispanic
<b>Clinical, biological, or genetic features of leukaemia</b>		
CNS involvement	No	Yes
Blood count at diagnosis	Low blood count; <50 × 10 <sup>9</sup> cells per L for B-cell acute lymphoblastic leukaemia and <100 × 10 <sup>9</sup> cells per L for T-cell acute lymphoblastic leukaemia	High blood count; ≥50 × 10 <sup>9</sup> per L for B-cell acute lymphoblastic leukaemia and ≥100 × 10 <sup>9</sup> cells per L for T-cell acute lymphoblastic leukaemia
Immunophenotype	B-cell lineage	T-cell lineage
Cytogenetic features	Hyperdiploidy, ETV6-RUNX, TCF3-PBX1, and trisomy of chromosomes 4, 10, or 17	Hypodiploidy, BCR-ABL1 Philadelphia chromosome-positive, MLL rearrangements, TCF3-HLF, and complex karyotype (≥5 chromosomal abnormalities)
Genomic features	DUX4-rearrangement (ERG deletion)	IKZF1 deletions or mutations, Philadelphia chromosome-like, MEF2D-rearrangement
<b>Response to treatment</b>		
Minimal residual disease at specified time points	Low minimal residual disease <10 <sup>-3</sup> nucleated cells or undetectable	Persistence of minimal residual disease ≥10 <sup>-3</sup> nucleated cells, the higher this value the worse the prognosis

Table 2: Prognostic factors for acute lymphoblastic leukaemia

Figura 12. Principali fattori prognostici nelle LAL. (Fonte: ALL Review The Lancet, 2020)

*a) Fattori demografici e clinici.*

Sono gli elementi che dipendono dalle condizioni del paziente al momento della diagnosi, ovvero:

*- Età.*

Si tratta tra questi del fattore probabilmente più rilevante poiché di impatto tanto sulle condizioni generali del soggetto quanto sulle opzioni terapeutiche proponibili (*concetti che verranno chiariti in seguito nei paragrafi dedicati allo studio statistico*). Non solo infatti il paziente adulto presenta una prognosi peggiore rispetto ai soggetti più giovani, ma anche nell'ambito della stessa popolazione pediatrica, i soggetti di età superiore ai 10 anni hanno dimostrato outcomes inferiori rispetto a lattanti e bambini nella prima infanzia);<sup>29, 91, 92, 93</sup>

*- Sesso.*

Classicamente considerato quello femminile associato a prognosi più favorevole;

*- Fattori genetici.*

Tra i quali l'*etnia* (con prognosi peggiore associata a quella afroamericana e ispanica, anche se non è possibile escludere con ragionevole certezza la possibilità di una influenza della componente socio-economica oltre che della pura genetica);<sup>94</sup>

*- Alterazioni dell'emocromo* (soprattutto leucocitosi marcata all'esordio);

*- Performance status all'esordio* (valutato in genere con scala ECOG e considerato a rischio aumentato quando >1).<sup>1, 2, 9</sup>

*b) Fattori relativi alla malattia.*

All'interno di questa ampia categoria sono considerati gli aspetti clinici, ma soprattutto biologici che caratterizzano ciascuna LAL e ne definiscono le specificità.

*- Diffusione all'esordio*

In primis, clinicamente, un elemento determinante è rappresentato dal coinvolgimento extramidollare al momento della diagnosi: la presenza di linfadenopatie diffuse e/o l'infiltrazione di altri organi ematopoietici (milza e fegato principalmente), così come la presenza di una voluminosa massa mediastinica, o ancora soprattutto una eventuale invasione a livello del Sistema

Nervoso Centrale (SNC), sono associati ad un decorso di malattia più aggressivo e ad una riduzione degli outcomes.

Altri aspetti poi sono quelli attinenti alla menzionata biologia tumorale: a partire dal suo fenotipo fino allo studio del ben più specifico pattern di alterazioni genetiche che caratterizzano la neoplasia.

Come trattato ai punti 1.4 e 1.5 infatti, le LAL possono essere studiate e classificate secondo differenti metodiche, correlando anche in questo caso con importanti implicazioni prognostiche.

- *Immunofenotipo e lineage*

Tramite metodo immunofenotipico, viene effettuata una prima dicotomica differenziazione tra lineage B e T sulla base di alcuni marcatori specifici espressi dal clone neoplastico: (CD2, CD3, CD5, CD7, CD4, CD8, TCR $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$  per le T-ALL; CD19, CD20, CD22, TdT, CD10, cyIgM per le B-ALL).

Globalmente, un 80-85% del totale delle LAL dell'adulto presentano un fenotipo B, mentre solo il restante 15-20 % quello T.

Classicamente, le LAL-B sono state associate ad una prognosi nel complesso migliore rispetto alle più infrequenti LAL-T.

In realtà, come vedremo, questa seppur valida distinzione risulta ad oggi parzialmente semplicistica ed incompleta per varie motivazioni.

In primo luogo, poiché all'interno di ciascuna delle due "macro-classi" di riferimento, "B" e "T", sono comprese in realtà numerosi sub-fenotipi, più che eterogenei e differenti tra loro in quanto a prognosi.

Nell'ambito della trattazione dei sistemi classificativi ad oggi impiegati<sup>22,27</sup> è stato possibile menzionare alcuni di queste specifiche sottoclassi di LAL: un esempio nell'ambito delle LAL-B è costituito dalle Leucemie "Pro-B", in cui la marcata immaturità del loro precursore, rende ragione del comportamento particolarmente aggressivo. Altrettanto sfavorevole è la prognosi associata alle LAL-B "BCR-ABL1 like"<sup>25,26</sup> (*si veda 1.5*), che insieme alle precedenti "Pro-B" concorrono

quindi a dimostrare quanto insufficiente possa risultare la riduzione dell'impatto prognostico alla sola linea di differenziamento del precursore neoplastico.

D'altra parte, anche l'intensificazione delle terapie e i nuovi protocolli pediatric-like proposti e applicati in pazienti affetti da LAL-T, hanno oggi dimostrato un miglioramento nei tassi di sopravvivenza per questi pazienti<sup>92, 93</sup> rendendo ancora più labile il netto confine prima riconosciuto tra i due lineages.

Resta comunque indiscutibilmente difficile la gestione di questi pazienti, specie quando refrattari e/o recidivati precocemente, le cui aspettative di vita risultano sì globalmente inferiori rispetto a quelle -B. Né possiamo tralasciare, in accordo alle più recenti classificazioni WHO e ICC di cui sopra, di menzionare un ulteriore fenotipo, appartenente proprio alle LAL-T, che resta associato ad una prognosi altamente sfavorevole: la "ETP" o "*Early T-cell Precursor*".<sup>9</sup> Si tratta di una LAL che trae origine da un precursore altamente indifferenziato, di fatto una cellula progenitrice staminale ancora potenzialmente in grado di differenziare in senso mieloide qualora sussistano adeguati stimoli citochinici. La cellula neoplastica in questo caso non esprime infatti né CD1a, né CD8 e solo debolmente il CD5, cui si aggiungono almeno uno tra i seguenti marcatori staminali: CD117, CD116 CD34, CD33, CD13 o addirittura quello proprio delle cellule NK CD56.<sup>9</sup>

Per collegarci a quanto verrà trattato immediatamente di seguito, è possibile notare che tale immunofenotipo, evidentemente maligno ed aggressivo, si correla non a caso a mutazioni genetiche marcatamente sfavorevoli (specie appartenenti alla via di RAS e a quella JAK/STAT, infatti annoverate nella categoria "poor risk"<sup>99</sup>).

#### - *Citogenetica*

Sempre maggior rilevanza stanno ad oggi assumendo la caratterizzazione molecolare e quella citogenetica del clone neoplastico, ovvero lo studio approfondito delle mutazioni genetiche e/o cromosomiche che lo contraddistinguono specificamente, definendone aggressività biologica, potenzialità di risposta alle terapie e pertanto, anche in questo caso, esiti attesi.

L'impatto da quest'ultimo punto di vista è risultato così rilevante che la caratterizzazione citogenetica-molecolare è attualmente un imprescindibile



criterio classificativo in accordo alla quinta classificazione delle patologie Ematolinfoproliferative, WHO 2022 (WHO-HAEM5)<sup>22</sup>.

Da un punto di vista citogenetico, un primo importante fattore da valutare risulta la ploidia della cellula neoplastica nel suo complesso: soprattutto per quanto riguarda infatti le BCP -ALL (Leucemie Acute Linfoidi da precursore-B o Pre-B), il riscontro di una iperdiploidia, ovvero di un numero di cromosomi superiore a 50 è associato ad una prognosi favorevole; non a caso, si tratta di una anomalia cromosomica frequente nella popolazione pediatrica.

Al contrario, una ipodiploidia rappresenta un fattore prognostico negativo, tanto nel bambino quanto nell'adulto, in maniera peraltro proporzionale al grado di ipodiploidia stessa (da un cariotipo alto ipodiploide 40-43 cromosomi, ad uno basso ipodiploide 32-39, o addirittura ad uno quasi aploide 24-31 la prognosi si riduce infatti progressivamente)<sup>1</sup>.

Altre anomalie citogenetiche degne di nota sono:

- la monosomia del cromosoma 7;
- la del(6q), ovvero la delezione del braccio lungo del cromosoma 6;
- le amplificazioni del cromosoma 21;
- le trisomie 8 e 21;

di cui la prima correlata ad una prognosi infausta, le ultime tre con una prognosi intermedia-sfavorevole.<sup>9,95</sup>

Ancora, per quanto concerne le LAL-B risultano rilevanti alcune traslocazioni e di conseguenza l'espressione dei relativi riarrangiamenti molecolari quali:

- t (9;22) (q34;q11) con riarrangiamento di BCR-ABL1;
- t (4;11) (q21;q23) con riarrangiamento MLL-AFF1
- altri riarrangiamenti a carico della regione 11q23 con MLL-r.

Tutte le anomalie precedenti sono classicamente associate ad un rischio elevato ed una prognosi sfavorevole. Tuttavia, è opportuno effettuare una ulteriore specificazione.

Come precedentemente esposto, mentre la positività del trascritto BCR-ABL1 (LAL-B Ph+), nonostante di fatto alla base di una malattia aggressiva e classificata come “poor risk”, rappresenta oggi un importante fattore predittivo positivo di risposta agli ITK; assai più infausta resta invece la prognosi dei casi con MLL-r, a tutt’oggi molto critici da gestire, soprattutto per quei pazienti che non risultano candidabili a trapianto<sup>9</sup>.

Al contrario, sono da considerare a buona prognosi:

- la delezione del braccio corto del cromosoma 12 o del(12p);
- la traslocazione, tipicamente pediatrica, t (12;21) (p12;q22) con riarrangiamento ETV6-RUNX1).<sup>96</sup>

Incerta infine attualmente la prognosi della t (1;19)(q23;p13) che determina il riarrangiamento TCF3-PBX1.

Per quanto riguarda invece le LAL-T, riarrangiamenti citogenetici noti si riscontrano in media in un paziente su due.

Quelli più frequenti sono rappresentati dal 7q34 e dal 14q11, dove sono localizzati rispettivamente i geni del TCRB e TCRA-TCRD: ciò che determinano è la giustapposizione dei promotori del TCR a fattori di trascrizione coinvolti nel differenziamento cellulare, determinandone una espressione aberrante nei progenitori T-linfocitari.<sup>9</sup>

In base allo specifico pattern di espressione aberrante quindi, le LAL-T vengono ulteriormente stratificate e sub-categorizzate in specifici gruppi a prognosi differente. Quello che possiamo affermare in linea generale rispetto alle LAL-B, è che il significato prognostico di molte di queste anomalie citogenetiche non è ancora del tutto chiarito, rendendo evidente la necessità di approfondire le nozioni a disposizione con ulteriori studi.

- *Alterazioni molecolari*

Accanto alla caratterizzazione citogenetica, in accordo a quanto riportato nella nuova classificazione WHO, e grazie alla disponibilità in crescita delle nuove tecnologie quali l'NGS (si veda paragrafo 1.5), attualmente sta assumendo via via più importanza uno studio ancora più preciso e incentrato sulle alterazioni genetiche presentate dalla cellula mutata, da un punto di vista più strettamente molecolare.

Le mutazioni descritte e riscontrabili sono innumerevoli.

Globalmente, è possibile affermare che, per quanto concerne le B-ALL, le alterazioni più frequenti sono quelle che colpiscono i geni coinvolti nel differenziamento del linfocita B stesso (PAX5, EBF1, VPRED1, BTG1, IKZF1). Tra questi, è proprio quella di IKZF1 che, soprattutto in caso di sua delezione (e secondariamente in caso di mutazione), rappresenta la alterazione più chiaramente associata a prognosi infausta.

Non a caso, una quota maggioritaria (circa un 80%) è stato riscontrato nei pazienti Ph+ BCR-ABL1 positivi, associandosi ad una riduzione del EFS e incremento degli eventi di recidiva.

Altre mutazioni con ruolo prognostico dimostrato sono CDKN2A/B ed EBF1, entrambe con impatto negativo in termini di riduzione della sopravvivenza globale e risposta alle terapie.

In un altro 30% dei casi sono riscontrate mutazioni dei geni del pathway di RAS (NRAS, KRAS, FLT3, PTPN11) con associazione significativa a riarrangiamenti a prognosi infausta quali MLL-r,<sup>97</sup> aumento del tasso di recidiva e possibile selezione durante il trattamento con aumento delle resistenze.<sup>9</sup>

In merito alle T-ALL invece, sono stati identificati più di 100 geni mutati, con incidenza variabile nei diversi sottogruppi di prognosi.<sup>98</sup> Alcuni di essi sono:

- NOTCH1, CDKN2A/B entrambi alterati in più del 50% dei casi;
- geni della via di RAS o JAK-STAT.

Interessante in questo caso rilevare come la presenza di alterazioni di NOTCH e FBXW7 siano spesso associate, e come questo pattern correli con una migliore risposta alla terapia steroidea e ad un aumento della sopravvivenza.<sup>99, 100</sup>

Tra le mutazioni che al contrario hanno dimostrato un impatto peggiore, sicuramente quelle di PI3K-AKT, i cui cloni risultanti mostrano un fenotipo particolarmente aggressivo.<sup>99, 101</sup>

	Frequency	Mutations	Prognosis
High hyperdiploid (gain of $\geq 5$ chromosomes)	25% children; 3% AYAs and adults	RTK-RAS signalling pathway, histone modifiers	Favourable
Near-haploid (24–31 chromosomes)	2% children; <1% AYAs and adults	RAS-activating, IKZF3	Poor
Low-hypodiploid (32–39 chromosomes)	<1% children; 5% AYAs; >10% adults	TP53, IKZF2, RB1	Very poor
MLL (KMT2A) rearrangements	>80% infants; <1% children; 4% AYAs; 15% adults	MLL (KMT2A) rearrangement, few additional mutations (PI3K-RAS signalling pathway)	Very poor
ETV6-RUNX1 translocation, t(12;21)(q13;q22)	30% children; <5% AYAs and adults	ETV6-RUNX1	Favourable
TCF3-PBX1 translocation, t(1;19)(q23;p13)	5% children, AYAs and adults	TCF3-PBX1	Favourable
TCF3-HLF variant of t(1;19)(q23;p13)	<1% acute lymphoblastic leukaemia	TCF3-HLF	Poor
BCR-ABL1 Philadelphia chromosome, t(9;22)(q34;q11)	2–5% children, 6% AYAs; >25% adults	BCR-ABL1 fusion gene, common deletions of IKZF1, CDKN2A, CDKN2B, and PAX5	Poor (improved with tyrosine kinase inhibitors)
Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukaemia	10% children; 25–30% AYAs; 20% adults	Rearrangements of CRLF2 (about 50%), ABL-class tyrosine kinase genes (12%) and JAK2 (10%); mutations of EPOR (3–10%); mutations activating JAK-STAT (10%) and RAS (2–8%) signalling pathways	Poor
DUX4 and ERG-deregulated acute lymphoblastic leukaemia	5–10% acute lymphoblastic leukaemia	DUX4 rearrangement and overexpression, ERG deletions	Favourable, including if coexistence of IKZF1 mutations (about 40% of patients)
MEF2D-rearranged acute lymphoblastic leukaemia	4% children; 7% AYAs and adults	MEF2D is fused to BCL9 (most frequent fusion event), HNRNPUL1, SS18, FOXJ2, CSF1R, or DAZAP1	Poor
ZNF384-rearranged acute lymphoblastic leukaemia	5% children; 10% AYAs and adults	ZNF384 rearranged with a transcriptional regulator or chromatin modifier (EP300, CREBBP, TAF15, SYNRG, EWSR1, TCF3, ARID1B, BMP2K, or SMARCA2)	Intermediate

AYAs=adolescents and young adults.

Table 1: Main genetic subtypes of B-cell acute lymphoblastic leukaemia

Figura 13. Principali alterazioni molecolari e relative categorie di rischio delle LAL.

(Fonte: ALL Review The Lancet, 2020)

Good Prognosis	Intermediate Prognosis	Poor Prognosis	Undetermined Prognosis
Hyperdiploid karyotypes	t(1;19); TCF3-PBX1	Hypodiploid karyotypes	t(5;14); IL3-IGH*
t(12;21);ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)		t(9;22); BCR-ABL	
		Philadelphia-like ALL	
		11q23 MLL rearrangements	

\* t(5;14);IL3-IGH is a World Health Organization classified acute leukemia and prognosis data has not been determined.

Figura 14. Alterazioni molecolari e citogenetiche più frequenti nelle diverse categorie prognostiche.

(Fonte: Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia, International Journal of Molecular Sciences)

c) *Risposta al trattamento*

Tra i fattori prognostici non possiamo dimenticare la risposta alle terapie proposte, che rappresenta probabilmente quello in assoluto maggiormente predittivo dell'andamento della malattia del paziente.

In precedenza, la rivalutazione di malattia e dunque la valutazione della risposta ai trattamenti è sempre stata eseguita sulla base di criteri cito-morfologici (ad esempio tramite la presenza di blasti evidenti ad uno striscio periferico o midollare). La sensibilità della metodica non era tuttavia sufficiente ad identificare la presenza di una malattia, seppur minima, estremamente rilevante nell'indicare una non completa risposta del paziente alla terapia e conseguentemente nella definizione e predizione del rischio di recidiva futura.

Ecco perché la gestione del paziente affetto da Leucemia Acuta Linfoide è stato radicalmente modificato dalla possibilità della rivalutazione di malattia tramite MMR (Malattia Minima Residua o MRD "Minimal Residual Disease").

*NdR Per una trattazione più esaustiva in merito al concetto di MRD e i suoi maggiori impieghi nella pratica clinica si rimanda al paragrafo seguente.*

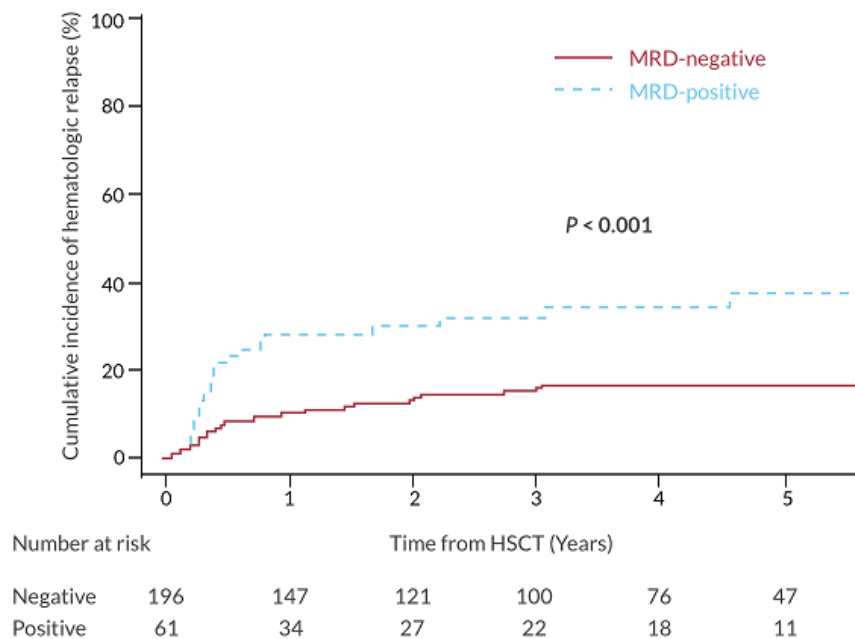


Figura 15. Impatto dello studio MRD come predittore di recidiva.  
(Fonte: <https://www.amgenoncology.com/measurable-minimal-residual-disease.html>)

Per il momento si ritiene importante introdurre soltanto il fatto che, poiché sia attendibile, lo studio della MMR in fase di rivalutazione di malattia deve essere sufficientemente sensibile, ovvero, che a prescindere dalla metodica che venga impiegata, essa deve garantire una SE almeno nell'ordine di  $10^{-4}$ , il che di fatto significa consentire di individuare anche una sola cellula leucemica tra 10.000 presenti nel campione analizzato <sup>102</sup>

Si sono peraltro ormai affermati dei protocolli di rivalutazione via via sempre più precoci, a partire da evidenze in ambito pediatrico, e successivamente applicate alle LAL dell'adulto, non solo dopo il primo ciclo di Induzione, ma addirittura a partire dal giorno +15 dall'inizio del trattamento. <sup>103</sup>

Si comprende dunque come la possibilità di rilevare una presenza di malattia anche così apparentemente ridotta e di farlo già in una fase estremamente precoce dell'iter diagnostico e terapeutico di questi pazienti, costituisca ad oggi uno strumento tanto efficace quanto irrinunciabile nell'ambito dello stesso.

## **1.8 Rivalutazione della malattia e MRD (Minimal Residual Disease)**

### **1.8.1 Introduzione allo studio della Malattia Minima Residua**

Con l'espressione "Malattia Minima Residua" o "MMR" (Minimal Residual Disease, MRD) si fa riferimento alla presenza nel post-trattamento di una Leucemia Acuta Linfoide (chemioterapico, immunoterapico, o radioterapico) di cellule leucemiche evidenziabili a livello midollare e più raramente a livello del sangue periferico.

Di fatto, essa può essere definita come una popolazione di cellule neoplastiche resistente al trattamento e pertanto potenzialmente in grado di dare origine a recidiva. <sup>102</sup>

Come precedentemente introdotto, attualmente la rivalutazione di malattia tramite MMR rappresenta un punto critico ed irrinunciabile tanto nello studio della

risposta più o meno soddisfacente del paziente rispetto all'attesa, quanto nel predire l'outcome dei soggetti affetti da LAL.

In definitiva, essa costituisce uno strumento con essenziali implicazioni pratiche che ne permettono l'utilizzo come guida al trattamento stesso (necessità di intensificare o piuttosto ridurre la chemioterapia nell'ottica di una tutela dalle principali reazioni avverse ad essa correlata, determinare l'indicazione del paziente al trapianto allogenico, necessità del passaggio ad una terapia di linea successiva alla prima).

Peraltro, non solo la positività dell'MRD in quanto tale, bensì anche i suoi livelli risultano rilevanti nell'ottica della stratificazione del rischio del paziente e per gli scopi sopra menzionati.

Le modalità e tempistiche di rivalutazione della MMR sono andati evolvendosi a partire dagli anni '90, periodo al quale risalgono le prime evidenze a partire dall'ambito pediatrico e successivamente nell'adulto, affermandosi progressivamente protocolli sempre più precoci e frequenti, in maniera da rilevare quanto prima una eventuale insufficienza della risposta al trattamento e poter riorientare di conseguenza tempestivamente le decisioni terapeutiche.<sup>102</sup>

Da un punto di vista generale, una MRD viene considerata positiva quando rilevabile da una qualsiasi metodica con sensibilità superiore a  $10^{-4}$ : questo requisito è quindi soddisfatto da tutte le metodiche utilizzabili per la rilevazione della Malattia Minima Residua, ciascuna con differenze tecniche, pro e contro.

### **1.8.2 Principali metodiche di rivalutazione e nuove prospettive a confronto.**

Da un punto di vista pratico, la rivalutazione della Malattia Minima Residua viene eseguita su campione biologico da aspirato midollare nella maggior parte dei casi, eseguito a multipli momenti della storia clinica del paziente.

### *LAL Philadelphia negative*

Le rivalutazioni vengono eseguite in specifici momenti definiti in genere “TimePoints o TP” localizzati a multipli e regolari intervalli nell’arco del protocollo terapeutico cui il paziente è sottoposto.

Fondamentali sono il primo TP post ciclo 1 di terapia (post-Induzione, anche se oggi è proposta non di rado una prima rivalutazione anche al giorno +15), e quello post ciclo 3, secondo TP; il terzo TP è invece individuato al termine del quinto ciclo di terapia.

Generalmente comunque, a seguito della prima, la rivalutazione è ripetuta nel corso del protocollo al termine di ogni ciclo di terapia, naturalmente con le inevitabili variabilità legate alla eterogeneità dei protocolli stessi e soprattutto all’unicità del caso clinico considerato.

### *LAL Philadelphia positive*

Un caso a sé stante è costituito poi dai pazienti affetti da LAL Ph+, peculiari sotto differenti aspetti. In questo caso infatti è più complesso identificare veri e propri cicli di terapia a seguito dei quali sottoporre il paziente a rivalutazione, per motivi connaturati alla terapia stessa con Inibitori TirocinKinasici; per questo, lo studio dell’MRD è usualmente eseguito ad intervalli di tempo regolari predefiniti (in genere a partire da un mese, tre mesi, più o meno una rivalutazione intermedia tra le due).

In questo caso inoltre sono degni di essere menzionati alcuni aspetti puramente tecnici per cui si rimanda alla trattazione dello studio dell’MRD con metodica molecolare (si veda RT-PCR).

- ***Studio MRD Immunofenotipico***

La prima metodica ad essersi affermata nello studio della MRD è quella che sfrutta l’Immunofenotipo: si tratta di una analisi multiparametrica eseguita tramite citometria a flusso (FCM). Questa tecnica permette di differenziare i linfociti normali dalle cellule leucemiche e, al contempo, di tipizzare lo specifico clone neoplastico oggetto di analisi sulla base dell’espressione di determinati antigeni di



superficie che vengono riconosciuti e “targeted” tramite anticorpi marcati in grado di emettere segnale a fluorescenza.

Di seguito sono riportate le principali fasi dello studio immunofenotipico.

1. << Lo studio dell'MRD tramite FCM inizia con la valutazione dei pannelli diagnostici del Pre-trattamento (immunofenotipo originale) delle cellule leucemiche del paziente>>. <sup>102</sup> In altre parole, le cellule leucemiche del soggetto vengono studiate al momento della diagnosi prima di iniziare la terapia, con dei panels predefiniti di marcatori, sulla base degli antigeni di superficie espressi (identificati in genere dalla sigla “CD” ad esempio CD19, CD20, CD22, CD34, CD58 etc.) <sup>104</sup> e che permettono quindi di identificare lo specifico fenotipo della LAL in esame;
2. Al momento della rivalutazione, anticorpi marcati a immunofluorescenza e ligandi specifici identificati durante la fase precedente, vengono cimentati con il campione delle cellule dell'aspirato (BOM);
3. Il campione viene fatto correre con un protocollo di FCM per svolgere l'analisi tramite confronto con il panel di marcatori identificato nel pretrattamento. <sup>105</sup>

Anche in questo caso la tecnologia ha subito una rapida evoluzione passando da una citometria a flusso che poteva contare su due o al massimo tre fluorocromi, alle attuali metodiche a disposizione impiegate nello studio della MMR che ne utilizzano 6 (standard) e addirittura 8 o 12: << A differenza dei citometri a quattro colori, che hanno la capacità di misurare MRD fino al livello diagnostico di 0,01%, i citometri a 8-12 citocromi possono normalmente misurare i livelli di MRD fino a 0,001% cellule, ovvero 1 cellula MRD in 100,000 cellule in un campione di midollo osseo, con sensibilità quindi ancora superiore>>. <sup>102, 104</sup>

Come è possibile desumere dalla maggior parte delle evidenze quindi, utilizzando citometri standard, si considera una MRD positiva quando è possibile attestare la presenza di blasti midollari in quantità superiore allo 0,01%, o addirittura in percentuale ancora inferiore (0,001% se consideriamo le tecnologie più moderne ed avanzate). <sup>102, 106, 107</sup>

In definitiva quindi, la sensibilità stimata della citometria a flusso e dunque della rivalutazione immunofenotipica della Malattia Minima Residua si attesta attorno a  $10^{-4}$ , standard minimo riconosciuto come valido.

Questo costituisce anche il principale limite della metodica, per il resto relativamente economica, disponibile e complessivamente vantaggiosa. La scarsa sensibilità è inoltre una criticità che ci aspettiamo possa essere progressivamente ovviata con i citometri a flusso di nuova generazione di cui sopra, che consentono una rilevazione di MRD con una superiorità netta in quanto a sensibilità fino a un ordine di grandezza maggiore ( $10^{-5}$ ).

- ***Studio MRD Molecolare***

Le tecniche di rilevazione della MRD attualmente in ascesa sono tuttavia quelle molecolari: una serie di metodiche e tecnologie caratterizzate ciascuna da proprie specificità, ma tutte accomunate dalla possibilità di mettere in evidenza la presenza di anomalie citogenetiche e/o aberrazioni nell'espressione di determinati trascritti caratteristici delle cellule della LAL.

Quella che sicuramente oggi trova più largo impiego è la PCR (Polymerase Chain Reaction) che fornisce una rilevazione della MRD tramite amplificazione di un certo campione di DNA.

Da un punto di vista tecnico, due sono i metodi più utilizzati nell'analisi della Malattia Minima Residua.

- *Real-time quantitative PCR (RQ-PCR)*: permette di ottenere, attraverso un numero predefinito di cicli, l'amplificazione esponenziale di un determinato tratto di DNA tramite l'utilizzo di sonde ("probes") fluorescenti in grado di appaiarsi specificamente ad una regione di DNA target appunto. L'emissione della fluorescenza è quindi correlata al raggiungimento di una certa soglia di concentrazione del materiale genetico. <sup>108, 109</sup>

- *Reverse transcription PCR (RT-PCR)*: in questo caso sono utilizzati come targets molecolari alcuni prodotti di trascrizione derivanti da geni di fusione o particolari sedi di riarrangiamento genomico. Essi sono quindi processati tramite una reazione di trascrizione inversa in modo da ottenerne cDNA (copyDNA), materiale che può essere a questo punto amplificato come nel metodo precedente.

Trattandosi in entrambi i casi di una tecnologia notevolmente avanzata, la sensibilità di questo studio è in linea di massima superiore a quella del caso precedente, partendo da una soglia base stimata a  $10^{-5}$ , fino a raggiungere con le metodiche più tecnologicamente avanzate quella di  $10^{-6}$ .

Questa maggiore sensibilità potrebbe consentire uno studio della MMR anche a livello del sangue periferico, riducendola però rispetto agli standards midollari ( $SE < 0 = 10^{-5}$ ); questo è il motivo per cui il campione midollare (circa 1 mcg in grado di fornire almeno  $10^5 - 10^6$  cellule) resta ad oggi il Gold Standard anche nell'analisi molecolare.<sup>110</sup>

Nello specifico, i principali targets su cui si concentrano la ricerca, l'amplificazione ed in definitiva lo studio molecolare sono rappresentati da regioni cromosomiche e/o geni critici nella trasformazione in senso neoplastico della cellula leucemica, in questo caso coinvolta nell'MRD: geni di fusione, riarrangiamenti patologici dei geni delle Ig o del TCR, mutazioni genetiche e altre aberrazioni cromosomiche. Principalmente riconosciamo:

- *Riarrangiamenti dell'Ig* nella regione associata a ipermutazione somatica VDJ (per le LAL-B, regioni "fingerprint" della catena pesante IGH, della catena leggera k IGK, o di quella lambda IGL) o *del TCR* beta, gamma o delta (per le LAL-T).<sup>108</sup> Per quanto riguarda il riarrangiamento VDJ, è importante sottolineare che l'ipermutazione non si verifica soltanto al momento della trasformazione iniziale da cui prende origine la Leucemia, ma può continuare anche durante la terapia, rendendosi responsabile della selezione di cloni resistenti che peraltro potrebbero non essere rilevati con i primers inizialmente individuati<sup>102</sup>.

Ecco perché, per evitare di misconoscere un eventuale flare di MRD o peggio una recidiva, lo studio PCR è effettuato sempre su due o più targets molecolari tra loro indipendenti.

- *Geni di fusione.* Si tratta di esiti di riarrangiamenti cromosomici a livello di punti critici noti come “breakpoints”, in grado di originare trascritti patologici e caratteristici di diversi fenotipi LAL. A differenza delle precedenti regioni VDJ e/o del TCR, i geni di fusione costituiscono un bersaglio molecolare ancora più affidabile poiché stabile nel tempo e non soggetto a nuove mutazioni durante il decorso della malattia. Il più caratteristico tra questi risulta il BCR-ABL1 (nelle sue varianti p210 e p190) associato alla traslocazione reciproca t (9;22). Nei pazienti che presentano tale prodotto di fusione, definiti “Philadelphia positivi (Ph+)”, la rivalutazione della MMR presenta tuttavia delle difficoltà aggiuntive. Esse, in parte come conseguenza delle peculiarità delle LAL con questo specifico fenotipo, ed in parte legate al protocollo terapeutico con ITK non rigidamente scandito in cicli, sono associate ad un importante problema di mancanza di standardizzazione nelle procedure di laboratorio e successiva interpretazione dei dati.<sup>102</sup>

<<La MRD [...] il suo ruolo nelle LAL Philadelphia positive è meno chiaro. Questa incertezza risulta ampiamente da differenze metodologiche nell’uso della real-time quantitative PCR (qRT-PCR) nella misurazione dei livelli del trascritto BCR-ABL1 per l’analisi>>. <sup>111</sup>

A partire da questo presupposto, hanno preso origine vari progetti, tra cui quello menzionato nell’articolo qui riportato: EURO-MRD, un consorzio fondato con l’intento di definire e unificare con maggiore chiarezza metodi e protocolli della RT-PCR nello studio del trascritto *e1a2 BCR-ABL1* nelle LAL Ph+ ALL. Secondo le evidenze, i migliori esiti nella riduzione della variabilità interlaboratorio sono stati ottenuti utilizzando preparati standardizzati e di origine centralizzata, oltre a criteri prestabiliti più rigidamente applicati per l’interpretazione dei dati.

In linea di massima, la PCR costituisce attualmente una valida opzione nella rivalutazione della MRD nelle LAL, offrendo un buon compromesso tra costi, rapidità di esecuzione e affidabilità. Si è infatti dimostrata superiore all'indagine immunofenotipica nell'identificazione dell'MRD, pur se con una laboriosità ed un costo relativamente maggiori.

Il principale limite nella sua attuazione tuttavia è costituito dal fatto che, per ragioni intrinseche alla tecnica molecolare, sono richiesti dei targets, ovvero delle sonde paziente-specifiche che possano essere riconosciute e quindi utilizzate nella rilevazione di un eventuale flare di malattia. Purtroppo, non è infrequente che l'individuazione di tali bersagli non risulti possibile, rendendo di fatto inattuabile l'esecuzione della metodica.

Infine, la terapia stessa può essere causa di instabilità nell'espressione dei trascritti RNA espressi dalla cellula, nuove mutazioni possono andare ad accumularsi e in generale possono verificarsi interazioni in senso negativo tra i trattamenti e la corretta messa in atto della RT-PCR, limitandone la affidabilità in una percentuale non trascurabile dei casi.<sup>112</sup>

Oltre alla RT-PCR, nuove tecnologie sono andate affermandosi negli ultimi anni: tra queste, la ddPCR e l'NGS.

Per quanto riguarda la prima, "Droplet Digital PCR", si tratta di una evoluzione della PCR standard e come questa utilizza una tecnica di amplificazione del DNA che impiega Taq polimerasi e sonde fluorescenti che riconoscono e legano specifici target genetici.

La differenza principale è la quantificazione, consentita in maniera ben più precisa nel caso di questa seconda metodica, che sfrutta un partizionamento del campione in "gocce" come suggerito dal nome stesso, in cui ciascuna di esse è analizzata in camere separate in modo da raggiungere una sensibilità e specificità molto elevate: <<il campione è frazionato in approssimativamente 20.000 gocce in camere separate e amplificate. I diversi partizionamenti sono poi bersaglio di sonde fluorescenti, e ciascuna delle reazioni nelle varie camere è esaminata per evidenziare presenza o assenza della fluorescenza >>.<sup>102</sup>

In definitiva, il vantaggio della ddPCR è quello di incrementare di circa un ordine di grandezza la sensibilità dell'esame diagnostico; tuttavia, come ogni nuova tecnica che si rende disponibile porta con sé la problematicità della scarsa standardizzazione ed esperienza nell'interpretazione dei risultati rispetto alle metodiche ormai più affermate, oltre ad essere più dispendiosa in tempo e risorse.<sup>113, 114</sup>

Per concludere, tra le metodiche molecolari di più recente introduzione, annoveriamo l'NGS o Next Generation Sequencing, una moderna metodologia di sequenziamento genomico basata sul processamento contemporaneo di piccoli frammenti di DNA in parallelo tra loro. Si comprende dunque come con una singola analisi, l'NGS renda possibile uno studio estensivo di inserzioni, delezioni, riarrangiamenti e ampie porzioni genomiche di rilievo.<sup>115</sup>

Per quanto riguarda l'impiego dell'NGS nella rivalutazione della MMR del paziente, le più recenti evidenze hanno messo in luce le ineguagliabili potenzialità nell'identificare cloni resistenti e/o di recidiva, scongiurando la possibilità di una "undetected MRD" grazie ad una sensibilità e specificità superiori a qualsiasi altra metodica già disponibile, fino a  $10^{-7}$ ,  $<0.0001\%$  (in questo caso tuttavia, per sfruttare a pieno tale precisione analitica, il campione midollare deve essere più consistente, anche di alcune decine di microgrammi. Viceversa un'analisi su campioni più ridotti, così come su sangue periferico permettono il raggiungimento di una SE di circa 10 volte inferiore<sup>116</sup>).

In un tempo peraltro relativamente breve (poche ore), una simile analisi molecolare permetterebbe quindi di implementare l'affidabilità dei protocolli MRD-guided nella gestione dei pazienti affetti da Leucemia Acuta Linfoblastica, oltre a costituire un fondamentale strumento di ricerca e sviluppo nell'ambito di una patologia in cui ancora moltissimo resta da indagare.

Un ulteriore vantaggio infine degno di nota è riscontrabile nell'ambito del confronto con la più largamente impiegata PCR. Se quest'ultima infatti vede nella necessità del disporre di sonde paziente-specifiche una delle sue principali difficoltà di attuazione, l'NGS può contare al contrario su una metodica in parallelo, che sfrutta cioè una ampia "libreria" di primers predefiniti che non

dipendono dal paziente, ma dalla specifica tecnologia del dispositivo commerciale utilizzato.

Naturalmente neppure questa metodica, seppur così promettente, è esente da svantaggi: in primis, non possiamo a tutt'oggi proporla come Gold Standard su larga scala per ragioni principalmente economiche, ma anche per i requisiti di elevata specializzazione richiesti nella progettazione, esecuzione ed interpretazione dei risultati che implicano competenze ultra-specifiche.

Pertanto, in analogia con la ddPCR, anche in questo caso le evidenze ridotte e la scarsa pratica clinica sono associate a deficit di standardizzazione e comparabilità tra centri e laboratori differenti.

Sono riportati di seguito tabelle e grafici riassuntivi di quanto finora affermato in merito alle diverse tecniche e relativi pro e contro.

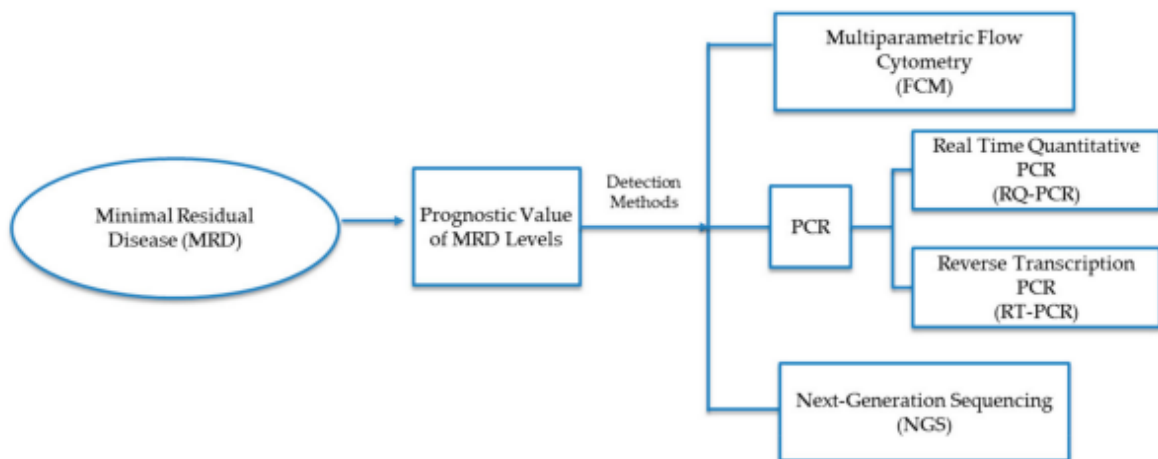


Figura 15. Principali metodi di valutazione della MRD. (Fonte: Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia, International Journal of Molecular Sciences)

	FCM *	Translocation PCR **	Antigen Receptor PCR **	Droplet Digital PCR **	NGS ***
<b>Turnaround Time</b>	3–4 h [32]	2–3 days [33]	Weeks [34]	5–8 h [35]	~1 week [36]
<b>Cost Per Sample</b>	~\$350 [32]	~\$500 [33]	~\$500 [32]	~500 [32]	~\$1000 [32]
<b>Standardization</b>	Standardized in different consortia [37]	Limited standardization [37]	Limited standardization [37]	Limited Standardization [32]	Limited Standardization [37]
<b>Use of Patient-Specific Reagent</b>	No [37]	No [37]	Yes [37]	Yes [32]	No [37]

\* multiparametric flow cytometry; \*\* polymerase chain reaction; \*\*\* next-generation sequencing; BM = bone marrow; PB = peripheral blood.

Figura 16. Principali metodi di valutazione della MRD a confronto.  
(Fonte: Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia, International Journal of Molecular Sciences)

	Vantaggi	Svantaggi
<b>FCM</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rapidità;</li> <li>- Economicità.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limitata standardizzazione;</li> <li>- Sensibilità variabile, inferiore alle altre;</li> <li>- Operatore-dipendente.</li> </ul>
<b>RQ-PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevata sensibilità;</li> <li>- Elevata accuratezza.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limitata standardizzazione;</li> <li>- Non sempre applicabile (necessari primers paziente-specifici);</li> <li>- Metodica complessa, richiede alta qualificazione professionale.</li> </ul>
<b>NGS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevata sensibilità;</li> <li>- Relativa rapidità;</li> <li>- Possibilità di individuare alterazioni e pattern ultraspecifici.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limitata standardizzazione;</li> <li>- Costi elevati;</li> <li>- Evidenze scientifiche limitate.</li> </ul>

Tabella 1. Principali metodi di valutazione della MRD a confronto.  
(Fonte: Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia, International Journal of Molecular Sciences)



### 1.8.3 Significato e principali impieghi dell'MRD nella pratica clinica

#### *- Marker prognostico*

Come abbondantemente sottolineato, la letteratura scientifica si dimostra concorde nel riconoscere innanzitutto un ruolo di natura predittiva e prognostica allo studio della Malattia Minima Residua, tanto in ambito pediatrico quanto nelle LAL dell'adulto. Nello specifico, la correlazione più significativa è generalmente identificata come “predittore di Relapse”, ovvero di recidiva di malattia con riduzione del RFS (Relapse Free Survival, il tempo intercorso tra la diagnosi e il primo evento di recidiva).<sup>102, 117, 118, 119</sup>

In altre parole, nel corso del follow up del paziente, una positività/positivizzazione della MRD, è correlata ad una aumentata probabilità di recidiva nei mesi successivi e, per lo più, in maniera proporzionale all'entità della positività stessa.<sup>102</sup> Viceversa, una sua riduzione, e meglio ancora una eventuale negativizzazione precoce correla con un miglior decorso e un minor tasso di eventi di Relapse.

Il momento di maggior rilevanza nella rivalutazione della negativizzazione della MMR è rappresentato dalla fase post-Induzione, ovvero a seguito del primo intensivo ciclo di terapia.<sup>118</sup> Addirittura, una MMR molecolare negativa a seguito del primo ciclo di Induzione ha dimostrato comportare un aumento significativo dell'RFS dal 17-40% al 54-74%.

Ciò è sicuramente vero nelle LAL pediatriche, in cui però sono dimostrati miglioramenti significativi nella prognosi anche in una negativizzazione della MRD ai cicli successivi; tuttavia, è nelle LAL dell'adulto che la MRD- a seguito del ciclo 1 assume un ruolo cruciale, essendo l'unico TimePoint chiaramente relazionato con la sopravvivenza libera da recidiva.<sup>2</sup>

Al contrario, meno evidenti e concordi invece risultano le correlazioni tra MRD positività e riduzione della sopravvivenza globale (OS).

#### *- Guida terapeutica e nel follow up dell'andamento del paziente*

Il ruolo prognostico di per sé non è tuttavia l'unico che attribuiamo allo studio della Malattia Minima Residua. Al contrario, per quanto importante, è forse

superato in quanto a rilevanza dalle innumerevoli potenzialità che essa offre nella gestione a 360 gradi del paziente affetto da neoplasia linfoide acuta.

Nell'ambito della rivalutazione periodica dell'andamento del paziente e della sua risposta ai trattamenti, la MRD è infatti essenziale sotto moltissimi aspetti tra loro compenetrati, a partire ad esempio dalla giusta calibrazione dell'intensità terapeutica. Ovvero, un paziente che presenti o torni a presentare una positività nell'MRD dovrà verosimilmente subire una intensificazione della sua linea terapeutica, prima ancora di pensare ad una sua modifica; al contrario, un paziente low-risk, soprattutto pediatrico, in CR stabile con MRD negatività a successive rivalutazioni, potrebbe giovare di una riduzione appropriata del suo regime terapeutico nell'ottica di ridurre i pesanti effetti avversi ad esso conseguenti (cardiomiopatie, endocrinopatie, problemi neuropsicologici e secondi tumori).<sup>102, 120, 121</sup>

Non solo. La Malattia Minima Residua, rappresentando di per sé la presenza di un clone refrattario o che abbia acquisito resistenze alla terapia che si sta somministrando, consente di identificare globalmente un insuccesso terapeutico molto prima che ciò diventi clinicamente evidente, e pertanto di adeguare il regime terapeutico passando a terapie alternative e/o se possibile candidando il paziente a trapianto.<sup>122, 123, 124</sup>

## 2. Obiettivi dello studio

Alla luce della revisione della letteratura scientifica oggetto della prima parte introduttiva del presente elaborato, emerge come le evidenze si esprimano in maniera fondamentalmente concorde riguardo alla rilevanza dell'introduzione della Malattia Minima Residua (MMR o MRD) nei protocolli di rivalutazione dei pazienti affetti da Leucemia Acuta Linfoide.<sup>102, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124</sup>

Per questa ragione, e constatato il fatto che mai una analisi sistematica era stata condotta in precedenza sulla casistica della Clinica di Ematologia presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche, si è ritenuto opportuno intraprendere un lavoro di ricerca focalizzato su questo tema e finalizzato alla valutazione pratica e concreta della rilevanza dello studio della MMR nella gestione dei nostri pazienti.

Gli obiettivi di questo studio sono dunque:

- Operare una revisione sistematica ed effettuare una raccolta di dati approfondita sugli ultimi casi di LAL dell'adulto diagnosticate e trattate presso la Clinica di Ematologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche, a partire dal 2016 (anno nel quale è stato avviato il protocollo centralizzato di rivalutazione MRD che verrà specificamente esplicito nei paragrafi seguenti), fino al settembre 2022, data di inizio della ricerca;
- Studiare l'impatto dei principali determinanti prognostici riconosciuti in letteratura e confermare la rilevanza degli stessi nella nostra casistica;
- Condurre un'indagine sul metodo di rivalutazione della Malattia Minima Residua impiegato presso la sopramenzionata Clinica di Ematologia, studiandone le possibilità di attuazione e la concordanza tra le differenti metodiche impiegate a tal fine;
- Ultimo e più importante target della ricerca, studiare impatto e principali impieghi della MRD nella gestione dei pazienti adulti affetti da LAL: a partire dal suo significato prognostico come predittore di recidiva ed eventuali altre correlazioni con outcomes "time-to-event", al fine di consentirne quindi una valutazione come strumento nella guida della pratica clinica.

### **3. Materiali e Metodi**

#### **3.1 Pazienti e criteri di inclusione**

Il presente studio retrospettivo ha incluso un totale di 34 pazienti giovani adulti, adulti e anziani affetti da Leucemia Acuta Linfoide/Linfoma Linfoblastico diagnosticati presso la Clinica di Ematologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche, con sede ad Ancona, a partire dall'anno 2016, fino al mese di settembre 2022, data di inizio del lavoro di revisione e raccolta dei dati.

Di uno dei pazienti inizialmente eleggibili per lo studio tuttavia, non è stato possibile reperire tutti i dati richiesti per l'attuazione delle analisi statistiche, in quanto perso troppo precocemente al follow up.

Per questo motivo, la numerosità campionaria globale ammonta a 33 pazienti in definitiva.

All'interno di tale coorte, sono risultati tre sottogruppi di pazienti: quelli affetti da LAL-T (8) e quelli affetti da LAL-B (25), a loro volta distinti in LAL Philadelphia negative (15) e LAL Philadelphia positive (10).

#### **3.2 L'esperienza del centro di Ancona**

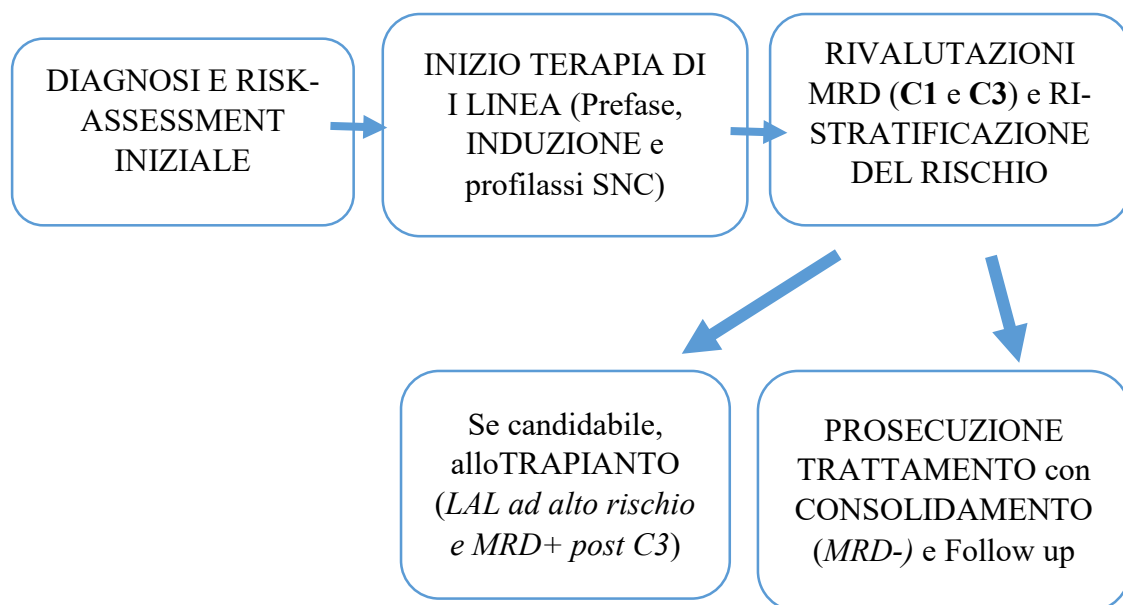
##### **3.2.1 Timing, Metodi e studi centralizzati nella rivalutazione della MRD**

Prima di procedere con lo studio propriamente detto, si riportano di seguito alcune informazioni basilari circa le metodiche di rivalutazione della Malattia Minima Residua nei pazienti affetti da LAL/LL diagnosticati e trattati presso la Clinica di Ematologia dell'ospedale di Ancona. Ciò sarà infatti funzionale ad una migliore comprensione dei dati raccolti e dei risultati di seguito menzionati.

In accordo ai protocolli attualmente impiegati ed evidence-based<sup>1, 2, 9, 102</sup>, il nostro centro adotta un iter di rivalutazione della Malattia Minima Residua in specifici momenti del percorso terapeutico proposto al paziente affetto da LAL.

Le rivalutazioni principali vengono infatti effettuate in tappe chiave dello stesso, definiti “Time Points” o “TP” come segue:

- *TP 1. Post ciclo 1*, ovvero a conclusione del primo ciclo di Induzione. Come già riportato infatti, è proprio la positività della Malattia Minima Residua post-induzione a correlare più chiaramente con il rischio di Relapse.<sup>91, 118</sup>
- *TP 2. Post ciclo 3*. Questo rappresenta un importantissimo punto di snodo nell’andamento della malattia, poiché una RC stabile ma che continui a presentare, o torni a presentare, una positività di MMR in questa seconda rivalutazione, può porre l’indicazione a considerare un eventuale trapianto allogenico<sup>122, 123</sup> (naturalmente, nel caso in cui siano rispettati gli stringenti criteri già menzionati).



Schema 1. Esempificazione delle tappe chiave nell’inizio dell’iter diagnostico-terapeutico delle LAL

- *TP 3. Post ciclo 5*. Ci si aspetta in questa fase del regime terapeutico che il paziente sia in Remissione Completa e che la MMR sia ormai negativizzata; in caso contrario, verosimilmente ci troveremo in presenza di una malattia non responder e/o di un eventuale esordio di recidiva qualora nel corso delle precedenti rivalutazioni la MMR fosse risultata non rilevabile.

Per quanto riguarda le LAL Ph+, è più complesso identificare dei TP altrettanto rigorosi nel corso della terapia con Inibitori TirosinKinasici, di prima scelta come già ampiamente trattato.<sup>46, 47, 48</sup>

In questo caso le rivalutazioni vengono eseguite ad intervalli quanto più possibile regolari, in media ogni 28 giorni, risultando anche qui cruciali quelle eseguite all'incirca a 1 e a 3 mesi di terapia.

Vediamo a questo punto in che cosa consistono concretamente tali rivalutazioni.

L'iter prevede innanzitutto l'esecuzione di un aspirato midollare. Il campione verrà dunque sottoposto a due differenti tipi di indagine in accordo a quanto trattato nel paragrafo 1.8: uno studio immunofenotipico eseguito con Citofluorimetria ed una indagine di natura citogenetica/molecolare generalmente tramite tecnica RQ-PCR.

Non tutte le fasi vengono però eseguite presso il laboratorio con sede ad Ancona.

Nello specifico, presso la nostra struttura è possibile effettuare tutti gli studi immunofenotipici, tramite FCM a 6 fluorocromi, sfruttando quindi il panel di marcatori di superficie derivante dallo studio di tipizzazione eseguito in fase di diagnosi iniziale. Con la stessa tecnica peraltro vengono periodicamente studiati anche eventuali campioni di liquor, sottoposti a tipizzazione a seguito degli studi preliminari di tipo chimico-fisico e citologico. (La rivalutazione di Malattia Minima Residua su LCR non è direttamente oggetto del presente elaborato, si ritiene però importante ricordare che anch'essa viene eseguita regolarmente negli affetti da LAL, con una frequenza che può coincidere o meno con quella midollare, ma comunque attuata generalmente in occasione delle cosiddette "punture lombari medicate", ovvero, della somministrazione intratecale di MTX ad alte dosi a scopo profilattico.

Nel caso in cui invece il paziente in questione abbia presentato nel corso della sua storia clinica un coinvolgimento del SNC, le rivalutazioni saranno naturalmente più seriate, spesso addirittura più ravvicinate di quelle su aspirato midollare).

Tornando al nostro centro, sempre presso il nostro laboratorio viene eseguita la stragrande maggioranza delle rivalutazioni molecolari dei pazienti affetti da LAL Philadelphia positive. Le tecnologie a disposizione permettono infatti uno studio quantitativo e affidabile del trascritto BCR-ABL1 nelle sue varianti p210 e p190 nella quasi globalità dei casi. Nei restanti rari casi selezionati è possibile procedere ad una centralizzazione dei campioni come descritto immediatamente di seguito.

Per l'esecuzione dello studio molecolare dell'MRD delle LAL-B Ph- e delle LAL-T (oltre che per i pochissimi casi selezionati LAL-B Ph+ appena descritti per cui non è possibile eseguire la rivalutazione nel laboratorio di Ancona per motivi tecnici), è adottato un metodo di centralizzazione dei campioni.

Questi ultimi vengono cioè spediti presso laboratori di riferimento localizzati a Palermo (Ospedali Riuniti Villa Sofia – Cervello) e Roma (Policlinico Umberto I). Sono questi centri specializzati a fornire poi gli esiti dello studio della Malattia Minima Residua, che vengono integrati con i dati localmente ottenuti dalla tipizzazione immunofenotipica.

In merito al timing, la centralizzazione è per ovvie ragioni più laboriosa e complessa nella gestione, per questo, non viene eseguita a seguito di ogni ciclo di terapia come teoricamente sarebbe previsto per lo studio immunofenotipico (ovvero, in linea generale ci si propone di eseguire una rivalutazione midollare ogni 28-30 giorni circa per effettuare almeno uno studio con FCM; naturalmente è poi l'andamento del paziente, le eventuali tossicità sviluppate in corso di trattamento e altre peculiarità del suo unico percorso terapeutico a rendere possibile o meno una tale rigorosità).

Quello che si cerca quindi di garantire è una centralizzazione almeno nei Time Points fondamentali sopra menzionati, seppur anche in questo caso con alcune inevitabili eccezioni.

### 3.2.2 Criteri e definizioni

Definiremo nell'ambito dello studio seguente il paziente in "Remissione Completa, RC" nel caso in cui egli presenti tre condizioni essenziali:

- Netto miglioramento del quadro clinico generale e della sintomatologia presentata all'esordio;
- Normalizzazione ematologica, oggettivata tramite emocromo: riduzione dell'anemia, ma soprattutto piastrine sopra 100.000/mmc e globuli bianchi sopra 1.000/mmc;
- Scomparsa dei blasti a livello del sangue periferico e netta riduzione o scomparsa totale di quelli osservabili ad un aspirato midollare (la quota eventualmente residua non dovrà superare il 5 % della cellularità globale).

Un paziente in RC, con apparente assenza di blasti anche a livello midollare, può tuttavia presentare una Malattia Minima Residua positiva.

Essa viene definita ai fini del presente studio:

- *MRD Immunofenotipica* + qualora la quota di blasti alla tipizzazione risulti >0.01% (in accordo alle maggiori evidenze già menzionate<sup>102, 104, 106, 107</sup> la citofluorimetria presenta infatti una sensibilità globalmente inferiore alle metodiche molecolari, in media pari ad un ordine di  $10^{-4}$ , che giustifica la scelta di un simile cut-off per considerare una MRD+).
- *MRD Molecolare* + per la quale si rendono necessarie ulteriori precisazioni a seconda del tipo di Leucemia presa in considerazione.
- Nel caso delle *LAL Ph* + la positività è stata considerata secondo il cut-off: (numero di copie del trascritto BCR-ABL1/numero di copie di ABL) x 100 >0.01% (essendo effettuato in questi casi uno studio di *Reverse Transcription PCR, RT-PCR*, la cui quantificazione si basa fondamentalmente sul rapporto tra le copie di DNA retrotrascritto a partire da quelle del prodotto di fusione aberrante di interesse, e quelle da retrotrascrizione di geni costitutivamente e fisiologicamente presenti nella cellula, ABL in questo caso, il tutto espresso in percentuale);



- Per le *LAL-B Ph-* invece, in cui i targets sono rappresentati per lo più dalle regioni di ipermutazione somatica VDJ caratteristiche del clone neoplastico (identificate in fase diagnostica e rivalutate poi con *Real-time quantitative PCR, RQ-PCR*), la sensibilità della metodica e dunque l'ordine di grandezza di eventuali cellule residue individuabili è risultato variabile a seconda della qualità dei campioni inviati a centralizzazione e specificità dei primers costruiti sui bersagli eventualmente individuati.

Lo stesso dicasi per le *LAL-T* in cui il discorso è esattamente analogo se si considera il riarrangiamento del TCR in questo caso.

(È stato sottolineato come in linea di massima le metodiche molecolari risultino, quando attuabili, globalmente dotate di una sensibilità superiore rispetto alla FCM, e che per questo consentano di identificare una positività MRD pari a circa  $10^{-5}$ .<sup>112, 117, 125</sup> Esiste tuttavia –come è infatti emerso anche in questo studio- un limite significativo correlato alla scarsa standardizzazione tra laboratori e differenti strumentazioni e metodi, nonché soprattutto alla differente specificità delle sonde che vengono utilizzate in fase di rivalutazione).

In definitiva possiamo affermare che, per quanto riguarda le *LAL-T* e *-B* non esprimenti il trascritto BCR-ABL1, nella maggioranza dei casi la sensibilità raggiunta con le metodiche molecolari adottate nei nostri centri di riferimento si è attestata compresa tra  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  per cui complessivamente superiore a quella propria dell'analisi immunofenotipica, ma con la dovuta variabilità.

- Un ultimo caso è quello rappresentato dalle *LAL non Ph +* che presentano però altre aberrazioni cromosomiche caratteristiche, in altre parole traslocazioni specifiche da cui derivano dei trascritti che, una volta identificati in fase di diagnosi e stratificazione del rischio, possono essere anch'essi utilizzati ai fini di rivalutazione di malattia, analogamente a quanto è stato affermato per i trascritti BCR-ABL1. Si tratta tuttavia di casi peculiari e meno frequenti rispetto a quello precedentemente esplicito.

### 3.3 Metodi e studio statistico

La raccolta dei dati è stata effettuata tramite consultazione delle cartelle di documentazione clinica cartacee e digitalizzate garantendone un utilizzo adeguato e rispettoso della sensibilità degli stessi.

Di ciascun paziente sono stati presi in esame i dati clinici di base: età, sesso, status generale e quadro al momento della diagnosi: da un punto di vista clinico (sintomatologia e diffusione della malattia all'esordio), laboratoristico (parametri dell'emocromo ed eventuali anomalie degne di nota) e studio della blastosi allo striscio periferico e al primo aspirato midollare.

Di lì, la raccolta dati è proseguita a seguito della diagnosi, dal momento del primo ricovero in poi, seguendo l'andamento della malattia e soprattutto l'iter terapeutico e di rivalutazione fino all'1 marzo 2023, data scelta come unitaria di ultimo follow up per tutti i membri della coorte.

Le caratteristiche dei pazienti sono state riassunte sulla base:

- Del range e valore mediano di riferimento, per le variabili continue;
- Della frequenza (percentuale), per le variabili categoriali.

Per le analisi "time-to-event" (OS Overall Survival, RFS Relapse Free Survival, EFS Event Free Survival), sono state studiate le stime di sopravvivenza in relazione alle diverse variabili prese in esame mediante il metodo di *Kaplan-Meier* e, successivamente, le curve ottenute sono state messe a confronto tramite *Log-rank test*.

Il livello di significatività statistica è stato fissato pari al 5% (ovvero per tutti i valori di p inferiori a 0.05).

Ci limitiamo in questa sede a precisare che nell'ambito della sopravvivenza globale (OS) sono stati considerati gli intervalli temporali intercorsi tra il "tempo 0" corrispondente al momento della diagnosi e quello dell'eventuale "evento decesso", qualora verificatosi, in caso contrario invece quello totale trascorso fino alla data di ultimo follow up comune per tutti i pazienti.

Lo stesso dicasi per gli altri outcomes: nel “Relapse Free Survival” (RFS) il  $\Delta t$  preso in esame è quello iniziato sempre al momento della diagnosi e proseguito fino all’eventuale “evento recidiva” (identificato dalla nuova comparsa in un paziente che aveva raggiunto la Remissione Completa –*si veda di seguito la Tabella 5-* di blasti a livello midollare in quantità superiore al 5% e/o al loro reperto a livello di uno striscio ematico periferico e/o alla presenza di infiltrazione a livello di qualsiasi altra sede secondaria non registrata in precedenza e/o riscontro di nuove citopenie inattese non dipendenti dal trattamento).

Per quanto riguarda l’EFS, come suggerito dall’espressione stessa, è preso infine in esame in questo caso un ventaglio più ampio di “eventi”, che comprende accanto ai medesimi “evento decesso” ed “evento recidiva” quello di mancata risposta alla terapia e conseguente passaggio a terapia di linea successiva alla prima.

Per alcune variabili selezionate è stata infine studiata l’esistenza di una correlazione tramite *Test esatto di Fisher (Fisher Exact test o Test del  $\chi^2$ )*, uno studio non parametrico applicabile per variabili dicotomiche, in campioni di numerosità limitata.

Anche in questo caso la significatività statistica è stata considerata raggiunta per valori di p inferiori a 0.05.

L’indagine statistica è stata condotta utilizzando il software *GraphPad Prism 9.5.1*.

## 4. Dati raccolti e Risultati

### 4.1 Statistica descrittiva

<u>TOTALE NUMEROSITA' CAMPIONARIA</u>	<u>N TOT =33 (%)</u>
<u>FENOTIPO, N (%)</u>	
LAL B	25 (75.7)
Di cui B Ph-	15 (45.4)
Di cui B Ph+	10 (30.3)
LAL T	8 (24.2)
<u>SESSO, N (%)</u>	
M	22 (66.7)
F	11 (33.3)
<u>ETA' MEDIANA ALLA DIAGNOSI, range</u>	49 (19-79)
< 60, N (%)	17 (51.5)
> o = 60, N (%)	16 (48.5)
<u>MALATTIA DIFFUSA ALLA DIAGNOSI, N (%)</u>	14 (42)
Di cui interessamento a livello del SNC	4 (28.6)
<u>CITOGENETICA/MOLECOLARE, N (%)</u>	
Favorevole	5 (15.2)
Poor Risk/Sfavorevole	26 (78.8)
Diagnosi citogenetica non disponibile	2 (6)
<u>VALORI EMOCROMO ALLA DIAGNOSI, range (mediana)</u>	
HB (range)	4–16,9 g/dL (10,1 g/dL)
WBC (range)	1.400–300.000/mmc (29.300/mmc)
PLT (range)	9.000–292.000/mmc (67.000/mmc)

<u>BLASTI DELL'ASPIRATO MIDOLLARE</u>	
<u>ALLA DIAGNOSI, range (mediana)</u>	26% - 96% (85%)

*Tabella 2*

In *Tabella 2* sono riportati i principali dati clinici e laboratoristici dei pazienti eleggibili per lo studio, raccolti in riferimento al momento della loro diagnosi.

Dal gennaio 2016 al settembre 2022 sono state effettuate 34 diagnosi di LAL/LL presso la Clinica di Ematologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche. Uno dei pazienti tuttavia è stato perso troppo precocemente al follow up e pertanto le statistiche di seguito riportate non hanno potuto prenderne in considerazione i relativi dati, in quanto non disponibili.

La coorte dunque considerata ai fini della presente statistica risulta di 33 pazienti totali.

Sono elencate nello specifico le principali variabili relative alla LAL e ai pazienti, oggetto poi delle successive analisi statistiche e discussioni loro riferite.

In particolare, sono stati riportati - *come predefinito al punto 3.3* - per le variabili continue il range di riferimento e il rispettivo valore mediano, mentre per le quelle categoriali la percentuale rispetto al campione di riferimento.

Lo stesso metodo è stato applicato anche nelle Tabelle successive.

<u>TOTALE NUMEROSITA' CAMPIONARIA</u>	<u>N TOT = 33 (%)</u>
<u>TERAPIA DI PRIMA LINEA Ph-, N (%)</u>	TOT 23
GIMEMA LAL1913	15 (48.5),
GIMEMA 1104	di cui 3 regime <55 anni (13)
	5 (21.7)
LAL 2000	1 (4.3)

LAL L3 NILG 2009	1 (4.3)
MINI hyper-CVAD	1 (4.3)
<b><u>TERAPIA DI PRIMA LINEA Ph+, N (%)</u></b>	TOT 10
Imatinib	3 (30)
Dasatinib (GIMEMA LAL1205)	6 (60)
Ponatinib (GIMEMA LAL1811)	1 (10)
<b><u>TERAPIA DI SECONDA LINEA Ph-, N (%)</u></b>	TOT 8
GIMEMA LAL2418	1 (12.5)
LAL L3 NILG 2009	1 (12.5)
MTX + ARA-C	1 (12.5)
Blinatumomab	3 (37.5)
Inotuzumab	1 (12.5)
ICE-R	1 (12.5)
<b><u>TERAPIA DI SECONDA LINEA Ph+, N (%)</u></b>	TOT 8
Dasatinib	2 (25)
Ponatinib	5 (62.5)
Blinatumomab	1 (12.5)
<b><u>TERAPIA DI TERZA LINEA Ph-, N (%)</u></b>	TOT 2
Navitoclax-Venetoclax	1 (50)
Blinatumomab	1 (50)
<b><u>TERAPIA DI TERZA LINEA Ph+, N (%)</u></b>	TOT 5
Ponatinib	1 (20)
Inotuzumab (GIMEMA LAL2418)	2 (40)
GIMEMA LAL2620	1 (20)
Memorial	1 (20)
<b><u>TRAPIANTO ALLOGENICO (allo-SCT), N (%)</u></b>	TOT 11
Di cui B Ph-	5 (45.4)
Di cui B Ph+	3 (27.8)
Di cui T	3 (27.8)

Tabella 3

In *Tabella 3* sono riassunte le principali informazioni inerenti ai regimi terapeutici messi in atto nella coorte di pazienti selezionati, facendo riferimento alla distribuzione dei diversi trattamenti anche nelle linee di terapia successive alla prima.

I pazienti con LAL Philadelphia positive sono stati considerati separatamente a causa delle peculiarità già descritte proprie del management della loro patologia, mettendo quindi in evidenza le differenze principali rispetto alle LAL non BCR-ABL1+.

Si ritiene a questo proposito interessante notare come a seguito della prima linea di terapia, a cui sono stati naturalmente sottoposti tutti i pazienti tempestivamente, per le linee successive è possibile osservare una netta distinzione tra Ph+ e Ph- : nel primo caso, la quasi totalità dei pazienti (8 su 10) ha subito un passaggio a terapia di seconda linea, al contrario, appena 10 pazienti su 23 tra i Philadelphia negativi sono stati sottoposti a terapia di seconda linea e, addirittura, soltanto 2 a quella di terza linea (contro i 5 Ph+).

In aggiunta, i regimi terapeutici proposti sono risultati - come atteso - radicalmente differenti.

Tutti i pazienti Ph+ sono stati infatti sottoposti ad una terapia ITK-based, non solo in prima linea, ma anche nella maggior parte dei casi in II linea (1 solo paziente su 8 ha ricevuto Blinatumomab, terapia target emergente, invece di un ITK).

In terza linea invece 1 solo paziente su 5 ha ricevuto Ponatinib, ITK di III linea, mentre per gli altri sono stati proposti regimi alternativi (tra cui Inotuzumab e regime Memorial).

È interessante notare infine, come non tutti i pazienti Ph+ abbiano ricevuto in prima linea Imatinib (ITK di I generazione), ma anzi al contrario solo 3 su 10.

Piuttosto, 6 pazienti su 10 hanno ricevuto fin da subito il Dasatinib (ITK di II generazione), in accordo a quanto proposto dal gruppo GIMEMA come sopra menzionato<sup>60</sup>.

Per 1 paziente infine, è stato scelto il Ponatinib fin dalla prima linea (nonostante sia un ITK di III generazione) seguendo il regime proposto dal gruppo MD Anderson Cancer Center.<sup>61</sup>

Per i non Ph+, sono stati adottati in prima linea regimi di predefinite associazioni polichemioterapiche proposte dagli specifici protocolli di riferimento (nella maggior parte dei casi del gruppo GIMEMA); nelle linee successive alla prima poi, anche qua hanno trovato un notevole impiego le nuove terapie target tra cui Blinatumomab e Inotuzumab.

TOTALE NUMEROSITA' CAMPIONARIA	N TOT = 33 (%)
Decessi (OS Overall Survival), N (%)	TOT 14 (42.4)
Di cui B Ph-	5 (15.5)
Di cui B Ph+	4 (12.1)
Di cui T	5 (15.5)
Recidive (RFS Relapse Free Survival), N (%)	TOT 15 (45.5)
Di cui B Ph-	4 (12.1)
Di cui B Ph+	9 (27.3)
Di cui T	2 (6)
Altro evento (EFS* Event Free Survival) , N (%)	TOT 23 (69.7)
Di cui B Ph-	9 (27.3)
Di cui B Ph+	9 (27.3)
Di cui T	5 (15.1)

\* EFS come Decesso, Recidiva, inizio Terapia di II linea per mancata risposta

*Tabella 4*

La *Tabella 4* riporta in linea generale gli esiti globali delle statistiche time-to-event che verranno successivamente approfondite e descritte nei paragrafi a seguire (*si rimanda a 4.2 e 5*).



TOTALE NUMEROSITA' CAMPIONARIA		N TOT = 33 (%)
<u>RC post C1, ciclo di Induzione, N (%)</u>		TOT 25 (75.6)
Di cui B Ph-		12 (36.4)
Di cui B Ph+		8 (24.2)
Di cui T		5 (15.1)
<u>MRD + post C1; C3, N (%)</u>		
Di cui B Ph-		3 post C1 (9); 1 post C3 (3)
Di cui B Ph+		7 post rivalutazione a 1 mese (21.2); 4 post rivalutazione a 3 mesi (12.1)
Di cui T		1 post C3 (3)
MRD NA		7 (21.2)

Tabella 5

Nella *Tabella 5* sono riportati dati essenziali ai fini del presente elaborato di ricerca, i cui esiti saranno discussi successivamente nel paragrafo 5.

Si ricorda ai fini di una corretta lettura dei dati stessi, che con “RC” sono indicati i pazienti in Remissione Completa, clinica ed ematologica (*si vedano i criteri esposti al punto 3.2.2*). Nella nostra coorte 25 pazienti su 33 (75.6%) hanno raggiunto la RC post ciclo di induzione, ovvero al termine del primo ciclo di terapia (C1).

Come si discuterà in seguito, il mancato raggiungimento dello stato di Remissione Completa al termine di C1 costituisce un fondamentale fattore prognostico negativo, di cui verrà studiato l’impatto in termini di sopravvivenza nell’ambito del capitolo dedicato alle indagini statistiche time-to-event.

Per quanto riguarda la MRD, come è possibile osservare, sono state considerate in particolare le rivalutazioni effettuate a due dei tre cosiddetti “Time Points” individuati in precedenza (*paragrafi 1.8.3 e 3.2.1*), quelli post ciclo 1 e quello post ciclo 3 di terapia.

Non sono stati invece riportati in Tabella gli esiti in merito alle rivalutazioni di malattia post C5, terzo “Time Point”, in quanto in questo caso le stesse non sono

risultate disponibili per tutti i pazienti, comportando dunque il rischio di ottenere esiti non confrontabili e statistiche non attendibili.

Inoltre, analizzando i dati di tali rivalutazioni, per i pazienti che la avevano a disposizione, non sono state riscontrate nuove MRD-positività degne di nota rispetto alle precedenti.

Alla luce di tale premessa, è sempre importante ricordare quando si parla di “rivalutazione di Malattia Minima Residua” che due sono le modalità con cui essa viene eseguita: la prima Immunofenotipica con citofluorimetria, la seconda tramite indagini di tipo molecolare. Si sottolinea pertanto che la voce “MRD+” in Tabella 5, ed eventualmente nelle analisi a seguire, fa riferimento alla positività di malattia rilevata con l’una e/o l’altra metodica.

Altro dato da tenere in considerazione a questo proposito è che la pratica clinica per varie ed imprescindibili ragioni, non sempre coincide con quanto si propone sul piano teorico.

Ovvero, la rivalutazione di MMR non è rigorosamente attuabile per tutti i pazienti e a tutti i TimePoints inizialmente individuati: questo fatto è alla base dell’oggettiva difficoltà di rendere omogenei e confrontabili tra loro casi clinici che di fatto costituiscono di per sé un “unicum”, poiché variabili a seconda delle caratteristiche del singolo paziente e di quelle dell’evoluzione della sua malattia.

Ad esempio, non è stata evidentemente possibile la rivalutazione di malattia dei pazienti persi precocemente al follow up, in quanto giunti al decesso prima di raggiungere i “Time Points” prestabiliti.

Analogamente, si sottolinea il fatto che il presente studio si concentra sulle rivalutazioni di Malattia Minima Residua dal “time 0” (diagnosi del paziente) all’insorgenza di un “evento” nell’arco del suo follow up (“evento decesso” nell’OS, ma anche “evento recidiva” nell’analisi dell’RFS, o ancora “evento generico” nell’EFS, anch’esso già precisato in precedenza).

Risulta in definitiva evidente che gli “eventi” appunto, presentatisi precocemente nella storia clinica di alcuni specifici pazienti non hanno consentito di continuare a raccogliere dati confrontabili con gli altri a partire da quel momento.

Dunque, tanto i soggetti deceduti, quanto quelli recidivati o che sono passati ad una terapia di II linea, sono stati definiti a partire dall'evento stesso "NA", ovvero pazienti per i quali lo studio della rivalutazione della MRD non è stata più presa in esame ai fini della nostra statistica.

Ciò premesso, e per rendere quanto più possibile liberi da bias gli studi che seguiranno nel paragrafo successivo, i pazienti deceduti prima del completamento dei primi tre cicli di terapia (un totale di 7) sono stati esclusi dalla analisi di *Kaplan-Meier* volta allo studio della correlazione tra MRD e Relapse Free Survival (RFS), in quanto, per ovvie ragioni, essi non sono stati né rivalutati per MRD né avrebbero avuto modo di sviluppare una recidiva essendo deceduti prima che questo potesse verificarsi. (Nel complesso quindi, la numerosità campionaria in questo caso sarà pari a 26: 33, numero complessivo di pazienti in esame, meno 7, ovvero gli "MRD NA" per decesso troppo precoce").

Lo stesso principio è stato applicato nel caso di MRD positività eventualmente riscontrate a seguito all'inizio di una nuova terapia, così come all'esecuzione di un trapianto, o di una già individuata recidiva etc.

Accanto a questi casi limite poi, dobbiamo considerare il fatto che non per tutti i pazienti è possibile eseguire una rivalutazione di Malattia Minima Residua con entrambe le modalità.

Ricordiamo infatti che per l'esecuzione dell'indagine molecolare con RQ-PCR, Gold Standard ad oggi per la sua maggiore sensibilità, è necessaria l'individuazione di bersagli specifici (in particolare per quanto riguarda le LAL Ph-) su cui poter costruire le sonde necessarie alle rivalutazioni successive. Questi targets non sono però individuabili per tutti i pazienti, fattore che costituisce come abbiamo visto una delle principali limitazioni connesse alla metodica.

Nel nostro campione nello specifico, per 4 pazienti, di cui 2 LAL-B Ph- e 2 LAL-T, non è stata possibile tale individuazione e, per questo, è stato condotto nel corso delle loro rivalutazioni MRD uno studio esclusivamente Immunofenotipico presso il laboratorio del nostro centro.

## 4.2 Statistica “time-to-event”

Procediamo quindi ora con la indagine statistica più propriamente detta.

Le variabili saranno analizzate dal punto di vista di outcomes time-to-event, ovvero letteralmente “il tempo intercorso” tra  $t_0$  = momento della diagnosi, e  $t$  dell’evento:

- Decesso (OS Overall Survival), ottenendo uno studio della sopravvivenza globale;
- Recidiva (RFS Relapse Free Survival), andando a valutare il tempo libero da recidiva di malattia;
- Evento (EFS Event Free Survival *si veda sopra per ulteriori chiarimenti*), intendendo quindi il tempo intercorso prima del verificarsi di un determinato evento rilevante nella storia clinica del paziente.

Il presente elaborato, secondo quanto preannunciato tra gli obiettivi dello studio, si propone di effettuare una analisi dell’impatto dei maggiori fattori prognostici riconosciuti in letteratura relativamente alla Leucemia Acuta Linfoide/Linfoma Linfoblastico.

A seguito di una panoramica iniziale di confronto in termini di mediana di sopravvivenza globale e libera da recidiva/eventi raggiunta nei tre diversi sottogruppi di diagnosi (LAL-B Ph-, LAL-B Ph+, LAL-T), verranno dunque analizzati uno ad uno i seguenti fattori e il loro impatto in termini di OS:

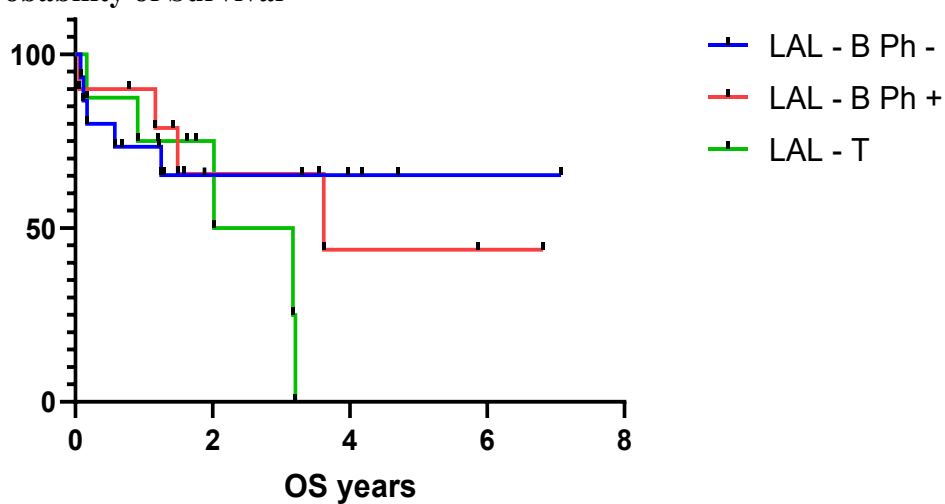
- Fenotipo B/T;
- Sesso maschile/femminile;
- Età alla diagnosi ( $\leq$  o  $>$  60 anni);
- Esecuzione o meno di alloSCT nell’iter terapeutico;
- Diffusione della malattia, comprendendo il coinvolgimento del SNC, all’esordio (diffusa/localizzata);
- Citogenetica e genetica standard/sfavorevole del clone neoplastico;
- RC post C1 (RC/NR, ovvero No Response);  
per poi arrivare allo studio dell’elemento cruciale di interesse della nostra indagine:
- Studio della Malattia Minima Residua (MRD +/-) e le sue correlazioni in termini di OS e RFS che verranno poi messe a confronto.

Nei paragrafi successivi poi (5. *Discussione* e 6. *Conclusioni*) i risultati ottenuti saranno discussi e analizzati più approfonditamente.

#### 4.2.1 Panoramica iniziale. 3 principali fenotipi di LAL a confronto

##### Sopravvivenza globale (OS)

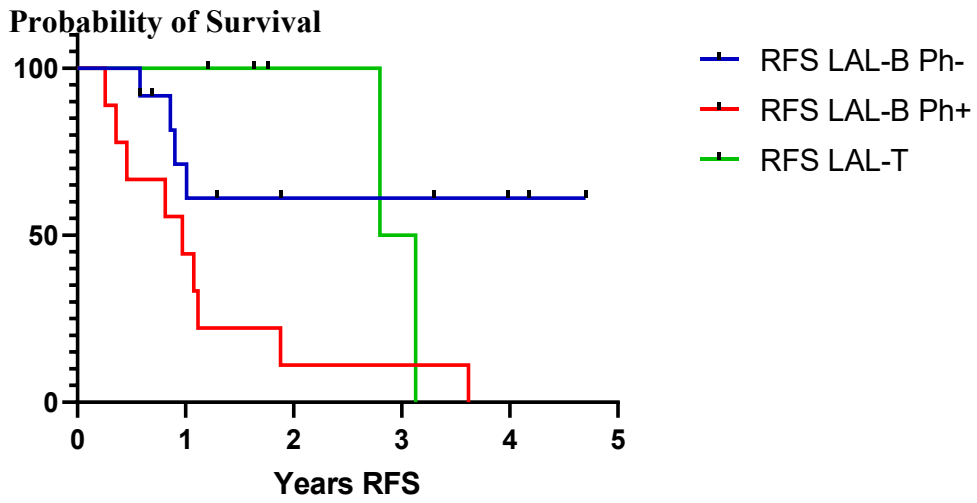
##### Probability of Survival



*Grafico 1*

FENOTIPO	Median OS	95% C.I.
LAL-B Ph -	Not reached	1.2 - NR
LAL-B Ph +	3.62	1.2 – 5.8
LAL-T	2.59	0.7 – 4.2

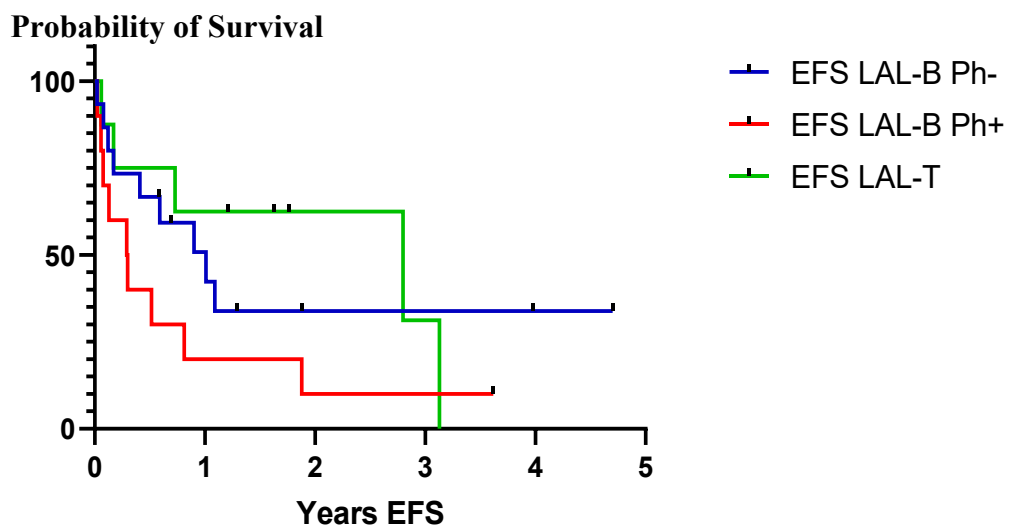
**Sopravvivenza libera da recidiva (RFS)**



*Grafico 2*

FENOTIPO	Median RFS	95% C.I.
LAL-B Ph -	Not reached (NR)	0.8 - NR
LAL-B Ph +	0.97	0.1 – 1.9
LAL-T	2.96	2.4 – 3.2

**Sopravvivenza libera da eventi (EFS)**



<b>FENOTIPO</b>	<b>Median EFS</b>	<b>95% C.I.</b>
LAL-B Ph -	1.01	0.2 – NR
LAL-B Ph +	0.29	0.1 – 1.9
LAL-T	2.8	0.2 – 3.4

Tutti i precedenti grafici sono il risultato del confronto fra i tre fenotipi LAL che sono stati presi in esame nel corso del nostro studio: in blu è rappresentata la curva dei casi di LAL-B Ph- (15 pazienti); in rosso, quella dei casi LAL-B Ph+ (10 pazienti); in verde, le LAL-T (8 pazienti).

Nel *Grafico 1*, il parametro preso in considerazione è l'Overall Survival, le cui mediane di sopravvivenza sono risultate le seguenti:

- “Not reached” (IC: 1.2 – NR) per le LAL-B Ph-, ovvero non ancora raggiunta;
- 3.62 anni (IC: 1.2 – 5.8) per le LAL Philadelphia positive;
- 2.59 anni (IC: 0.7 – 4.2) per le LAL-T.

Nel *Grafico 2*, è studiato il parametro RFS, Relapse Free Survival; anche qui sono state analizzate le mediane dei dati ricavati:

- Come il precedente, “Not reached” (IC: 0.8 – NR) per le LAL-B Ph-;
- 0.97 anni (IC: 0.1 – 1.9) per le LAL Ph+;
- 2.96 anni (0.7 – 4.2) per le LAL-T.

Nel *Grafico 3*, è stato invece analizzato l'outcome Event Free Survival; anche in questo caso riportiamo i risultati in termini di mediana:

- 1.01 anni (IC: 0.2 – NR) per le LAL-B Ph-;
- 0.29 anni (IC: 0.1 – 1.9) per le LAL Ph+;
- 2.8 anni (0.2 – 3.4) per le LAL-T.

#### 4.2.2 Analisi dei singoli fattori prognostici e loro impatto sulla sopravvivenza

##### a) Immunofenotipo: LAL di Lineage B e T

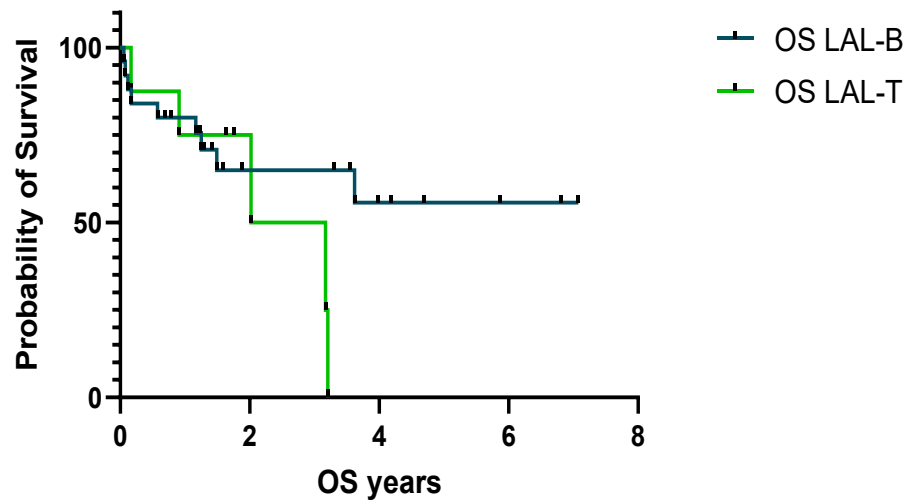


Grafico 4

IMMUNOFENOTIPO	Median OS	95% C.I.
LAL-B	Not reached (NR)	1.2 – NR
LAL-T	2.59	0.2 – 3.2

Iniziamo l'indagine sull'impatto in termini di OS dei fattori precedentemente menzionati proprio riprendendo in considerazione la variabile "immunofenotipo LAL"; questa volta però, in accordo a quanto espresso nella prima parte introduttiva, l'analisi statistica è volta a confermare o meno l'esistenza di una effettiva differenza in quanto a prognosi riconosciuta per le LAL di lineage T, rispetto a quelle di lineage B.

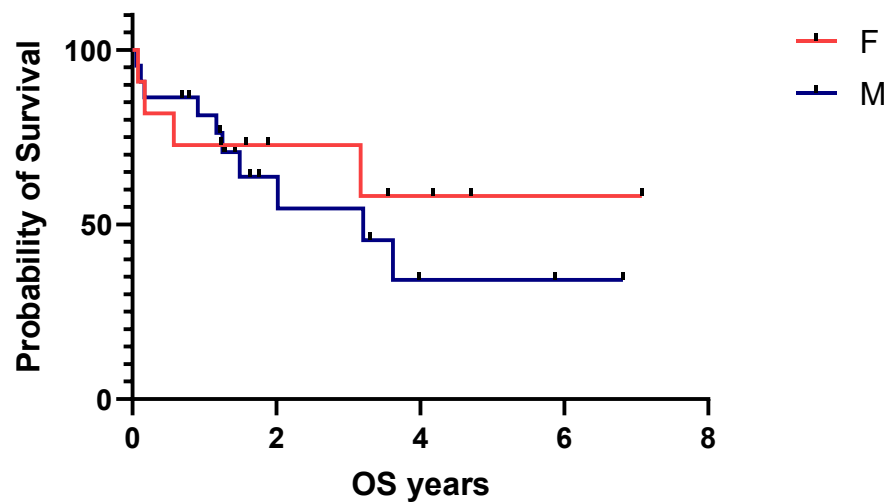
I risultati ottenuti sono i seguenti:

- Mediana di sopravvivenza globale del Lineage B (25 pazienti totali quindi, risultanti della somma dei 10 Philadelphia positivi e dei 15 Philadelphia negativi): "Not reached" (IC: 1.2 – NR);



- Mediana di sopravvivenza del lineage T (8 pazienti): 2.59 anni (IC: 0.2 – 3.2), in accordo a quanto risultante dal *Grafico 1*.
- Confrontando però le curve con *Log-rank test*, la differenza tra loro individuata non è risultata statisticamente significativa ( $p = 0.2142$ ), non potendo escludere d'altra parte che questo fatto sia imputabile alla ridotta numerosità campionaria, soprattutto per quanto riguarda il gruppo delle LAL-T.

**b) Sesso**



*Grafico 5*

SESSO	Median OS	95% C.I.
M	3.2	1.3 – NR
F	Not reached (NR)	0.16 - NR

Proseguendo nell'indagine volta allo studio dei principali fattori prognostici riconosciuti in letteratura, ci concentreremo ora ai punti **b) c) e d)** su parametri di natura più propriamente clinica: il primo ad essere studiato sarà l'impatto della

variabile “sesso” del paziente (*Grafico 5*) e a seguire la “età alla diagnosi” (*Grafico 6*); l’ultima ad essere presa in esame sarà la “diffusione di malattia” (*Grafico 8*), ovvero la presenza o meno di un coinvolgimento sistemico della stessa al momento del suo esordio.

Per quanto riguarda il primo degli aspetti menzionati, classicamente, il sesso maschile del paziente è stato associato ad una prognosi peggiore rispetto a quello femminile.

Nella nostra coorte, 22 pazienti erano di sesso maschile (M), 11 di sesso femminile (F).

I risultati ottenuti sono i seguenti:

- Mediana di sopravvivenza per la curva F: “Not reached” (IC: 0.16 – NR);
- Mediana di sopravvivenza per la curva M: 3.2 anni (1.3 – NR).
- Tramite *Log-rank test* tuttavia, la differenza osservata non ha raggiunto il livello di significatività statistica ( $p = 0.5403$ ) come è possibile osservare infatti già dalla parziale sovrapposizione tra le curve stesse.

c) Età anagrafica

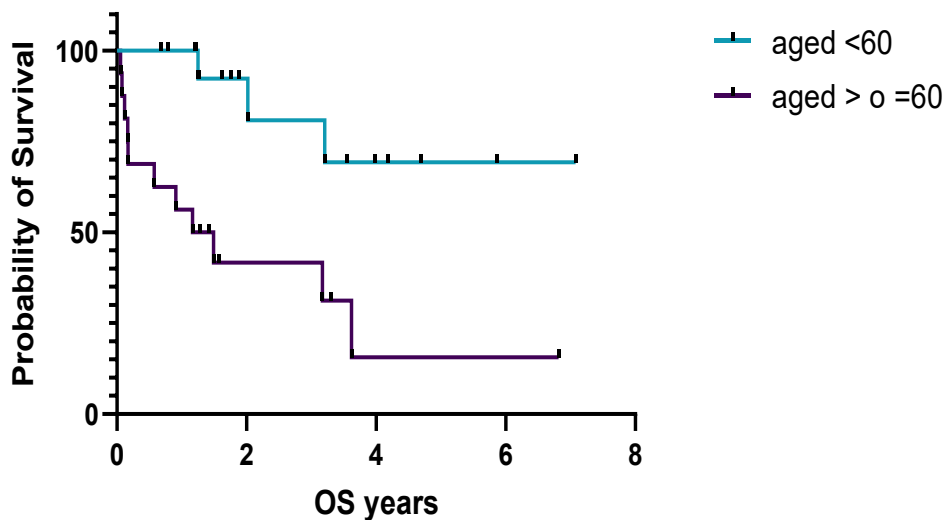


Grafico 6

ETA' ALLA DX	Median OS	95% C.I.
< 60	Not reached (NR)	2.01 - NR
> o = 60	1.33	0.12 – 3.61

Anche in questo caso, come preannunciato, è stata presa in esame una variabile di natura prettamente clinica: l'età dei pazienti al momento della loro diagnosi.

Il *Grafico 6* rappresenta infatti l'esito dello studio dell'impatto a livello prognostico legato appunto all'età dei soggetti affetti. Quest'ultima costituisce ormai da tempo uno dei pochi fattori su cui la letteratura scientifica si esprime in maniera concorde, tanto per quanto riguarda le evidenze ormai più datate, quanto per quelle più recenti.<sup>92, 93, 126, 127</sup>

Partendo da questi presupposti abbiamo dunque voluto comprovare nella nostra coorte la rilevanza del suddetto fattore nella determinazione dell'OS sempre tramite metodo di *Kaplan-Meier*. Questi sono i dati ricavati da tale analisi:

- La mediana di sopravvivenza per la curva relativa ai soggetti di età inferiore ai 60 anni è risultata: “Not reached” (IC: 2.01 – NR), anche in questo caso quindi non ancora raggiunta;
- La mediana di sopravvivenza della curva dei soggetti di età maggiore o uguale a 60 anni è pari a 1.33 anni (IC: 0.12 – 3.61).
- A seguito dell’esecuzione del *Log-rank test* quanto emerso dallo studio si è confermato statisticamente significativo, con una  $p = 0.0021$  ( $<0.05$ , livello di significatività prestabilito).

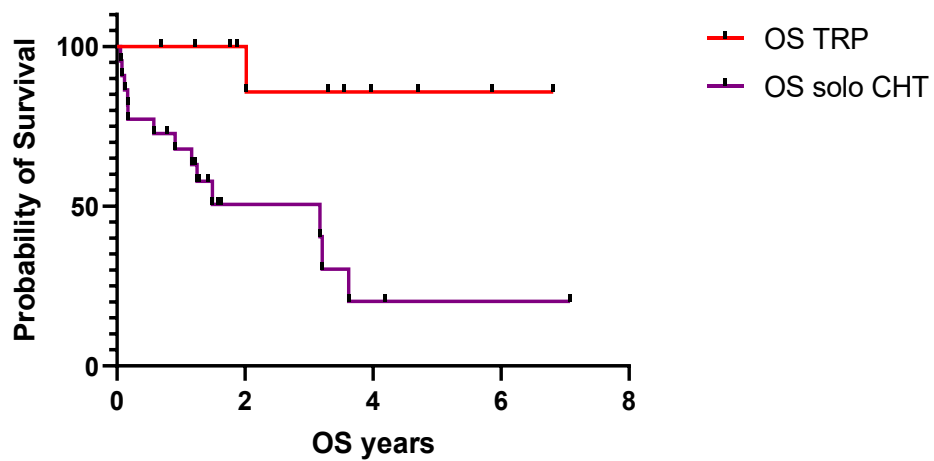
Si precisa che il cut-off dei 60 anni è stato scelto in analogia a quello fissato in linea di massima in letteratura (*si veda 5. Discussione*).

A completamento dello studio incentrato sul fattore prognostico “età”, è stata eseguita una ulteriore indagine statistica volta a valutarne le implicazioni terapeutiche, e più nello specifico, l’impatto sulla sopravvivenza dei pazienti sottoposti ad alloSCT (trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche) rispetto a coloro che sono invece risultati non candidabili ad esso.

Tali considerazioni scaturiscono dal fatto che tipicamente solo i soggetti più giovani di norma non presentano controindicazioni alla procedura di trapianto allogenico (nella nostra casistica ad esempio solo 2 dei pazienti che lo hanno ricevuto su un totale di 11 superavano questo “cut-off” e peraltro non discostandosene che di pochissimo: pazienti di 61 e 62 anni rispettivamente). Questo dato infatti è stato –come del tutto atteso- confermato dall’esecuzione di un *Fisher Exact test* ( $\chi^2$ ) che ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra “età < 60” ed “esecuzione di trapianto allogenico” ( $p = 0.0342$ ).

Alla luce di quanto premesso, è stato quindi possibile proporre uno studio volto a valutare le differenze in termini di sopravvivenza tra coloro che sono stati sottoposti a trapianto (che la regressione lineare precedente ha quindi dimostrato essere soggetti di età inferiore ai 60 anni praticamente nella totalità dei casi), ed i pazienti che invece non sono risultati candidabili ad esso. Gli esiti sono quelli osservabili nel *Grafico 7*.

**Possibilità di attuare un trapianto allogenico:**



*Grafico 7*

<b>alloSCT</b>	<b>Median OS</b>	<b>95% C.I.</b>
Trapianto allogenico	Not reached (NR)	2.01 - NR
Non TRP (solo chemio)	3.17	0.57 – 3.61

Le curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di *Kaplan-Meier* sono evidentemente differenti tra loro, come confermato dal loro confronto tramite *Log-rank test* che ha riportato una significatività di p pari a 0.0041.

d) Diffusione della malattia e/o coinvolgimento del SNC all'esordio

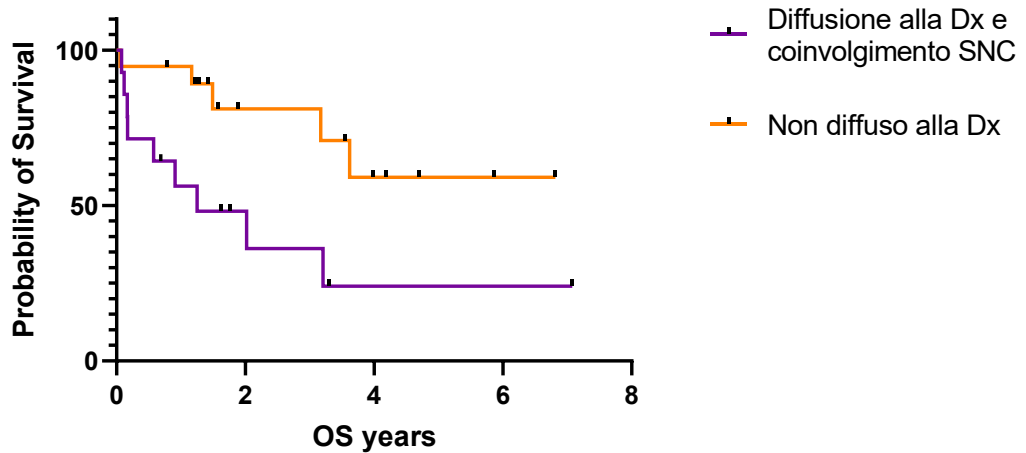


Grafico 8

<b>DIFFUSIONE alla Dx</b>	<b>Median OS</b>	<b>95% C.I.</b>
Diffuso	1.25	1.04 - NR
Non diffuso	Not reached (NR)	0.16 - NR

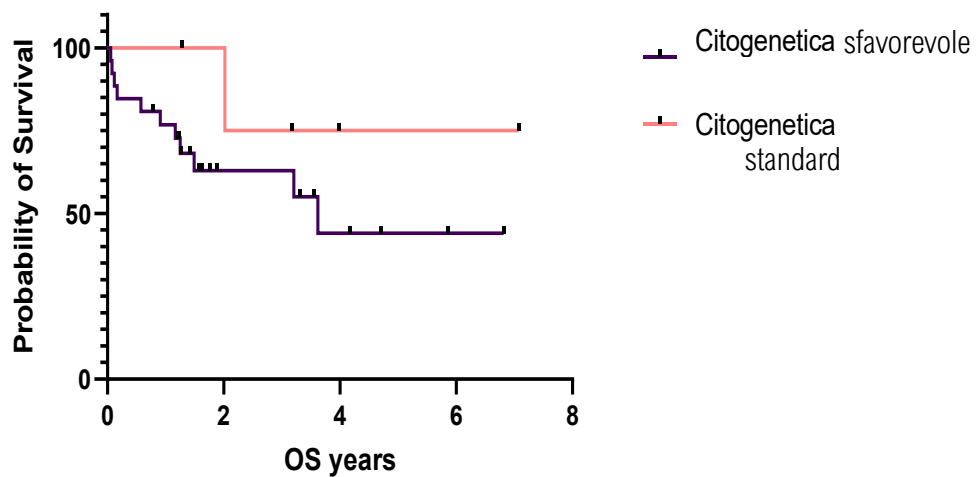
Concludiamo quindi l'analisi volta allo studio dell'impatto dei fattori clinici e demografici con quello che, tra tutti, è il maggiormente relazionato alla aggressività del tumore e dunque alle caratteristiche biologiche dello stesso, piuttosto che allo status del paziente in sé: la presenza di diffusione di malattia al momento della diagnosi (intendendo linfadenopatie multiple, epatosplenomegalia massiva, coinvolgimento sistemico e/o altre localizzazioni d'organo).

Nello specifico, il coinvolgimento d'organo da sempre più chiaramente correlato ad una prognosi infausta è, come già enunciato in precedenza, quello del Sistema Nervoso Centrale (nella nostra coorte, riscontrato in 4 pazienti sul totale dei 14 che presentavano malattia diffusa all'esordio). Ciò è attribuibile a diverse ragioni: in primo luogo, alla oggettiva complessità connaturata al distretto anatomico, d'altra parte alla difficoltà nell'offrire valide opzioni terapeutiche per le motivazioni che verranno discusse nel paragrafo seguente.

I risultati ottenuti dalla nostra casistica sono comunque coerenti con quanto affermato:

- OS dei pazienti con malattia non diffusa alla diagnosi: “Not reached” (IC: 1.49 – NR);
- OS dei pazienti con coinvolgimento SNC/diffuso all’esordio: 1.25 anni (IC: 1.04 – NR).
- Quanto emergente già ad una prima osservazione delle curve del *Grafico 8*, è stato in seguito confermato tramite *Log-rank test*, ottenendo una significatività statistica di p pari a 0.0156.

**e) Anomalie a livello citogenetico/molecolare**



*Grafico 9*

CITOGENETICA	Median OS	95% C.I.
Sfavorevole	3.62	1.24 - NR
Standard	Not reached (NR)	2.01 - NR

Il *Grafico 9* rappresenta l’analisi di quello che, ad oggi, è riconosciuto come uno tra i più determinanti, se non in assoluto il principale elemento nella definizione

della diagnosi, terapia e stratificazione del rischio delle Leucemie Acute Linfoidi: la caratterizzazione citogenetica-cariotipica e ancor più quella molecolare alla base della proliferazione neoplastica.

Come già riportato in *Tabella 1*, nella coorte analizzata solo 5 pazienti presentavano anomalie genetiche riconosciute come “a prognosi non sfavorevole” (principalmente del(12p), del(9p), t (12;21)(p12;q22) con riarrangiamento ETV6-RUNX1, iperdiploidia).

Per 2 pazienti non è stata invece messa in evidenza alcuna alterazione genetica di rilevanza e/o aberrazioni riconosciute tra le più frequenti e note (per cui la numerosità campionaria totale è costituita in questo caso da 31 pazienti, sottraendo questi due soggetti alla globalità della coorte iniziale).

I restanti 26 pazienti presentavano tutti anomalie genetiche/citogenetiche annoverate tra le cosiddette “poor risk”, ovvero a prognosi sfavorevole.

È rilevante in questo caso sottolineare che tra questi ultimi sono considerati, in accordo alle evidenze e classificazioni più aggiornate<sup>22, 27</sup>, anche i 10 pazienti affetti da LAL Philadelphia positiva (la t (9;22) è ancora considerata tra le suddette anomalie “poor risk”), nonostante, come più volte ribadito, oggi la prognosi di questi pazienti non sia più associata come un tempo ad esiti fatali, a seguito delle opzioni terapeutiche che si sono rese disponibili negli ultimi anni. (*Si vedano dunque anche in questo caso le osservazioni nel paragrafo relativo alla discussione dei dati ottenuti, 5*).

Per il momento, ci limitiamo a riportare i risultati emersi dallo studio:

- Mediana di OS dei pazienti con citogenetica e genetica standard: “Not reached” (IC: 2.01 – NR);
- Mediana di OS per i pazienti con LAL “poor risk”: 3.62 anni (IC: 1.24 – NR).
- La differenza tra le due curve non è risultata tuttavia statisticamente significativa ( $p = 0.2669$ ): i possibili fattori da computare per comprenderne la ragione verranno, come già accennato, discussi in seguito.



f) Raggiungimento della CR post Induzione

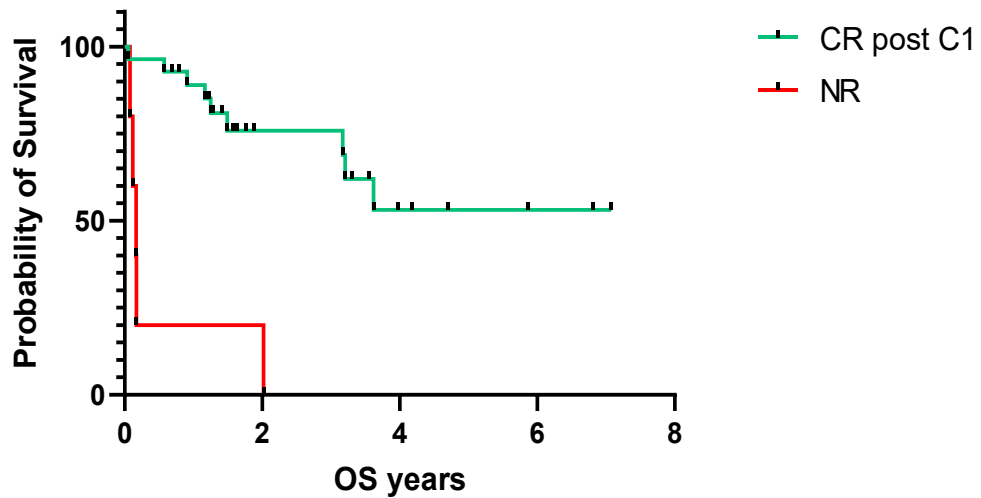


Grafico 10

RC post C1	Median OS	95% C.I.
RC (Remissione Completa)	Not reached (NR)	3.1 – NR
NR (No response)	0.17	0.05 – 0.9

Si intraprende con il *Grafico 10* l'analisi dell'ultima delle "categorie" in cui al Paragrafo 1.7 abbiamo visto essere didascalicamente suddivisi i Fattori di Rischio maggiormente implicati nella stratificazione prognostica delle LAL: quella della risposta alla terapia.

In questo ambito, andremo ad analizzare l'impatto di due aspetti: in primo luogo, il raggiungimento della Remissione Completa a seguito del primo ciclo di terapia (*Grafico 10* appunto); successivamente, procederemo allo studio di quello che rappresenta il punto cruciale del presente elaborato, ovvero le implicazioni prognostiche della MRD positività nella coorte dei nostri pazienti (*Grafici 11, 12 e 13*).

Per quanto riguarda il primo dei suddetti, esso consente di osservare la differenza in termini di sopravvivenza globale dei pazienti che hanno raggiunto rapidamente la Remissione Completa (entro cioè le 4 settimane di terapia di Induzione o Ciclo 1), rispetto a coloro che invece lo hanno fatto più tardivamente, o per i quali

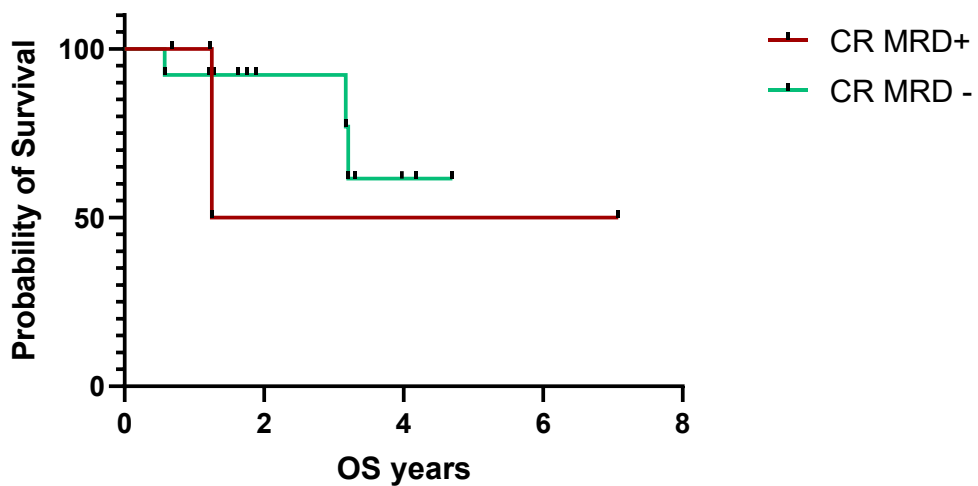
addirittura tale obiettivo non è mai stato raggiunto a causa della refrattarietà della loro malattia al trattamento proposto in prima linea.

Come riportato in *Tabella 5*, 25 pazienti hanno raggiunto la RC post C1, 8 al contrario sono risultati NR, ovvero “No Responders”.

Si riportano gli esiti dello studio:

- Mediana di sopravvivenza del gruppo responder (CR post C1): “Not reached” (IC: 3.1 – NR);
- Mediana di sopravvivenza del gruppo NR: 0.17 anni (IC: 0.05 – 0.9).
- La netta differenza emersa è stata poi confermata tramite *Log-rank test* con un livello di significatività statistica notevole ( $p < 0.0001$ ).

**g) MRD, Malattia Minima Residua**



*Grafico 11*

MRD	Median OS	95% C.I.
MRD + post C1	4.16	1.2 – NR
MRD – post C1	Not reached (NR)	3.1 - NR

L'ultimo dei fattori prognostici oggetto di studio di questa analisi statistica è rappresentato dalla Malattia Minima Residua che costituisce uno dei nuclei tematici più vivi attualmente riconosciuti nel contesto della Leucemia Acuta Linfoide, nonché quello su cui il presente elaborato maggiormente si proponeva di incentrarsi, già tra gli obiettivi inizialmente proposti.

Sono state condotte a tal proposito due analisi.

Nella prima sopra riportata (*Grafico 11*) la MRD positività (valutata in accordo ai criteri prestabiliti ed enunciati in precedenza nei Metodi dello studio, 3.2.2) è stata considerata a seguito del primo ciclo di terapia C1 e valutata in termini di impatto sulla sopravvivenza globale, OS, per analogia con quanto eseguito nello studio della RC e con il fine di consentirne successivamente un confronto coerente (5. *Discussione*).

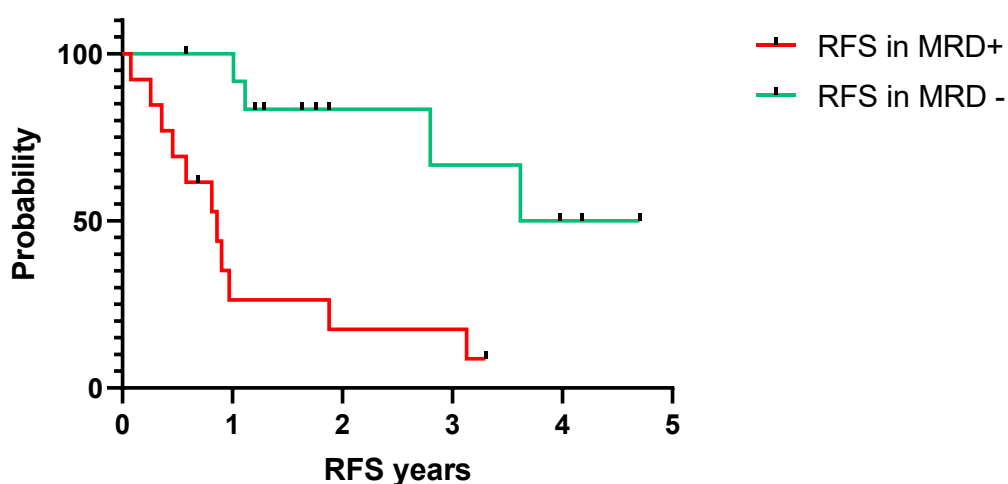
Nella successiva invece, l'outcome sulla base del quale sono stati messi a confronto i soggetti con MRD positività rispetto a quelli presentanti assenza di Malattia Minima Residua è stato l'“RFS”: Relapse Free Survival, con l'obiettivo di indagare quello che concordemente in letteratura è riportato come aspetto maggiormente legato alla MMR stessa, ovvero il suo ruolo nel predire la recidiva. Una ultima premessa è quella relativa alla numerosità campionaria: si ricorda che nello studio della MRD non sono stati presi in considerazione i pazienti persi troppo precocemente al follow up, o “NA”, data l'impossibilità di procedere a rivalutazioni della loro malattia (totale del campione 26 pazienti).

Nel caso specifico del *Grafico 11* inoltre, l'analisi si concentra sulle sole LAL Ph-poiché, essendo la Remissione Completa valutata specificamente a seguito del primo ciclo di terapia, risultava complesso includere le Philadelphia positive il cui timing di rivalutazione risulta meno rigidamente scandito e dunque il C1 meno nettamente individuabile.

Cominciando dunque da quest'ultimo, i risultati ottenuti sono riportati di seguito:

- OS mediana dei pazienti con MRD + post Ciclo 1: 4.16 anni (1.2 – NR);

- OS mediana dei pazienti MRD – post Ciclo 1: “Not reached” (IC: 3.1 – NR).
- Gli esiti osservati tuttavia non hanno raggiunto il livello di significatività statistica (*per le osservazioni in merito si rimanda al paragrafo successivo*).



*Grafico 12*

MRD post C1 e/o C3	Median RFS	95% C.I.
MRD + post C1 e/o C3	0.86	0.35 – 1.0
MRD - post C1 e/o C3	4.16	1.0 - NR

Concludiamo con questa ultima analisi il capitolo dedicato allo studio statistico del nostro lavoro di revisione. Il *Grafico 12* verte in particolare sugli esiti ottenuti dalle rivalutazioni della Malattia Minima Residua eseguite sui nostri pazienti nell’arco del decorso della loro malattia.

È stato scelto di includere tra gli “MRD +”, i pazienti in RC che hanno continuato a presentare persistenza di Malattia Minima Residua al C1 e al C3, ovvero i primi due Time Points riconosciuti dalla maggioranza dei protocolli, compreso quello adottato presso la nostra Clinica ematologica; ciò ha reso possibile comprendere nell’analisi anche i pazienti affetti da LAL Ph+, in cui sono state prese in esame le rivalutazioni effettuate nei primi 3 mesi dall’inizio della terapia.

Di seguito, i risultati ottenuti:

- Il  $\Delta t$  intercorso tra momento della diagnosi e prima recidiva (Relapse), espresso come mediana di RFS nel gruppo MRD- è risultata pari a 4.16 anni (IC: 1.0 – NR);
- La mediana di RFS invece tra coloro che hanno presentato una positività dell’MRD tra ciclo 1 e ciclo 3 è risultata pari a 0.86 anni (IC: 0.35 – 1.0).
- La differenza evidentemente riscontrata tramite analisi di *Kaplan-Meier*, si è poi confermata statisticamente significativa anche a seguito di verifica con *Log-rank test* ( $p = 0.0005$ ).

A conferma di quanto affermato, esiti concordi e che hanno raggiunto il livello di significatività statistica sono stati ottenuti anche tramite esecuzione del *Fisher Exact test*, o test esatto del  $\chi^2$  (*Chi quadrato*) volto allo studio dell’esistenza di una correlazione tra due variabili dicotomiche; in questo caso è stata studiata l’associazione tra presenza di MRD positività a C1/C3 e evento di recidiva (corrispondente appunto alla RFS):

	Results		<i>Marginal Row Totals</i>
	Relapse SI	Relapse NO	
MRD + (C1 + C3)	11	2	13
MRD - (C1 + C3)	4	9	13
<i>Marginal Column Totals</i>	15	11	26 (Grand Total)

The Fisher exact test statistic value is 0.0154. The result is significant at  $p < .05$ .

*Grafico 13*

## 5. Discussione dei risultati ottenuti

In questo paragrafo verranno presi in esame e discussi gli esiti della analisi statistica appena riportati.

### 5.1 Lineage ed Immunofenotipo

Iniziamo dal confronto tra i gruppi di pazienti affetti da LAL di lineage differente: “T” e “B” e, tra questi ultimi, “Ph” positive e negative.

Classicamente, la presenza di linfoblasti di tipo T è stata associata ad outcomes peggiori, in termini di refrattarietà alla terapia e riduzione della sopravvivenza globale.<sup>2,9</sup>

In effetti, osservando le mediane di sopravvivenza riportate per i *Grafici 1, 2, 3*, rispettivamente per OS, RFS ed EFS, le LAL-T si sono confermate anche nella nostra casistica associate ad esiti globalmente più modesti rispetto alle LAL di fenotipo B.

Allo stesso modo, ciò è stato ulteriormente confermato nella analisi seguente, rappresentata dal *Grafico 4*, in cui è stato approfondito il ruolo prognostico della differenziazione immunofenotipica tra lineage B e lineage T: non c'è dubbio infatti che la mediana di sopravvivenza registrata a 2.59 anni per le LAL-T sia ben inferiore a quella propria delle LAL-B, non ancora raggiunta; la differenza tuttavia, non è risultata statisticamente significativa ( $p = 0.2142$ ).

Ciò può essere spiegato senz'altro tenendo in considerazione la ridotta numerosità campionaria che, come vedremo, ha costituito uno dei principali limiti assieme al tempo limitato di follow up del presente elaborato.

D'altra parte però, si ritiene importante sottolineare in questo contesto che di per sé la netta distinzione riconosciuta in passato tra LAL-B e LAL-T risulti ormai in parte anacronistica, e che, come tale, non possiamo escludere che anche questo fatto partecipi alla non significatività del risultato ottenuto.

Si procede di seguito a chiarire maggiormente questo concetto.

Le conoscenze e gli strumenti di cui si dispone oggi per definire la prognosi di una Leucemia Acuta Linfoide, ci impongono di osservare l'aspetto immunofenotipico con un occhio più critico ed uno studio più approfondito: non possiamo trascurare cioè che tanto la linea linfoide T, tanto quella B, presentino numerosi sub-fenotipi ed aberrazioni genetiche riconosciute (come abbiamo avuto modo di esplicitare già in alcuni paragrafi della prima parte introduttiva) e che ciascuno di essi abbia delle peculiarità che lo contraddistinguono in quanto a marcatori, certo, ma anche a implicazioni prognostiche.

Non può che essere riduttiva quindi una distinzione limitata a "B " e "T", che non tenga conto ad esempio del fatto che tra le LAL-B sono comprese le altamente immature "pro-B", che presentano una prognosi nettamente peggiore<sup>9</sup>, così come il fenotipo "BCR-ABL1 like" oggi riconosciuto come uno tra i più complessi da gestire poiché associato ad una peggiore risposta alla terapia di induzione ed elevata positività di Malattia Minima Residua, con in definitiva un peggioramento globale della sopravvivenza.<sup>25, 26</sup>

D'altra parte invece le LAL-T, seppur mantengano una notevole incidenza di recidiva e anche in questo caso alcune delle sotto-classi riconosciute siano caratterizzate da una notevole aggressività ("early-T cell precursor"),<sup>9</sup> stanno conoscendo un miglioramento notevole nelle loro prospettive grazie all'applicazione anche nell'adulto di regimi "pediatric-like" (ricordiamo infatti che le LAL-T sono in assoluto le più frequenti nella popolazione pediatrica e che nell'ambito di quest'ultima sono da sempre riportati esiti nettamente più favorevoli rispetto a quelli del soggetto adulto/anziano) ed in generale alle nuove opzioni terapeutiche, spesso MRD-guided.

L'obiettivo di queste considerazioni non è certo quello di negare il fatto che le LAL-T siano associate ad un decorso clinico più imprevedibile e globalmente più "challenging" nella gestione del loro andamento, quanto piuttosto, affermare che sia imprescindibile riconoscere le novità introdotte dalle più recenti classificazioni, così come lo studio del singolo patrimonio genetico della specifica LAL.

Allo stesso modo, non è interesse del presente elaborato minimizzare l'importanza dello studio fenotipico, quanto suggerire di ricontestualizzarlo: più che come unico e indipendente fattore incidente sulla sopravvivenza del paziente, sfruttarlo come

strumento diagnostico e di guida terapeutica: tanto per l'individuazione di targets specifici utilizzabili per una terapia mirata, quanto per la rivalutazione della Malattia Minima Residua che, come vedremo, si ritiene debba essere interpretata esattamente con la medesima prospettiva.

## **5.2 Impatto degli aspetti clinici: genere, età e diffusione di malattia**

Per quanto riguarda la rilevanza dei fattori prognostici esaminati in ambito clinico, la discussione prende inizio da quella sul sesso del paziente.

Come già commentato, la differenza osservata si presenta in linea con quanto atteso, riportando cioè una sopravvivenza inferiore per i soggetti di sesso maschile rispetto alle pazienti di sesso femminile del campione, differenza che però non è risultata statisticamente significativa.

Anche in questo caso, non possiamo trascurare quanto affermato pocanzi in merito alla ristretta numerosità campionaria che con ogni probabilità inficia la possibilità di ottenere dei risultati più attendibili.

Accanto a questo però, è opportuno adottare uno sguardo ulteriormente critico in virtù degli obiettivi che il presente elaborato si proponeva nell'indagare l'effettiva efficacia di ciascuno dei fattori presi in esame.

Il sesso biologico in effetti è qualcosa che storicamente è stato riconosciuto come determinante indipendente negli outcomes del paziente; tuttavia, la maggior parte delle evidenze in tal senso non solo sono ormai datate, ma per lo più riferite a studi condotti su LAL pediatriche, in cui frequentemente la peggior prognosi del paziente di sesso maschile è imputata ad una aumentata incidenza di recidiva a livello testicolare.<sup>128, 129</sup>

Ad oggi, in accordo a quanto emerso dalla nostra analisi statistica, ma anche alla luce della carenza di una unisona espressione della letteratura più recente in tal senso, si suggerisce di ridimensionare l'importanza del sesso come fattore indipendente impattante sulla sopravvivenza globale ed eventualmente incentivare ad approfondire tale aspetto con più aggiornate statistiche su larga scala.



Proseguiamo ora con quello che, probabilmente, è stato a lungo considerato in assoluto il più importante fattore prognostico nell'ambito delle LAL, e che per alcuni versi continua ancora a rappresentare uno tra i più rilevanti determinanti nel loro "risk-assessment": l'età all'esordio.

Come già esplicitato, con "età" non si fa riferimento soltanto alla abissale differenza in termini di outcomes registrati tra la popolazione pediatrica e quella adulta, bensì alla notevole differenza nell'aspettativa di vita tra soggetti giovani adulti, adulti e chiaramente anziani. La prognosi va riducendosi in un "continuum" inversamente proporzionale, in modo quasi lineare, all'aumentare dell'età tra i 20 ed i 65 anni; in particolare il cut-off riconosciuto dalla maggior parte degli studi è fissato proprio a 60 anni, al di là dei quali la prognosi dei pazienti risulta davvero misera: <<i> i pazienti con un'età superiore ai 60 anni, hanno una prognosi particolarmente sfavorevole, con una sopravvivenza a lungo termine del solo 10-15%>>).<sup>127</sup>

Tale impatto è risultato indiscutibilmente sostenuto anche nella nostra, pur limitata, casistica con una differenza statisticamente significativa tra la mediana di sopravvivenza, "unreached", dei pazienti di età inferiore al "valore critico" dei 60 anni, contro una di appena 1.33 anni negli over 60.

Le ragioni di quanto emerso sono sicuramente in parte ovvie ed intuitive: un soggetto anziano ha per sua natura una aumentata probabilità di essere affetto da concomitanti patologie e/o di presentare comunque uno status generale più compromesso del paziente giovane e fit: per questo, la intrinseca fragilità e le comorbidità eventuali risultano fortemente impattanti sul decorso della malattia, riducendo al contempo le possibilità di essere sottoposti a regimi intensivi e di rispondere adeguatamente ad essi.

Accanto a ciò poi vanno considerati degli aspetti meno evidenti, ma fondamentali.

In primo luogo, difficilmente i pazienti anziani vengono candidati a studi e trials poiché non conformi ai rigidi criteri di eleggibilità degli stessi; la naturale conseguenza di ciò è che le uniche opzioni che possiamo loro offrire nel trattarli, sono quelle testate e comprovate su coorti di pazienti più giovani, privi delle loro fragilità, e che quindi con ragionevole probabilità finiranno per richiedere una riduzione della

dose, se non la sospensione, del protocollo avviato a causa di tossicità e/o altre criticità insorte<sup>127</sup>.

Ancora, l'età avanzata correla con il riscontro di aberrazioni genetiche e citogenetiche spesso più aggressive di quelle riscontrate nelle LAL pediatriche ed in quelle dell'adulto più giovane, contribuendo pesantemente alla mediocre prognosi cui queste LAL sono associate (in primis il cromosoma Philadelphia derivante dal riarrangiamento BCR-ABL1, riscontrato fino ad un 50% nei pazienti di età superiore a 50 anni<sup>41</sup>, dato conforme al nostro campione in cui sono 7 su 10 i pazienti affetti da LAL Ph+ di età superiore ai 60 anni; accanto a queste anomalie poi, varie altre sempre annoverate fra le "poor risk").

A completamento di quanto affermato, è estremamente rilevante ricordare che ai pazienti anziani, di default, non è proponibile in linea di massima la più radicale e per questo efficace opzione terapeutica nella gestione della Leucemia Acuta Linfoide: il trapianto allogenico di cellule staminali o alloSCT.

Sono stati infatti riportati al punto c) del paragrafo precedente, i dati relativi all'analisi statistica di tale aspetto, emergendo sia la conferma dell'esistenza di una correlazione statisticamente significativa tra età alla diagnosi e pazienti che sono andati incontro a trapianto (analisi eseguita tramite *Fisher Exact test*,  $p = 0.0342$ ), sia l'outcome nettamente superiore (anche qui significativamente,  $p = 0.0041$ ) in termini di sopravvivenza per quest'ultimo gruppo di soggetti (*Grafico 7*).

Numerose evidenze sono presenti a sostegno del fatto che l'alloSCT costituisca ad oggi uno dei fattori più impattanti sul decorso clinico dei nostri pazienti: ad esempio, in uno studio del 2008<sup>130</sup> osserviamo quanto segue:

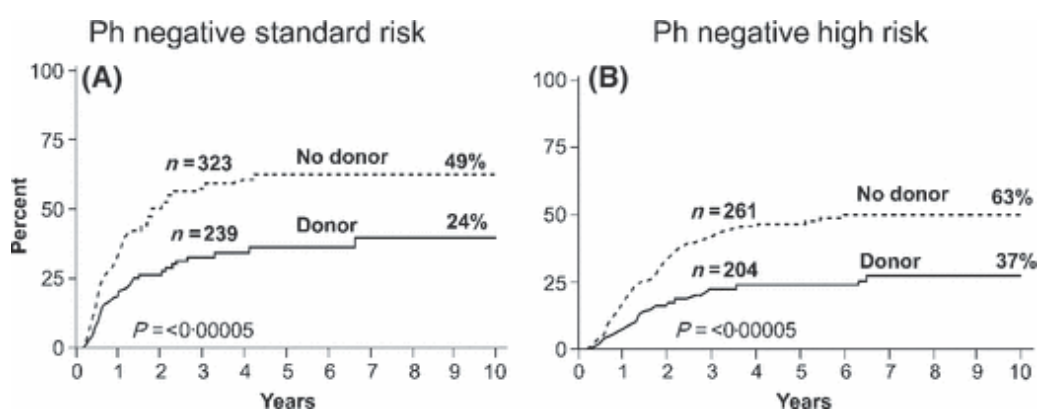
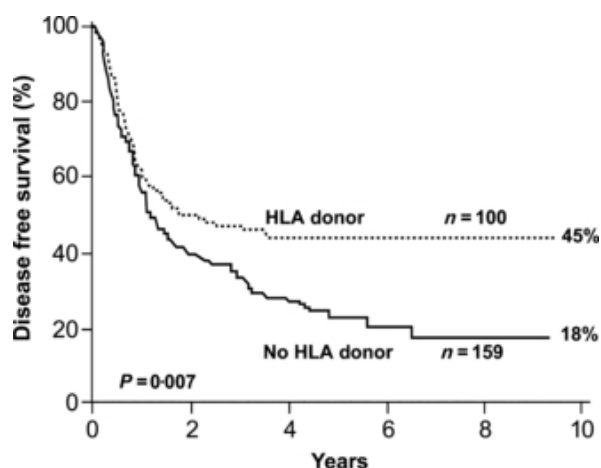


Figure 17 e 18. Andamento e sopravvivenza libera da malattia di pazienti sottoposti o meno a trapianto allogenico. (Fonte: International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). *Blood*. 2008)

In conclusione, la globalità dei numerosi aspetti sopra menzionati partecipa a far sì che l'età alla diagnosi possa essere considerata a tutt'oggi un tassello nel quadro clinico del paziente su cui poco possiamo impattare terapeutamente.

Si ritiene quindi che studi più mirati, o che perlomeno comprendano attivamente soggetti di età avanzata nel loro reclutamento, si rendano assolutamente necessari al fine di elaborare strategie più efficaci ed aumentare le prospettive di questi pazienti.

Concludiamo ora con l'ultimo dei fattori clinici presi in esame: la diffusione della neoplasia al momento del suo esordio.

Anche in questo caso l'impatto negativo che una simile condizione possa avere sull'andamento della malattia è a rigor di logica intuitivo e, di fatto, sostenuto praticamente in modo unanime in letteratura, così come nella analisi condotta presso

la nostra Clinica di Ematologia di Ancona: la sopravvivenza globale dei pazienti con malattia diffusa all'esordio e coinvolgimento del Sistema Nervoso Centrale è risultata significativamente inferiore ( $p = 0.0156$ ) a quella osservata nel gruppo dei pazienti con malattia meno aggressiva e più localizzata.

Con il nostro studio, non possiamo dunque che confermare alla luce di quanto osservato l'importanza in quanto a prognosi dell'aspetto in esame, riservandoci però di aggiungere alcune osservazioni.

Analogamente a quanto è valido per i pazienti di età avanzata, anche coloro che hanno una diffusione importante, se non massiva, di malattia all'esordio tendono ad essere esclusi dai trials di sperimentazione; da ciò non può che conseguire una mancanza di solide evidenze nel trattamento da riservare loro e, inevitabilmente, il fatto che fin troppo spesso vengano sottoposti a regimi standard, validati su LAL dalla clinica ben distinta, alla cui sperimentazione non sono stati candidati.

Questo è quanto mai vero per quanto concerne l'interessamento del SNC (che nella nostra coorte è stato osservato in 4 dei 14 pazienti appartenenti al gruppo "diffusione alla diagnosi"). All'aggressività della malattia infatti, si aggiunge in questo caso una difficoltà oggettiva nella gestione di questi pazienti, a causa della scarsità di opzioni terapeutiche in grado di attraversare ed agire efficacemente oltre la BEE (Barriera Emato-Encefalica).

È proprio qui allora che si rende manifesta la necessità di approfondimento scientifico ed ampliamento delle prospettive di trattamento attuabili in questo contesto, tramite studi e sperimentazioni appropriate.

Bisogna comunque riconoscere che in letteratura negli ultimi anni siano stati registrati in parte miglioramenti in questa direzione: è possibile menzionare infatti non molti ma rilevanti trials su larga scala incentrati su questo aspetto.

Ad esempio l'MRC UKALL XII/ECOG E2993, avviato nel 1993 e condotto per più di 20 anni dal Medical Research Council (MRC) in Inghilterra e dalla Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) negli Stati Uniti, includendo un totale di 1508 pazienti tra i 15 e i 60 anni (da notare che anche in questo caso gli over 60 non sono stati arruolati), il 5% dei quali presentavano coinvolgimento del SNC alla diagnosi.

Lo studio è stato condotto con protocolli mirati al trattamento della malattia a livello centrale (fondamentalmente MTX intratecale ad alte dosi, Leucovorina (acido folinico) ed irradiazione encefalica e spinale, con polichemioterapia a completamento).<sup>131</sup>

Dai risultati riportati, anche questo studio conferma la ridotta sopravvivenza dei pazienti con affezione del SNC, confermandone il significato prognosticamente negativo; tuttavia, non sono stati riportate differenze significative in quanto a RFS (qui indicata come Disease Free Survival), verosimilmente a seguito di una linea di trattamento dimostratasi adeguata.

Si attesta dunque l'importanza di validare con il potenziamento della ricerca protocolli quanto più possibile sicuri ed efficaci.

### **5.3 Pattern genetico e citogenetico**

Più volte è stato affermato nell'ambito del presente elaborato che la caratterizzazione genetica, molecolare soprattutto, costituisce probabilmente uno dei fattori in assoluto più rilevanti tanto nella determinazione degli outcomes della malattia, quanto per la definizione del percorso terapeutico più adeguato possibile nella gestione della stessa.

In effetti, i dati raccolti nel nostro campione hanno in parte evidenziato una differenza in termini prognostici tra gruppo "poor risk" -ovvero LAL con una genetica ampiamente sfavorevole alla base- e gruppo costituito da pazienti affetti da Leucemie geneticamente meno aggressive. Tale differenza mediana di sopravvivenza però, non si è dimostrata statisticamente significativa a seguito dell'esecuzione di *Log-rank test* ( $p = 0.2669$ ).

Il dato, che potrebbe inizialmente risultare incongruo, può essere analizzato tenendo a mente due considerazioni: la prima, è che all'interno del campione, già di per sé numericamente limitato, soltanto 5 pazienti hanno presentato una genetica standard o comunque non categorizzabile come "poor risk", il che facilmente lascia supporre che

la numerosità sia risultata insufficiente al raggiungimento della significatività statistica auspicata.

Non solo.

Particolarmente interessante risulta osservare che tra i 26 pazienti affetti da LAL prognosticamente sfavorevoli ben 10 sono rappresentate da LAL Philadelphia positive, conseguentemente al fatto che tutt'oggi la comunità scientifica e le principali classificazioni già menzionate<sup>22, 27</sup> annoverano il riarrangiamento BCR-ABL1 tra le aberrazioni genetiche a peggior prognosi.

Sappiamo tuttavia che i dati delle statistiche ormai più datate secondo cui la aspettativa di vita a un anno per le nuove diagnosi di LAL Ph+ raggiungeva appena il 10%<sup>126</sup> sono state drasticamente modificate dall'avvento degli ampiamente discussi Inibitori TirosinKinasici in primo luogo, ma anche all'ampliamento in generale del ventaglio di opzioni terapeutiche (terapia target con anticorpi monoclonali e soprattutto trapianto allogenico, che risulta ancora più salvavita se possibile in questi pazienti) di cui disponiamo al giorno d'oggi.

Nel nostro caso concreto ad esempio, dei ben 10 pazienti BCR-ABL1 + soltanto 4 hanno riportato l'“evento decesso” nel corso del loro follow up, e per di più non possiamo escludere (al contrario risulta alquanto plausibile) che a questo dato abbia partecipato l'età avanzata di tali soggetti, essendo la t (9;22), come già discusso, ampiamente più diffusa nei soggetti anziani<sup>41</sup> (all'interno del nostro campione 7 LAL-B Ph+ su 10).

Accanto a quello degli ITK, moltissimi sono gli esempi a sostegno del fatto che per garantire il massimo dell'efficacia terapeutica ai nostri pazienti, non può assolutamente essere trascurata la valutazione del pattern genetico-molecolare della loro malattia (uno fra i vari, il gene NOTCH1, codificante per un recettore transmembrana, la cui mutazione è spesso associata a quella di FBXW7 nelle LAL-T: assieme costituiscono una delle anomalie molecolari a esito più favorevole, certamente per la minore aggressività biologica tumorale da loro determinata, ma anche perché rappresentano uno dei nuovi bersagli riconosciuti in terapia target con inibitori delle  $\gamma$ -secretasi)<sup>99</sup>

#### 5.4 CR, NR, MRD + e –

Sono discussi in questo paragrafo i dati chiave del presente elaborato, riportati in *Tabella 5*.

Iniziando dalla Remissione Completa post ciclo di Induzione, gli esiti riportati al punto **f** del paragrafo 4, dimostrano con ragionevole certezza ( $p = 0.0005$ ) l'assoluta superiorità in quanto a sopravvivenza riportata dai pazienti in RC già al primo ciclo di terapia, rispetto ai soggetti NR, al contrario maggiormente refrattari ed il cui outcome è stato notevolmente peggiore.

Il raggiungimento della RC a 4 settimane dall'inizio della terapia è ormai da tempo riconosciuto come uno dei principali elementi impattanti sull'andamento di una Leucemia Linfoblastica Acuta. Tra gli studi a sostegno anche il già menzionato "MRC UKALL XII/ECOG E2993 study".<sup>130</sup>

Peraltro, il cut-off stabilito a 4 settimane e prevalentemente utilizzato nell'adulto è di fatto arbitrario e scelto in coincidenza della prima rivalutazione di malattia tramite aspirato midollare eseguita secondo i protocolli standard di trattamento, al termine quindi del primo ciclo di terapia.

Tuttavia, studi condotti in ambito pediatrico tramite applicazione di protocolli di rivalutazione più precoci, a 14 se non addirittura a 7 giorni, dimostrano che la prognosi migliora in maniera quasi direttamente proporzionale alla rapidità del raggiungimento della remissione completa.<sup>103, 126, 132</sup>

A conclusione della discussione in merito ai dati raccolti e agli esiti da essi desunti nel corso del presente lavoro di ricerca, giungiamo alla trattazione di uno degli elementi più cruciali e fondanti la attuale gestione delle Leucemie Acute Linfoidi nella pratica clinica: quello della Malattia Minima Residua.

Sono state già largamente trattate le modalità con cui le varie rivalutazioni vengono eseguite così come i ruoli che le evidenze scientifiche attribuiscono a tale aspetto, per poi approfondire il tema calandolo nel contesto concreto della Clinica di Ematologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche.

Gli obiettivi posti ed enunciati al punto 2. prevedevano un'indagine sui protocolli utilizzati nel nostro centro, ma soprattutto sui risvolti che l'applicazione di questi nella

attuale pratica clinica va a comportare nel management dei pazienti presi in carico presso il nostro reparto.

Sono già state presentate in proposito le metodologie di analisi dell'MRD dell'ospedale di Ancona (*paragrafo 3.2.2*), per questo, ricordiamo in questa sede solo alcune nozioni fondamentali all'interpretazione dei risultati che qui di seguito verranno discussi. Le rivalutazioni di malattia vengono eseguite da protocollo in ben determinati momenti dell'iter terapeutico del paziente: post C1, post C3, post C5 in primis; naturalmente, anche a seguito di questo quinto ciclo terapeutico, un paziente in RC stabile e mantenuta nel tempo, continuerà ad essere rivalutato nel corso del suo follow up con una frequenza meno rigorosa, ma sufficiente ad accertare che la malattia sia mantenuta completamente sotto controllo.

Ricordiamo altresì che, mentre i soggetti affetti da LAL Ph+ sono completamente presi in carico dal laboratorio del centro di Ancona, non solo per il completamento della diagnosi ma anche nel corso dell'iter di rivalutazione (tanto immunofenotipica quanto molecolare), per le LAL Ph- non possiamo offrire altrettanto ai nostri pazienti: la rivalutazione citofluorimetrica è per queste eseguita localmente, mentre quelle molecolari sono oggetto di un iter di centralizzazione a Palermo, ed in misura maggiore Roma, in modo da poter contare sulle strumentazioni all'avanguardia e la massima affidabilità di un centro ultra-specializzato.

Nel *Grafico 11* la MRD è oggetto di una statistica time-to-event, che, per analogia con quelle precedentemente eseguite, prevede il confronto dei due gruppi di pazienti (con positività di Malattia Minima Residua post Induzione, e negatività della stessa) in termini di Overall Survival (OS).

I risultati ricavati dallo studio non sono tuttavia risultati statisticamente significativi a seguito dell'esecuzione del *Log-rank test*.

Al contrario, i dati emersi a seguito dello studio oggetto del *Grafico 12* si mostrano davvero degni di nota: sono stati stratificati anche in questo caso i pazienti sulla base delle loro rivalutazioni di malattia eseguite post C1 e post C3, i due principali Time Points riconosciuti in letteratura<sup>2, 91, 102, 118</sup>, distinguendo quindi soggetti MRD – che



non presentavano rilevanza di Malattia Minima Residua midollare e MRD + che invece non ne hanno mai raggiunta l'eradicazione e/o sono tornati a presentarla al terzo ciclo di terapia.

In questo caso però l'outcome considerato è stata la RFS, Relapse Free Survival, con l'intento di comprovare quanto emerso nella prima parte introduttiva e dunque dalle evidenze che ne sono alla base: la MMR e la sua relazione con la sopravvivenza libera da recidiva.

I dati sono evidenti: pazienti MRD+ hanno dimostrato una mediana di sopravvivenza libera da recidiva nettamente inferiore rispetto ai soggetti in RC con MRD negatività; risultato confermato poi statisticamente significativo tramite *Log-rank test* e alla successiva analisi tramite *Fisher Exact test* (*Grafico 13*) che ha contribuito a mettere ulteriormente in risalto la correlazione MRD positività – “evento Relapse”.

Poiché questo aspetto rappresenta il punto alla base della nostra ricerca, risulta indispensabile procedere ad alcune considerazioni.

In primo luogo, la non significatività riportata dallo studio dell'impatto della positività MRD sulla sopravvivenza globale dei pazienti è di certo in parte attribuibile all'errore campionario ancora una volta associato ad una numerosità eccessivamente ridotta, peraltro in questo caso ulteriormente diminuita per i motivi precedentemente elencati in merito ai pazienti “NA” esclusi da queste analisi.

In aggiunta, la MMR, in quanto variabile che intrinsecamente si associa ad una lunga rivalutazione nel tempo, avrebbe richiesto probabilmente un tempo di follow up più ampio per poter essere correlata con maggiore affidabilità statistica ad un esito come quello di una OS. Trattandosi infatti di una minima concentrazione di cellule neoplastiche in un paziente altrimenti in remissione, e non certo di una mancata risposta evidente già sul piano clinico, non possiamo escludere che nell'arco di un tempo maggiore si sarebbero registrate recidive e/o altri eventi in grado di impattare sulla sopravvivenza di alcuni dei pazienti.

Se ciò è senz'altro vero, limitarci a questo non sarebbe tuttavia probabilmente corretto.

Non è da ritenersi casuale infatti la differenza degli esiti ottenuti studiando la MMR sulla base dei due differenti outcomes: questa è risultata in maniera evidente e statisticamente significativa ( $p = 0.0005$ ) relazionata all'aumento del tasso di incidenza di Relapse, mentre non significativa se correlata alla riduzione della sopravvivenza globale.

Questo dato è del tutto coerente in realtà con quanto riportato nella maggioranza delle evidenze ormai disponibili sul tema.

La MRD rappresenterebbe cioè certamente un importantissimo determinante prognostico, in quanto per sua natura evidenzia di una non completa risposta alla terapia e dunque di una maggiore refrattarietà della malattia alla stessa; tuttavia, la sua correlazione più rilevante risulta quella che essa presenta con la sopravvivenza libera da malattia, molto più che con la riduzione della sopravvivenza globale poiché, intuitivamente, la persistenza di un clone non eradicato di malattia è pesantemente associato al rischio che questo esiti in un vero e proprio evento di recidiva.

Quanto emerso dalla nostra analisi sembra confermare quindi ciò che è appena stato affermato, supportando il principio che lo studio della rivalutazione della MRD debba essere considerato come strumento in un più ampio quadro di stratificazione del rischio determinato dagli innumerevoli fattori citati, più che come predittore indipendente di mortalità.

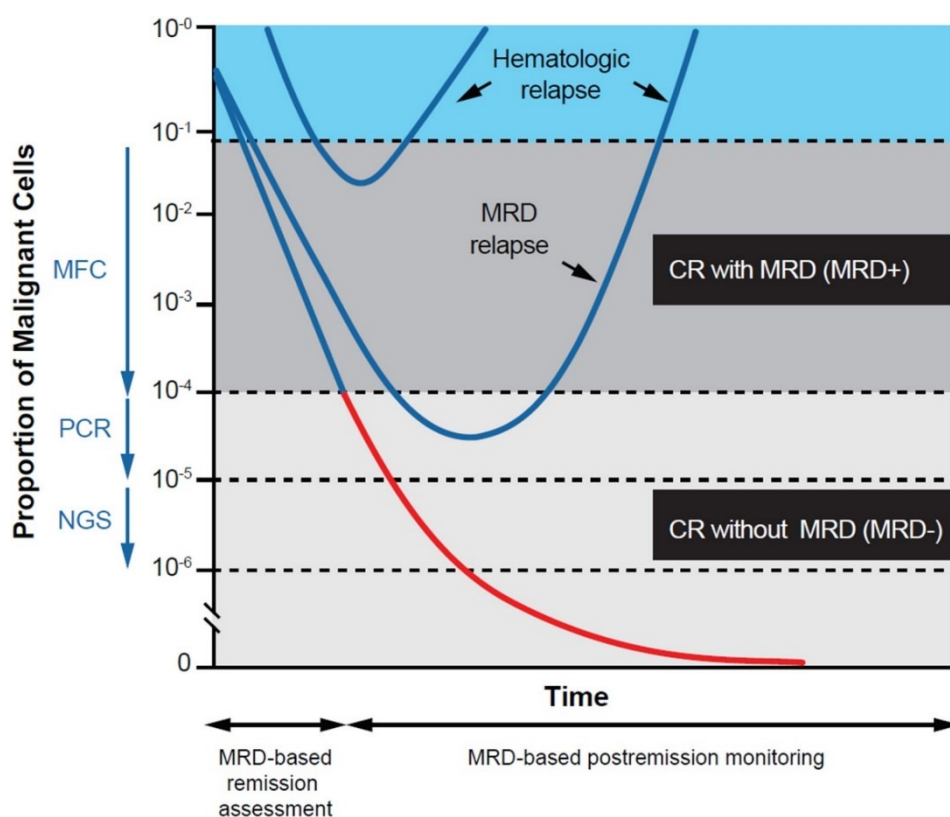
A questo proposito concludiamo con due ulteriori osservazioni.

Nella nostra coorte, solo 4 sono i pazienti recidivati a seguito della Remissione Completa pur presentando una MMR non rilevabile (al contrario, tutti gli altri 9 pazienti che non hanno mai presentato MRD positività, non sono andati incontro ad evento "Relapse").

Di questi 4, 2 sono pazienti per i quali non era stato possibile eseguire la rivalutazione molecolare della MRD, poiché a seguito della centralizzazione non erano stati individuati bersagli idonei ad essere sfruttati nello studio della stessa, da eseguire con l'utilizzo di sonde specifiche.

Sapendo dunque che il metodo di rivalutazione molecolare rappresenta oggi il Gold Standard e che per questi pazienti al contrario è stato attuabile soltanto lo studio tramite citofluorimetria, non possiamo escludere alla base della loro recidiva una “undetected MRD”, imputabile alla sensibilità inferiore inevitabilmente legata al metodo Immunofenotipico.

Una esemplificazione di quanto affermato può essere ottenuta dall’osservazione della *Figura 19*.



*Figura 19. Limiti nell’“MRD detection” delle metodiche Immunofenotipiche e Molecolari.*

*(Fonte: Recommendations for the assessment and management of measurable residual disease in adults with acute lymphoblastic leukemia: A consensus of North American experts. Am J Hematol. 2019).*

Infine, in merito alla non significatività della correlazione MRD-OS, sottolineiamo come 3 dei 10 pazienti presentanti MRD positività post Ciclo 1 (la più chiaramente associata a prognosi infausta), fossero pazienti giovani o molto giovani (19, 26, 43 anni), fattore di per sé fortemente favorevole come già dimostrato; ad essi sono stati proposti per di più regimi terapeutici intensivi, proprio in risposta alla refrattarietà individuata tramite studio della Malattia Minima Residua, nonché, ad uno di essi, il trapianto allogenico, tra tutti il più radicale ed efficace trattamento attualmente disponibile e maggiormente associato a miglioramento della sopravvivenza.

Questo ultimo punto in particolare è quello che più si correla alle conclusioni che dal presente elaborato si ritiene opportuno trarre e che verranno esplicitate nel paragrafo conclusivo.

## 6. Limiti dello studio

Si ritiene doveroso spendere alcune parole nell'inquadramento di quelli che hanno costituito le principali limitazioni riscontrate nella elaborazione e stesura di questa ricerca.

In primo luogo, la più volte menzionata ridotta numerosità campionaria.

Sappiamo infatti che un ridotto numero di soggetti costituenti la coorte, si trova ad essere inscindibilmente correlata ad una maggiore probabilità di errore statistico e bias, nonostante siano stati attuati tutti gli accorgimenti possibili per limitarne eventuali effetti.

Tale limitata numerosità si è dimostrata dunque, se non la causa principale, sicuramente una delle concause che hanno contribuito al mancato raggiungimento della significatività statistica di alcuni degli aspetti che sono stati indagati.

Altro elemento, anch'esso già citato, è senz'altro rappresentato da un limitato tempo di follow up dei pazienti.

Si è infatti deciso di prendere in esame le diagnosi a partire dal 2016, per rendere confrontabili le LAL oggetto di studio in quanto a protocolli di rivalutazione a cui sono state sottoposte (essendo stato il 2016 l'anno in cui è stato intrapreso dal centro di Ancona il processo di centralizzazione delle MRD molecolari presso il Policlinico Umberto I di Roma e gli Ospedali Riuniti Villa Sofia – Cervello di Palermo).

Possiamo quindi affermare che, per patologie complesse come quella in esame, specie se valutate per outcomes maggiori di sopravvivenza globale, è verosimile che la possibilità di seguire in un arco temporale maggiore i soggetti, avrebbe portato a dei risultati ancora più evidenti e significativi.

Ci auspichiamo pertanto in definitiva, che studi retrospettivi come quello che, pur forse limitatamente, è stato in questa sede portato a termine vengano proseguiti ed ampliati nel tempo, poiché potenzialmente in grado di rappresentare un importante strumento di audit della propria pratica clinica oltre che di pura ricerca sulle LAL in trattamento presso la nostra Clinica di Ematologia.

## 7. Conclusioni

Negli ultimi decenni enormi progressi sono stati raggiunti in quanto a conoscenza, diagnosi e trattamento delle Leucemie Acute Linfoidi, una patologia che ciò nonostante permane di complessa gestione e gravata da una prognosi globalmente pesante. Anche lo studio dei singoli fattori che concorrono a determinare quest'ultimo aspetto ha permesso una più profonda comprensione del peso relativo esercitato da ciascuno di essi nel caratterizzare la malattia e, con essa, le aspettative del singolo paziente.

Il quadro complessivo è stato in un certo senso ridefinito e radicalmente trasformato dall'avanzare delle tecnologie e dagli esiti della ricerca.

Se fino a pochi anni fa, la prognosi del paziente poteva essere associata soltanto al suo status al momento della diagnosi, alla sua età, sesso ed una grossolana distinzione tra fenotipo "B e T", poiché questi erano gli aspetti valutabili in una patologia per certi versi misconosciuta e con una tecnologia di fatto inadeguata, ad oggi gli strumenti a nostra disposizione impongono una ridefinizione di quanto affermato e di ricalibrare ciò che sappiamo con prospettive meno anacronistiche.

Il grafico riportato a pagina seguente è tratto da un lavoro di revisione risalente ormai a 13 anni fa<sup>126</sup> che testimonia quanto già fossero mutate rispetto ai decenni precedenti le prospettive nello studio e definizione della prognosi della Leucemia Acuta Linfoide, proponendo peraltro una previsione delle ripercussioni che questi stessi mutamenti avrebbero avuto nel 2020.

Ad oggi, correndo l'anno 2023, quanto è emerso dal nostro lavoro di ricerca si conferma essenzialmente concorde alla direzione intrapresa.

Alle fondamenta già poste da questi lavori particolarmente lungimiranti però, possiamo aggiungere nuove consapevolezze che derivano dai brillanti passi avanti che nel frattempo hanno avuto luogo.

### The evolving paradigm of prognostic factors for ALL in adults

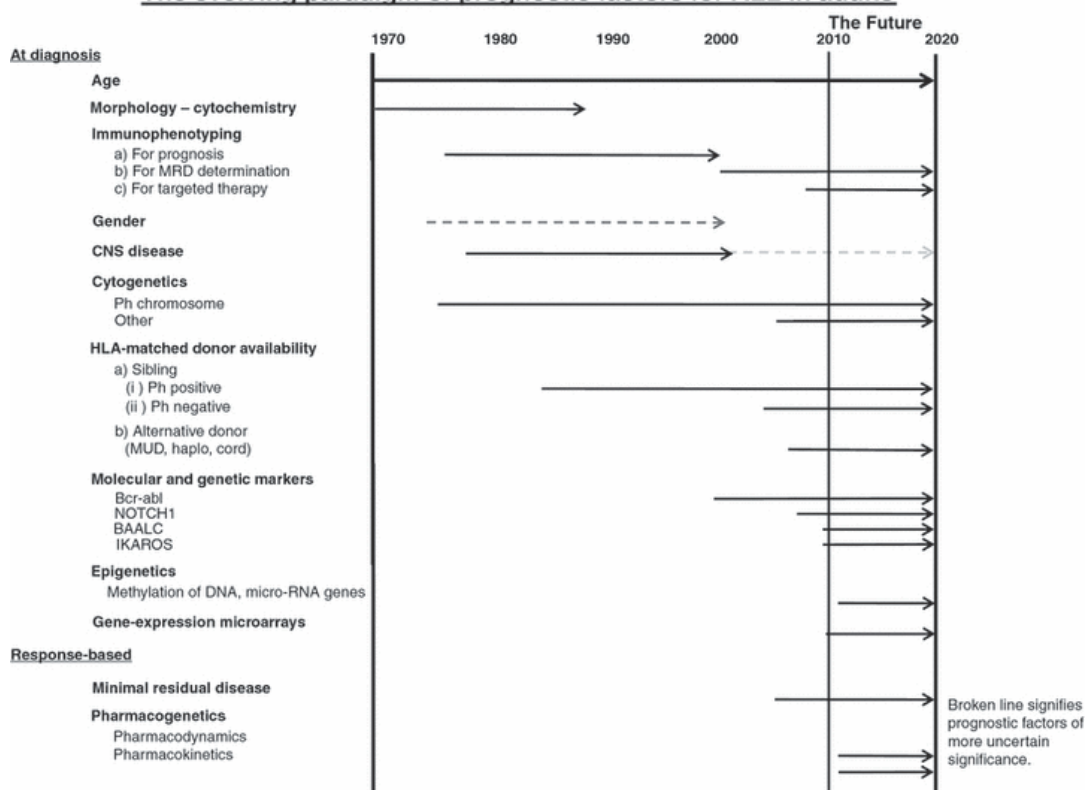


Figura 20. Cambiamenti nell'impatto dei diversi fattori prognostici tra ieri e oggi. (Fonte: Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2010)

Abbiamo osservato infatti come tanto il genere del paziente, quanto l'immunofenotipo inteso come pura definizione del lineage della Leucemia oggetto di studio, siano stati sempre più ridimensionati, mantenendo nel caso della seconda un ruolo invece notevole nella definizione di eventuali bersagli molecolari impiegabili nell'ottica di una "target therapy" (pensiamo al CD19 per Blinatumomab o addirittura l'immunoterapia con CAR-T cells, CD22 per Inotuzumab etc.).

Allo stesso modo, anche il coinvolgimento del SNC e la diffusione alla diagnosi, pur mantenendo un impatto maggiore nella definizione di un peggioramento degli outcomes, stanno progressivamente assumendo un carattere meno infausto ed ineluttabile e, auspicabilmente, con le nuove opzioni terapeutiche a disposizione le prospettive di questi pazienti continueranno ad aumentare.

Altri elementi, tra cui l'età all'esordio invece, permangono tutt'oggi cruciali nella determinazione della prognosi dei soggetti, in maniera totalmente concorde a quanto

emerso dai nostri risultati, di cui si è già ampiamente discusso nell'arco dei paragrafi precedenti.

Sono però i tasselli più recentemente introdotti in questo complesso panorama a costituire, probabilmente, la più grande rivoluzione rispetto al passato e che si sono attualmente affermati come indiscutibilmente cruciali in questo senso: in primis, la caratterizzazione citogenetico-molecolare che, sebbene già presente in passato, ha conosciuto passi da gigante nell'epoca più recente e può oggi contare su tecnologie impensabili soltanto fino a pochi anni fa.

Accanto a questa però, troviamo le sue implicazioni, la possibilità cioè di attuare terapie sempre più specifiche e all'avanguardia di tipo target e ancor più l'attuazione del trapianto allogenico.

Infine, soprattutto, i fattori connessi alla risposta della malattia al trattamento: raggiungimento precoce della RC e eradicazione della Malattia Minima Residua.

Concentrandoci su quest'ultima poiché interesse primario della nostra ricerca, è stato riscontrato sicuramente un netto miglioramento nella gestione dei pazienti diagnosticati, ricoverati e trattati con protocolli MRD-guided presso la Clinica di Ematologia di Ancona.

Si ritiene che le massime potenzialità nello studio della MRD stessa derivino infatti dall'integrazione dei protocolli di rilevazione e rivalutazione con quelli terapeutici proposti ai nostri pazienti. In altre parole, non è intenzione di questo lavoro sminuire l'importanza della MMR come fattore prognostico indipendente, che è anzi riconosciuto e sostenuto, specialmente però come predittore di un evento di recidiva piuttosto che come direttamente implicato nella riduzione della sopravvivenza globale.

Altrettanto tuttavia, quello che più si ritiene essenziale rimarcare è che la sua maggiore utilità si esplicita quando letta ed interpretata come strumento nelle mani del team di esperti che concorrono alla gestione del paziente: una vera e propria guida, in grado di oggettivare e dare sostegno concreto alle complesse scelte che nel quotidiano si è tenuti a compiere per trattare queste patologie, tanto insidiose quanto complesse.



La Malattia Minima Residua è quindi risultata essenziale per:

- Mantenere sotto controllo l'andamento clinico della malattia, individuando eventuali refrattarietà alla terapia di prima linea nonostante la generale Remissione Completa (persistenza di MRD positività), o piuttosto individuare tempestivamente il preludio di una recidiva (paziente in RC e MRD negativa che torni a presentare un flare di malattia), permettendo di riorientare il trattamento prima che questa si renda manifesta;
- Consentire quindi un "risk-assessment dinamico ed in itinere"<sup>9</sup>, in corso cioè di trattamento, e non solo al momento della diagnosi. Le caratteristiche della malattia infatti possono per sua natura andare incontro a mutamento ed è indispensabile che queste alterazioni siano rilevate precocemente, così da indirizzare il paziente a terapie di seconda o terza linea o, quando possibile ed indicato, a trapianto allogenico;
- Il ruolo della MMR relazionato al trapianto allogenico è probabilmente quello che tra tutti costituisce la massima evidenza della rivoluzione che questo strumento, quando saggiamente impiegato, può costituire. Si pensi ad un paziente giovane, in Remissione Completa riscontrata con le metodiche tradizionali, ma con una malattia in realtà resistente alla terapia a causa di un profilo genotipico molecolare ad alto rischio, la cui prognosi fino a non molto tempo fa sarebbe risultata assai più pesante in assenza di un protocollo aggressivo e mirato alla sua refrattarietà. Poter rivalutare la MRD invece, consentirebbe, e consente nei fatti, di rilevare la presenza di quegli stessi cloni neoplastici che lo avrebbero altrimenti condotto nel tempo ad una recidiva e, con tutta probabilità, ad un conseguente esito infausto. Questi pazienti giovani e fit infatti, con MRD persistentemente positiva al secondo Time Point (C3) sono avviati a trapianto in presenza di donatore compatibile, invece che al regime chemioterapico di mantenimento standard a cui evidentemente non stavano rispondendo, offrendo loro una concreta possibilità di guarigione;
- L'MRD è connessa anche alla capacità di predire l'esito dello stesso alloSCT e al suo monitoraggio nel tempo. Ovvero, il paziente avviato a trapianto con un flare molto importante di Malattia Minima Residua è risultato secondo evidenze <sup>123, 124,</sup> <sup>133</sup> correlato a maggior insuccesso terapeutico per aumento delle probabilità di

rigetto e soprattutto di seconda recidiva post-trapianto, evento grave e contro cui disponiamo di poche armi terapeutiche. Ecco quindi che studiare adeguatamente la MMR permetterà di sottoporre il nostro paziente a trapianto nelle condizioni più opportune possibili alla riduzione del tale rischio. Allo stesso modo, una volta eseguito l'alloSCT, continuare tali rivalutazioni si dimostrerà essenziale nel rilevare precocemente l'esordio di un'eventuale Relapse per consentire, analogamente a quanto visto nei non trapiantati, di mettere in atto come "extrema ratio" terapie con anticorpi monoclonali o addirittura immunoterapia con cellule CAR-T.

Concludiamo a questo punto il presente elaborato con queste ultime righe.

Le LAL, come ogni altra neoplasia, e per alcuni versi ancor più spiccatamente, appaiono caratterizzate da una profonda eterogeneità che fin dal principio risulta inevitabile di fronte ad una simile complessità di fenotipi, presentazioni cliniche, caratteristiche epidemiologiche, biologiche e genetiche.

Ancora molto resta perciò da indagare ed approfondire.

La ricerca continua e le tecnologie avanzano, consegnando alla pratica clinica strumenti teorici e pratici sempre più all'avanguardia che ci permettono di affrontare con consapevolezza ed efficacia il lungo e spesso arduo percorso diagnostico e terapeutico dei nostri pazienti. Tra questi, proprio la rivalutazione della Malattia Minima Residua, dimostratasi chiave insostituibile praticamente in ogni aspetto del management degli stessi.

I determinanti prognostici basati infatti sulla risposta alla terapia hanno costituito un punto di svolta cruciale della presente e verosimilmente futura pratica clinica, risultando fondamentali nel percorso verso la definizione di una medicina sempre più individualizzata e "costruita" sull'esigenza del paziente e l'unicità della sua neoplasia.

Questo risulta possibile però soltanto se elementi come l'"MRD assessment" vengono intesi e sfruttati quali guida al percorso diagnostico e terapeutico, fondamento per le decisioni che al clinico spettano nella presa in carico del suo paziente, per poter offrire la più adeguata tra le strategie a disposizione, e con essa le migliori prospettive.

Ecco che si configura allora la sfida del nostro tempo: studiare, conoscere ed approfondire per far sì che ciascuno di quei fattori non sia ridotto ad una sentenza ineluttabile di “buona” o “cattiva” prognosi. Al contrario, l’obiettivo verso il quale sempre più ci stiamo dirigendo e che più che mai si ritiene che debba essere perseguito, sarà proprio quello di mutare prospettiva ed interpretare i diversi elementi come compartecipi di un quadro più ampio, una prospettiva più globale che deriva dalla loro unica intersezione certo, su cui però possiamo andare ad agire, modulando i trattamenti a cui sottoponiamo i nostri pazienti, adattandoli all’esigenza del singolo.

Giungere così in un futuro auspicabilmente prossimo a considerare ogni LAL (e questo sia valido per qualsiasi neoplasia) come un “unicum”, da studiare nella sua globalità ed affrontare di conseguenza, con una medicina che ci auguriamo si dimostrerà sempre più “tailored”, mirata e adattata al singolo, per aumentare la sopravvivenza ma anche la qualità di vita dei nostri pazienti.

## 8. Bibliografia

- 1 Giuliani, N. (cur.); Olivieri, A. (cur.); Ematologia. Per medicina, scienze biologiche, biotecnologie mediche. Idelson-Gnocchi, 2020.
- 2 Malard, F., & Mohty, M. (2020). Seminar Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 395(10230), 1146–1162.
- 3 *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®)–Health Professional Version - NCI*. (n.d.). Retrieved May 7, 2023, from [https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq#\\_7\\_toc](https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq#_7_toc)
- 4 PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. (2002). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. *PDQ Cancer Information Summaries*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389206>
- 5 Surveillance, Epidemiology, and End Results Program: SEER Cancer Stat Facts: Childhood Leukemia (Ages 0–19). Bethesda, Md: National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program. [Available online](#). (Last accessed September 7, 2022).
- 6 Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2014. Bethesda, MD: National Cancer Institute; April, 2017. [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/).
- 7 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 7–30.
- 8 National Cancer Institute: NCCR\*Explorer: An interactive website for NCCR cancer statistics. Bethesda, MD: National Cancer Institute. [Available online](#). (Last accessed December 6, 2022).
- 9 Bosi, A. Seminari di Ematologia Clinica. Leucemia linfoblastica acuta, EDIMES, Anno 2. Numero 1. 2017.
- 10 Pulte, D., Gondos, A., & Brenner, H. (2009). Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood*, 113(7), 1408–1411.
- 11 Hunger, S. P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B. M., Gaynon, P. S., Winick, N. J., Reaman, G. H., & Carroll, W. L. (2012). Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children’s oncology group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(14), 1663–1669.

- 12 Pulte, D., Jansen, L., Gondos, A., Katalinic, A., Barnes, B., Rensing, M., Holleccek, B., Eberle, A., & Brenner, H. (2014). Survival of adults with acute lymphoblastic leukemia in Germany and the United States. *PloS One*, 9(1).
- 13 Kaushansky, Kenneth; T. Prchal, Josef; W. Press, Oliver; A. Lichtman, Marshall; Levi, Marcel; J. Burns, Linda; A. Caligiuri, M. (2006). Williams Hematology, 9th Edition McGraw-Hill. In *eLS*.
- 14 Brown, P. A., Shah, B., Advani, A., Aoun, P., Boyer, M. W., Burke, P. W., DeAngelo, D. J., Dinner, S., Fathi, A. T., Gauthier, J., Jain, N., Kirby, S., Liedtke, M., Litzow, M., Logan, A., Luger, S., Maness, L. J., Massaro, S., Mattison, R. J., ... Campbell, M. (2021). Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 19(9), 1079–1109.
- 15 Pui CH, Evans WE: Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354:166, 2006.
- 16 Magatha LS, Scott JX, Subramaniam G, Chandrasekaran T, Paul SFD, Koshy T. Cytogenetic and Fluorescence in situ Hybridization Profile of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia in a University Hospital in South India. *Med Princ Pract*. 2021;30(6):563-570.
- 17 Chang HH, Lu MY, Jou ST, Lin KH, Tien HF, Lin DT. Cytogenetics in childhood acute lymphoblastic leukemia in Taiwan: a single-institutional experience. *Pediatr Hematol Oncol*. 2006;23(6):495–506
- 18 Romana SP, Coniat ML, Berger RT. t(12; 21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;9(3):186–91
- 19 Spathas DH, Stewart J, Singer IO, Theriault A, Bovey M, Connor JM. Detection of t (12; 21) in childhood acute lymphoblastic leukemia by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics Cytogenetics*. 1999;110(1): 7–13
- 20 Nordgren A, Heyman M, Sahlén S, Schoumans J, Söderhäll S, Nordenskjöld M, et al. Spectral karyotyping and interphase FISH reveal abnormalities not detected by conventional G-banding: implications for treatment stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: detailed analysis of 70 cases. *Eur J Haematol*. 2002;68(1):31–41

- 21 Speicher, M. & Carter, N. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet.* 6, 782–792 (2005).
- 22 Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Barreto, I., Araujo, D. O., Ferry, J., Gratzinger, D., Guitart, J., Gujral, S., Harris, M., Geyer, J., Harrison, C. J., Hartmann, S., Hochhaus, A., Khoury, J., Leoncini, L., Leung, N., Rajkumar, S. V., ... Vergier, B. (2022). *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours : Lymphoid Neoplasms.* June.
- 23 Panagopoulos I, Micci F, Thorsen J, Haugom L, Tierens A, Ulvmoen A, et al. A novel TCF3-HLF fusion transcript in acute lymphoblastic leukemia with a t(17;19)(q22;p13). *Cancer Genet* 2012;205:669–72.
- 24 Fischer U, Forster M, Rinaldi A, Risch T, Sungalee S, Warnatz HJ, et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet.* 2015;47:1020–9.
- 25 Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, McCastlain K, Harvey RC, Chen IM, Pei D, Iacobucci I, Valentine M, Pounds SB, Shi L, Li Y, Zhang J, Cheng C, Rambaldi A, Tosi M, Spinelli O, Radich JP, Minden MD, Rowe JM, Luger S, Litzow MR, Tallman MS, Wiernik PH, Bhatia R, Aldoss I, Kohlschmidt J, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD, Stock W, Kornblau S, Kantarjian HM, Konopleva M, Paietta E, Willman CL, Mullighan CG. High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *J Clin Oncol.* 2017 Feb;35(4):394-401.
- 26 Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, McCastlain K, Harvey RC, Chen IM, et al. High frequency and poor outcome of philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults. *J Clin Oncol.* 2017;35:394–401.
- 27 Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R. P., Borowitz, M. J., Calvo, K. R., Kvasnicka, H., Wang, S. A., Bagg, A., Barbui, T., Branford, S., Bueso-ramos, C. E., Cortes, J. E., Cin, P. D., Duncavage, E. J., Ebert, B. L., Estey, E. H., & Facchetti, F. (2022). *Special Report International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias : integrating morphologic , clinical , and genomic data.* 140(11), 1200–1228.
- 28 Chen Z, Hu S, Wang SA, et al. Chronic myeloid leukemia presenting in lymphoblastic crisis, a differential diagnosis with Philadelphia-positive B-lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2020;61(12): 2831-2838

- 29 Hoelzer, D., Bassan, R., Dombret, H., Fielding, A., Ribera, J. M., & Buske, C. (2016). Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 27, v69–v82.
- 30 Pui, C. & Williams, W. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 354, 166–178 (2006).
- 31 Fielding, A. The treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Progr*. 381–390 (2008).
- 32 Rowe, J. Optimal management of adults with ALL. *Br J Haematol*. 144, 468–483 (2009).
- 33 Mitchell CD, Richards SM, Kinsey SE, Lilleyman J, Vora A, Eden TO. Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial. *Br J Haematol* 2005; 129: 734–45.
- 34 Bostrom BC, Sensel MR, Sather HN, et al. Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children’s Cancer Group. *Blood* 2003; 101: 3809–17.
- 35 Moricke A, Zimmermann M, Valsecchi MG, et al. Dexamethasone vs prednisone in induction treatment of pediatric ALL: results of the randomized trial AIEOP-BFM ALL 2000. *Blood* 2016; 127: 2101–12.
- 36 Larsen EC, Devidas M, Chen S, et al. Dexamethasone and highdose methotrexate improve outcome for children and young adults with high-risk B-acute lymphoblastic leukemia: a report from Children’s Oncology Group study AALL0232. *J Clin Oncol* 2016; 34: 2380–88.
- 37 Igarashi S, Manabe A, Ohara A, et al. No advantage of dexamethasone over prednisolone for the outcome of standard- and intermediate-risk childhood acute

- lymphoblastic leukemia in the Tokyo Children's Cancer Study Group L95-14 protocol. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6489–98.
- 38 De Moerloose B, Suci S, Bertrand Y, et al. Improved outcome with pulses of vincristine and corticosteroids in continuation therapy of children with average risk acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoblastic non-Hodgkin lymphoma (NHL): report of the EORTC randomized phase 3 trial 58951. *Blood* 2010; 116: 36–44.
- 39 van der Sluis IM, Vrooman LM, Pieters R, et al. Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica* 2016; 101: 279–85
- 40 Patel B, Kirkwood AA, Dey A, et al. Pegylated-asparaginase during induction therapy for adult acute lymphoblastic leukaemia: toxicity data from the UKALL14 trial. *Leukemia* 2017; 31: 58–64.
- 41 Burmeister, T., Schwartz, S., Bartram, C. & Al. Patients' age and BCR-ABL frequency in adult B-precursor ALL: a retrospective analysis from the GMALL study group. *Blood* 112, 918–919 (2008).
- 42 Dombret, H., Gabert, J., Boiron, J. & Al. Outcome of treatment in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia—results of the prospective multicenter LALA-94 trial. *Blood* 100, 2357–2366 (2002).
- 43 Gleissner, B., Gokbuget, N., Bartram, C. & Al. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 99, 1536–1543 (2002).
- 44 Avivi, I., Goldstone, A. & Al., E. Bone marrow transplant in Ph<sup>+</sup> ALL patients. *Bone Marrow Transplant*. 31, 623–632 (2003).
- 45 Laport, G., Alvarnas, J., Palmer, J. & Al. Long-term remission of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia after allogeneic hematopoietic



- cell transplantation from matched sibling donors: a 20-year experience with the fractionated total body irradiation-etoposide regimen. *Blood* 112, 903–903 (2008).
- 46 Gruber, F., Mustjoki, S. & Porkka, K. Impact of tyrosine kinase inhibitors on patient outcomes in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 145, 581–597 (2009).
  - 47 Foà, R., Vitale, A. & Al. Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118, 6521–6528 (2011).
  - 48 Chiaretti, S., Vitale, A., Vignetti, M. & Al. A sequential approach with imatinib, chemotherapy and transplant for adult Ph<sup>+</sup> acute lymphoblastic leukemia. Final results of the GIMEMA LAL 0904 study. *Haematologica* 101, 1552–1554 (2016).
  - 49 Daver N, Thomas D, Ravandi F, et al. Final report of a phase II study of imatinib mesylate with hyper-CVAD for the front-line treatment of adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2015; 100: 653–661.
  - 50 Jones D, Thomas D, Yin CC, et al. Kinase domain point mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia emerge after therapy with BCR-ABL kinase inhibitors. *Cancer* 2008; 113: 985–94.
  - 51 de Labarthe A, Rousselot P, Huguet-Rigal F, et al. Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with de novo Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. *Blood* 2007; 109: 1408–13.
  - 52 Ravandi F, O'Brien SM, Cortes JE, et al. Long-term follow-up of a phase 2 study of chemotherapy plus dasatinib for the initial treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2015; 121: 4158–64.
  - 53 Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2013; 369: 1783–96.

- 54 Bassan, R., Rossi, G., Pogliani, E. & Al. Chemotherapy-phased Imatinib pulses improve long-term outcome of adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia: Northern Italy Leukemia Group Protocol 09/00. *J Clin Oncol* 28, 3644–3652 (2010).
- 55 Fielding, A., Rowe, G., Buck, G. & Al. UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 123, 843–850 (2014).
- 56 Vignetti, Fazi, P., Cimino, G. & Al. Imatinib plus steroids induces complete remissions and prolonged survival in elderly Philadelphia chromosome-positive patients with acute lymphoblastic leukemia without additional chemotherapy: results of the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell’Adu. *Blood* 109, 3368–3376 (2007).
- 57 Chiaretti, S., Vitale, A., Vignetti, M. & Al. A sequential approach with imatinib, chemotherapy and transplant for adult Ph+ acute lymphoblastic leukemia. Final results of the GIMEMA LAL 0904 study. *Haematologica* 101, 1552–1554 (2016).
- 58 Chiaretti, S. & Foà, R. Management of adult Ph-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Progr.* 406–413 (2015).
- 59 Ribera, J., Garcia, O., Fernandez Abella, P. & Al. Lack of negative impact of Philadelphia chromosome in older patients with acute lymphoblastic leukaemia in the tyrosine kinase inhibitor era: comparison of two prospective parallel protocols. 159, 480–495 (2012).
- 60 Jabbour, E., Kantarjian, H., Ravandi, F. & Al. Combination of hyper-CVAD with ponatinib as first-line therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: a single-centre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 16, 1547–1555 (2015).
- 61 Brissot, E., Labopin, M. & Beckers, M. Tyrosine kinase inhibitors improve long-term outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100, 392–399 (2015).

- 62 Skarby TV, Anderson H, Heldrup J, Kanerva JA, Seidel H, Schmiegelow K. High leucovorin doses during high-dose methotrexate treatment may reduce the cure rate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 1955–62.
- 63 Childhood ALL Collaborative Group. Duration and intensity of maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukaemia: overview of 42 trials involving 12 000 randomised children. *Lancet* 1996; 347: 1783–88.
- 64 Richards S, Pui CH, Gayon P. Systematic review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60: 185–95.
- 65 Pui C-H, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol* 2008; 9: 257–68.
- 66 Vora A, Andreano A, Pui CH, et al. Influence of cranial radiotherapy on outcome in children with acute lymphoblastic leukemia treated with contemporary therapy. *J Clin Oncol* 2016;34: 919–26.
- 67 Malard F, Chevallier P, Guillaume T, et al. Continuous reduced non relapse mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-institution's three decade experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20: 1217–23.
- 68 Giebel S, Marks DI, Boissel N, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first remission: a position statement of the European Working Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (EWALL) and the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 2019; 54: 798–809.
- 69 Dhedin, N., Huynh, A., Maury, S. & Al. Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **125**, 2486–2496 (2015).

- 70 Bar, M., Wood, B., Radich, J. & Al. Impact of minimal residual disease, detected by flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res Treat*. Epub, (2014).
- 71 Leung W, Pui CH, Coustan-Smith E, et al. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. *Blood* 2012; 120: 468–72.
- 72 Mathisen, M., Kantarjian, H., Jabbour, E. & Al. Emerging drugs for acute lymphocytic leukemia. *Expert Opin Emerg Drugs* 19, 37–50 (2014).
- 73 Portell, C. & Advani, A. Novel targeted therapies in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 55, 737–748 (2014).
- 74 Kochuparambil, S. & Litzow, R. Novel Antibody Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 9, 165–173 (2014).
- 75 Ai, J. & Advani, A. Current status of antibody therapy in ALL. *Br J Haematol*. 168, 471–480 (2015).
- 76 Gibson, A., Trabal, A., McCall, D., Khazal, S., Toepfer, L., Bell, D. H., Roth, M., Mahadeo, K. M., Nunez, C., Short, N. J., Dinardo, C., Konopleva, M., Issa, G. C., Ravandi, F., Jain, N., Borthakur, G., Kantarjian, H. M., Jabbour, E., & Cuglievan, B. (2021). Venetoclax for Children and Adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma. *Cancers*, 14(1).
- 77 Richard-Carpentier, G., Jabbour, E., Short, N. J., Rausch, C. R., Savoy, J. M., Bose, P., Yilmaz, M., Jain, N., Borthakur, G., Ohanian, M., Alvarado, Y., Rytting, M., Kebriaei, P., Konopleva, M., Kantarjian, H., & Ravandi, F. (2020). Clinical Experience With Venetoclax Combined With Chemotherapy for Relapsed or Refractory T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 20(4), 212–218.
- 78 Maury, S., Chevret, S., Thomas, X. & Al. Rituximab in B-Lineage adult acute lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 375, 1044–1053 (2016).

- 79 Thomas DA, O'Brien S, Faderl S, et al. Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo Philadelphia chromosome-negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2010;28: 3880–89.
- 80 Maiti A, Kantarjian HM, Ravandi F, et al. Hyper-CVAD plus ofatumumab as frontline therapy in CD20+ acute lymphoblastic leukemia: updated results of a phase II trial. *Blood* 2017; 130: 3876.
- 81 Topp, M., Kufer, P., Gokbuget, N. & Al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol.* 29, 2493–2498 (2011).
- 82 von Stanlkenberg, A., Locatelli, F., Zugmaier, G. & Al. Phase I/Phase II Study of Blinatumomab in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO Epub*, (2016).
- 83 Topp, M., Gokbuget, N., Stein, A. & Al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* **16**, 57–66 (2015).
- 84 Kantarjian, H., Stein, A., Gokbuget, N. & Al. Blinatumomab vs. chemotherapy in advanced acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **376**, 836–847 (2017).
- 85 Foà, R., Bassan, R., Vitale, A., Elia, L., Piciocchi, A., Puzzolo, M.-C., Canichella, M., Viero, P., Ferrara, F., Lunghi, M., Fabbiano, F., Bonifacio, M., Fracchiolla, N., Di Bartolomeo, P., Mancino, A., De Propriis, M.-S., Vignetti, M., Guarini, A., Rambaldi, A., & Chiaretti, S. (2020). Dasatinib-Blinatumomab for Ph-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *The New England Journal of Medicine*, 383(17), 1613–1623.
- 86 Kantarjian, H., DeAngelo, D., Stelljes, M. & Al. Inotuzumab ozogamicin versus standard therapy for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 375, 68 740–753 (2016).
- 87 Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia

- 88 Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-term follow-up of CD1 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018; 378: 449–59.
- 89 Le RQ, Li L, Yuan W, et al. FDA approval summary: tocilizumab for treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced severe or life-threatening cytokine release syndrome. *Oncologist* 2018; 23: 943–47.
- 90 Karschnia P, Jordan JT, Forst DA, et al. Clinical presentation management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T cells. *Blood* 2019; 133: 2212–21.
- 91 Schrappe M, Hunger SP, Pui CH, Saha V, Gaynon PS, Baruchel A, Conter V, Otten J, Ohara A, Versluys AB, Escherich G, Heyman M, Silverman LB, Horibe K, Mann G, Camitta BM, Harbott J, Riehm H, Richards S, Devidas M, Zimmermann M. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Apr 12;366(15):1371-81.
- 92 Haïat S, Marjanovic Z, Lapusan S, Vekhoff A, Rio B, Corre E, Dimicoli S, Hirsch P, Marie JP, Legrand O. Outcome of 40 adults aged from 18 to 55 years with acute lymphoblastic leukemia treated with double-delayed intensification pediatric protocol. *Leuk Res*. 2011 Jan;35(1):66-72.
- 93 Huguet F, Leguay T, Raffoux E, Thomas X, Beldjord K, Delabesse E, Chevallier P, Buzyn A, Delannoy A, Chalandon Y, Vernant JP, Lafage-Pochitaloff M, Chassevent A, Lhéritier V, Macintyre E, Béné MC, Ifrah N, Dombret H. Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-2003 study. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 20;27(6):911-8.
- 94 Xu H, Cheng C, Devidas M, Pei D, Fan Y, Yang W, Neale G, Scheet P, Burchard EG, Torgerson DG, Eng C, Dean M, Antillon F, Winick NJ, Martin PL, Willman CL, Camitta BM, Reaman GH, Carroll WL, Loh M, Evans WE, Pui CH, Hunger SP, Relling MV, Yang JJ. ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 1;30(7):751-7.
- 95 Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, Vance GH, Cherry AM, Higgins RR, Fielding AK, Feroni L, Paietta E, Tallman MS, Litzow MR, Wiernik PH, Rowe JM, Goldstone AH, Dewald GW; Adult Leukaemia Working Party, Medical Research Council/National Cancer Research Institute. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated

- on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3189-97.
- 96 Burmeister T, Gökbuget N, Schwartz S, Fischer L, Hubert D, Sindram A, Hoelzer D, Thiel E. Clinical features and prognostic implications of TCF3-PBX1 and ETV6-RUNX1 in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010 Feb;95(2):241-6.
- 97 Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, Wu G, Chen X, Edmonson M, Buetow KH, Carroll WL, Chen IM, Devidas M, Gerhard DS, Loh ML, Reaman GH, Relling MV, Camitta BM, Bowman WP, Smith MA, Willman CL, Downing JR, Hunger SP. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3080-7.
- 98 Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood*. 2017 Mar 2;129(9):1113-1123.
- 99 Gianfelici V, Chiaretti S, Demeyer S, Di Giacomo F, Messina M, La Starza R, Peragine N, Paoloni F, Geerdens E, Pierini V, Elia L, Mancini M, De Propriis MS, Apicella V, Gaidano G, Testi AM, Vitale A, Vignetti M, Mecucci C, Guarini A, Cools J, Foà R. RNA sequencing unravels the genetics of refractory/relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. Prognostic and therapeutic implications. *Haematologica*. 2016 Aug;101(8):941-50.
- 100 Breit S, Stanulla M, Flohr T, Schrappe M, Ludwig WD, Tolle G, Happich M, Muckenthaler MU, Kulozik AE. Activating mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1151-7.
- 101 Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y, Dahlberg S, Neuberg D, Moreau LA, Winter SS, Larson R, Zhang J, Protopopov A, Chin L, Pandolfi PP, Silverman LB, Hunger SP, Sallan SE, Look AT. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):647-50.
- 102 Kruse, A., Abdel-Azim, N., Kim, H. N., Ruan, Y., Phan, V., Ogana, H., Wang, W., Lee, R., Gang, E. J., Khazal, S., & Kim, Y. M. (2020). Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3).

- 103 Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, Benetello A, Buldini B, Maglia O, Masera G, Conter V, Arico M, Biondi A, Gaipa G. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol.* 2009 Nov 1;27(31):5168-74.
- 104 Theunissen, P.; Mejstrikova, E.; Sedek, L.; van der Sluijs-Gelling, A.J.; Gaipa, G.; Bartels, M.; Sobral da Costa, E.; Kotrova, M.; Novakova, M.; Sonneveld, E.; et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017, 129, 347–357.
- 105 Campana, D.; Coustan-Smith, E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999, 38, 139–152.
- 106 Campana, D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. 2010 Am. Soc. Hematol. Educ. Program Book* 2010, 2010, 7–12.
- 107 Szczepanski, T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 2007, 21, 622–626.
- 108 van der Velden, V.H.; Hochhaus, A.; Cazzaniga, G.; Szczepanski, T.; Gabert, J.; van Dongen, J.J. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003, 17, 1013–1034.
- 109 Nunes, V.; Cazzaniga, G.; Biondi, A. An update on PCR use for minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2017, 17, 953–963.
- 110 van der Velden, V.H.; Cazzaniga, G.; Schrauder, A.; Hancock, J.; Bader, P.; Panzer-Grumayer, E.R.; Flohr, T.; Sutton, R.; Cave, H.; Madsen, H.O.; et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: Guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007, 21, 604–611.
- 111 Pfeifer, H.; Cazzaniga, G.; van der Velden, V.H.J.; Cayuela, J.M.; Schafer, B.; Spinelli, O.; Akiki, S.; Avigad, S.; Bendit, I.; Borg, K.; et al. Standardisation and consensus guidelines for minimal residual disease assessment in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL) by real-time quantitative reverse transcriptase PCR of e1a2 BCR-ABL1. *Leukemia* 2019, 33, 1910–1922.



- 112 Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2318-57.
- 113 Della Starza, I.; De Novi, L.A.; Santoro, A.; Salemi, D.; Tam, W.; Cavalli, M.; Menale, L.; Soscia, R.; Apicella, V.; Ilari, C.; et al. Digital droplet PCR and next-generation sequencing refine minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2019, 60, 2838–2840.
- 114 Cocco, N.; Anelli, L.; Zagaria, A.; Casieri, P.; Tota, G.; Orsini, P.; Impera, L.; Minervini, A.; Minervini, C.F.; Cumbo, C.; et al. Droplet Digital PCR Is a Robust Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Adult Philadelphia-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Mol. Diagn.* 2018, 20, 474–482.
- 115 Behjati S, Tarpey PS What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice* 2013;98:236-238.
- 116 Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2399-402.
- 117 van Dongen, J.J.; Seriu, T.; Panzer-Grumayer, E.R.; Biondi, A.; Pongers-Willemsse, M.J.; Corral, L.; Stolz, F.; Schrappe, M.; Masera, G.; Kamps, W.A.; et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998, 352, 1731–1738.
- 118 Stow, P.; Key, L.; Chen, X.; Pan, Q.; Neale, G.A.; Coustan-Smith, E.; Mullighan, C.G.; Zhou, Y.; Pui, C.H.; Campana, D. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010, 115, 4657–4663.
- 119 Brüggemann M, Kotrova M. Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Blood Adv.* 2017 Nov 28;1(25):2456-2466.

- 120 Vora, A.; Goulden, N.; Wade, R.; Mitchell, C.; Hancock, J.; Hough, R.; Rowntree, C.; Richards, S. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): A randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013, 14, 199–209.
- 121 Pieters, R.; de Groot-Kruseman, H.; Van der Velden, V.; Fiocco, M.; van den Berg, H.; de Bont, E.; Egeler, R.M.; Hoogerbrugge, P.; Kaspers, G.; Van der Schoot, E.; et al. Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 2016, 34, 2591–2601.
- 122 Campana, D.; Leung, W. Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 2013, 162, 147–161.
- 123 Giebel, S.; Stella-Holowiecka, B.; Krawczyk-Kulis, M.; Gokbuget, N.; Hoelzer, D.; Doubek, M.; Mayer, J.; Piatkowska-Jakubas, B.; Skotnicki, A.B.; Dombret, H.; et al. Status of minimal residual disease determines outcome of autologous hematopoietic SCT in adult ALL. *Bone Marrow Transplant.* 2010, 45, 1095–1101.
- 124 Bader, P.; Kreyenberg, H.; Henze, G.H.; Eckert, C.; Reising, M.; Willasch, A.; Barth, A.; Borkhardt, A.; Peters, C.; Handgretinger, R.; et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2009, 27, 377–384.
- 125 van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Feroni L, Zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJ; European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia.* 2007 Apr;21(4):604-11.
- 126 Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(6), e577.

- 127 Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2010; 150: 389–405.
- 128 Shuster JJ, Wacker P, Pullen J, Humbert J, Land VJ, Mahoney DH Jr, Lauer S, Look AT, Borowitz MJ, Carroll AJ, Camitta B. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 1998 Aug;16(8):2854-63.
- 129 Chessells JM, Richards SM, Bailey CC, Lilleyman JS, Eden OB. Gender and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: report from the MRC UKALL trials. *Br J Haematol*. 1995 Feb;89(2):364-72.
- 130 Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, Tallman MS, Buck G, Fielding AK, Burnett AK, Chopra R, Wiernik PH, Foroni L, Paietta E, Litzow MR, Marks DI, Durrant J, McMillan A, Franklin IM, Luger S, Ciobanu N, Rowe JM. International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):1827-33.
- 131 Lazarus HM, Richards SM, Chopra R, Litzow MR, Burnett AK, Wiernik PH, Franklin IM, Tallman MS, Cook L, Buck G, Durrant IJ, Rowe JM, Goldstone AH; Medical Research Council (MRC)/National Cancer Research Institute (NCRI) Adult Leukaemia Working Party of the United Kingdom and the Eastern Cooperative Oncology Group. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*. 2006 Jul 15;108(2):465-72.
- 132 Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Heerema NA, Rubnitz JE, Loh ML, Raetz EA, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Gaynon PS, Camitta BM. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):926-35.
- 133 Sramkova L, Muzikova K, Fronkova E, Krejci O, Sedlacek P, Formankova R, Mejstrikova E, Stary J, Trka J. Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2007 Jan;48(1):93-100.