



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

**Corso di Dottorato in Scienze Pediatriche
Curriculum Specialità Pediatriche (XXXVIII ciclo)**

Tesi di Dottorato
Dipartimento di Emato-Oncologia-Trapianto

***“Leucemia Mieloide Acuta in età Pediatrica: evoluzione
del trattamento ed esperienza presso l'Istituto Giannina
Gaslini.”***

Relatore

Dott.ssa Concetta Micalizzi

Candidato

Dott.ssa Sara Pestarino

Direttore Corso Dottorato

Prof. Pasquale Striano

INDICE

INDICE	2
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	4
INDICE FIGURE.....	8
INDICE TABELLE	10
ABSTRACT	11
Introduzione e scopo dello studio.....	11
Casistica e metodi.....	11
Risultati	11
Conclusioni.....	12
INTRODUZIONE	13
Epidemiologia delle leucemie in età pediatrica.....	13
Classificazione e patogenesi della Leucemia Mieloide Acuta pediatrica.....	14
Quadro clinico	19
DIAGNOSI.....	20
1. Approccio diagnostico.....	20
a. Esami ematochimici.....	20
b. Analisi midollo osseo: valutazione dell'infiltrazione blastica.....	21
c. Analisi liquido cerebrospinale	21
d. Esami strumentali	21
2. Diagnosi Morfologica.....	22
3. Diagnosi Immunofenotipica	24
4. Diagnosi Citogenetica e Molecolare	26
CARATTERISTICHE GENETICHE DELLE LAM PEDIATRICHE E STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO	27
Anomalie Citogenetiche	28
Mutazioni somatiche	29
Stratificazione del rischio	31
LAM PEDIATRICHE PECULIARI.....	33
LEUCEMIA ACUTA PROMIELOCITICA	33
NEOPLASIE MIELOIDI POST TERAPIE CITOTOSSICHE.....	34
NEOPLASIE MIELOIDI ASSOCIATE A GERMLINE PREDISPOSITION.....	35
LA TERAPIA DELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA DEL BAMBINO.....	37
Premesse.....	37
La storia.....	39
Lo sviluppo dei protocolli AIEOP LAM.....	42
Prima del 1982.....	42
Studio AIEOP LAM 82	43

Studio AIEOP LAM 87	44
Studio AIEOP LAM 87M.....	45
Studio AIEOP LAM 92	46
Studio AIEOP LAM 2002	49
Studio AIEOP LAM 2013/01	54
Studio AIEOP-BFM AML 2020, il presente.....	60
Il Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche, a che punto siamo	63
Recidive di malattia.....	69
Nuove terapie	69
Leucemia Acuta Promielocitica	72
LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA: LA STORIA DEI PAZIENTI TRATTATI PRESSO L'ISTITUTO GIANNINA GASLINI	74
Materiali e Metodi	74
1. Serie casistica ed eleggibilità.....	74
2. Disegno dello studio	75
3. Obiettivi dello studio e definizioni	76
4. Analisi statistica.....	77
Risultati	78
1. Descrizione della serie casistica	78
2. Analisi delle curve di sopravvivenza.....	103
3. Ruolo del Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche.....	120
Discussione, osservazioni conclusive.....	128
BIBLIOGRAFIA.....	139

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

ADC	Coniugati Anticorpo-Farmaco
AE	Citarabina/Etoposide
AIEOP	Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica
Allo-TCSE	TCSE Allogénico
AMKL	Leucemia Mieloide Acuta Megacarioblastica
ANAE	Alfa Naftil-Acetato
AR	Rapporto Allelico
Ara-C	Citarabina
ASH	American Society of Hematology
ATO	Triossido di Arsenico
ATRA	Acido All-Trans-Retinoico
Auto-TCSE	TCSE Autologo
AVE	Citarabina/Etoposide
BCNU	Carmustina
BFM	Berlin, Frankfurt, Münster
BiTE	Anticorpi Bispecifici
BM/MO	Midollo Osseo
Bu/Bus	Busulfano
Bzip	Basic Leucina Zipper
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CASIGG	Casistica Istituto Giannina Gaslini
CB	Cord Blood
CBF	Core Binding Factor
CBU	Cord Blood Unrelated
CCG	Childhood Cancer Group
CEBPA	CCAAT/Enhancer Binding Protein-Alfa
CFM	Citometria a Flusso
CI	Incidenza Cumulativa
CID	Coagulazione Intravascolare Disseminata
CLARA	Clofarabina/Citarabina
cMDS-IB	Childhood MDS with Increased Blasts
cMDS-LB	Childhood MDS with Low Blasts
CML	Leucemia Mieloide Cronica
COG	Children's Oncology Group
CT	Chemioterapia
Cy	Ciclofosfamide
DA	Daunoblastina/Citarabina
DART	Dual-Affinity Re-Targeting Agent

DAT	Daunoblastina/Citarabina/Thioguanina
DCOG	Dutch Childhood Oncology Group
DFCI	Dana Faber Cancer Institute
DFI	Intervallo Libero da Malattia
DfN	Difference from Normal
DFS	Desease Free Survival
DNR	Daunoblastina
DS	Sindrome di Down
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
ECG	Elettrocardiogramma
ED	Early Death
EFS	Event Free Survival
ELN	European Leukemia Net
EORTC	European Organization of Research and Treatment of Cancer
FA	Anemia di Fanconi
FAB	French-American-British
FISH	Ibridazione Fluorescente in Situ
FLAMSA	Fludarabina/Amsacrina/Citarabina
FLAMy	Citarabina/Fludarabina/Myocet
Flow-MRD/CFM-MRD	Malattia Residua Minima Citofluorimetrica
Fluda	Fludarabina
GB	Globuli Bianchi
GITMO	Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo
GO	Gemtuzumab-Ozagamicin
GvHD	Graft versus Host Disease
HAM	Mitoxantrone/Citarabina ad alte dosi
haM	Citarabina/Mitoxantrone
HD-ARA C	Citarabina ad alte dosi
HMA	Agenti Ipometilanti
HR	Alto Rischio
I-BFM	International BFM
IC	Intervallo di confidenza
ICC	International Consensus Classification
ICE	Idarubicina/Citarabina/Etoposide
Ida	Idarubicina
IGG	Istituto Giannina Gaslini
IR/MR	Medio Rischio
ITD	Duplicazione Tandem Interna
JMD	Dominio Juxtamembrana

JMML	Leucemia Mielomonocitica Giovanile
LAIP	Leukemia associated Immunophenotype
LAM/AML	Leucemia Mieloide Acuta
LAM-pCT	LAM post terapie citotossiche
LAP/APL	Leucemia Acuta Promielocitica
LCH	Istiocitosi a Cellule di Langerhans
LFS	Leukemia Free Survival
LHD	Linfoma di Hodgkin
LLA	Leucemia Linfoblastica Acuta
LNHD	Linfoma Non-Hodgkin
MAC	Regime di Condizionamento Mieloablato
M-AMSA	Amsacrina
MDS	Neoplasie Mielodisplastiche
MDS-IB1/2	MDS with Increased Blasts 1/2
MDS/MPN	Neoplasie Mielodisplastiche/Mieloproliferative
Mel	Melphalan
ML-DS	LAM del bambino con Sindrome di Down
MMRD	Misurable Residual Disease Molecolare
MMUD	Mismatched Unrelated Donor
MN-pCT	Neoplasie Mieloidi post Terapie Citotossiche
MO	Microscopio Ottico
MPAL	Leucemia Acuta a Fenotipo Misto
MPN	Neoplasie Mieloproliferative
MPO	Mieloperossidasi
MR	Myelodysplasia-related
MRC	Medical Research Council
mRC	Remissione Completa Morfologica
MRD	Misurable or Minimal Residual Disease
MSD	Matched Sibling Donor
MUD	Matched Unrelated Donor
NB	Neuroblastoma
NEC	Cellule Non Eritroidi
NGS	Next Generation Sequencing
Non-DS AMKL	Leucemia Megacarioblastica in non Sindrmo di Down
NOPHO	Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology
NOS	Not otherwise specified
NRM	Non Relapse Mortality
OS	Overall Survival
PBSC	Cellule Staminali Periferiche

PCR	Reazione Polimerasi a Catena
PDWP	Pediatric Diseases Working Party
PL	Puntura Lombare
POG	Pediatric Oncology Group
PT-Cy	Ciclofosfamide post Trapianto
RC	Remissione completa
RC2	Seconda Remissione completa
RCC	Citopenia Refrattaria dell'Infanzia
RI	Incidenza di Recidiva
RIC	Regime di Condizionamento a Ridotta Intensità
RM	Risonanza Magnetica
RNA/DNA seq	Sequenziamento RNA/DNA
RR	Rischio di Recidiva
RT-PCR	Reazione a catena della Polimerasi con Trascrittasi Inversa
SJCRH	St. Jude Children's Research Hospital
sMEC	Mitoxantrone/Etoposide
SNC	Sistema nervoso centrale
SP	Sangue Periferico
SR	Rischio Standard
TAC	Tomografia Computerizzata Assiale
TAM	Transient Abnormal Myelopoiesis
TBI	Total Body Irradiation
TCSE	Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche
TdT	Deossiribonucleotidil-transferasi terminale
TG	Thioguanina
TKD	Dominio Tirocin-Kinasico
Treo	Treosulfano
TRM	Transplant-Related Mortality
TT	Thiotepa
UD	Unrelated Donor
VAF	Variant Allele Frequency
VAPA	Vincristina/Adriablastina/Prednisone/Ara-C
VP-16	Etoposide
WHO	World Health Organization

INDICE FIGURE

Figura 1: Leucemie in età pediatrica, tasso di incidenza annuale per età e sesso.	13
Figura 2: LAM, Tasso di incidenza annuale per età e sesso.	14
Figura 3: Confronto classificazione 5° WHO e ICC 2022..	19
Figura 4: LAM Infant diagnosticata presso IGG.	20
Figura 5: Approccio integrato per la diagnosi di LAM.	22
Figura 6: LAM Morfologia. Classificazione FAB.....	23
Figura 7: Approccio raccomandato per la diagnosi genetica delle LAM pediatriche.	27
Figura 8: ML-DS 2018 studio internazionale non-randomizzato	37
Figura 9: Incidenza Cumulativa (CI) di relapse o "induction failure" in base alla MRD dopo il primo ciclo di Induzione.	38
Figura 10: Incidenza Cumulativa (CI) di relapse o "induction failure" in base alla MRD dopo il secondo ciclo di induzione.	39
Figura 11: Protocollo VAPA, EFS a 5 anni.....	43
Figura 12: Confronto della DFS a 5 anni dei pazienti sottoposti a TCSE autologo, allogenico o chemioterapia post-remissione.	48
Figura 13: Outline dei protocolli AIEOP LAM 82, 87, 87M e 92.....	48
Figura 14: Overall Survival ed Event Free Survival protocolli AIEOP LAM 82-92.	49
Figura 15: Outline protocollo AIEOP LAM 2002/01.....	50
Figura 16: Protocollo LAM 2002/01 OS e EFS a 8 anni dell'intera coorte dei pazienti.	52
Figura 17: Protocollo LAM 2002/01 OS, EFS, DFS e CI di relapse a 8 anni dei pazienti SR e HR.	52
Figura 18: Outline protocollo AIEOP LAM 2013/01.....	57
Figura 19: Outcome globali dei pazienti trattati secondo protocollo AIEOP LAM 2013/01.	59
Figura 20: Outline protocollo AIEOP-BFM LAM 2020.	61
Figura 21: Incidenza cumulativa di relapse in pazienti con inv16(CBF::MYH11) sulla base del logaritmo di riduzione della MRD dopo il primo e il secondo ciclo di Induzione.	63
Figura 22: Curve per EFS e OS a 3 anni per MSD-TCSE e MUD-TCSE.....	65
Figura 23: LFS, OS, RI, e NRM a 2 anni da donatore MUD o aploidentico.....	66
Figura 24: NRM e incidenza cumulativa di recidiva in base al regime di condizionamento.	68
Figura 25: DSF e OS in base al regime di condizionamento.	68
Figura 26: Terapie target disponibili o in fase di studio nelle LAM	72
Figura 27: Protocollo ICC-APL 02.	73
Figura 28: Descrizione dei pazienti secondo la morfologia.....	80
Figura 29: Diagnosi pregresse dei pazienti della nostra serie casistica.	81
Figura 30: Suddivisione per caratterizzazione citogenetica e molecolare in base ICC 2022/WHO 2022 in numero assoluto.....	83
Figura 31: Distribuzione percentuale della caratterizzazione citogenetica e molecolare in base ICC2022/WHO 2022 della serie casistica in studio.	83
Figura 32: Suddivisione dei pazienti LAM in base ai protocolli di trattamento.	91
Figura 33: Suddivisione dei pazienti LAM infant in base ai protocolli di trattamento di prima linea personalizzata.	92
Figura 34: OS di tutti i pazienti con LAM-pCT vs la casistica di tutti i pazienti LAM dello studio.	94
Figura 35: OS di tutti i pazienti con LAM-pCT vs la casistica di tutti i pazienti LAM dello studio.	97
Figura 36: Suddivisione dei pazienti LAP in base ai protocolli di trattamento.	98
Figura 37: Suddivisione dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico secondo il tipo di donatore	100
Figura 38: Percentuale di pazienti sottoposti a trapianto negli anni '85-'99 e 2000-2025, suddivisi per tipo di TCSE autologo o allogenico.....	101
Figura 39: Suddivisione di tutti i pazienti trapiantati secondo il regime di condizionamento.	102
Figura 40: Percentuale di eventi post TCSE della serie casistica in studio suddivisa per anno del trapianto, < o ≥ 2000.	103
Figura 41: OS per pazienti in studio suddivisa per LAM e LAP.....	104
Figura 42: Sopravvivenza libera da evento EFS per pazienti in studio suddivisi per LAM e LAP.....	105
Figura 43: OS in base a caratteristiche citogenetiche e molecolari all'esordio.	106
Figura 44: EFS in base a caratteristiche citogenetiche e molecolari all'esordio.....	107
Figura 45: OS dei pazienti con LAP suddivisi in base ai protocolli di trattamento.	108
Figura 46: EFS dei pazienti LAP suddivisi in base ai protocolli di trattamento.....	109

Figura 47: OS dei pazienti con LAP suddivisi in base a fascia di rischio.	109
Figura 48: OS dei pazienti LAM suddivisi in base ai protocolli di trattamento.	111
Figura 49: EFS dei pazienti LAM suddivisi in base ai protocolli di trattamento.	112
Figura 50: OS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 92 in base a classe di rischio.	113
Figura 51: EFS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 92 in base a classe di rischio. .	114
Figura 52: OS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2002/01 in base a classe di rischio.	114
Figura 53: EFS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2002/01 in base a classe di rischio.	115
Figura 54: OS pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2013/01 in base a classe di rischio.	116
Figura 55: EFS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2013/01 in base a classe di rischio.	117
Figura 56: OS dei pazienti Infant	117
Figura 57: EFS globale dei pazienti Infant	118
Figura 58: OS dei pazienti con diagnosi di LAM-pCT.	118
Figura 59: EFS dei pazienti con diagnosi di LAM-pCT.....	119
Figura 60: OS dei pazienti con LAM in Sindrome di Down.	119
Figura 61: Sopravvivenza globale per pazienti trapiantati in RC1 nei due gruppi LAP e LAM.	121
Figura 62: Sopravvivenza globale per TCSE autologo versus allogenico dei pazienti trapiantati in RC1.	122
Figura 63: Sopravvivenza globale per tipo di donore nei TCSE allogenici dei pazienti trapiantati in RC1.	123
Figura 64: Sopravvivenza globale dei pazienti trapiantati in RC1 suddivisi per regime di condizionamento.	124
Figura 65: Sopravvivenza globale dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico con regime di condizionamento Bus-BASED, Bus/Cy/Mel versus Bus/Fluda/Mel.....	125
Figura 66: Sopravvivenza globale nei pazienti trapiantati in RC1 per “epoca di trapianto” (< 2000; ≥ 2000).....	126
Figura 67: Sopravvivenza globale dal trapianto nei pazienti trapiantati in RC1 versus RC2.	126
Figura 68: EFS e OS dei pazienti della nostra serie casistica arruolati al protocollo LAM 2013 suddivisi per fascia di rischio e confrontati con le curve pubblicate di EFS e OS del protocollo.....	132
Figura 69: Sopravvivenza suddivisa nelle epoche successive di diagnosi dei pazienti arruolati nei protocolli AIEOP LAM del nostro centro e del St. Jude Children's Research Hospital.	137
Figura 70: Incremento OS in pazienti pediatriche LAM sottoposti a TCSE in CR1. Confronto tra trials BFM e nostra serie casistica dal 1983 ai giorni nostri.	138

INDICE TABELLE

Tabella 1: 5 ^a edizione WHO 2022. Classificazione in base anomalie genetiche ricorrenti.	16
Tabella 2: 5 ^a edizione WHO 2022. Sottotipi LAM definiti dalla differenziazione.	16
Tabella 3: 5 ^a edizione WHO 2022. Anomalie citogenetiche e molecolari delle LAM-MR.	17
Tabella 4: Classificazione ICC 2022 con percentuale di blasti richiesti per la diagnosi.	18
Tabella 5: Classificazione FAB e caratterizzazione citochimica.	24
Tabella 6: Lista dei marcatori di superficie e citoplasmatici per la diagnosi di LAM secondo ELN 2022..	25
Tabella 7: Distribuzione età-correlata delle principali alterazioni geniche in LAM.	27
Tabella 8: Stratificazione del rischio delle LAM pediatriche basato sulle alterazioni genetiche negli attuali trial clinici internazionali.	32
Tabella 9: Alterazioni genetiche rare a rischio sfavorevole presenti nelle LAM pediatriche.	32
Tabella 10: Protocolli recentemente completati per pazienti pediatrici LAP di nuova diagnosi.	33
Tabella 11: Sottotipi di LAM associati a germline predisposition WHO 2022.	36
Tabella 12: Recenti protocolli di fase 3 per il trattamento dei pazienti LAM con Sindrome di Down.	36
Tabella 13: EFS, OS e tasso di Relapse dei principali studi cooperativi internazionali per il trattamento delle LAM pediatriche, protocolli attivi ≤ 2010.	40
Tabella 14: EFS, OS dei principali studi cooperativi internazionali per il trattamento delle LAM pediatriche, protocolli attivi ≥ 2010.	41
Tabella 15: VAPA Protocol, schema di terapia di consolidamento sequenziale.	43
Tabella 16: Elementi del protocollo AIEOP LAM 82.	44
Tabella 17: Schema "Wolff" protocollo 87M.	46
Tabella 18: Ciclo ICE LAM 92.	47
Tabella 19: Chemioterapia protocollo AIEOP LAM 2002/01.	51
Tabella 20: Outcome LAM pediatriche. Trial clinici dei gruppi pediatrici internazionali prima decade anni 2000.	53
Tabella 21: Outline comparativi e risultati dei protocolli AIEOP LAM 82-2002/01.	54
Tabella 22: Criteri di stratificazione protocollo AIEOP LAM 2013/01.	56
Tabella 23: Caratteristiche dei pazienti arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2013/01.	58
Tabella 24: Stratificazione pazienti in gruppi di rischio secondo protocollo AIEOP-BFM LAM 2020.	62
Tabella 25: Outcome a 8 anni in base ai 3 diversi regimi post-remissione.	64
Tabella 26: Suddivisione dei pazienti secondo sesso ed età alla diagnosi.	79
Tabella 27: Frequenza delle anomalie citogenetiche/molecolari e significato prognostico dei pazienti del gruppo LAM con genetica disponibile	82
Tabella 28: Anomalie genetiche classificate come rare ricorrenti con relativo significato prognostico.	84
Tabella 29: Anomalie genetiche classificate come MDS-Related.	85
Tabella 30: Suddivisione dei pazienti LAM “de novo” per gruppo di rischio correlato al protocollo, ove indicato, e tasso di sopravvivenza grezzo.	91
Tabella 31: Suddivisione pazienti LAM secondo tipo di trattamento di prima linea, chemioterapia (CT) o TCSE (Allo o Auto).	93
Tabella 32: Caratteristiche dei pazienti in studio con LAM-pCT.	96
Tabella 33: Stratificazione dei pazienti LAP e tasso di sopravvivenza per protocollo.	98
Tabella 34: Eventi post TCSE della serie casistica in studio suddivisa per anno del trapianto, < o > 2000.	102
Tabella 35: OS e EFS dei pazienti della serie casistica per protocollo, per i sottotipi e per LAP anche fascia di rischio.	120
Tabella 36: OS a 5 anni relativa ai pazienti sottoposti a TCSE in RC1.	127
Tabella 37: Disposizione dei pazienti trattati secondo i protocolli LAM 82 e LAM 87 e tasso di sopravvivenza, esclusi dall’analisi i pazienti con LAP e LAM-pCT.	129

ABSTRACT

Introduzione e scopo dello studio

Il trattamento delle Leucemia Mieloide Acuta (LAM) ha subito un'evoluzione significativa negli ultimi 50 anni. Negli anni '70 il trattamento si basava su protocolli istituzionali che utilizzavano pochi farmaci, uguali a quelli usati per il trattamento della Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) a dosi non elevate. Dal 1982, con il primo protocollo AIEOP LAM, sono stati adottati protocolli condivisi di chemioterapia, nazionali prima e internazionali poi. Questo studio retrospettivo si propone di valutare la sopravvivenza a lungo termine dei pazienti affetti da LAM trattati presso il Dipartimento di Emato-Oncologia Pediatrica dell'Istituto Giannina Gaslini (IGG). L'obiettivo primario è analizzare i progressi ottenuti in termini di sopravvivenza e rischio di ricaduta con l'implementazione dei protocolli di trattamento.

Casistica e metodi

Dal 01/01/1974 al 31/12/2025 sono stati registrati nel database dell'Istituto Giannina Gaslini (CASIGG) 244 pazienti eleggibili allo studio. I criteri di inclusione sono stati: età < 18 anni, nuova diagnosi di LAM e trattamento eseguito presso l'Istituto. La serie casistica è stata suddivisa ed analizzata in modo dettagliato in 2 gruppi differenti: 31 pazienti con diagnosi di Leucemia Mieloide Acuta Promielocitica (LAP) e 213 pazienti con diagnosi di altri sottotipi di LAM. Per esaminare le curve di sopravvivenza globale (*overall survival, OS*) e libera da eventi (*event free survival, EFS*) si sono valutate le caratteristiche genetiche presenti all'esordio, il protocollo di trattamento somministrato e la categoria di rischio in base al protocollo. Inoltre si sono analizzati i pazienti sottoposti ad un primo trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE), sia in prima che in seconda linea, valutando l'impatto sulla survival del trapianto di midollo autologo versus allogenico, della fonte delle cellule staminali utilizzate e del tipo di regime di condizionamento.

Risultati

Si è valutato un incremento significativo della sopravvivenza dei pazienti. In particolare la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti LAP è aumentata dal 50% dei primi protocolli al 100% del protocollo ICC-APL 02. Per i pazienti LAM la sopravvivenza globale a 5 anni è aumentata dal 16.67% dei primi trattamenti applicati all'88.57% del protocollo LAM 2013, con simili vantaggi in termini di EFS. Per il trapianto in prima remissione (RC1),

globalmente considerato indipendentemente dal protocollo di chemioterapia utilizzato, la OS a 5 anni è pari al 50% nelle LAP e al 59.5% nelle LAM, con differenza in base all'epoca del trapianto: nel periodo < 2000 la OS a 5 anni è 50.7%, mentre ≥ 2010 è pari al 67.2% (p-value = 0.028). Inoltre risulta significativa la differenza della survival fra TCSE autologo rispetto allogenico (a 5 anni 44.1% vs 66.4% rispettivamente, p-value = 0.007), con risultati sovrapponibili tra donatore familiare identico (*matched sibling donor, MSD*) e identico non correlato (*matched unrelated donor, MUD*).

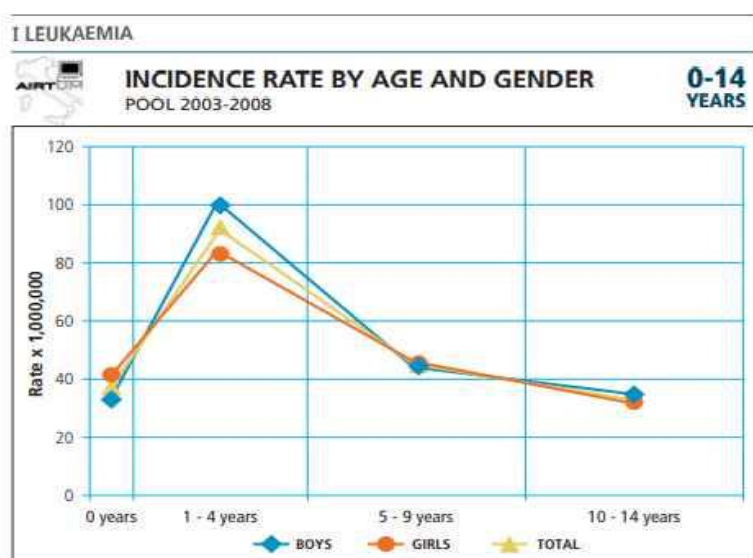
Conclusioni

Il progresso degli studi di genetica e di biologia molecolare, la stratificazione dei pazienti per Malattia Residua Minima (MRD), l'abbandono del trapianto autologo, l'indicazione al trapianto in prima remissione, unitamente all'evoluzione dei regimi di condizionamento del trapianto allogenico, e l'adozione di schemi di trattamento sempre più complessi hanno permesso negli anni il miglioramento della prognosi.

INTRODUZIONE

Epidemiologia delle leucemie in età pediatrica

Come riporta l'ultimo rapporto dell'Associazione Italiana Registro Tumori (1) del 2013, che si riferisce ai dati raccolti nel periodo 2003-2008, le leucemie sono le neoplasie maligne più frequenti dell'età pediatrica (0-14 anni), rappresentando un terzo (30%) delle neoplasie pediatriche, con il tasso d'incidenza annuale più elevato: 56 casi per milione (IC95% 51,3-61,3) nei maschi e 51,6 (IC 95% 0,74-0,84) nelle femmine. L'andamento dell'incidenza presenta un picco nella classe di età 1-4 anni (91,8 casi per milione/anno; 99,9 nei bambini e 83,2 nelle bambine) (fig.1).



Fonte: AIRTUM 2012 • Epidemiol Prev 2013; 37(1) Suppl 1

Figura 1: Leucemie in età pediatrica, tasso di incidenza annuale per età e sesso.

Il tipo più frequente è la LLA (80%), seguita dalla LAM che rappresenta il 13% del totale di tutte le leucemie e dalle neoplasie croniche mieloproliferative e mielodisplastiche (MPD/MDS) (4,5%).

Il tasso di incidenza della LAM standardizzato per età è di 6,8 casi per milione (IC95% 5,6-8,1). L'incidenza è più elevata nei maschi (7,5 casi per milione; IC95% 5,8-9,5) che nelle femmine (6,1; IC95% 4,6-8,0).

I tassi di incidenza sono particolarmente elevati sotto l'anno di età nelle bambine (17,1 casi per milione) rispetto ai maschi (4,9 casi per milione), seguiti da un andamento stabile intorno ai 5 casi per milione e da una lieve tendenza all'aumento nella classe di età 10-14 anni in tutti e due i sessi (fig.2).

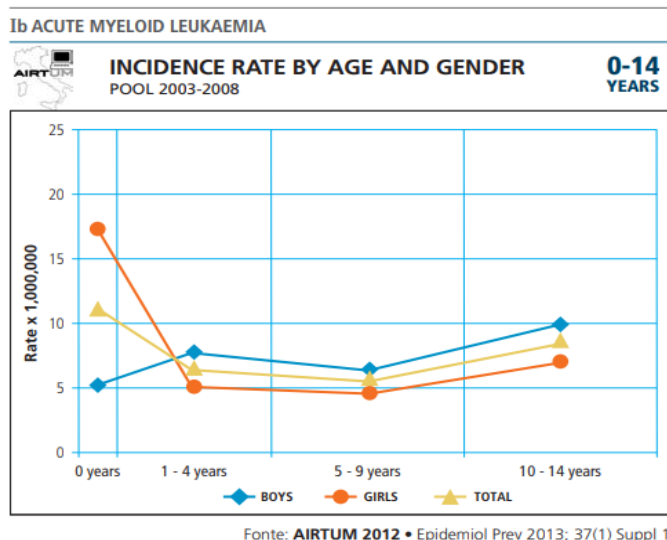


Figura 2: LAM, Tasso di incidenza annuale per età e sesso.

Classificazione e patogenesi della Leucemia Mieloide Acuta pediatrica

Nel 2022 sono state pubblicate le nuove edizioni della classificazione della Leucemia Mieloide Acuta della “World Health Organization” (WHO) (2) e dell’ “International Consensus Classification” (ICC) (3). Il gruppo internazionale “European Leukemia NET” (ELN) ha recepito i principi relativi alle nuove classificazioni e, ispirandosi principalmente alla classificazione ICC 2022, ha a sua volta formulato e pubblicato raccomandazioni per il trattamento dei pazienti con LAM (4).

La 5° edizione della classificazione WHO (2), nella sezione tumori pediatrici, distingue le seguenti forme di neoplasia mieloide:

- Neoplasie mieloproliferative (MPN)

Leucemia Mieloide Cronica (CML)

- Neoplasie Mielodisplastiche/Mieloproliferative (MDS/MPN)

Leucemia Mielomonocitica Giovanile (JMML)

- Neoplasie Mielodisplastiche (MDS) (il termine sostituisce il precedente “Sindromi Mielodisplastiche) e si riconoscono:

- Forma a bassa conta di blasti (*childhood MDS with low blasts, cMDS-LB*), se blasti <5% su Midollo Osseo (MO) e <2% su sangue periferico (SP), che sostituisce la precedente citopenia refrattaria dell’infanzia (RCC) e include 2 sottotipi: MDS pediatriche con basso conteggio di blasti e ipocellularità (*cMDS-LB Hypocellular*) e MDS pediatriche con basso conteggio di blasti non altrimenti specificate (*cMDS-LB not otherwise specified, NOS*);

- Forma con eccesso di blasti riunita in una unica categoria (*childhood MDS with increased blasts, cMDS-IB*), se blasti 5-19% su MO e 2-19% su SP).

Nei pazienti adulti vengono mantenute distinte le categorie MDS con eccesso di blasti 1 (MDS-IB1: blasti 5-9% su MO e 2-4% su SP) e con eccesso di blasti 2 (MDS-IB2: blasti 10-19% su MO e 2-19% su SP). Il cut-off della percentuale di blasti per differenziare la LAM rispetto da MDS-IB2 viene messo in discussione per i pazienti adulti (2), e i pazienti MDS-IB2 possono essere assimilati ai pazienti con LAM con bassa percentuale di blasti ai fini dell'eleggibilità ai trial clinici, mentre per le caratteristiche biologiche uniche e per l'approccio terapeutico specifico, la categoria delle MDS-IB per i pazienti con età inferiore a 18 anni viene mantenuta e distinta dalle LAM.

- **Leucemia Mieloide Acuta (LAM)**

LAM con anomalie genetiche ricorrenti

LAM definite dalla differenziazione (precedente NOS)

- **Sarcoma Mieloide** raro tumore solido delle cellule mieloidi presente in un sito extra-midollare, più comunemente strutture ossee-sottoperiostee di cranio, seni paranasali, sterno, costole, vertebre, bacino, linfonodi e cute.

- **Neoplasie Mieloidi secondarie legate a condizioni predisponenti**

Neoplasie Mieloidi post terapie citotossiche *LAM-pCT* (in precedenza *therapy-related, t-LAM*)

Neoplasie Mieloidi associate a *germline predisposition*

Neoplasie Mieloproliferative associate alla Sindrome di Down

La classificazione WHO 2022 (2) (5) mette in rilievo l'importanza delle alterazioni genetiche per la diagnosi di LAM rispetto al grado di infiltrazione blastica e definisce 2 gruppi basati sulla presenza o meno di anomalie genetiche ricorrenti (tab.1).

Acute myeloid leukaemia with defining genetic abnormalities
Acute promyelocytic leukaemia with <i>PML::RARA</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>RUNX1::RUNX1T1</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>CBFB::MYH11</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>DEK::NUP214</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>RBM15::MRTFA</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>BCR::ABL1</i> fusion
Acute myeloid leukaemia with <i>KMT2A</i> rearrangement
Acute myeloid leukaemia with <i>MECOM</i> rearrangement
Acute myeloid leukaemia with <i>NUP98</i> rearrangement
Acute myeloid leukaemia with <i>NPM1</i> mutation
Acute myeloid leukaemia with <i>CEBPA</i> mutation
Acute myeloid leukaemia, myelodysplasia-related
Acute myeloid leukaemia with other defined genetic alterations

Tabella 1: 5^a edizione WHO 2022. Classificazione in base anomalie genetiche ricorrenti (2).

In assenza di anomalie genetiche definite, i dati morfologici, citochimici, citofluorimetrici e clinico-anamnestici rimangono fondamentali per inquadrare il gruppo basato sulla differenziazione (tab.2).

Type	Diagnostic criteria*
AML with minimal differentiation	• Blasts are negative (<3%) for MPO and SBB by cytochemistry • Expression of two or more myeloid-associated antigens, such as CD13, CD33, and CD117
AML without maturation	• ≥3% blasts positive for MPO (by immunophenotyping or cytochemistry) or SBB and negative for NSE by cytochemistry • Maturing cells of the granulocytic lineage constitute <10% of the nucleated bone marrow cells • Expression of two or more myeloid-associated antigens, such as MPO, CD13, CD33, and CD117
AML with maturation	• ≥3% blasts positive for MPO (by immunophenotyping or cytochemistry) or SBB by cytochemistry • Maturing cells of the granulocytic lineage constitute ≥10% of the nucleated bone marrow cells • Monocyte lineage cells constitute < 20% of bone marrow cells • Expression of two or more myeloid-associated antigens, such as MPO, CD13, CD33, and CD117
Acute basophilic leukemia	• Blasts & immature/mature basophils with metachromasia on toluidine blue staining • Blasts are negative for cytochemical MPO, SBB, and NSE • No expression of strong CD117 equivalent (to exclude mast cell leukemia)
Acute myelomonocytic leukaemia	• ≥20% monocytes and their precursors • ≥20% maturing granulocytic cells • ≥3% of blasts positive for MPO (by immunophenotyping or cytochemistry)
Acute monocytic leukaemia	• ≥80% monocytes and/or their precursors (monoblasts and/or promonocytes) • <20% maturing granulocytic cells • Blasts and promonocytes expressing at least two monocytic markers including CD11c, CD14, CD36 and CD64, or NSE positivity on cytochemistry
Acute erythroid leukaemia	• ≥30% immature erythroid cells (proerythroblasts) • Bone marrow with erythroid predominance, usually ≥80% of cellularity
Acute megakaryoblastic leukaemia	• Blasts express at least one or more of the platelet glycoproteins: CD41 (glycoprotein IIb), CD61 (glycoprotein IIIa), or CD42b (glycoprotein Ib)^b

Tabella 2: 5^a edizione WHO 2022. Sottotipi LAM definiti dalla differenziazione. BM=bone marrow, MPO=mieloperossidasi, NSE=esterasi non specifica, PB=sangue periferico, SBB=sudan black B (2).

Inoltre le forme di LAM con *myelodysplasia-related changes* vengono ora definite *LAM myelodysplasia-related* (MR), escludendo la sola morfologia dai criteri diagnostici e la cui diagnosi si basa sulla presenza di una o più anomalie citogenetiche o molecolari definite e/o nell'ambito di una trasformazione in mieloide acuta di una precedente MDS-MDS/MPN (tab.3).

Defining cytogenetic abnormalities
Complex karyotype (≥ 3 abnormalities)
5q deletion or loss of 5q due to unbalanced translocation
Monosomy 7, 7q deletion, or loss of 7q due to unbalanced translocation
11q deletion
12p deletion or loss of 12p due to unbalanced translocation
Monosomy 13 or 13q deletion
17p deletion or loss of 17p due to unbalanced translocation
Isochromosome 17q
idic(X)(q13)
Defining somatic mutations
ASXL1
BCOR
EZH2
SF3B1
SRSF2
STAG2
U2AF1
ZRSR2

Tabella 3: 5^a edizione WHO 2022. Anomalie citogenetiche e molecolari delle LAM-MR (2).

Il cut-off del $\geq 20\%$ di blasti per porre diagnosi di LAM viene rimosso nelle forme con anomalie genetiche ricorrenti, a sottolineare il peso e la specificità di tali alterazioni per la diagnosi di leucemia acuta, ma viene mantenuto per le LAM con trascritto di fusione BCR::ABL1 (per differenziarle dalla CML in fase blastica), per le LAM con mutazione mono o biallelica di CEBPA- bZIP (in quanto in ambito WHO non sono stati rilevati sufficienti argomenti di supporto per tale cambiamento) e nelle forme LAM-MR, per differenziare in modo più netto le MDS dalle LAM ed evitare il rischio di terapie eccessive.

Infine si introduce la nuova categoria delle forme secondarie, distinta dagli altri due gruppi.

Contemporaneamente alla classificazione WHO 2022 è stata sviluppata e pubblicata da un gruppo di esperti clinici, patologi e genetisti internazionali la classificazione ICC 2022 (3) la quale presenta alcune differenze rispetto alle WHO 2022 (5) (tab.4, 5, fig.3):

- **definisce 5 sottotipi di LAM** con una *classificazione gerarchica* e per ciascuno definisce il grado di infiltrazione blastica:

=> LAM con anomalie genetiche ricorrenti per le quali è necessaria la presenza di blasti $\geq 10\%$, eccetto per le LAM con trascritto di fusione BCR::ABL1 o precedente MDS/MPN per le quali rimane il cut-off del $\geq 20\%$;

=> LAM con TP53 mutato (VAF $> 10\%$), cut-off dei blasti $\geq 20\%$;

=> LAM con mutazioni genetiche molecolari MR, cut-off dei blasti $\geq 20\%$;

=> LAM con anomalie citogenetiche MR, cut-off dei blasti $\geq 20\%$;

=> LAM NOS, non classificabili biologicamente, ma opzionalmente sottoclassificabili dal punto di vista della morfologia, per quanto con limitato significato prognostico per ICC e con cut-off dei blasti $\geq 20\%$;

Acute promyelocytic leukemia (APL) with t(15;17)(q24.1;q21.2)/ PML::RARA $\geq 10\%$
APL with other RARA rearrangements* $\geq 10\%$
AML with t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 $\geq 10\%$
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11 $\geq 10\%$
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A $\geq 10\%$
AML with other KMT2A rearrangements† $\geq 10\%$
AML with t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214 $\geq 10\%$
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2; MECOM(EVI1) $\geq 10\%$
AML with other MECOM rearrangements‡ $\geq 10\%$
AML with other rare recurring translocations (see supplemental Table 5) $\geq 10\%$
AML with t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1§ $\geq 20\%$
AML with mutated NPM1 $\geq 10\%$
AML with in-frame bZIP CEBPA mutations $\geq 10\%$
AML and MDS/AML with mutated TP53† 10-19% (MDS/AML) and $\geq 20\%$ (AML)
AML and MDS/AML with myelodysplasia-related gene mutations 10-19% (MDS/AML) and $\geq 20\%$ (AML) Defined by mutations in ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, or ZRSR2
AML with myelodysplasia-related cytogenetic abnormalities 10-19% (MDS/AML) and $\geq 20\%$ (AML) Defined by detecting a complex karyotype (≥ 3 unrelated clonal chromosomal abnormalities in the absence of other class- defining recurring genetic abnormalities), del(5q)/t(5q)/ add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) or del(17p), del(20q), and/or idic(X)(q13) clonal abnormalities
AML not otherwise specified (NOS) 10-19% (MDS/AML) and $\geq 20\%$ (AML)
Myeloid sarcoma

Tabella 4: Classificazione ICC 2022 con percentuale di blasti richiesti per la diagnosi (3).

- per tutti i sottotipi, escluso quello delle anomalie genetiche ricorrenti, viene introdotta la categoria di “overlap” MDS/AML (eliminata la precedente forma ad eccesso di blasti MDS-EB2) per infiltrazione blastica compresa tra 10-19%, che sottolinea il continuum clinico e genetico tra le due forme, distinta dalla LAM definita da blasti $\geq 20\%$;

- le LAM MR sono separate nei due gruppi sopra citati con differenze minime rispetto alle WHO 2022 per il tipo di anomalie citogenetiche e molecolari incluse;

- in ICC viene riconosciuta una nuova entità, LAM con **mutazione dell'oncogene TP53**, che condiziona chemioresistenza e prognosi avversa (6);

- infine, benché sia riconosciuta l'importanza dell'esposizione a precedenti terapie, di precedenti MDS o MDS/MPN o di mutazioni *germline* predisponente allo sviluppo di

LAM, l'orientamento della nuova classificazione è di identificare tali associazioni come *qualificanti* per la diagnosi, più che gruppi di LAM differenti.

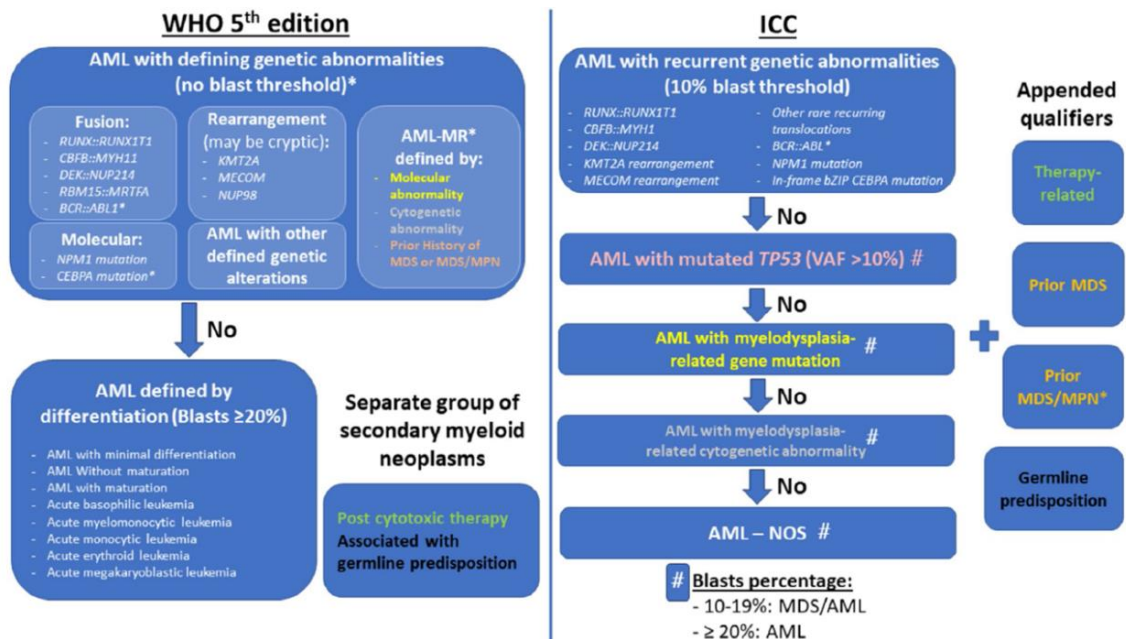


Figura 3: Confronto classificazione 5° WHO e ICC 2022. * >20% blasti per diagnosi (5).

ELN nel 2022 attraverso la sintesi dei dati classificativi WHO e ICC e dei risultati dei trial clinici ha riformulato una classificazione del rischio (4), recepita dai massimi esperti delle società scientifiche di emato-oncologia pediatrica internazionali ed adattata all'età pediatrica (7). Illustreremo questi aspetti in dettaglio nel capitolo dedicato alla stratificazione del rischio.

Quadro clinico

L'infiltrazione leucemica del midollo osseo e l'insufficienza midollare secondaria sono causa di neutropenia, anemia e piastrinopenia.

Il quadro clinico è dominato da febbre, astenia, pallore, ecchimosi, emorragie cutaneo-mucose, dolori ossei e infezioni.

Raramente, la LAM può esordire con localizzazioni extra-midollari isolate, in assenza di infiltrazione midollare; tali condizioni si definiscono Sarcomi Mieloidi o Cloromi. Le sedi più frequentemente coinvolte sono il tratto gastrointestinale, l'osso, i tessuti molli e la cute. In rari casi (< 10%), si possono osservare localizzazioni extra-midollari multiple (8). Caratteristici sono gli infiltrati sottocutanei, definiti "blueberry muffin" per la caratteristica morfologia e colorazione (fig.4), le infiltrazioni della gengiva, dell'orbita e

dello spazio epidurale. La leucemia extra-midollare è più comune nei pazienti con LAM sotto i due anni di età.



Figura 4: LAM Infant diagnosticata presso IGG: infiltrazioni sottocutanee tipo "blueberry muffin", e cariotipo caratterizzato da $t(16;21)(p11.2;q22.2)FUS::ERG$ (e subclone $NPM1$).

Più rara nelle LAM la presenza di linfadenopatie ed epatosplenomegalia, e la localizzazione testicolare, che sono più frequenti nella LLA.

Le localizzazioni a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC) possono manifestarsi con cefalea e/o segni focali, come il deficit dei nervi cranici, ma più frequentemente sono asintomatiche.

DIAGNOSI

1. Approccio diagnostico

Il percorso diagnostico è un processo dinamico che si aggiorna e si perfeziona in base alle nuove acquisizioni relative alla patologia e prevede l'attuazione di accertamenti biochimici e strumentali di seguito riportati (fig.5):

a. Esami ematochimici

All'esordio di LAM devono essere eseguiti esami basali da sangue periferico compresi di emocromo completo con striscio periferico che evidenzierà solitamente un quadro di leucocitosi, più raramente leucopenia, anemia solitamente normocromica normocitica e piastrinopenia, ionogramma completo con fosforo e magnesio, funzionalità epatica e renale (transaminasi, bilirubina, creatinina e uricemia), per monitorare le possibili disomie legate al rapido turnover dei blasti quali ipokaliemia e acidosi lattica, ma più frequentemente iperkaliemia, iperfosfatemia e ipocalcemia associate a iperuricemia fino all'insufficienza renale. Indispensabile il monitoraggio dei test della coagulazione che possono risultare alterati a causa dell'attivazione dell'endotelio e la coagulopatia da

consumo conseguente, fino ad arrivare a quadri di coagulazione intravascolare disseminata (CID), più caratteristica della LAP, ma che può presentarsi anche in associazione ad LAM. Sierologie virali estese possono essere eseguite in base allo standard care del centro e se richieste dai protocolli.

b. Analisi midollo osseo: valutazione dell'infiltrazione blastica

Per quanto la caratterizzazione dei blasti a livello del sangue periferico, se presenti, permetta un rapido inquadramento, la diagnosi definitiva di LAM si esegue mediante valutazione dell'aspirato di midollo osseo con morfologia, immunofenotipo e test genetici. Il livello del 20% di blasti necessario per la diagnosi di LAM e l'avvio della chemioterapia, introdotto con la 3^a edizione della classificazione della WWHO 2001, è di fatto un limite arbitrario ed è stato modificato nelle ultime classificazioni WHO 2022 e ICC 2022 (2) (3), come precedente esposto, con l'intento di dare maggiore importanza alle anomalie genetiche alla base della definizione di LAM. Rimane più dibattuto il cut-off per le forme MR, per le quali in futuro le decisioni terapeutiche potrebbero essere guidate esclusivamente dalle caratteristiche genetiche, piuttosto che da un limite arbitrario per il numero di blasti.

c. Analisi liquido cerebrospinale

L'eventuale infiltrazione SNC deve essere valutata all'esordio mediante l'analisi del liquido cerebrospinale ottenuto con una puntura lombare (PL), a meno che non vi sia una sintomatologia neurologica sospetta per ipertensione endocranica che richieda prima l'effettuazione di una risonanza magnetica (RM) cerebrale, unitamente ad una valutazione del fundus oculare. In alcuni contesti l'esecuzione della PL viene posticipata di circa una settimana ed eseguita dopo l'avvio della chemioterapia citoriduttiva per minimizzare il rischio di trauma per la coagulopatia/piastrinopenia e di contaminazione da sangue periferico del liquor in presenza di conta blastica elevata (9) (10).

d. Esami strumentali

Una radiografia del torace deve essere eseguita per la valutazione di masse mediastiniche, per quanto non comuni nelle LAM pediatriche. Altri esami strumentali, come ecografia, tomografia assiale computerizzata (TAC), RM, possono essere eseguiti per valutare eventuali localizzazioni extra-midollari di malattia non SNC. Infine una

valutazione cardiologica completa di elettrocardiogramma (ECG) ed ecocardiografia deve essere eseguita prima dell'inizio delle terapie potenzialmente cardiotossiche.

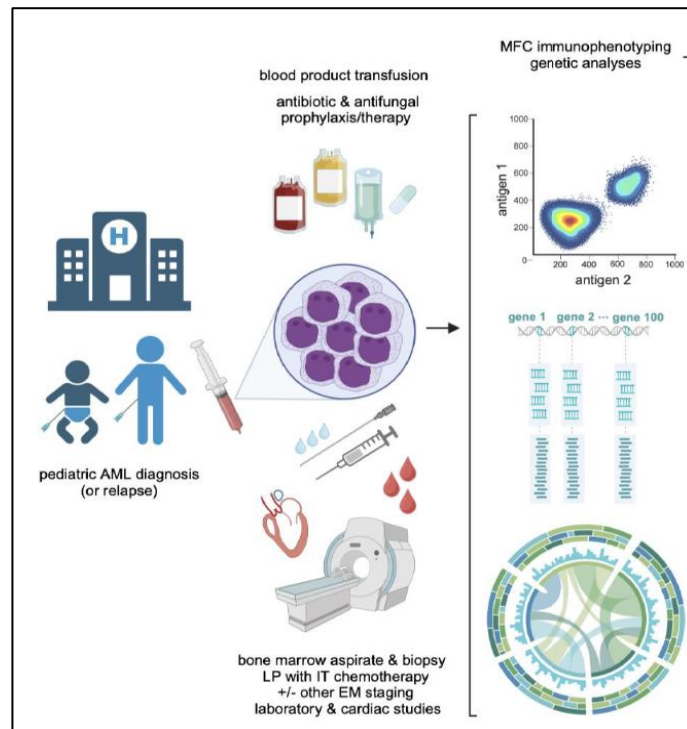


Figura 5: Approccio integrato per la diagnosi di LAM (7).

2. Diagnosi Morfologica

La classificazione FAB (French-American-British), elaborata nel 1976, distingue le cellule sulla base delle caratteristiche morfologiche linea-specifiche, mediante l'osservazione al microscopio ottico (MO) di strisci di sangue periferico e midollo osseo con colorazione May-Grunwald-Giemsa o Wright (11). I sottotipi identificati sono M0, M1, M2, M3, M3v, M4, M4eo, M5a, M5b, M6, M7 e si differenziano per la percentuale di cellule indifferenziate, granulate o atipiche, per la presenza di anomale strutture intracellulari (es. corpi di Auer) e per la presenza di mielodisplasia (fig.6, tab.5).

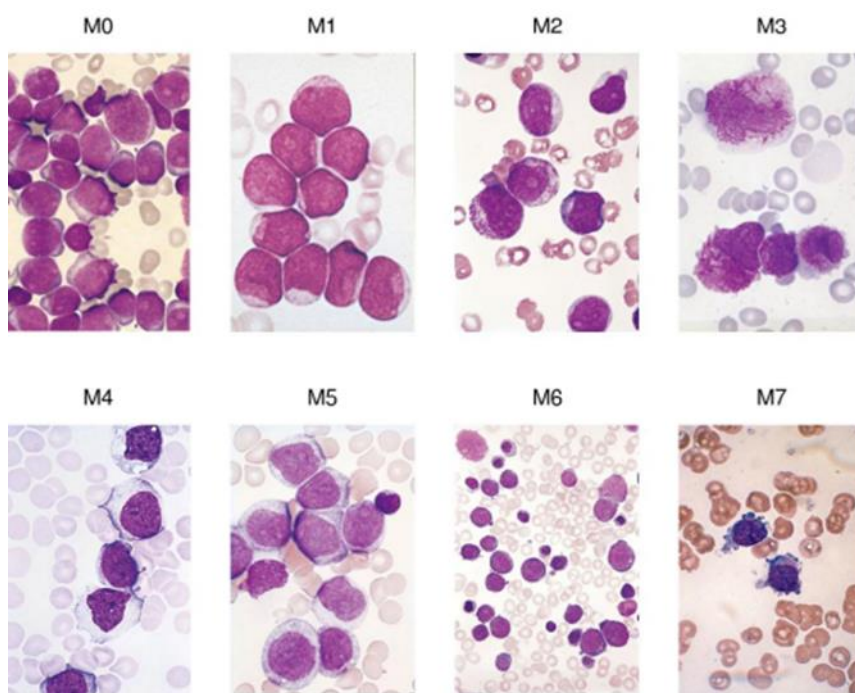


Figura 6: LAM Morfologia. Classificazione FAB.

La valutazione citochimica è l'analisi della reazione colorimetrica in grado di identificare composti intracellulari specifici e permette di confermare la linea cellulare. La colorazione per la mieloperossidasi (MPO), identifica la maggior parte dei blasti mieloidi (FAB M1-M2-M3-M4). MPO viene oggi rilevata con l'utilizzo di anticorpi specifici nella valutazione immunofenotipica della leucemia. La PAS positività è caratteristica dei blasti M3, dei monoblasti, dei blasti eritroidi e dei megacarioblasti. Alfa Naftil-Acetato (ANAE) colora caratteristicamente i blasti monocitoidi. Diversamente i linfoblasti sono positivi in circa il 95% dei casi all'enzima nucleare deossiribonucleotidil-transferasi terminale (TdT), che appare invece negativo nelle LAM (tab.5).

SIGLA	CATEGORIA	CRITERI MORFOLOGICI
M0	Indifferenziata	MPO<3%, ANAE negativa
M1	Mieloblastica immatura	Blasti>90% nel midollo esclusi eritroblasti; MPO>3%, 10% componente monocitaria; <10% granulociti, MPO>3%
M2	Mieloblastica matura	Blasti 30-90%; granulociti>10%; monociti<20%
M3	Promielocitica	>20% promielociti anomali ipergranulari (corpi di Auer), MPO>3%
M3v	Promielocitica ipogranulare	Nuclei reniformi, granulazioni fini nel citoplasma, poco visibili al MO, MPO+++ MPO>3%
M4	Mielomonocitica	Blasti>30%, NEC componente granulocitaria 20-80%, MPO>3%; componente monocitaria 20-80%
M4eo	Mielomonocitica con ipereosinofilia	Criteri per M4 associati a eosinofili anormali con granuli eosinofili e basofili
M5a	Monoblastica	>80% NEC componente monocitaria; monoblasti>80% della componente monocitaria, ANAE positiva
M5b	Monocitica	>80% NEC componente monocitaria; monoblasti<80% della componente monocitaria, ANAE positiva
M6	Eritroblastica	Cellule eritroidi >50% delle cellule midollari; blasti >30% NE
M7	Megacarioblastica	Blasti>30% NEC: megacarioblasti, blebs (mielofibrosi)

Tabella 5: Classificazione FAB e caratterizzazione citochimica [7]. MPO: Mieloperossidasi; ANAE: Alfa Naftil-Esterasi; NEC: Cellule Non Eritroidi; MO: microscopio ottico.

La valutazione morfologica è stata superata dai criteri classificativi immunofenotipici e genetici, per quanto rimanga la tecnica utilizzata nell'adulto per la valutazione della risposta alle terapie, mentre nel bambino venga associata alle altre tecniche disponibili (7).

3. Diagnosi Immunofenotipica

L'immunofenotipo è lo strumento essenziale per l'inquadramento diagnostico della LAM. La citometria a flusso (CFM) rappresenta il metodo di scelta nella determinazione dell'immunofenotipo. Essa consente di differenziare le cellule in base all'espressione degli antigeni di superficie e quindi di definire la linea di appartenenza delle cellule neoplastiche, il loro stato di maturazione e di differenziazione. Questo avviene mediante il contatto delle cellule leucemiche con anticorpi monoclonali legati a fluorocromi (Citofluorimetria). Esistono pannelli di anticorpi monoclonali in grado di riconoscere antigeni specifici di linea B, di linea T o di linea mieloide.

L'immunofenotipo permette inoltre di identificare specifici markers associati alla leucemia ("LAIP = leukemia associated immunophenotype") e/o diversi dalla norma ("DfN = difference from normal"), che sono alla base della valutazione della risposta al trattamento nel corso del protocollo di chemioterapia (MRD = Misurable or Minimal Residual Disease), che è l'elemento di stratificazione più rilevante. Inoltre, l'identificazione di specifici antigeni può essere utilizzata per realizzare immunoterapie mirate (7).

In base alle raccomandazioni ELN 2022 è indispensabile lo studio di **marcatori staminali precoci** (CD34/CD117/HLA-DR), di **antigeni di differenziazione mieloide** (CD13/CD33/Impo/CD45), che in base alla clinica e alla morfologia possono essere integrati con **marcatori monocitoidi** (CD11c/CD14/CD36/CD64), di **differenziazione eritroide** (CD71) e **megacariocitica** (CD41/CD42b/CD61) (tab.2, tab.6) (4).

Diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia (AML)*	
Precursor stage/backbone markers	CD34, CD117 , CD133, HLA-DR
Myelomonocytic markers	CD4, CD11b, CD11c , CD13 , CD14 , CD15, CD33 , CD36 , CD64 , CD65, CD123 , CD371 intracellular† myeloperoxidase (iMPO)
Megakaryocytic markers#	CD41 , CD42b , CD61
Erythroid markers (optional)	CD71, (CD235a, CD105)
Leukemia-specific antigen	<i>NG2 homolog‡</i>
Lineage-aberrant antigens	CD2, CD7 , CD19, CD56^
Pan-leukocyte markers	CD11a , CD38, CD45, CD45RA, CD99
Diagnosis of mixed phenotype acute leukemia (MPAL)§	
Myeloid lineage	iMPO (strong) or evidence of monocytic differentiation by at least two of CD11c, CD14, CD64 or i-lysozyme
B-lineage	CD19 (strong) with at least one of iCD79a , iCD22 , CD10 strongly expressed or CD19 (weak) with at least two of iCD79a, iCD22, CD10 strongly expressed
T-lineage	iCD3 (strong) or surface CD3

Tabella 6: Lista dei marcatori di superficie e citoplasmatici per la diagnosi di LAM secondo ELN 2022. §Diagnosi di MPAL secondo WHO 2022. In grassetto marcatori mandatori secondo WHO 2022, in italico quelli più tipici delle forme pediatriche, sottolineati gli antigeni raccomandati per monitoraggio MRD alla diagnosi e nel follow-up (2) (7) (4).

Alcune LAM pediatriche con anomalie genetiche ricorrenti presentano specifici patterns di espressione antigenica. Ad esempio, il fenotipo RAM caratterizzato dall'espressione elevata di CD56, debole o assente di CD38 e CD45 e mancanza di HLA-DR e CD36, è fortemente associato alla presenza del trascritto di fusione CBFA2T3::GLIS2 (98).

Anche la LAP (M3) con fusione PML::RARA presenta un immunofenotipo

caratteristico con espressione alta di CD99, frequente positività di CD2, espressione debole-negativa di CD11a e CD15 e assenza di CD34 e HLA-DR (99). LAM con riarrangiamento KMT2A è frequentemente positiva per NG2 (7).

4. Diagnosi Citogenetica e Molecolare

L'analisi Citogenetica convenzionale è mandatoria per l'inquadramento delle LAM, richiede l'analisi di 20 cellule in metafase con bandeggio G e il cariotipo deve essere riportato secondo il sistema di nomenclatura internazionale ISNC (*International System for Human Cytogenomic Nomenclature*) (12). Essa è utile per identificare aneuploidie, come monosomie o trisomie, e definire i cariotipi complessi.

Per meglio individuare le anomalie genetiche ricorrenti delle LAM secondo i criteri WHO 2022 e ICC 2022 (tab.1, tab.3 e tab.4), è necessario ricorrere ad altre tecniche tra le quali ibridazione fluorescente in situ (FISH), sequenziamento RNA/DNA, reazione polimerasi a catena (PCR) e/o next generation sequencing (NGS) in grado di diagnosticare simultaneamente mutazioni geniche e riarrangiamenti.

La FISH è essenziale per l'individuazione di specifiche anomalie cromosomiche come RUNX1::RUNX1T1, CBFB::MYH11, KMT2A e riarrangiamenti di NUP98, PLM::RARA o fusioni geniche di MECOM (EV11).

Tramite PCR ed elettroforesi capillare è possibile eseguire analisi dedicate delle mutazioni CEBPA, NPM1 e FLT3 (con determinazione quantitativa del rapporto allelico (AR) mutante FLT3: wildtype) (7).

Le recenti tecniche di biologia molecolare sono sempre più essenziali per la diagnosi delle LAM e il monitoraggio MRD, individuando varianti geniche patogenetiche, alterazione citogenetiche criptiche e mutazioni somatiche che spesso coesistono e sono indispensabili quando l'analisi citogenetica fallisce. Tali tecniche permettono inoltre di definire meglio la categoria di rischio delle LAM e utilizzare potenziali terapie target.

L'NGS RNA-based fusion panels, la reazione a catena della polimerasi con trascrittasi inversa (RT-PCR) o il sequenziamento dell'RNA (RNAseq) sono altamente efficaci nel rilevare fusioni oncogeniche tipiche delle LAM pediatriche con elevata sensibilità. L'NGS DNA-based è in grado di rilevare mutazioni puntiformi di significato prognostico (ad es. CEBPA, NPM1, FLT3) o non prognostico (ad es. KRAS, NRAS) con elevata sensibilità. Tecniche più recenti, come il sequenziamento nanopore, la mappatura ottica del genoma e il sequenziamento dell'intero genoma, possono essere eseguite come test di ricerca o nell'ambito di test clinici, se disponibili (fig.7) (7).

La ricerca di mutazioni germline dovrebbe essere eseguita in tutti i pazienti con sospetta insufficienza midollare o predisposizione alle neoplasie sulla base della clinica o del risultato delle indagini genetiche somatiche.

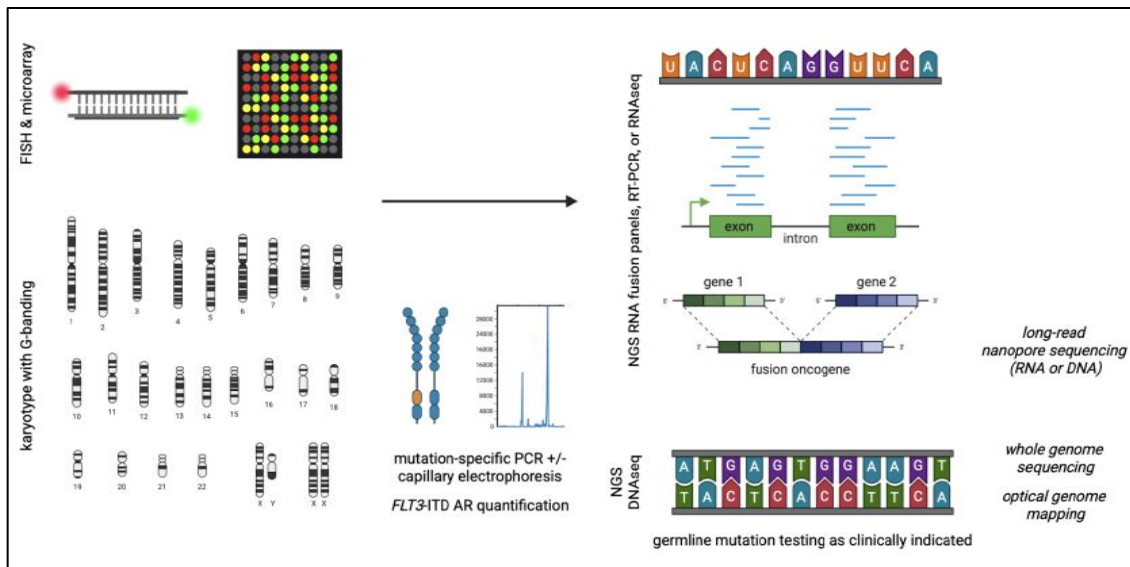


Figura 7: Approccio raccomandato per la diagnosi genetica delle LAM pediatriche (7).

CARATTERISTICHE GENETICHE DELLE LAM PEDIATRICHE E STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO

La LAM pediatrica presenta un panorama genomico distinto rispetto alla LAM dell'adulto, caratterizzato da una predominanza di alterazioni strutturali e da una frequenza notevolmente inferiore di mutazioni somatiche legate all'età.

Le mutazioni genetiche presenti nei sottotipi di LAM riguardano i sentieri di regolazione della proliferazione, della differenziazione e della morte cellulare, che condizionano arresto della differenziazione e aumento della capacità di auto-replicazione ("self-renewal") (tab.7) (13).

Genomic alteration/mutation	Infants (<2y)	Children (2-12y)	Adolescents/AYA (13-18y)	Adults (>18y)
KMT2A rearrangements	35-60%	~10-15%	~5-10%	~5-10%
CBF (t(8;21), inv(16))	Rare (<5%)	15-20%	10-15%	10-15%
NUP98 fusions (eg, NSD1)	~10%	5-10%	<5%	Rare (<1%)
CBFA2T3::GLIS2, MECOM-r	~10%	~5%	Rare	Not reported
NPM1 mutations	Rare (<5%)	~5-10%	~10-15%	~30-35% (esp. in NK)
CEBPA mutations (biallelic)	Rare	~5-10%	~10%	~10-15%
FLT3-ITD	5-10%	~10-15%	~15-20%	~25-30%
DNMT3A mutations	Absent	Rare	Rare	~20-25%
IDH1/IDH2 mutations	Absent	Rare (<1%)	Rare	~15-20%
WT1	Rare	~2-12%	~5-15%	8-15%
TP53 mutations	Very rare	Very rare	Rare	~5-10% (↑ in older patients)
Normal karyotype	~10-20%	~20-25%	~30-35%	~40-50%

Tabella 7: Distribuzione età-correlata delle principali alterazioni geniche in LAM (13).

Anomalie Citogenetiche

Circa il 75% delle LAM pediatriche presenta alterazioni cromosomiche (traslocazioni, delezioni o inversioni), le maggiori delle quali hanno un valore prognostico, e le 5 più frequenti, trovate in circa il 60% delle forme pediatriche, sono (7):

- riarrangiamento di KMT2A (MLL) (11q23) è il più comune, 20-30% delle forme pediatriche e negli infant (< 12 mesi) raggiunge anche il 60%, spesso con FAB M4 o M5. Rappresenta uno dei maggiori fattori determinanti la prognosi e il rischio di relapse delle LAM pediatriche ed è correlato al tipo di proteina di fusione associata, più favorevole (rischio intermedio) la t(9;11)(p22;q23), in assenza di altre alterazioni genetiche, e la t(11;19)(p13;q23) (100). In particolare, favorevole la prognosi nei pazienti con t(9;11)(p22;q23) (KMT2A::MLLT3) e sottotipo FAB M5 (101). Identificati 5 differenti traslocazioni di KMT2A coinvolgenti rispettivamente AFF1 (t(4;11)(q21;q23) (4q21/ KMT2A::AFF1 fusion), AFDN (t(6;11)(q27;q23) (6q27/KMT2A::AFDN fusion), MLLT10 (t(10;11)(p12;q23) (10p12/KMT2A::MLLT10 fusion), ABI1 fusion ((10p11.2/KMT2A::ABI1 fusion) e MLLT1(t(11;19)(q23;p13.3) (19p13.3/KMT2A::MLLT1), che clusterizzano in un gruppo a rischio sfavorevole e indipendentemente associato a cattiva prognosi. Sono state inoltre riportate aberrazioni citogenetiche aggiuntive con significato prognostico: la trisomia 8 si associa ad *outcome* favorevole, mentre la trisomia 19 e altre aberrazioni strutturali si associano a prognosi sfavorevole (102). Più recentemente è stata validata inoltre la correlazione fra *partner genes* coinvolti e la risposta al trattamento di induzione valutata mediante FLOW-MRD in una larga coorte di pazienti in ambito IBFM, confermando il valore prognostico indipendente della malattia residua minima (103).
- LAM con riarrangiamenti Core Binding Factor (CBF) sono presenti nel 20-25% della LAM pediatriche e tradizionalmente classificate come a rischio favorevole. In realtà circa il 30 % dei pazienti con tali anomalie recidivano e il rischio di relapse è influenzato da concomitanti mutazioni in altri oncogeni coinvolti soprattutto nel sentiero delle Tirosine-Kinasi, come la mutazione di KIT associata a t(8;21). Sulla base di queste considerazioni il rischio viene “ridefinito” sulla base della risposta ai cicli di induzione, come preciseremo in seguito:
 - fusione RUNX1::RUNX1T1 (AML1-ETO) correlata a t(8;21)(q22;q22), si trova nel 13-19% dei casi ed è associata alle LAM con FAB M1/M2;

- fusione CBFβ::MYH11 correlata a inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13.1;q22) nel 7-10% dei casi ed è associata più frequentemente alle LAM con FAB M4eo;
- fusione PML::RARA legata t(15;17)(q24.1;q21.2) o varianti tipica della LAP (FAB M3) e si trova nel 5-10% dei casi;
- riarrangiamento di NUP98 (11p15.4) nel 5-10% delle forme, più frequenti NUP98::NSD1 (t5;11)(p35;p15) e NUP98::KMD5A (t11;12)(p15;p13), il primo più frequente nella seconda decade di vita e associato a mutazione di FLT3-ITD e il secondo prevalente nei bambini < 5 anni e con LAM megacarioblastica. Le LAM con mutazioni di NUP98 sono a prognosi sfavorevole con alto rischio di relapse e di resistenza alla chemioterapia di induzione.

Altre alterazioni più rare sono per lo più tipiche degli infant o bambini con Leucemia Mieloide Acuta Megacarioblastica (AMKL), come ETV6 rearrangement, fusione RBM15::MRTFA e CBFA2T3::GLIS2, molte delle quali sono associate a chemioresistenza e/o elevato rischio di recidiva. Di rilievo la recente identificazione di FOLR1, un marcatore di superficie espresso specificamente nelle cellule leucemiche CBFA2T3::GLIS2-positive, utilizzabile come bersaglio terapeutico (14) (15) (16) (17). Caratteristica la LAM con fusione KAT6A::CREBBP (t8;16)(p11;p13) che può regredire spontaneamente negli infant, ma associata a una prognosi sfavorevole quando viene diagnosticata nei bambini > 1 anno di vita (18) (19).

Mutazioni somatiche

Negli ultimi anni sono state identificate nuove mutazioni somatiche nelle LAM pediatriche, per quanto meno frequenti rispetto alle forme dell'adulto, con significato prognostico e potenziali terapie target. I geni più coinvolti sono:

- FLT3: codifica per il recettore tirosin-kinasico FLT3, ed è uno dei geni più comunemente mutati nelle LAM sia dell'adulto che dell'infanzia. Nell'emopoiesi normale, FLT3 è espresso nelle cellule staminali e svolge un ruolo fondamentale nella proliferazione, sopravvivenza e differenziazione di esse. Il tipo più comune di mutazione (10-20% delle LAM) è quello in duplicazione tandem interna (ITD), più spesso nel dominio juxtamembrana (JMD), ma raramente possono verificarsi nel primo dominio tirosin-kinasico (TKD1) (5-10% delle LAM). Entrambi i tipi di mutazioni portano all'attivazione costitutiva di FLT3 anche in assenza del legame

con il suo ligando (FL), e rappresenta un target dei farmaci FLT3-inibitori. FLT3-TKD non ha un impatto sulla prognosi, mentre le mutazioni FLT3-ITD si caratterizzano per una non ottimale risposta alla terapia di induzione (20). È stato dimostrato che è significativo in termini di prognosi il rapporto allelico tra FLT3-ITD mutato e wild-type: nel protocollo attualmente adottato in ambito AIEOP-IBFM il cut-off 0,5 ($AR \geq 0.5$) stratifica i pazienti nella fascia alto rischio (HR), se non associato a NPM1 mutato o altre mutazioni ricorrenti (21). Il 50% dei pazienti con LAP presentano la mutazione di FLT3-ITD, ma incerto ad oggi è il valore prognostico.

- NPM1: presente nel 6-8% dei pazienti LAM, generalmente con cariotipo normale, codifica per la nucleofosmina, una proteina ubiquitariamente espressa, localizzata prevalentemente nel nucleolo. Questa proteina è coinvolta in molteplici funzioni cellulari, tra cui la biogenesi ribosomiale, la duplicazione centrosomale e il mantenimento dell'integrità genomica. Le mutazioni NPM1 sono associate a una risposta favorevole alla chemioterapia di induzione e a una sopravvivenza globale e libera da eventi superiore (22). Come riportato in precedenza attenua l'effetto prognostico sfavorevole di FLT3-ITD (21). Nell'ambito di uno studio internazionale recente, che ha consentito di analizzare oltre 4000 pazienti con AML e identificare 348 pazienti pediatrici e 75 pazienti adulti con AML e mutazione di NPM1 di cui era noto genotipo e outcome, si è dimostrato che la mutazione di tipo D ha un impatto negativo sull'outcome (104).
- CEBPA: 5-6% dei casi, codifica per la proteina alfa legante CCAAT/Enhancer Binding Protein-Alfa (C/EBP α). CEBPA è uno dei fattori di trascrizione cruciali per lo sviluppo delle cellule mieloidi e la perdita della sua funzione determina un blocco precoce e selettivo della differenziazione dei granulociti. Recentemente è stata segnalata anche una modifica epigenetica attraverso l'ipermetilazione del promotore del CEBPA, con conseguente suo silenziamento. Sono state descritte varie mutazioni in tutto il CEBPA, ma due sedi sono quelle più frequentemente colpite: la prima si trova tra il principale sito di inizio traslazione e un secondo ATG più a valle, la seconda sede si trova nel dominio bZIP (basic leucina zipper). CEBPA può presentare mutazione in entrambe le posizioni (doppia mutazione) (23), ma recentemente la definizione di LAM con mutazione di CEBPA è cambiata e appare significativa in termini prognostici (prognosi favorevole) esclusivamente la presenza della mutazione di bZIP, sia mono che biallelica in assenza della mutazione

concomitante di CSF3R, che aumenta il rischio di relapse (24). La prognosi favorevole è stata dimostrata in una coorte di pazienti pediatriche e adulti > 70 anni (25).

- WT1: 7-14% dei casi, codifica per il fattore di trascrizione WT1. Questa proteina svolge un ruolo nella regolazione della crescita e del normale sviluppo. WT1 può causare l'attivazione o la repressione del gene a seconda dell'isoforma espressa, del livello relativo di espressione e del tessuto in cui viene espresso. In molte leucemie è sovraespresso, quindi la sua maggiore espressione sembra essere associata alla leucemogenesi (20).
- GATA1: è fondamentale nella regolazione della differenziazione dell'emopoiesi, in particolare per le linee eritroidi e megacariocitiche. Le mutazioni che portano a forme troncate di GATA1 sono principalmente osservate nella AMKL o nella malattia mieloproliferativa transitoria megacarioblastica che si verificano nei bambini con sindrome di Down. Sebbene non siano sufficienti da sole a causare leucemia, le mutazioni di GATA1 rappresentano il primo *hit* genetico e sono state anche rilevate in epoca prenatale.
- TP53: recentemente sono state identificate varianti somatiche patogene rare con potenziale significato prognostico nelle LAM pediatriche e potrebbero meritare di essere incluse negli algoritmi di stratificazione del rischio, tra queste le mutazioni di TP53, messe in evidenza nell'1-4% dei casi ad insorgenza in età pediatrica. Nella classificazione ICC 2022 delle LAM dell'adulto costituiscono una entità separata alto rischio, in particolare nelle LAM post terapia citotossica e in quelle con cariotipo complesso. Nei bambini, le mutazioni di TP53 si verificano spesso indipendentemente da altre mutazioni. È sufficiente una VAF > 10% per la definizione di LAM TP53 mutata (26).

Stratificazione del rischio

Sia la quinta edizione WHO che la ICC 2022 si basano su informazioni derivanti dalle leucemie dell'adulto, ma entrambe contengono sezioni pediatriche in considerazione della peculiarità di queste forme. Molti sottotipi genetici di LAM pediatriche sono così rari che la stratificazione del rischio basata sull'evidenza e la potenziale assegnazione a terapie specifiche rimane difficile.

Negli attuali protocolli di terapia, per quanto non uniformi, la stratificazione del rischio viene determinata sulla base dei dati ottenuti dalla caratterizzazione genetica e

immunofenotipica associati alla risposta alla terapia di induzione, misurata come MRD, che è altamente predittiva del rischio di recidiva (RR).

Lo studio della MRD non ha esclusivamente un significato prognostico e di stratificazione, ma è anche essenziale per la definizione dell'aggressività della terapia di consolidamento prima dell'attuazione del TCSE. Le caratteristiche genetiche di stratificazione del rischio per le LAM pediatriche utilizzate negli attuali trial clinici con consenso internazionale sono elencate nella tabella 8. I sottotipi genetici di LAM pediatrica ad alto rischio recentemente identificati ma non ancora interamente inclusi nei protocolli sono elencati nella tabella 9 (7) (13).

Genetic alteration
Favorable risk (non-high-risk)
t(8;21)(q21.3;q22) with <i>RUNX1::RUNX1T1</i> fusion*
inv(16)/t(16;16)(p13.1;q22.1) with <i>CBFB::MYH11</i> fusion*
<i>NPM1</i> mutation
<i>CEBPA</i> bZIP mutation
Unfavorable risk (high-risk)
inv(3)(q21.3;q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2) with <i>RPN1::MECOM</i> fusion
t(6;9)(p22.3;q34.1) with <i>DEK::NUP214</i> fusion
inv(16)(p13.3;q24.3) with <i>CBFA2T3::GLIS2</i> fusion (or RAM flow cytometry immunophenotype ¹⁷ in the absence of detected fusion)
t(4;11)(q21;q23.3) with <i>KMT2A::AFF1</i> fusion
t(6;11)(q27;q23.3) with <i>KMT2A::AFDN</i> fusion
t(10;11)(p12.3;q23.3) with <i>KMT2A::MLLT10</i> fusion
t(10;11)(p12.1;q23.3) with <i>KMT2A::ABI1</i> fusion
t(5;11)(q35;p15.4) with <i>NUP98::NSD1</i> fusion
11p15.4 rearrangement with <i>NUP98</i> fusion with other/non- <i>NSD1</i> partner gene
12p13.2 rearrangement with <i>ETV6</i> fusion with any partner gene
Deletion 12p (including 12p13.2) with loss of <i>ETV6</i>
Monosomy 5/del 5q (including 5q31) with loss of <i>EGR1</i>
Monosomy 7
<i>FLT3</i> -ITD (allelic ratios thresholds may vary; high-risk status may be mitigated by occurrence of favorable risk co-mutations)

Tabella 8: Stratificazione del rischio delle LAM pediatriche basata sulle alterazioni genetiche negli attuali trial clinici internazionali (7).

Genetic alteration
t(3;21)(26.2;q22) with <i>RUNX1::MECOM</i> fusion or <i>MECOM/EVI1</i> dysregulation in the absence of rearrangement ²⁹⁶
t(3;5)(q25;q34), <i>NPM1::MLF1</i> fusion
t(8;16)(p11.2;p13.3) with <i>KAT6A::CREBBP</i> fusion
t(16;21)(p11.2;q22.2) with <i>FUS::ERG</i> fusion
t(9;22)(q34;q11) with <i>BCR::ABL1</i> fusion
t(11;19)(q23.3;p13.3) with <i>KMT2A::MLLT1</i> fusion ³²
10p12.3 rearrangement
Myelodysplasia-related cytogenetic aberrations
<i>TP53</i> mutation
<i>UBTF</i> tandem duplication

Tabella 9: Alterazioni genetiche rare a rischio sfavorevole presenti nelle LAM pediatriche (7).

LAM PEDIATRICHE PECULIARI

LEUCEMIA ACUTA PROMIELOCITICA

Morfologicamente la Leucemia Acuta Promielocitica (LAP) è caratterizzata dalla presenza nel midollo osseo o nel sangue periferico di promielociti ipergranulati con citoplasma abbondante, nuclei irregolari con granuli azzurrofilici e corpi di Auer nel 90 % dei casi. E' stata identificata inoltre una variante citologica ipogranulare o microgranulare M3v (27). I blasti esprimono antigeni mieloidi CD13, CD33, CD117 e MPO, mentre caratteristicamente sono CD34 and HLA-DR negativi, così come negativi sono i markers di differenziazione granulocitaria. La LAP si caratterizza per la presenza della traslocazione t(15;17) con produzione della proteina di fusione PML::RARA. Una piccola percentuale di LAP (circa il 2%) è causata da trascritti di fusione atipici, la maggior parte dei quali coinvolge RARA o altri membri dei recettori dell'acido retinoico (RARB o RARG). Queste LAP varianti spesso presentano elevata espressione di CD56, generalmente presentano una prognosi sfavorevole dovuta sia alla difficoltà diagnostica e al ritardo diagnostico conseguente, sia alla resistenza ai farmaci differenzianti (ATRA/ATO) comunemente utilizzati per il trattamento delle forme classiche di LAP (105, 106, 107). La LAP si caratterizzava per l'elevato rischio di mortalità precoce a causa della grave sindrome emorragica correlata alla CID e alla abnorme fibrinolisi tipica di questa forma di leucemia. La prognosi è nettamente migliorata con la scoperta della sensibilità dei blasti ai retinoidi, in particolare all'Acido All-Trans-Retinoico (ATRA), e al Triossido di Arsenico (ATO) (28) (29), che se prontamente avviati inducono la differenziazione dei blasti e limitano tale grave complicanza (tab.10).

Protocollo	Periodo di arruolamento	N° pts arruolati	Random	EFS	OS	Biblio
ICC-APL-01 (ATRA/chemo)	2008-2015	258	Non applicabile	5-year 80%	5-year 95%	(28)
CCLG-APL (ATRA/ATO/RIF)	2011-2020	204	Intravenous ATO vs oral Realgar-Indigo naturalis formula	5-year 98% vs 98%	8-year 100% (tutti i pts)	(30)
COG AAML 1331 (ATRA/ATO) ¹	2015-2019	154	Non applicabile	2-year 98% (SR), 96% (HR)	2-year 99% (SR), 100% (HR)	(31)
CCLG-APL 2016 (ATRA-ATO)	2016-2018	193	Non applicabile	2-year 97% (SR), 90% (HR)	2-year 99% (SR), 95% (HR)	(32)
ICC-APL02 (ATRA-ATO+/-GO)	2019-2025	110	Non applicabile	2-year 97% (SR), 94% (HR)	2-year 100% (SR), 97% (HR)	(33)

Tabella 10: Protocolli recentemente completati per pazienti pediatrici LAP di nuova diagnosi (estratte e modificate da Zwaan et al Blood 2025 (7)).

In base al numero di blasti all'esordio le LAP vengono classificate secondo i criteri modificati di Sanz in rischio standard se globuli bianchi (GB) < 10.000/mm³ e alto rischio se ≥ 10.000/mm³ (28).

Fondamentale è una rapida diagnosi con identificazione della t(15;17) o del trascritto PML::RARA per immediato avvio dell'ATRA e delle terapie di supporto, per quanto anche il solo sospetto della patologia è sufficiente per l'avvio del retinoico.

Il coinvolgimento SNC o altre localizzazioni extra-midollari sono rare, pertanto, in considerazione del rischio emorragico legato alla malattia, se la diagnosi di LAP è sospetta o confermata, la Puntura Lombare (PL) è controindicata alla diagnosi e deve essere eseguita solo nei pazienti ad alto rischio in tempi successivi dopo la risoluzione della coagulopatia.

La terapia differenziante con ATRA e ATO presenta tossicità peculiari:

- la sindrome da differenziazione legata all'aumento delle conte dei globuli bianchi che si verifica pochi giorni dopo l'avvio di ATRA/ATO e caratterizzata da febbre, dispnea, aumento di peso e ipotensione fino ad arrivare a insufficienza renale acuta, infiltrati polmonari, versamento pleurico e/o pericardico. La terapia consiste nel rapido avvio della terapia steroidea e nella modulazione dei farmaci;
- pseudotumor cerebri legato all'aumento della pressione intracranica indotta da ATRA, più comune nei bambini, che si manifesta con cefalea, tinniti, alterazione del visus fino alla cecità e si risolve con la riduzione/sospensione momentanea di ATRA.

NEOPLASIE MIELOIDI POST TERAPIE CITOTOSSICHE

In questa categoria rientrano le forme secondarie all'esposizione ad agenti leucemogeni e/o radioterapia per pregresse patologie oncologiche, "LAM-pCT". Fattori esterni con effetto carcinogenico hanno un ruolo limitato in età pediatrica per l'insufficiente tempo di esposizione. I bambini sopravvissuti a patologie neoplastiche hanno un rischio 80 volte maggiore di sviluppare successive neoplasie mieloidi rispetto alla popolazione generale. Più comuni negli adulti, possono presentarsi anche in età pediatrica dove hanno una incidenza cumulativa dell'1% per i bambini con tumori solidi o leucemie linfoidee trattate con alte dosi di agenti alchilanti e inibitori delle topoisomerasi II (es. epipodofillotossine e antracicline) (34).

Alterazione genetiche frequentemente riscontrate nelle LAM-pCT sono mutazioni somatiche nei geni di RAS/MAPK pathway o TP53 e riarrangiamenti di KMT2A.

Tali forme sono spesso associate ad una ridotta risposta alle terapie standard e hanno una sopravvivenza $\leq 10\%$ se non trattate con TCSE, che rimane l'unica opzione curativa. Vari regimi terapeutici sono riportati tra questi il CPX-351, formulazione di Citarabina e Daunorubicina incapsulate in liposomi di 100nm di diametro con un rapporto molare di 5:1, ha ricevuto la recente approvazione dall'FDA per i bambini con nuova diagnosi di MN-pCT (35).

NEOPLASIE MIELOIDI ASSOCIATE A GERMLINE PREDISPOSITION

Tali forme sono associate a varianti germline con aumentato rischio di sviluppare MDS/LAM. Una rapida identificazione in caso di sospetto clinico è fondamentale per un corretto approccio terapeutico ed essendo il TCSE allogenico la terapia di scelta, è indicato lo screening in tutti i familiari potenziali donatori. La probabilità di evoluzione in MDS/LAM è differente a seconda del tipo di anomalia genetica e correla con l'età.

In base alle manifestazioni cliniche la WHO 2022 (2) distingue 3 sottotipi (tab.11) e la condizione più frequente è la Sindrome di Down contraddistinta dalla mutazione somatica nell'esone 2 o 3 di GATA1, con sviluppo di due possibili condizioni (5): la "transient abnormal myelopoiesis" (TAM) e la LAM del bambino con Sindrome di Down (ML-DS). L'acquisizione di ulteriori mutazioni è molto comune e alcune di

queste sono associate a prognosi peggiore (es. TP53, CDKN2A).

Myeloid neoplasms with germline predisposition without a pre-existing platelet disorder or organ dysfunction
• Germline <i>CEBPA</i> P/LP variant (CEBPA-associated familial AML)
• Germline <i>DDX41</i> P/LP variant ^a
• Germline <i>TP53</i> P/LP variant ^a (Li-Fraumeni syndrome)
Myeloid neoplasms with germline predisposition and pre-existing platelet disorder
• Germline <i>RUNX1</i> P/LP variant ^a (familial platelet disorder with associated myeloid malignancy, FPD-MM)
• Germline <i>ANKRD26</i> P/LP variant ^a (Thrombocytopenia 2)
• Germline <i>ETV6</i> P/LP variant ^a (Thrombocytopenia 5)
Myeloid neoplasms with germline predisposition and potential organ dysfunction
• Germline <i>GATA2</i> P/LP variant (GATA2-deficiency)
• Bone marrow failure syndromes
◦ Severe congenital neutropenia (SCN)
◦ Shwachman-Diamond syndrome (SDS)
◦ Fanconi anaemia (FA)
• Telomere biology disorders
• RASopathies (Neurofibromatosis type 1, CBL syndrome, Noonan syndrome or Noonan syndrome-like disorders ^{a,b})
• Down syndrome ^{a,b}
• Germline <i>SAMD9</i> P/LP variant (MIRAGE Syndrome)
• Germline <i>SAMD9L</i> P/LP variant (SAMD9L-related Ataxia Pancytopenia Syndrome) ^c
• Biallelic germline <i>BLM</i> P/LP variant (Bloom syndrome)

Tabella 11: Sottotipi di LAM associati a germline predisposition WHO 2022 (a-possibili anche neoplasie linfoidi, c-atassia non sempre presente, P=pathogenic, LP=likely pathogenic) (2).

La TAM è una forma pre-leucemica, che si manifesta nel 10-30% dei bambini con DS entro i 6 mesi di vita e si risolve spontaneamente, senza la necessità di chemioterapia, se non in caso di iperleucocitosi associata a danno d'organo. L'esecuzione di un emocromo alla nascita è raccomandata nei bambini con DS, per quanto molti siano asintomatici. Non è definito un cut-off di blasti nel sangue periferico per porre diagnosi, per quanto una quota di blasti tra 5-10% sia indicativa, ma la presenza della mutazione di GATA1 anche con blasti <5% è sufficiente per la diagnosi. Le caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche dei blasti sono compatibili con FAB M0, M6 o M7 e la CFM può rapidamente identificare l'isoforma mutata di GATA1 (GATA1s) (108, 109). Bambini con DS e precedente TAM neonatale hanno un rischio del 30% di sviluppare ML-DS nei primi 4 anni di vita, per cui è indicato un attento monitoraggio clinico-laboratoristico. La diagnosi si basa sull'identificazione nel midollo osseo di blasti simili a quelli della TAM in un bimbo con età ≤ 4 anni. Tale criterio dell'età correla con la presenza della mutazione somatica di GATA1, che deve essere ricercata per porre diagnosi nei rari pazienti >4 anni. L'assenza di tale mutazione nei bambini più grandi esclude la ML-DS e la terapia dovrà essere quella delle LAM standard, nonostante la potenziale tossicità associata. La prognosi delle ML-DS è molto migliorata negli ultimi decenni grazie alla valutazione della spiccata chemiosensibilità dei blasti dei pazienti con DS, in particolare alla Citarabina (Ara-C), che ha consentito la de-intensificazione della chemioterapia e la riduzione conseguente della mortalità per tossicità in pazienti particolarmente fragili. In tabella 12 vengono riportati i risultati dei protocolli più recenti, la cui strategia si basa sull'intensificazione della terapia con Citarabina (dose cumulativa media 30g/mq) e la riduzione della dose cumulativa di antraciclinici, etoposide e terapia intratecale (36).

Protocollo	Periodo di arruolamento	N° pts arruolati	Random	EFS	OS	Biblio
ML DS 2006	2007-2015	170	Non applicabile	5-year 87%	5-year 89%	(37)
JPLSG AML-D11 ²³⁵	2012-2015	78	Non applicabile	3-year 88%	3-year 91%	(38)
COG AAML1531	2015-2020	201	Omissione di HDARAC in IND2 SR Pts; confronto storico con COGAAML0431	2-year 98% (SR), 96% (HR)	2-year 91% vs 96%	(39)

Tabella 12: Recenti protocolli di fase 3 per il trattamento dei pazienti LAM con Sindrome di Down (estratte e modificate da Zwaan et al Blood 2025 (7)).

In trial clinici *ongoing* si stanno sviluppando strategie per stratificare i pazienti con DS in base a mutazioni associate di oncogeni che possono condizionare la prognosi e il rischio di relapse. Contestualmente si è progettato di testare l'impiego di CPX-531 in induzione, che dovrebbe consentire un *uptake* selettivo nei blasti rispetto alle cellule normali, limitando ulteriormente la tossicità. Il protocollo Europeo DS-ML, sponsorizzato dal gruppo tedesco pediatrico di oncologia ed ematologia (GPOH) in cui è previsto CPX-531 in induzione, è in via di approvazione (fig.8) (110).

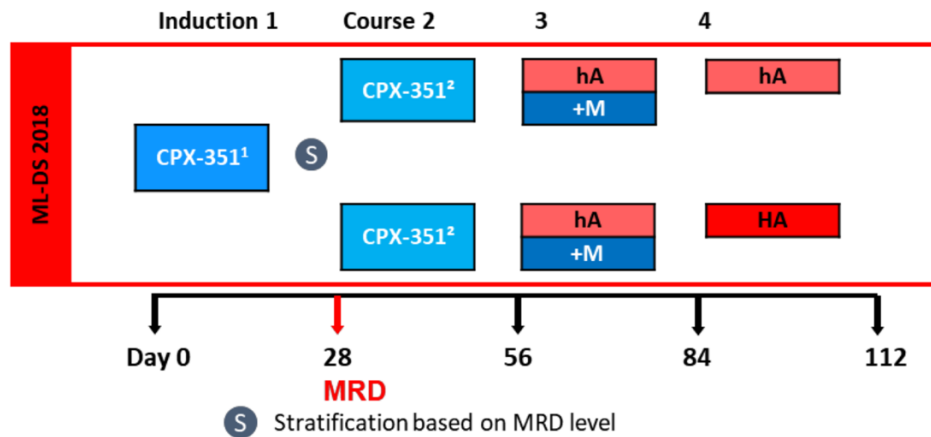


Figura 8: ML-DS 2018 studio internazionale non-randomizzato, aperto, con controllo storico di fase III per i pazienti con ML-DS. Le coorti sono definite da MRD al giorno 28 dopo il primo ciclo di induzione con CPX-351: blasti $\geq 0.1\%$ in Midollo Osseo (MRD+; poor early responders); blasti $< 0.1\%$ in MO (MRD-; good early responders). La dose di Citarabina è ridotta nel ciclo 4 nei pazienti good early responders. Questi pazienti riceveranno 1g/m²/12h cytarabine al posto di 3g/m²/12h (110).

LA TERAPIA DELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA DEL BAMBINO

Premesse

I regimi di chemioterapia che hanno permesso di ottenere i migliori risultati in termini di raggiungimento della prima Remissione Completa (RC1) e della probabilità di sopravvivenza sono quelli basati sulla combinazione di antraciclinici e Citarabina. A questi due agenti sono stati nel tempo associati, allo scopo di aumentare l'Intervallo Libero da Malattia (DFI) e la Sopravvivenza Libera da Malattia (*Disease Free Survival*, DFS), altri antiblastici come l'Etoposide (VP-16), inibitore della Topoisomerasi II, e l'antimetabolita 6-Thioguanina (TG).

Il raggiungimento della RC dopo il primo ciclo di chemioterapia ha una elevata valenza prognostica, in quanto i bambini che non la ottengono presentano un outcome peggiore.

Il miglioramento della DFS è stato ottenuto con l'evoluzione delle terapie di consolidamento post-remissione, basate esclusivamente sull'utilizzo di una chemioterapia intensiva nei pazienti con caratteristiche citogenetiche favorevoli (di cui le alte dosi di Ara-C rappresentano il cardine) e successivo TCSE nei pazienti ad alto rischio di recidiva.

Per quanto riguarda il ruolo del TCSE come terapia post-remissione, è emerso da numerosi studi internazionali che l'outcome dei pazienti sottoposti a TCSE allogenico è superiore rispetto a quello dei pazienti sottoposti a TCSE autologo o alla sola chemioterapia nei pazienti ad alto rischio. Pertanto, oggi il trapianto autologo è stato completamente abbandonato (40).

Certamente di rilievo l'intuizione e il progresso degli studi sulla valutazione della MRD avviati dalla fine degli anni '90 (41) con metodiche citofluorimetriche multiparametriche, che ha consentito la stratificazione dei pazienti in fasce di rischio al fine di orientare l'aggressività della terapia post-remissione. Si metteva in evidenza una più elevata incidenza di relapse in pazienti con MRD $\geq 1\%$ dopo il primo ciclo di induzione e $\geq 0.1\%$ dopo il secondo ciclo. L'MRD era pertanto un elemento di "poor prognosis" indipendente (42) (fig.9, 10).

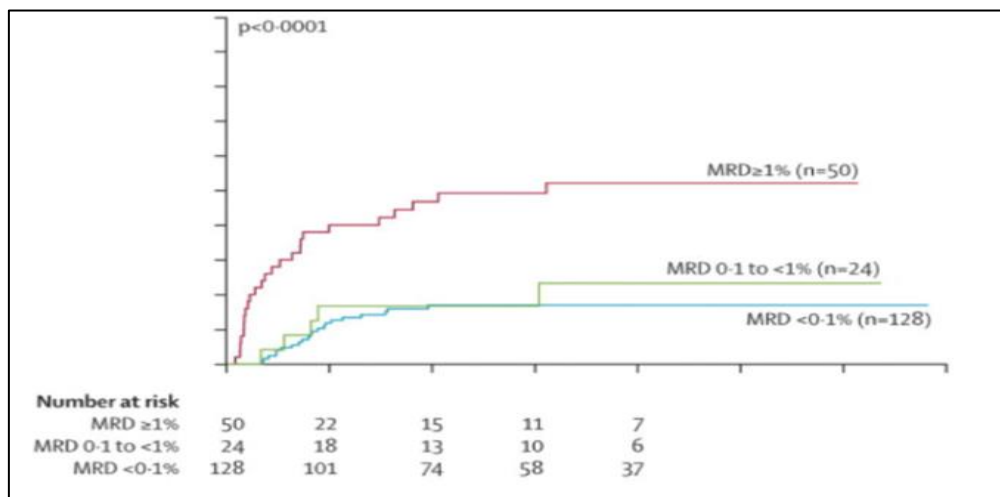


Figura 9: Incidenza Cumulativa (CI) di relapse o "induction failure" in base alla MRD dopo il primo ciclo di Induzione (41).

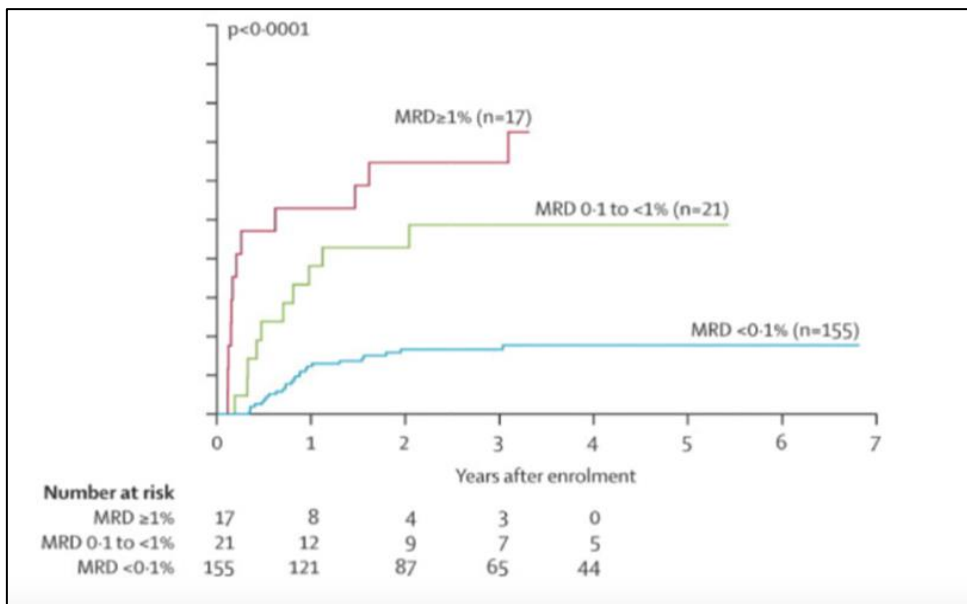


Figura 10: Incidenza Cumulativa (CI) di relapse o "induction failure" in base alla MRD dopo il secondo ciclo di induzione (41).

Nell'ultimo decennio la stratificazione dei pazienti sulla base delle caratteristiche genetiche e molecolari della malattia veniva quindi ulteriormente ridefinita in base al comportamento della Flow-MRD (43).

Punto cardine del trattamento dei pazienti affetti da leucemia sia linfoblastica che mieloide è stata l'introduzione della profilassi della localizzazione di malattia a livello del SNC o la terapia nel caso di localizzazioni SNC alla diagnosi, mediante la somministrazione intratecale di chemioterapia. Le prime esperienze risalgono agli anni '70 presso il St. Jude Children's Research Hospital (44). Inizialmente la chemioterapia intratecale consisteva nella somministrazione di Citarabina in monoterapia, dai primi anni 2000 lo stesso gruppo di ricercatori ha proposto l'attuazione di una tripla intratecale con Methotrexate, Metilprednisone e Ara-C, che ha consentito una netta riduzione del rischio di relapse (42).

La storia

I primi protocolli di chemioterapia per il trattamento della LAM pediatrica venivano avviati negli anni '70. Fino agli anni '80 quasi tutti i bambini che si ammalavano di LAM morivano. Nel corso degli ultimi 40 anni e in particolare nell'ultima decade, il trattamento della LAM in età pediatrica ha presentato notevoli progressi, grazie soprattutto alla realizzazione di protocolli di trattamento più aggressivi, all'implementazione della conoscenza delle lesioni genetiche alla base della leucemia con valenza prognostica e all'introduzione della valutazione della MRD dopo i cicli di

induzione per la stratificazione in fasce di rischio, al fine di attuare una più appropriata terapia di intensificazione post-remissione. Tali elementi hanno consentito inoltre di definire l'indicazione al TCSE allogenico in prima remissione.

Il miglioramento delle terapie di supporto ha ulteriormente influenzato la sopravvivenza (45), che ha raggiunto mediamente il 70% nei trial attivi dal 2000 al 2010 (tab.13) e l'80% in quelli più recenti (tab.14) e quasi tutti i gruppi cooperativi internazionali hanno riportato un miglioramento della EFS e della OS durante l'implementazione dei protocolli consecutivi (46).

Study Group	Study	Patients (n)	EFS (%)	OS (%)	Relapse (%)	Source
AIEOP	AML2002/01 (2002-2011)	482	8-yr 55.0±2.6	8-yr 67.7±2.4	24	Pession et al 2013
BFM-SG	AML-BFM 2004 (2004-2010)	521	5-yr 55±2	5-yr 74±2	29	Creutzig et al 2013
COG	AAML03P1 (2003-2005)	340	3-yr 53±6	3-yr 66±5	33±6	Cooper et al 2012
	AAML0531 (2006-2010) (0-29 years)	1022	3-yr 53.1 vs 46.9	3-yr 69.4 vs 65.4	32.8 vs 41.3	Gamis et al, 2014
JACLS	AML99 (2000-2002)	240	5-yr 61.6±6.5	5-yr 75.6±5.3	32.2	Tsukimoto et al 2009
JPLSG	AML05 (2006-2010)	443	3-yr 54.3±2.4	3-yr 73.2±2.3	30.3	Tomizawa et al 2013
MRC	MRC AML12 (1995-2002)	564	10-yr 54	10-yr 63	32	Gibson et al 2011
NOPHO	NOPHO AML 2004 (2004-2009)	151	3-yr 57±5	3-yr 69±5	30	Abrahamsson et al 2011 & Hasle et al 2012
PPLSG	PPLSG AML-98 (1998-2002)	104	5-yr 47±5	5-yr 50±5	24	Dłuzniewska et al 2005
SJCRH	AML02 (2002-2008)	216	3-yr 63	3-yr 71	21	Rubnitz et al 2010

Tabella 13: EFS, OS e tasso di Relapse dei principali studi cooperativi internazionali per il trattamento delle LAM pediatriche, protocolli attivi ≤ 2010 (46).

Protocollo	Periodo di	N° pts	Random	EFS	OS	Biblio
------------	------------	--------	--------	-----	----	--------

	arruolamento	arruolati				
SJCRH AML08	2008-2017	285	clofarabine and cytarabine vs cytarabine, daunorubicin, and etoposide	3-year 53% vs 52%	3-year 75% vs 65%	(47)
AML-BFM 2012 registry	2012-2017	324	Non applicabile	5-year 58%	5-year 79%	(48)
NOPHO AML 2012	2013-2021	287 (194 randomizzati)	liposomal daunorubicin vs mitoxantrone	5-year 57% vs 72%	5-year 73% vs 89%	(49)
JPLSG AML-12	2014-2018	324	standard-dose vs high-dose cytarabine in induction	3-year 64% vs 61%	3-year 84% vs 75%	(50)
CCLG-AML 2015	2015-2019	1258 (in 554 mantenimento)	homoharringtonin e (H) vs etoposide (E) in induction cytarabine (C) vs ATRA (AT) in maintenance	3-year 61% vs 52%	3-year 69% vs 63%	(51)
AIEOP AML 2013	2015-2022	371	SR: standard multi-agent chemotherapy IR e HR: ICE vs FLA-L- doxo) in induction 2	3-year DFS 74.3% (no difference between arms in IR or HR patients)	3-year 99.2% (SR) 84.2% (IR) 79.4% (HR)	(52)
Myechild 01	2019-2022	515	1 dose (day 4) vs 3 dosi (days 4, 7, 10) di GO in induzione	3-year 63% vs 70%	3-year 80% vs 86%	(53)
COG AAML1831	2020-2024	721	CPX-351 vs daunorubicina e cytarabina in induzione	2-year 51% vs 61%	2-year 75% vs 76%	(54)

Tabella 14: EFS, OS dei principali studi cooperativi internazionali per il trattamento delle LAM pediatriche, protocolli attivi ≥ 2010 (estratte e modificate da Zwaan et al Blood 2025 (7)).

Questi risultati sono stati raggiunti grazie alla costruzione di protocolli nell'ambito di gruppi cooperativi nazionali e internazionali.

Fino a tutti gli anni 70', il trattamento della LAM si basava su protocolli istituzionali, ideati nei singoli centri pediatrici, i farmaci a disposizione erano esigui e spesso venivano utilizzati schemi di terapia LLA-orientata. Dal 1976 con la creazione della società scientifica pediatrica italiana AIEOP (Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica), nata grazie all'impegno di ricercatori illuminati, come la Professoressa Luisa Massimo di Genova, primario emerito della Pediatria IV dell'Istituto Giannina Gaslini, sono stati formulati protocolli di chemioterapia condivisi in ambito nazionale per il trattamento della LAM in età pediatrica.

Contestualmente nascevano in Germania il Gruppo AML-BFM (Berlin, Frankfurt, Münster), in Nord Europa il Gruppo NOPHO (Nordic Society for Pediatric Hematology

and Oncology), in Inghilterra l'MRC (Medical Research Council), e in Europa il Gruppo EORTC (European Organization of Research and Treatment of Cancer). Negli Stati Uniti il Gruppo CCG (Childhood Cancer Group), POG (Pediatric Oncology Group) fusi negli nel 2000 nel COG (Children's Oncology Group) e SJCRH (St. Jude Children's Research Hospital).

Successivamente, con l'aggregazione delle società scientifiche di ematologia pediatrica delle singole nazioni europee e non, nasceva nel 1987 la più importante piattaforma internazionale per la ricerca e la cura dei bambini e degli adolescenti affetti da Leucemia e Linfoma, denominata "I-BFM" (International BFM). Oggi partecipano all'I-BFM 28 gruppi di studio di 35 nazioni diverse.

Nell'ambito dell'I-BFM si individuavano laboratori di riferimento nazionali coordinati in una rete internazionale per il confronto e la validazione dei risultati, orientati alla conferma diagnostica, all'inquadramento genetico e al monitoraggio della malattia residua minima. In Italia, per volontà, impegno e passione del professore Giuseppe Basso il laboratorio di riferimento per le LAM pediatriche veniva creato nei primi anni '90 presso l'Emato-Oncologia della Clinica Pediatrica dell'Università di Padova con un impressionante sviluppo in termini di implementazioni diagnostiche immunofluorimetriche e di genetica molecolare nell'ultima decade.

Lo sviluppo dei protocolli AIEOP LAM

Prima del 1982

I primi pazienti guariti da LAM risalgono ai primi anni 80, quando si iniziarono ad adottare schemi di chemioterapia a 2 farmaci per l'induzione della remissione (Daunoblastina - DNR e Citarabina), associati alla profilassi SNC mediante chemioterapia intratecale con Citarabina (55).

I primi schemi di chemioterapia prevedevano una Induzione 1: 3+7 (DNR 45 mg/m² al giorno per 3 giorni consecutivi e Ara-C in infusione continua per 7 giorni a 100 mg/m² o 200 mg/m²) e Induzione 2: 2+5 (DNR + Ara-C al medesimo dosaggio, rispettivamente per 2 e 5 giorni). Si otteneva in tal modo un tasso di RC compresa fra 60 e 80%.

Tuttavia, entro 2 anni dalla diagnosi oltre il 75% dei pazienti che aveva raggiunto la RC recidivavano e morivano per progressione di malattia. Sono state sviluppate quindi strategie per ridurre le recidive e migliorare la prognosi. Il protocollo VAPA

(Vincristina/Adriablastina/Prednisone/Ara-C) adottato nell'ambito della Dana Faber Cancer Institute (DFCI) nei primi anni '80, è stato il primo basato sul principio della chemioterapia intensiva post-remissione. I pazienti venivano sottoposti a 2 cicli di induzione VAPA e successivamente a cicli sequenziali di chemioterapia per 14 mesi (56) (tab.15).

Sequence I	Sequence II	Sequence III	Sequence IV
Adriamycin, 45 mg/sq m/day, day 1, intravenous	Adriamycin, 30 mg/sq m/day, day 1, intravenous	Vincristine 1.5 mg/sq m/day, day 1, intravenous	Cytosine arabinoside, 200 mg/sq m/day, days 1-5, continuous infusion
Cytosine arabinoside, 200 mg/sq m/day, days 1-5, continuous infusion	Azacytidine 150 mg/sq m/day, days 1-5, continuous intravenous infusion	Methylprednisolone, 800 mg/sq m/day, days 1-5, intravenous	
		6-Mercaptopurine, 500 mg/sq m/day, days 1-5, intravenous	
		Methotrexate, 7.5 mg/sq m/day, days 1-5, intravenous	
Given 4 times at 3-4-wk intervals	Given 4 times at 4-wk intervals	Given 4 times at 3-wk intervals	Given 4 times at 3-4 wk intervals

Tabella 15: VAPA Protocol, schema di terapia di consolidamento sequenziale (56).

Con questa strategia si raggiungeva una EFS in età pediatrica a 5 anni del 40% (fig.11).

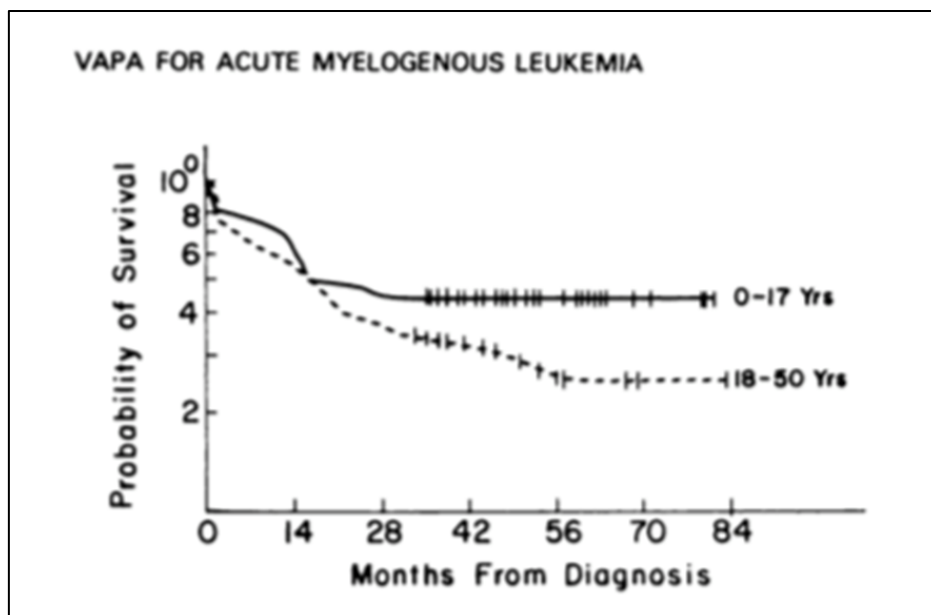


Figura 11: Protocollo VAPA, EFS a 5 anni (56).

Sulla base di queste premesse, nel febbraio 1982 è stato avviato il primo studio cooperativo AIEOP LAM.

Studio AIEOP LAM 82

Nel 1982 nell'ambito del gruppo cooperativo AIEOP fu attivato il primo studio prospettico multicentrico denominato LAM 82, con l'obiettivo di incrementare la DFS.

Il protocollo prevedeva 2 cicli di terapia di Induzione con DNR e Ara-C (DA) seguiti da 4 cicli di consolidamento con DNR, TG e dosi scalari di Ara-C (DAT) e da 6 cicli di terapia post-consolidamento costituiti da 3 coppie di farmaci somministrati a rotazione (VP-16/Ara-C; TG/Ara-C; DNR/Ara-C) (tab.16).

DAT Consolidation Introduced in Study-82	<i>Cycle 1: daunorubicin 60 mg/m² i.v. 1 h day 1, cytarabine 60 mg/m² s.c. every 8 h for 5 days; thioguanine 70 mg/m² os every 8 h for 5 days.</i> <i>Cycle 2: daunorubicin 60 mg/m² i.v. 1 h day 1, cytarabine 80 mg/m² s.c. every 8 h for 5 days; thioguanine 70 mg/m² os every 8 h for 5 days.</i> <i>Cycle 3: daunorubicin 60 mg/m² i.v. 1 h day 1, cytarabine 110 mg/m² s.c. every 8 h for 5 days; thioguanine 70 mg/m² os every 8 h for 5 days.</i> <i>Cycle 4: daunorubicin 60 mg/m² i.v. 1 h day 1, cytarabine 150 mg/m² s.c. every 8 h for 5 days; thioguanine 70 mg/m² os every 8 h for 5 days</i>
Postconsolidation Introduced in Study-82	<i>Cycles 1 and 2: etoposide 100mg/m² i.v. push days 1, 2, 3; cytarabine 150 mg/m² s.c. every 8 h for 3 days.</i> <i>Cycles 3 and 4: thioguanine 70mg/m² os every 8 h for 5 days; cytarabine 150 mg/m² s.c. every 8 h for 5 days.</i> <i>Cycles 5 and 6: daunorubicin 40mg/m² i.v. push day 1; cytarabine 300 mg/m² continuous i.v. infusion on days 1–3</i>

Tabella 16: Elementi del protocollo AIEOP LAM 82 (tabella adattata da Pession et al, Leukemia 2005 (55)).

La profilassi SNC veniva attuata con la periodica somministrazione di Citarabina intratecale. 171 pazienti furono arruolati nel protocollo. La probabilità di EFS a 5 anni risultò del 53% (55) (57).

La RC veniva raggiunta nell'82% dei pazienti e i non responders erano prevalentemente affetti da LAM M5 o con iperleucocitosi all'esordio. La mortalità in induzione era 8.8%. 14 di 171 pazienti furono sottoposti a TCSE allogenico da donatore HLA-identico familiare (8.2%). Nessun trapianto autologo (auto-TCSE) era stato effettuato.

Studio AIEOP LAM 87

Dopo l'acquisizione dei risultati preliminari del protocollo LAM 82 veniva formulato il protocollo LAM 87 che comprendeva 2 induzioni consecutive con DA, come nel protocollo LAM 82 (3+7/2+5), a cui facevano seguito, nei pazienti in RC senza donatore HLA-identico familiare, 2 cicli di DAT, come nel protocollo 82.

Successivamente i pazienti venivano randomizzati per essere sottoposti a ulteriori 2 cicli di consolidamento, seguiti da 6 cicli di chemioterapia post-consolidamento come nel protocollo precedente, oppure ad auto-TCSE.

Il regime di condizionamento adottato per il trapianto autologo era rappresentato da BCNU (Carmustina), M-AMSA (Amsacrina), Etoposide e Citarabina (regime BAVC); non veniva data indicazione all'attuazione in vitro della purificazione delle cellule midollari raccolte. Il TCSE allogenico era indicato se disponibile un familiare HLA-identico.

Questo studio è stato il primo in cui veniva eseguita una randomizzazione per il confronto della chemioterapia e il trapianto autologo.

I risultati del protocollo AIEOP LAM 87 erano sostanzialmente sovrapponibili a quelli del protocollo precedente, la OS a 2 anni era del 36%.

Si definiva inoltre il vantaggio significativo del trapianto allogenico (DFS a 5 anni 51%) rispetto a chemioterapia o trapianto autologo (rispettivamente 26 e 21%), che risultavano equivalenti (58).

Sulla base di questi risultati e delle recenti acquisizioni dell'esperienza internazionale dal 1989 il protocollo fu emendato e si eliminò l'opzione dell'auto-TCSE (59).

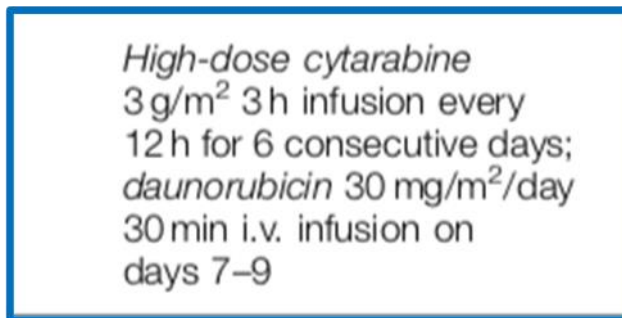
Studio AIEOP LAM 87M

Nello studio AIEOP LAM 87M i 2 cicli di induzione DA furono mantenuti come nel precedente studio, mentre si decise di ridurre drasticamente l'intensità e la durata della fase di consolidamento costituita da un unico blocco con Ara-C ad alte dosi (HD Ara-C) per 6 giorni, seguita da DNR per 3 giorni consecutivi (tab.17), sulla base dell'esperienza positiva ottenuta da Wolff (59) con questo schema in pazienti con età < 25 anni: RC dell'83%, con un follow-up mediano di oltre 3.5 anni.

Il concetto dell'efficacia della HD-AraC fu introdotto da quegli anni e si ritenne che potesse rappresentare una effettiva terapia di consolidamento per la LAM in RC1, con un outcome comparabile, se non migliore, a quello ottenuto con gli approcci terapeutici precedenti, compreso il trapianto di midollo.

Sfortunatamente il protocollo AIEOP LAM 87M non replicò i risultati riportati da Wolff e la EFS ottenuta a 3 anni fu solo del 23% (dati non pubblicati, gruppo di lavoro

LAM AIEOP). Per tale motivo nel 1992 il protocollo LAM 87M fu interrotto e si avviò il protocollo LAM 92.



<i>High-dose cytarabine</i> 3 g/m ² 3 h infusion every 12 h for 6 consecutive days; <i>daunorubicin</i> 30 mg/m ² /day 30 min i.v. infusion on days 7–9
--

Tabella 17: Schema "Wolff" protocollo 87M (tabella adattata da Pession et al, *Leukemia* 2005 (55)).

Studio AIEOP LAM 92

Per la prima volta con il protocollo LAM 92 si introdusse il criterio della stratificazione per la scelta della terapia di consolidamento. Furono considerati standard risk (SR) i pazienti con anomalie genetiche favorevoli (trascritto di fusione AML1-ETO o riarrangiamento del CBF-β). I pazienti SR, che raggiungevano la RC1, venivano esclusi dalla procedura trapiantologica.

Vennero esclusi inoltre dal protocollo LAM 92 i pazienti affetti da LAP con t(15;17), che venivano trattati secondo un protocollo specifico basato sull'associazione dell'ATRA ad alte dosi associato alla chemioterapia (**protocollo GIMEMA-AIEOP AIDA**) (28).

Con il protocollo LAM 92 venne introdotto in induzione l'utilizzo dell'antraciclina Idarubicina (Ida) al posto della DNR. I pazienti venivano sottoposti a 1 o 2 cicli di Induzione ICE per 10 giorni (Idarubicina, Citarabina ed Etoposide) (tab.18) in base al raggiungimento della RC dopo il primo ciclo.

ICE (3+5+10)^a:
idarubicin 12 mg/m²/day 1 h infusion
 on days 1, 3, 5;
etoposide 100 mg/m²/day 1 h i.v. infusion
 on days 1–5;
cytarabine 25 mg/m²/day i.v. push on
 day 1 followed by 100 mg/m²/day
 continuous i.v. infusion on days 1–10

ICE (2+3+7)^b:
idarubicin 12 mg/m²/day 1 h infusion
 on days 1 and 3;
etoposide 100 mg/m²/day 1 h i.v. infusion
 on days 1–3;
cytarabine 25 mg/m² i.v. push on day 1
 followed by 100 mg/m²/day continuous
 i.v. infusion on days 1–7

Tabella 18: Ciclo ICE LAM 92 (tabella adattata da Pession et al, *Leukemia* 2005 (55)).

Il razionale per l'utilizzo dell'Idarubicina derivava dalla suggestione di una maggior efficacia valutata in studi preclinici in vitro per un più rapido uptake e ritenzione intracellulare del farmaco e una minore suscettibilità al sistema di “multidrug resistance” (60) (61), inoltre il suo metabolita Idarubicinolo presentava una prolungata vita media (54h) e la capacità di penetrare il SNC.

I pazienti in RC dopo il primo ciclo ICE di 10 giorni venivano sottoposti a un secondo ciclo ICE della durata di 7 giorni e a seguire 1 o 2 blocchi di chemioterapia con Citarabina ad alte dosi associata a Etoposide o a Daunoblastina. Successivamente i pazienti ad alto rischio (HR) venivano sottoposti ad allo o auto-TCSE in base alla disponibilità di un donatore familiare HLA-identico. **Le cellule staminali autologhe venivano purificate (*purging*) in vitro con Mafosfamide. Il regime di condizionamento per il TCSE autologo includeva Total Body Irradiation (TBI) e Melphalan (Mel); il condizionamento del TCSE allogenico includeva il Busulfano (Bu) al posto della TBI associato a Ciclofosfamide (Cy) e Mel.**

La morte per tossicità in Induzione (Early Death-ED) risultò estremamente bassa (6%) e con questo approccio si ottenne un significativo incremento della RC (90%), della EFS e della DFS, che raggiunsero a 5 anni rispettivamente il 53% e il 60%. Oltre il 75% dei pazienti fu sottoposto a TCSE (54% autologhi e 33% allogenici), con contributo all'incremento della sopravvivenza dei pazienti (fig.12).

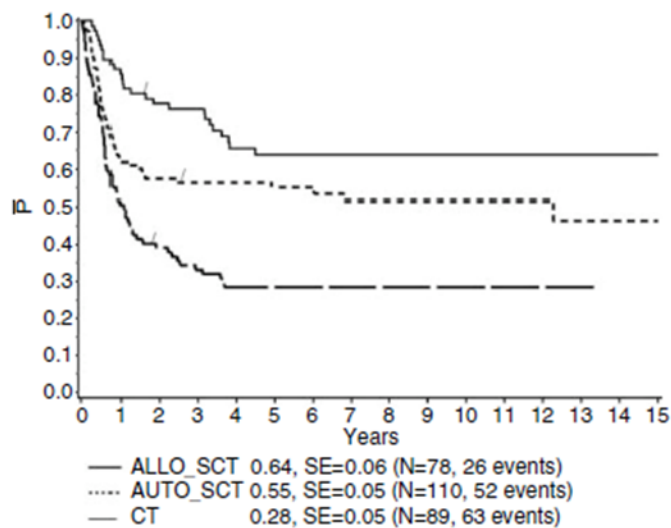


Figura 12: Confronto della DFS a 5 anni dei pazienti sottoposti a TCSE autologo, allogenico o chemioterapia post-remissione (55).

Nelle figure 13 e 14 vengono confrontate le outline e le curve di survival delle varie generazioni dei protocolli AIEOP LAM da 82 a 92.

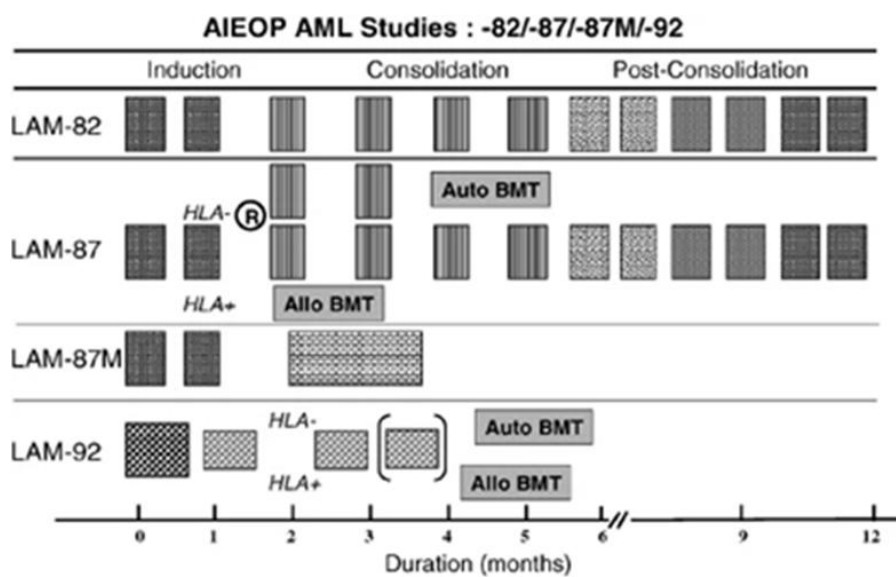


Figura 13: Outline dei protocolli AIEOP LAM 82, 87, 87M e 92 (55).

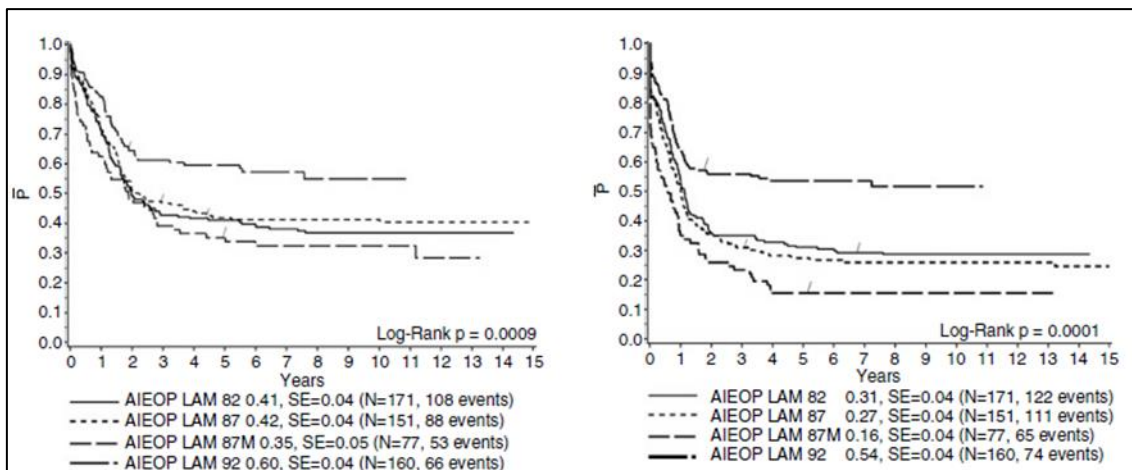


Figura 14: Overall Survival ed Event Free Survival protocolli AIEOP LAM 82-92 (55).

Il miglioramento significativo dei risultati ottenuti con il protocollo LAM 92 è da attribuire a più fattori: 1) l'introduzione dell'Idarubicina in induzione; 2) l'utilizzo della Citarabina ad alte dosi nel protocollo di consolidamento; 3) il *purging* delle cellule staminali autologhe prima dell'infusione; 4) l'introduzione della stratificazione dei pazienti in SR e HR.

Studio AIEOP LAM 2002

L'esperienza acquisita con la generazione dei 4 protocolli AIEOP LAM e in particolare quella del protocollo LAM 92 ispirò la costruzione dei protocolli applicati più recentemente: il protocollo AIEOP LAM 2002/01 (attuato nei centri AIEOP e nel nostro centro dal 2003 al 2013) (62) e il protocollo AIEOP LAM 2013/01, avviato nel 2014 e chiuso nel luglio 2022 (52).

La stratificazione dello studio AIEOP LAM 2002/01 di fatto ripeteva quella del protocollo LAM 92: SR i pazienti con i riarrangiamenti del CBF, t(8;21)-t(16;16)-inv(16), e in RC morfologica (<5% di blasti) dopo il primo ciclo di Induzione; HR tutti i pazienti che non presentavano i criteri SR.

Dallo studio erano esclusi i pazienti con LAP, come per lo studio 92, e i pazienti con Sindrome di Down, inseriti nel nuovo protocollo AIEOP LAM 2002/02, meno aggressivo che prevedeva l'utilizzo di antraciclinici liposomiali e una riduzione delle dosi di Citarabina, in totale costituito da 4 cicli, 2 cicli di induzione e 2 di consolidamento, **senza l'attuazione del TCSE**. In precedenza, i bambini con DS venivano trattati con i protocolli in uso per gli altri pazienti, con il rischio di tossicità eccessive vista la fragilità di questi pazienti.

Per la prima volta si introduceva la caratterizzazione molecolare dei blasti per l'individuazione delle traslocazioni e delle mutazioni con significato prognostico: AML-ETO, anomalie CBF β , riarrangiamenti di MLL, FLT3-ITD e TKD (62).

Lo schema del protocollo è riportato nella figura 15.

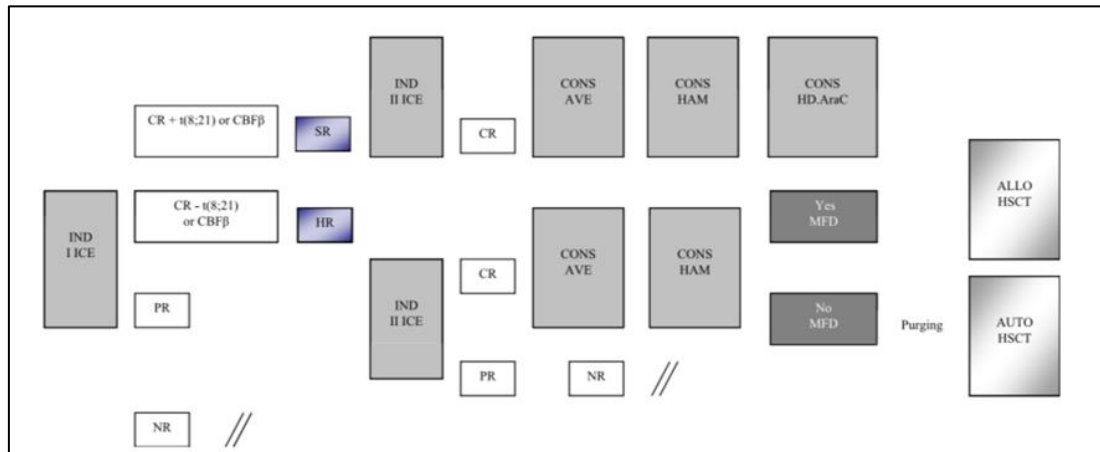


Figura 15: Outline protocollo AIEOP LAM 2002/01(62).

Il ciclo ICE dell'induzione fu modificato rispetto a quello adottato nel protocollo LAM 92 per incrementare la *dose intensity*, somministrando l'Idarubicina in giorni consecutivi (giorni 1, 2, 3) anziché a giorni alterni, in tal modo si poteva utilizzare una dose/mq inferiore (10mg/mq/dose anziché 12mg/mq/dose). L'obiettivo era quello di mantenere il tasso di RC raggiunto con il protocollo LAM 92 (90%) riducendo la tossicità correlata agli antraciclinici.

Dopo il primo ciclo ICE veniva eseguito in tutti i pazienti un secondo ciclo ICE; quindi, i pazienti SR procedevano con 3 cicli di consolidamento AVE (Citarabina, VP-16), HAM (Citarabina alte dosi, Mitoxantrone), HD Ara-C (fig.15, tab.19).

Phase	Week	Administration route	Doses	Days
Remission induction (ICE ×2)				
Idarubicin	1, 4	IV	10 mg/m ²	1, 2, 3
Etoposide	1, 4	IV	100 mg/m ²	1, 2, 3, 4, 5
Cytarabine	1, 4	IV (24 h)	200 mg/m ²	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
IT therapy				
Cytarabine	1, 4	IT	Depending on age*	1
Methotrexate (only for CNS disease)	1, 4	IT	Depending on age*	1, 4, 7, 10, 14 of first cycle
Methylprednisolone (only for CNS disease)	1, 4	IT	Depending on age*	1, 4, 7, 10, 14 of first cycle
Consolidation 1 (AVE)				
Etoposide	8	IV	125 mg/m ²	2, 3, 4, 5
Cytarabine	8	IV	3 g/m ² bid	1, 2, 3
IT therapy				
Cytarabine	8	IT	Depending on age*	6
Consolidation 2 (HAM)				
Cytarabine	11	IV	3 g/m ² bid	1, 2, 3
Mitoxantrone	11	IV	10 mg/m ²	3, 4
IT therapy				
Cytarabine	11	IT	Depending on age*	6
Consolidation 3 (HD Ara-C) (only for SR)				
Cytarabine	14	IV	3 g/m ² bid	1, 2, 3
IT therapy				
Cytarabine	14	IT	Depending on age*	6

Tabella 19: Chemioterapia protocollo AIEOP LAM 2002/01 (62).

I pazienti HR in RC dopo il secondo ciclo di induzione ICE proseguivano con 2 blocchi di chemioterapia di consolidamento (AVE e HAM) e successivamente venivano sottoposti a TCSE autologo o allogenico da donatore familiare identico se disponibile.

Si introduceva per la prima volta tra i pazienti definiti very-HR (età < 1 anno o morfologia FAB M7 o non in RC1 o con cariotipo complesso), **l'indicazione al trapianto da donatore non correlato (unrelated donor, UD)**. Tale indicazione dal 2006 fu estesa a tutti i pazienti positivi per FLT3-ITD in RC. Il regime di condizionamento consisteva in Bus/Cy/Mel sia per il trapianto autologo che allogenico, la TBI veniva abbandonata. Raccomandato il *purging* del midollo autologo.

Tra dicembre 2002 e giugno 2011, furono arruolati nello studio 504 pazienti, valutabili 482. Il tasso di RC risultò sovrapponibile a quello del protocollo LAM 92 (87%), estremamente bassa la ED (3%). Il 100% dei pazienti SR raggiunse la RC dopo il primo ciclo di induzione. I pazienti SR rappresentavano il 20% dell'intera popolazione. L'incidenza cumulativa di recidiva risultò del 27% sia per SR che HR. La probabilità stimata a 8 anni di OS, EFS, e DFS per l'intera coorte dei pazienti era rispettivamente del 68%, 55% e 63% (fig.16); 83%, 63% e 66% nei pazienti SR e 64%, 53% e 62% nei pazienti HR (fig.17). OS e EFS erano significativamente migliori nei pazienti SR, mentre non differiva la probabilità di DFS in entrambi i gruppi di rischio.

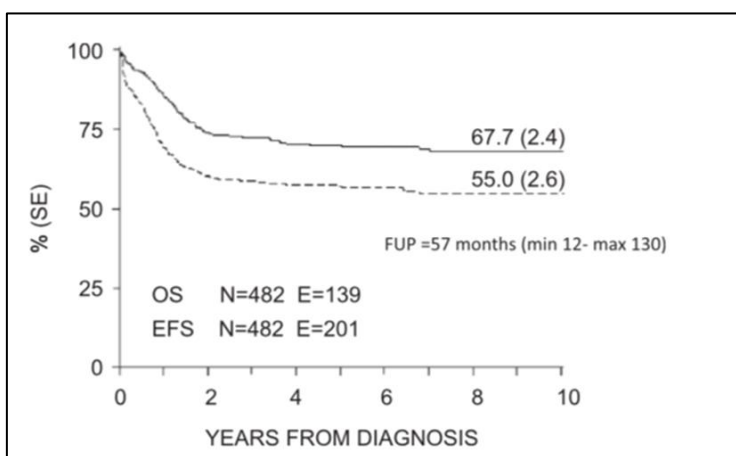


Figura 16: Protocollo LAM 2002/01 OS e EFS a 8 anni dell'intera coorte dei pazienti (62).

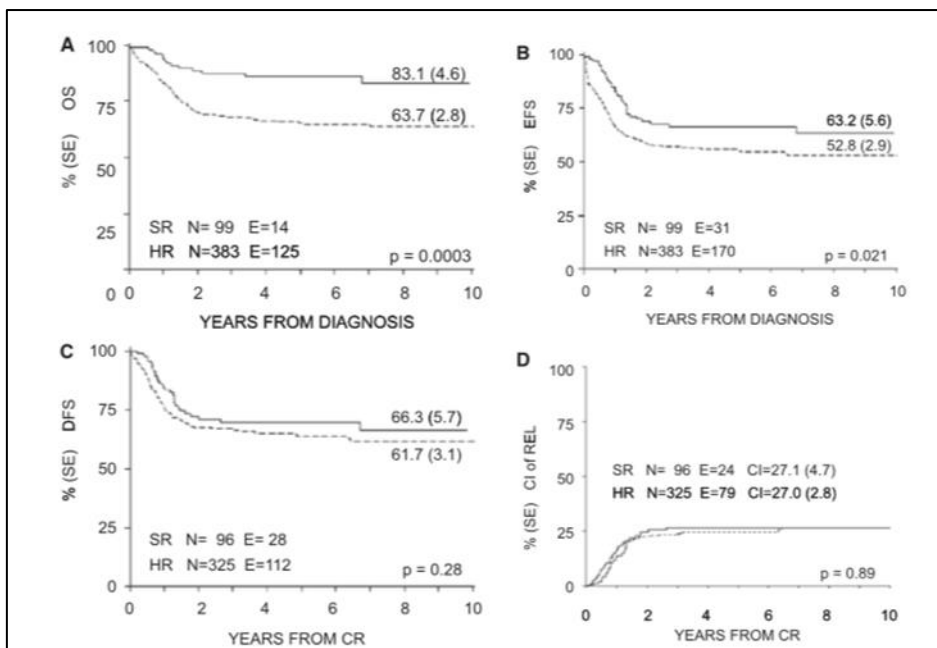


Figura 17: Protocollo LAM 2002/01 OS, EFS, DFS e CI di relapse a 8 anni dei pazienti SR e HR (62).

Evidente la differenza dell'OS fra pazienti SR e HR, rispetto alla differenza dell'EFS, dovuta alla più alta proporzione di pazienti SR che guariva dopo la seconda linea di

terapia. **L'outcome dei pazienti SR risultò inaspettatamente peggiore nel protocollo AIEOP LAM 2002/01 rispetto a quello riportato dagli altri gruppi internazionali.**

In analisi multivariata rappresentavano elementi di poor EFS la stratificazione, i GB all'esordio $\geq 100.000/\text{mmc}$ e il cariotipo monosomico.

Prognosi peggiore nei pazienti con cariotipo monosomico era stata riportata nei pazienti adulti (63), ma rappresentava una nuova osservazione per i pazienti in età pediatrica, dal momento che in precedenza era stato definito l'impatto prognostico negativo esclusivamente della monosomia del cromosoma 7 (64).

Globalmente tutti i gruppi internazionali ottennero un incremento della OS con risultati comparabili, anche se con l'utilizzo di differenti schemi di chemioterapia nella prima decade degli anni 2000 (tab.20).

Study Group	Study	Periode	Patients (N)	EFS (%)	OS (%)	Relapse (%)	Source
AIEOP	AML2002/01	2002-2011	482	8-years 55.0 $\pm$ 2.6	8-years 67.7 $\pm$ 2.4	24	Pession et al. 2013
AML-BFM	AML-BFM 2012	2012-2018	324	5-years 65 $\pm$ 3	5-years 82 $\pm$ 3	22	Waack et al. 2020
	AML-BFM 2004	2004-2010	521	5-years 55 $\pm$ 2	5-years 74 $\pm$ 2	29	Creutzig et al. 2013
COG	AAML03P1	2003-2005	340	3-years 53 $\pm$ 6	3-years 66 $\pm$ 5	33 $\pm$ 6	Cooper et al. 2012
	AAML0531	2006-2010	1022	3-years 53.1 vs. 46.9	3-years 69.4 vs. 65.4	32.8 vs. 41.3	Garnis et al. 2014
JACLS	AAML1031	2011-2016	1097	3-years 45.9 $\pm$ 3	3-years 65.4 $\pm$ 3	47.2	Aplenc et al. 2020
	AML99	2000-2002	240	5-years 61.6 $\pm$ 6.5	5-years 75.6 $\pm$ 5.3	32.2	Tsukimoto et al. 2009
JPLSG	AML05	2006-2010	443	3-years 54.3 $\pm$ 2.4	3-years 73.2 $\pm$ 2.3	30.3	Tomizawa et al. 2013
MRC	MRC AML12	1995-2002	564	10-years 54	10-years 63	32	Gibson et al. 2011
	MRC AML 17	2010-2014			5-years 74		Burnett et al.
NOPHO	NOPHO AML 2004	2004-2009	151	3-years 57 $\pm$ 5	3-years 69 $\pm$ 5	30	Abrahamsson et al. 2011
							Hasle et al. 2012
PPLSG	PPLSG AML-98	1998-2002	195	5-years 46 $\pm$ 5	5-years 53 $\pm$ 5	24	Duzniowska et al. 2010
	AML-BFM 2012	2015-2019	131	3-years 67 $\pm$ 5	3-years 75 $\pm$ 5	17	Czogala et al. 2021
SJCRH	AML02	2002-2008	216	3-years 61	3-years 71		Rubnitz et al. 2010
	AML08	2008-2017	285	3-years 52.9	3-years 74.8	21	Rubnitz et al. 2019

AIEOP (Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica), AML-BFM (Berlin, Frankfurt, Münster), COG (Childhood Oncology Group), JACLS (Japanese Association of Childhood Leukemia Study), JPLSG (Japanese Pediatric Leukemia Study Group), NOPHO (Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology), MRC (Medical Research Council), PPLSG (Polish Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group), SJCRH (St. Jude Children's Research Hospital).

Tabella 20: Outcome LAM pediatriche. Trial clinici dei gruppi pediatrici internazionali prima decade anni 2000 (65).

Nell'ambito del trial AIEOP LAM 2002, la terapia adattata al rischio e un più ampio utilizzo del trapianto di midollo consentirono un miglioramento significativo dell'outcome rispetto ai precedenti protocolli AIEOP (55) (tab.21).

	I ciclo	II ciclo	Numero di pazienti n	Remissioni complete n (%)	Decessi precoci n (%)	Non risposte n (%)	OS		EFS	
							5 aa (%)	10 aa (%)	5 aa (%)	10 aa (%)
Protocollo AIEOP LAM-82	DA: 3+7 Dauno 45 mg/mq/die infusione ev 30 min gg 1,2,3 Citarabina 200 mg/mq/die i.c. ev gg 1-7	DA: 2+5 Dauno 45 mg/mq/die infusione ev 30 min gg 1,2 Citarabina 200 mg/mq/die i.c. ev gg 1-5	171	141 (82.4)	15 (8.8)	15 (8.8)	41.5	36.6	31.1	29.0
Protocollo AIEOP LAM-87	DA : vedi Protocollo 82	DA : vedi Protocollo 82	151	124 (82.1)	8 (5.3)	19 (12.6)	41.8	41.1	27.4	26.0
Protocollo AIEOP LAM-87M	DA : vedi Protocollo 82	DA : vedi Protocollo 82	77	50 (64.9)	11 (14.3)	16 (20.8)	35.1	32.2	15.6	15.6
Protocollo AIEOP LAM-92	ICE: (3+5+10) ^b Idarubicina 12 mg/mq/die infusione ev 1 ora gg 1,3,5 Etoposide 100 mg/mq/die infusione ev 1 ora gg 1-5 Citarabina 25 mg/mq/die infusione ev push gg 1 seguita da 100 mg/mq/die i.c. gg 1-10	ICE: (2+3+7) ^c Idarubicina 12 mg/mq/die infusione ev 1 ora gg 1,3 Etoposide 100 mg/mq/die infusione ev 1 ora gg 1-3 Citarabina 25 mg/mq/die infusione ev push gg 1 seguita da 100 mg/mq/die i.c. gg 1-7	160	142 (88.8)	10 (6.2)	8 (5.0)	59.5	54.8	53.5	51.6
Protocollo AIEOP LAM-2002	ICE: (3+5+7) Idarubicina 10 mg/mq/die infusione ev 4 ore gg 1-3 Citarabina 200 mg/mq/die i.c. ev gg 1-7 Etoposide 100 mg/mq/die infusione ev 1 ora gg 1-5	ICE: (3+5+7) Idarubicina 10 mg/mq/die infusione ev 4 ore gg 1-3 Citarabina 200 mg/mq/die i.c. ev gg 1-7 Etoposide 100 mg/mq/die infusione ev 1 ora gg 1-5	482	424 (87.9)	48 (9.9)	13 (2.6)	67.7		55.0	

^a Decessi precoci sono definiti come i decessi prima del giorno 42

^b Questo ciclo è stato ripetuto due volte per i bambini con remissione parziale

^c Solo per i pazienti che hanno ottenuto una remissione completa dopo il primo ciclo ICE

Tabella 21: Outline comparativi e risultati dei protocolli AIEOP LAM 82-2002/01 (55).

Studio AIEOP LAM 2013/01

Le acquisizioni emerse dalle esperienze maturate nelle generazioni successive dei protocolli AIEOP, in particolare l'analisi dei dati dal protocollo LAM 2002/01 e i dati delle esperienze internazionali, costituirono le basi per il disegno del protocollo AIEOP LAM 2013/01.

L'innovazione più significativa fu l'introduzione dello studio della MRD valutata in citofluorimetria (CFM-MRD) dopo il primo e il secondo ciclo di Induzione.

Lo sviluppo delle tecniche, come l'immunofenotipo *multicolor* e la PCR quantitativa iniziò negli anni '90, e nel corso della prima decade degli anni 2000 numerosi studi hanno analizzato e confermato l'utilità della CFM per la valutazione della malattia occulta in pazienti in remissione morfologica e il suo impatto prognostico.

La correlazione della CFM-MRD con il rischio di recidiva fu valutato nell'ambito del Children's Cancer Group su 252 pazienti pediatrici con LAM in remissione morfologica (66). Tale osservazione fu confermata su una casistica pediatrica in ambito I-BFM, in cui si evidenziò come la CFM-MRD eseguita a *time points* precoci rappresentava un indice predittivo significativo dell'*outcome* in termini di EFS a 3 anni: in particolare, prima del secondo ciclo di induzione, la CFM-MRD differenziava i pazienti pediatrici a buona o a cattiva prognosi (67).

Lo studio SJCRH AML02 evidenziò l'alta incidenza di recidive in pazienti con MRD $\geq 1\%$ dopo il primo ciclo di induzione e $\geq 0.1\%$ dopo il secondo ciclo (42). Nell'ambito delle società scientifiche Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) ANLL 97, e Medcal Research COUNCIL -UK (MRC 12) trials si confermò il significato prognostico positivo della CFM-MRD misurata dopo il primo e il secondo ciclo di induzione (68). Nello studio NOPHO 2004 si definì ulteriormente la differenza prognostica della CFM-MRD rispetto alla valutazione morfologica (69).

Presso il laboratorio AIEOP di riferimento dell'Emato-Oncologia dell'Università di Padova, fu fatta una analisi retrospettiva di una proporzione significativa di pazienti arruolati nel protocollo LAM 2002/01, con l'obiettivo di valutare il ruolo prognostico della MRD durante la terapia di induzione (43).

Tale studio ha confermato la correlazione tra MRD, valutata mediante CFM al termine del primo ciclo di induzione, e outcome. Il riscontro di una MRD positiva ($\geq 0.1\%$) precocemente nel corso della terapia (termine del primo ICE) correlava con una prognosi sfavorevole.

Si studiò inoltre il comportamento della MRD dopo il secondo ciclo di induzione nei pazienti MRD positivi: DFS risultò significativamente differente ($p = 0.037$) in base al risultato della MRD $< 0.1\%$ o $\geq 0.1\%$ alla fine dell'induzione 2, ma la positività dopo il primo ciclo ICE rappresentava un fattore prognostico indipendente.

Il significato dello studio della MRD molecolare mediante PCR per ricercare la presenza di trascritti prodotti dai geni di fusione o mutati individuati alla diagnosi, al momento della costruzione del protocollo LAM 2013 era ancora in fase di valutazione e ancora dibattuto (70). Gli studi pediatrici ancora limitati comprendevano in particolare sottogruppi di pazienti con t(8;21) e inv(16), si decise pertanto di non utilizzare la RT-PCR per la stratificazione dei pazienti nel protocollo AIEOP-LAM 2013.

Per la prima volta i pazienti vennero stratificati in 3 fasce di rischio (SR/IR/HR) sulla base delle lesioni molecolari valutate alla diagnosi e alla clearance della MRD (tab.22).

STANDARD RISK (SR) 20-22%	Anomalie CBF β (senza altre anomalie citogenetiche) e MRD < 0.1% al TP1 - t(8;21)(q22;q22)/inv(16)(p13q22)t(16;16)(p13;q22) Pazienti con cariotipo normale e mutazioni di NPM-1 con MRD < 0.1% al TP1
INTERMEDIATE RISK (IR) 50-55%	Cariotipo normale t(9;11)(p22;q23) senza altre anomalie citogenetiche t(1;11)(p32;q23) t(11;19)(p13;q23) t(16;21)(p11;q22)/FUS-ERG, t(3;5)(q25;q34) Altre anomalie citogenetiche M7 con t(1;22), indipendentemente dall'età del paziente Pazienti non altrimenti stratificabili a SR e HR MRD al TP1 > 0.1% ma < 1% e con MRD al TP2 < 0.1%
HIGH RISK (HR) 25-30%	Anomalie citogenetiche associate ad outcome sfavorevole: - Cariotipo complesso (≥ 3 anomalie numeriche o strutturali) - Cariotipo monosomico, (-7, -5, altro) § - t(9;11)(p22;q23) associata ad altre anomalie citogenetiche - Anomalie citogenetiche comprendenti 11q23 non incluse nel IR: t(11;17)(q23;q21), t(10;11)(p12;q23), t(4;11)(q21;q23), t(6;11)(q27;q23), t(x;11) - Anomalie citogenetiche rare: t(6;9)(p23;q34), t(8;16)(p11;p13), t(9;22)(q34;q11) t(5;11)NUP98/NSD1, t(4;11)MLL/ArgBP2 FLT3-ITD Pazienti con LAM citogeneticamente normale e con il trascritto di fusione CBFA2T3-GLIS2 FAB M0, M6, M7 senza t(1;22) Infants (esclusi i pazienti con LAM M7 con t(1;22)) Pazienti non in remissione completa morfologica al termine del primo ciclo di induzione MRD > 1% al TP1 o > 0.1% al TP2 Pazienti con criteri non-SR e WBC >100.000/ μ L

Tabella 22: Criteri di stratificazione protocollo AIEOP LAM 2013/01 (estratto dal protocollo LAM 2013).

Nella fascia di rischio SR, oltre alle LAM con anomalie del CBF, si inseriscono le LAM con riarrangiamento NPM1 per le quali era stata dimostrata una valenza prognostica favorevole (22).

Nella fascia di rischio HR furono inseriti i pazienti con **cariotipo complesso** (definito come 3 o più alterazioni strutturali e/o numeriche con esclusione delle anomalie del CBF), **monosomico** (-7, -5), con **riarrangimenti di MLL** (oggi KMT2A) diversi da t(9;11), t(11;19) e t(1;11), o con **anomalie genetiche rare** [t(6;9), t(8;16), t(9;22), t(5;11)NUP98/NSD1, t(4;11)MLL/ArgBP2]. Venivano inoltre considerati HR i pazienti con il trascritto di fusione **CBFA2T3-GLIS2** e mutazione di **FLT3-ITD**.

Per caratteristiche cliniche erano trattati come HR gli infants, esclusi quelli con LAM M7 e t(1;22), e i pazienti con GB $\geq 100.000/\text{mmc}$ non SR per assetto genetico.

Per fenotipo FAB erano considerati a prognosi sfavorevole e considerati HR i pazienti con LAM M0, M6 e M7 in assenza di t(1;22).

Nella fascia a Rischio Intermedio furono inseriti tutti i pazienti con anomalie genetiche e caratteristiche cliniche non comprese nelle altre fasce di rischio.

Per quanto riguarda la stratificazione per risposta al trattamento e clearance della MRD venivano confermati essere a Rischio Standard i pazienti della fascia SR con CFM-MRD < 0.1% dopo il primo ciclo ICE. I pazienti a Rischio Intermedio con CFM-MRD

I pazienti IR dopo i 2 cicli di consolidamento AVE e HAM procedevano con TCSE se disponibile un donatore familiare HLA-identico o con un terzo ciclo di chemioterapia, inizialmente FLAMSA (Fludarabina, Amsacrina e Citarabina), che dal 2018, per eccesso di tossicità fu sostituito con il ciclo HD Ara-C. **Eliminata l'opzione del trapianto autologo nei pazienti che non disponevano di donatore familiare identico.**

I pazienti della fascia HR dopo i 2 cicli AVE e HAM venivano sottoposti a TCSE da qualunque donatore: MSD, MUD o donatore familiare HLA-parzialmente compatibile (aploidentico).

Per tutta la fase del programma di chemioterapia la profilassi del SNC veniva attuata con la triplice terapia intratecale, prima volta nell'ambito dei protocolli AIEOP.

Nel protocollo LAM 2013 aperto all'arruolamento da giugno 2015 a luglio 2022 sono stati arruolati 371 pazienti. I risultati del protocollo sono stati oggetto di presentazione orale in occasione del congresso dell'“*American Society of Hematology*” (ASH) nel 2023 e attualmente il lavoro è in fase di pubblicazione. Nella tabella 23 vengono riportate le caratteristiche dei pazienti (52).

	N	%
All patients	371	
M/F	198/173	53/47
Age (years, range)	10 (0.1-17.9)	
infants	28	
WBC at diagnosis (/mcl, range)	19600 (540-880000)	
SR/IR/HR	72/81/218	19/23/58
KMT2A-rearranged	75	
M0/M6/M7	32/7/28	9/2/8
TP1<0.1%	261	73*
TP2<0.1%	303	84*
* of evaluable patients		

Tabella 23: Caratteristiche dei pazienti arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2013/01 (52).

Un marker genetico è stato messo in evidenza in 247/371 pazienti (67%). Dopo l'induzione 72 (19%) erano i pazienti SR, 81 (23%) IR e 218 (58%) HR. Il 92% dei pazienti ha raggiunto la RC morfologica dopo i 2 cicli di induzione, rispetto all'87% del precedente protocollo LAM 2002/01 ($p<0.05$).

L'OS e l'EFS a 3 anni (follow-up medio 4.5 anni) di tutta la coorte dei pazienti è risultata 83.9% e 68.5% rispettivamente, valori significativamente migliori rispetto al protocollo LAM 2002/01 ($p<0.01$). L'OS nei pazienti SR, IR e HR rispettivamente 99.2%, 84.2% e 79.4% ($p=0.01$). La disease-free survival (DFS) è stata 74.3%, senza differenza tra i 3 gruppi di rischio, con una incidenza cumulativa di recidiva (CIR) a 3 anni del 18.9% (63 pazienti recidivati) (fig.19). La sopravvivenza degli infants trattati è stata particolarmente buona con una EFS a 3 anni del 78.3%. Per quanto riguarda le anomalie genetiche i 35 pazienti con FLT3-ITD hanno avuto EFS del 57.1% mentre i 75 con riarrangiamenti di KMT2-A del 64.7%.

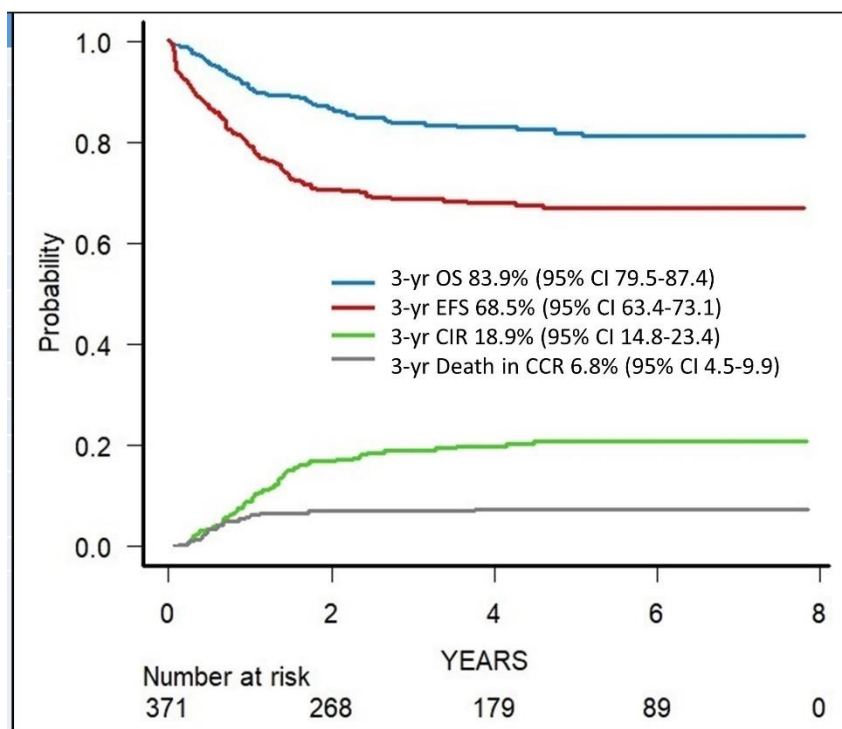


Figura 19: Outcome globali dei pazienti trattati secondo protocollo AIEOP LAM 2013/01 (52).

Non è risultata significativa la differenza in EFS fra i pazienti IR e HR trattati con un secondo ciclo ICE rispetto al ciclo FLA-L-Doxo in induzione.

In totale sono stati trapiantati 160 pazienti, ottenendo una OS e DFS a 3 anni rispettivamente di 87.7% e 85.1%, senza differenze in base al tipo di donatore. Tutti i pazienti IR sottoposti a trapianto sono vivi in RC (DFS 100%), rispetto ai 71 non trapiantati (DFS 72.1%, $p=0.07$).

Lo studio della MRD in CFM ha confermato il valore prognostico del cut-off $< 0.1\%$ dopo il primo ciclo e dopo il secondo ciclo di induzione, in particolare l'EFS è stata 76% e 48% nei pazienti con MRD TP2 $< e > 0.1\%$ rispettivamente ($p<0.01$).

In conclusione, le strategie del protocollo AIEOP LAM 2013/01 hanno determinato un netto miglioramento della sopravvivenza dei pazienti affetti da LAM: i dati di OS e di EFS del protocollo LAM 2013/01 sono significativamente migliori rispetto a quelli del protocollo LAM 2002/01.

Studio AIEOP-BFM AML 2020, il presente

È acquisito che la terapia della LAM pediatrica è basata su chemioterapia intensiva, consolidata nel 50% dei pazienti con trapianto di midollo allogenico. L'intensificazione della chemioterapia ha determinato il miglioramento della sopravvivenza, ma presenta contestualmente complicanze tossiche acute e a lungo termine.

Le nuove terapie devono essere costituite in massima parte da farmaci target presumibilmente con minori effetti collaterali e non devono avere un impatto negativo sui buoni risultati raggiunti.

Lo sviluppo di nuovi farmaci può avvenire solo attraverso la collaborazione dei gruppi di studio internazionali e recentemente è stato approvato dagli enti regolatori internazionali e avviato il nuovo protocollo per il trattamento della LAM pediatrica ideato nell'ambito delle maggiori società scientifiche europee AIEOP e BFM a cui si sono associate la maggior parte dei gruppi europei: il protocollo AIEOP-BFM-AML 2020 (fig.20).

All'apertura dello studio per i pazienti con nuova diagnosi di LAM in induzione era previsto un random tra i 2 cicli di induzione (ICE e HAM) versus due cicli con CPX-351. Tale disegno era stato motivato dalla positiva esperienza dell'utilizzo di CPX-351 in induzione in pazienti con LAM pediatrica in prima recidiva (COG AAML 1421) (72) e nei pazienti anziani con *poor-risk LAM* (73). In concomitanza dell'elaborazione del protocollo AIEOP-BFM e del processo di apertura in ambito europeo, il gruppo COG avviava nel corso del 2022 uno studio analogo randomizzato per valutare l'efficacia di CPX-351 + GO (Gentuzumab Ozogamicin, Mylotarg), anticorpo monoclonale anti CD33 coniugato con l'antraciclinico Calicheamicina) nelle LAM de novo pediatriche (COG AAML 1831) rispetto al ciclo di induzione tradizionale (Daunoblastina + Citarabina) + GO. Tale studio veniva chiuso precocemente a fine 2023 per inefficacia di CPX-351 (OS 75.5% vs 80.5%) (54). In considerazione di tale "*alert*" si effettuava una analisi ad interim dopo circa 12 mesi dall'apertura dello studio AIEOP-BFM, che mostrava risultati simili a quelli del protocollo COG 1831. La randomizzazione è stata

quindi chiusa il 30 novembre 2025 e tutti i pazienti sono trattati con i 2 cicli di induzione ICE e HAM.

A seguire, dopo l'induzione, sono previsti 2 cicli di consolidamento AE (Ara-C alte dosi + VP-16) e haM (Ara-C + Mitoxantrone), uguali per entrambi i gruppi.

In base alle caratteristiche genetiche all'esordio e alla risposta ai 2 cicli di induzione i pazienti vengono distinti in A1 (SR), A2 (IR), A3 (HR) (tab.24). Per i pazienti IR è previsto un ulteriore ciclo di Ara-C ad alte dosi (HA), mentre i pazienti HR sono candidati a TCSE allogenico in presenza di donatore familiare HLA-identico o MUD.

Per le forme recidivate/refrattarie è previsto un random nel primo ciclo di re-induzione: Ida + FLA versus FLA + GO, a seguire secondo ciclo di re-induzione uguale con FLA, per poi procedere al TCSE allogenico.

Anche per quanto riguarda il trapianto è prevista una randomizzazione per il tipo di regime di condizionamento: Treosulfano (Treo) + Fluda +Thiotepa (TT) versus Busulfano Bu + Cy + Mel.

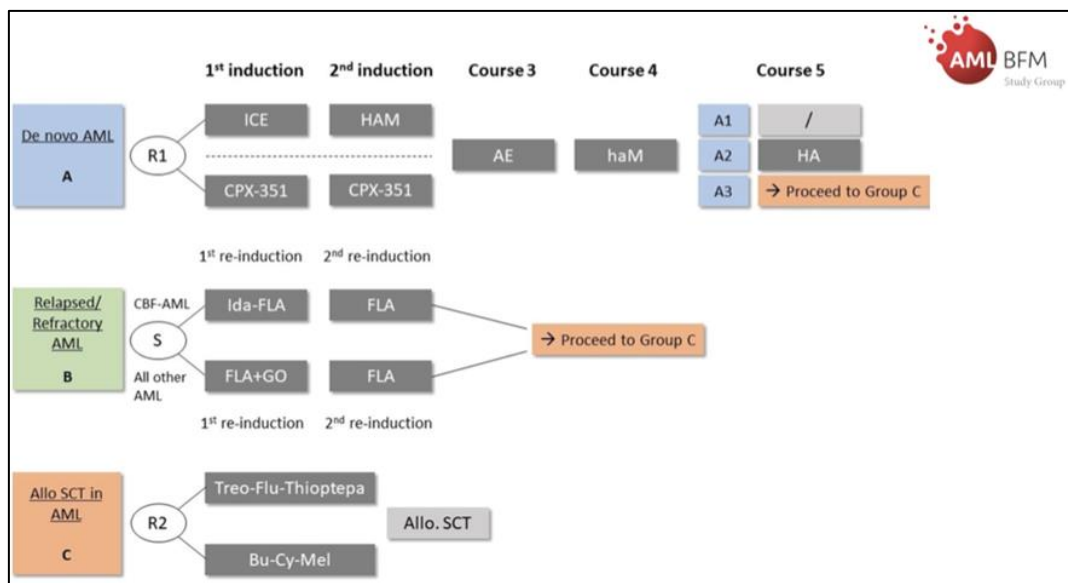


Figura 20: Outline protocollo AIEOP-BFM LAM 2020 (estratto dal protocollo AIEOP-BFM LAM 2020).

RISK GROUP	GENETIC RISK CRITERIA	RESPONSE CRITERIA
STANDARD RISK (SR)	• CBFβ abnormalities • t(8;21)(q22;q22) with adequate (≥ 2 log) reduction by qPCR at IND 2 • inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) • Biallelic CEBPα aberrations • NPM1 mutations • t(16;21) CBFA2T3/RUNX1 and FLT3-ITD negative	Genetic standard risk and • MRD <0.1% at IND 2 t(8;21) and • MRD >2 log reduction at IND 2 (qPCR)
INTERMEDIATE RISK (IR)	• NON SR and NON HR patients	Genetic standard or intermediate risk and • MRD at IND 1 $\geq 0.1\%$ and <1% and MRD at IND 2 < 0.1%
HIGH RISK (HR)	• Complex karyotype (≥ 3 aberrations including at least one structural aberration) excluding those with recurrent translocations • Monosomal Karyotype, i.e. -7, -5/del(5q) • 11q23/KMT2A rearrangements involving: • t(4;11)(q21;q23) KMT2A/AFF1 • t(6;11)(q27;q23) KMT2A/AFDN • t(10;11)(p12;q23) KMT2A/MLLT10 • t(16;21)(p11;q22) FUS/ERG • t(9;22)(q34;q11.2) BCR/ABL1 • t(6;9)(p22;q34) DEK/NUP214 • t(7;12)(q36;p13) MNX1/ETV6 • inv3(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) RPN1/MECOM • 12p abnormalities • FLT3-ITD with AR ≥ 0.5 not in combination with other recurrent abnormalities or NPM1 mutations • WT1 mutation and FLT3-ITD • inv(16)(p13q24) CBFA2T3/GLIS2 • t(5;11)(q35;p15.5) NUP98/NSD1 and t(11;12)(p15;p13) NUP98/KDM5A • Pure Erythroid leukemia	• MRD $\geq 1\%$ at IND 1 or ≥ 0.1 at IND 2 or (only if FLOW-result not available/informative) blast count $\geq 5\%$ at IND 1

Tabella 24: Stratificazione pazienti in gruppi di rischio secondo protocollo AIEOP-BFM LAM 2020 (estratto dal protocollo AIEOP-BFM LAM 2020).

Nel protocollo AIEOP-BFM LAM 2020 per la prima volta è stato introdotto l'utilizzo sistematico dello studio della MRD molecolare (RT-qPCR) per stratificare i pazienti con t(8;21)/RUNX1::RUNX1T1 sulla base della valutazione della EFS e del rischio di relapse dei pazienti con tale caratteristica genetica arruolati nel protocollo AIEOP-LAM 2013/01 (74).

La riduzione di 2 logaritmi rispetto alla diagnosi della MRD molecolare (MMRD) misurata tramite RT-qPCR dopo i primi 2 cicli di chemioterapia rappresenta un fattore prognostico indipendente (EFS: 47% vs 88%, $p=0.004$): i pazienti con t(8;21) che non ottengono una riduzione di almeno 2 Log dopo i 2 cicli di induzione saranno stratificati come IR e non SR (75).

La stratificazione dei pazienti con inv(16)(CBF::MYH11) proseguiranno, come per il protocollo precedente, ad essere stratificati mediante citometria a flusso (CFM-MRD), in quanto non è stata messa in evidenza una correlazione significativa con il comportamento precoce della MRD e il rischio di recidiva (fig.21) (75).

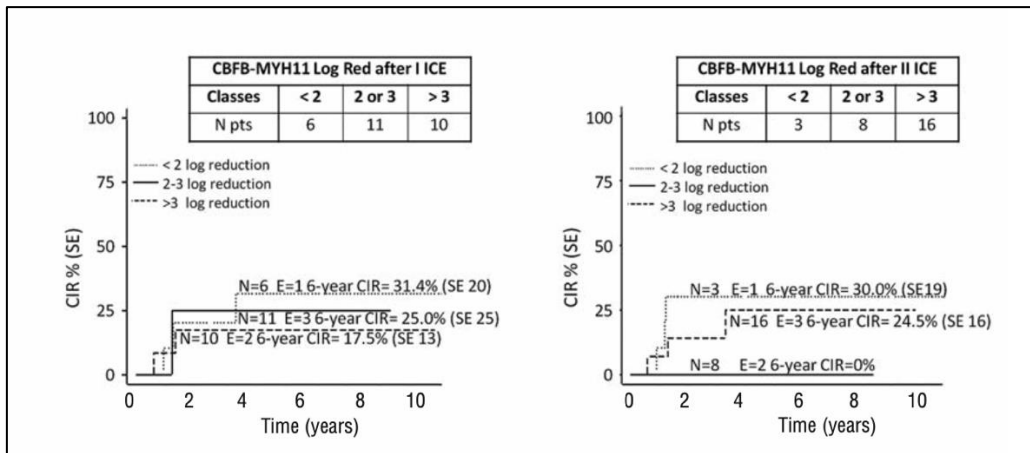


Figura 21: Incidenza cumulativa di relapse in pazienti con inv16(CBF::MYH11) sulla base del logaritmo di riduzione della MRD dopo il primo e il secondo ciclo di Induzione (75).

Il Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche, a che punto siamo

Come abbiamo ampiamente riportato, una terapia di induzione aggressiva e una efficace terapia di consolidamento post-induzione rappresentano la strategia ottimale per le LAM in bambini, adolescenti e giovani adulti, che hanno raggiunto la prima remissione completa, per ridurre l'incidenza cumulativa di recidiva, che rimane ancora elevata, attorno al 25-35% (76).

Prima del 1990, pochi miglioramenti in termini di OS furono raggiunti con i protocolli di induzione seguiti dalla sola chemioterapia aggressiva o, quando disponibile, TCSE da MSD. Diversi studi, tuttavia, evidenziarono come l'outcome a lungo termine fosse migliore nei pazienti sottoposti ad allo-TCSE. Il trapianto autologo come terapia di consolidamento veniva largamente applicato in quanto procedura applicabile in tutti i pazienti in remissione senza la necessità di trovare un donatore compatibile. Woods et al. nel 2000 pubblicarono i dati di un trial randomizzato prospettico di comparazione tra 3 diverse strategie di terapia post remissione: allo-TCSE da MSD, auto-TCSE o sola chemioterapia aggressiva. Furono arruolati 537 bambini/adolescenti in RC1. L'OS globale a 8 anni fu del $54\% \pm 4\%$ così suddivisi per tipo di regime terapeutico assegnato: allo-TCSE $60\% \pm 9\%$, auto-TCSE $48\% \pm 8\%$, chemioterapia $53\% \pm 8\%$. L'OS nel gruppo allo-TCSE era significativamente superiore rispetto all'auto-TCSE ($p = .002$) e alla sola chemioterapia ($p = 0.05$), legata soprattutto ad un minor tasso di recidiva. Nessuna differenza veniva evidenziata tra auto-TCSE e sola chemioterapia ($p = 0.21$). Gli autori concludevano quindi come l'allo-TCSE fosse il

trattamento di scelta in bambini e adolescenti con LAM in RC1, quando disponibile MSD, abbandonando l'uso dell'auto-TCSE (77) (tab.25).

	Allogeneic BMT		Autologous BMT		Chemotherapy	
		P value (allo vs auto)		P value (auto vs chemo)		P value (chemo vs allo)
All patients (n = 537)	181		177		179	
Survival	60% ± 9%	.002	48% ± 8%	.21	53% ± 8%	.05
Disease-free survival	55% ± 9%	.001	42% ± 8%	.31	47% ± 8%	.01
Patients receiving intensive-timing induction (n = 336)	113		115		108	
Survival	70% ± 9%	.006	54% ± 9%	.67	57% ± 10%	.02
Disease-free survival	66% ± 9%	.003	48% ± 9%	.53	53% ± 10%	.02

Tabella 25: Outcome a 8 anni in base ai 3 diversi regimi post-remissione (45).

Da un'ulteriore revisione sistematica, l'allo-TCSE risultava associato ad un significativo ridotto RR, seppur con maggior rischio di TRM e di tossicità prolungata rispetto alla sola chemioterapia come consolidamento. L'OS risultava comparabile e gli autori calcolavano che per 10 pazienti trapiantati si evitava 1 recidiva (78).

Sulla base di tali risultati e soprattutto su una migliore stratificazione dei pazienti in fasce di rischio, nella maggior parte dei protocolli attivati dopo il 2010 è stata modificata l'indicazione ad attuare TCSE in base alla disponibilità di MSD in tutti i pazienti in RC1 e limitata generalmente ai pazienti definiti HR per rischio genetico o per risposta al trattamento di induzione.

Come già esposto, nella popolazione pediatrica l'allo-TCSE è riservato alle LAM in RC1 ad alto rischio di recidiva per caratteristiche citogenetiche e molecolari della malattia o per risposta alle terapie misurata in MRD, alle LAM recidivate in RC2, alle forme post terapia citotossica o *myelodysplasia-related*.

Una meta-analisi in ambito AIEOP del 2022 dimostra come nei pazienti ad alto rischio sottoposti ad allo-TCSE in RC1, sia l'OS (rischio relativo 1.15, $p = 0.0006$) che la DFS (rischio relativo 1.31, $p = 0.0001$) siano migliori rispetto alla sola chemioterapia, associata invece a maggiore rischio di recidiva (rischio relativo 1.26, $p = 0.006$) (76).

La probabilità di trovare un donatore familiare HLA-identico è però del 30%. Negli ultimi anni, lo sviluppo delle tecniche trapiantologiche da donatori alternativi, soprattutto HLA-identico non familiare (MUD), ha permesso di estendere questa strategia terapeutica anche a coloro privi di MSD, con risultati di outcome sovrapponibili, aumentando il pool di donatori disponibili (79).

Da un'analisi retrospettiva su 30 pazienti sottoposti a trapianto per LAM in RC1 tra giugno 2002 e agosto 2005, di cui 13 da MUD e 17 da MSD, si evidenziano tassi di

EFS a 3 anni del 77% e 71% e di OS del 77% e 76%, rispettivamente (fig.22), con incidenza di Graft versus Host Disease (GvHD) acuta e cronica sovrapponibile nei due gruppi. Il trapianto da MUD risulta quindi indicato per i pazienti affetti da LAM in fase RC1 che non hanno un familiare HLA-identico (80).

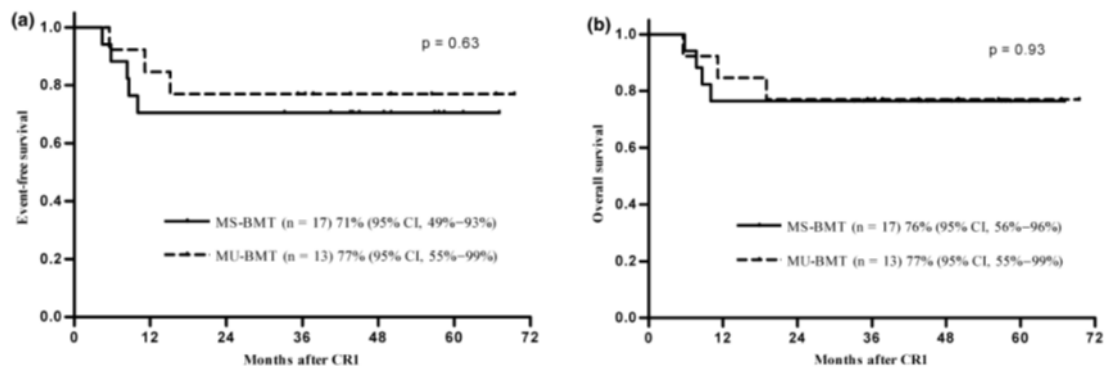


Figura 22: Curve per EFS (a) e OS (b) a 3 anni per MSD-TCSE e MUD-TCSE (80).

Nel 20-30% dei pazienti candidati a trapianto non si identifica un donatore MUD nei registri internazionali donatori. Recentemente, il trapianto da donatore familiare aploidentico è emerso quindi come valida alternativa, con il vantaggio della rapida disponibilità del donatore per quasi tutti i pazienti, associandolo alle nuove strategie di T deplezione sviluppate per superare la disparità dell'HLA, per migliorare la ricostituzione immunitaria e ridurre la GvHD.

Le due piattaforme utilizzate sono:

- T deplezione ex vivo del graft prima che venga infuso mediante rimozione dei linfociti T $\alpha\beta$ e dei linfociti B CD19+;
- T deplezione in vivo con somministrazione di Ciclofosfamide post trapianto (PT-Cy) (2 dosi da 50mg/kg a +3 e +5), che è in grado di eliminare le cellule T alloreattive, preservando le cellule emopoietiche, le cellule T memoria e regolatorie.

Per quanto riguarda la prima piattaforma Bertaina et al. nel confrontare i risultati di 98 pazienti pediatrici sottoposti a trapianto aploidentico $\alpha\beta$ depleto con 127 MUD e 118 mismatched-UD (MMUD), riportano valori di DFS a 5 anni sovrapponibili (67%, 55%, e 62%, rispettivamente), con più bassa incidenza di GVHD acuta nel gruppo degli aploidentici (GVHD grado II-IV del 35% vs 44% vs 16%, rispettivamente) (81).

Nel caso della piattaforma PT-Cy in uno studio multicentrico retrospettivo del “Pediatric Diseases Working Party” (PDWP) dell’ “European Society for Blood and Marrow Transplantation” (EBMT) vengono confrontati gli outcome trapiantologici in

pazienti pediatrici (<18 anni) con LAM in RC1 e RC2, di cui 253 da MUD e 95 da donatore aploidentico. A 2 anni i dati non mostrano differenze significative per OS (78.4% vs 71.5%, $p=0.19$), Leukemia Free Survival (LFS) (72.7% vs 69.5%; $p=0.41$), incidenza cumulativa di recidiva (RI) (19.3% vs 19.5%; $p=0.68$), NRM (non relapse mortality) (8% vs 11%; $p=0.39$) e sopravvivenza libera da GvHD (60.7% vs 54.5%, $p=0.09$) dopo MUD o aplo-HSCT rispettivamente (fig.23). Il rischio di GvHD acuta grado III-IV risulta significativamente più alto nel gruppo degli aploidentici (HR=2.33, 95%CI 1.18-4.58, $p=0.03$). Tali risultati suggeriscono come tale piattaforma sia una valida opzione trapiantologica in bambini con LAM privi di donatore compatibile (82).

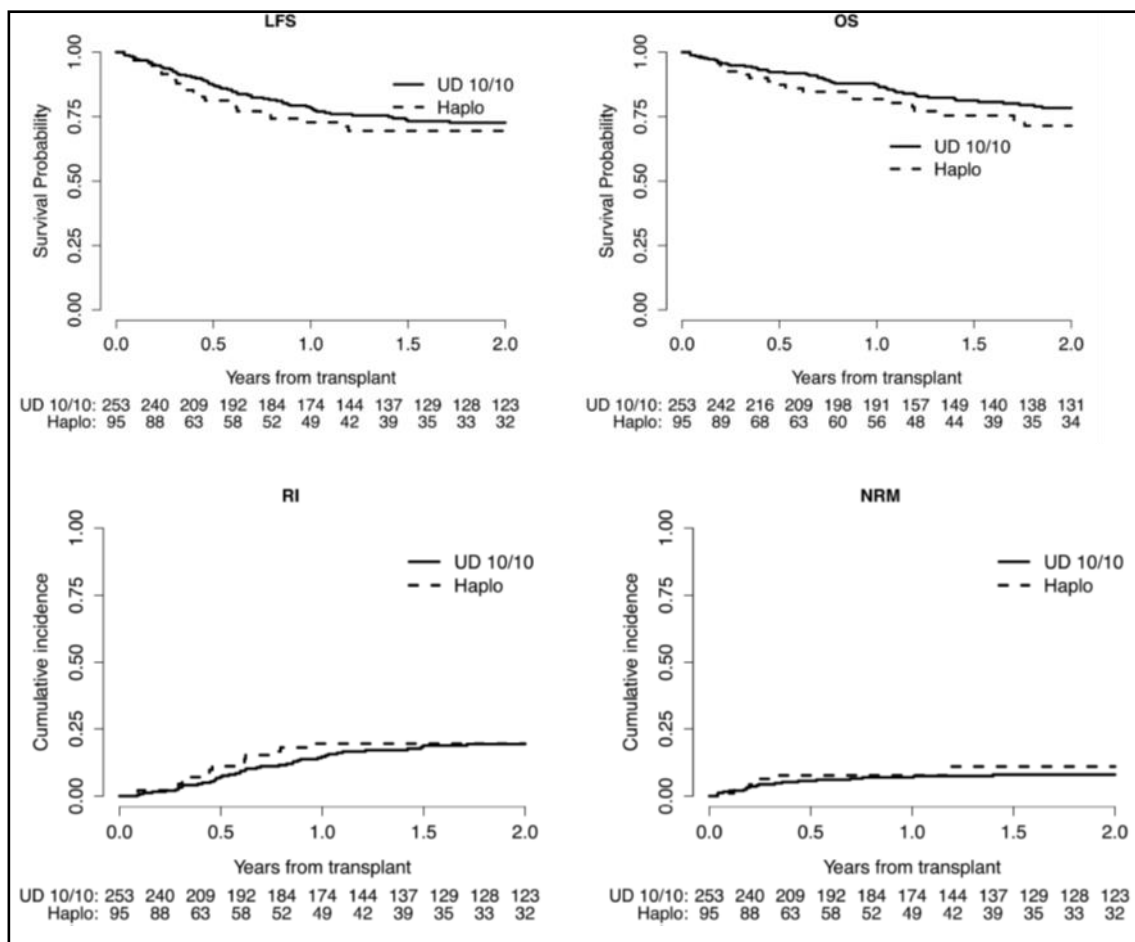


Figura 23: LFS, OS, RI, e NRM a 2 anni da donatore MUD o aploidentico (82).

Sia cellule staminali midollari (BM) che periferiche (PBSC) possono essere utilizzate come fonte per allo-TCSE e la scelta è influenzata da vari fattori, come discrepanza di

peso tra donatore e ricevente, disponibilità di eseguire espianto midollare versus aferesi e possibilità di manipolazione del graft per T deplezione. Le PBSC sono generalmente associate a maggior rischio di GvHD cronica e non sarebbero da prediligere come prima fonte, soprattutto in caso di MUD (83).

Le cellule staminali di origine cordonale (cord blood, CB) sono meno utilizzate negli ultimi anni, per quanto siano un'altra potenziale fonte di cellule staminali, per quanto associate a ritardato attecchimento e più lenta ricostituzione immunologica.

Per quanto riguarda il regime di condizionamento un regime mieloablativo (MAC) è generalmente raccomandato nelle LAM pediatriche, per quanto si debbano tenere in considerazione le possibili tossicità correlate in relazione alle pregresse terapie erogate e il performance status dei pazienti. Regimi a ridotta tossicità dovrebbero essere considerati nei pazienti a maggiore rischio di TRM, come bambini con sindromi predisponenti (es. S. di Down, anemia di Fanconi, discheratosi congenita, ecc.), con elevate comorbidità o secondi trapianti (84).

I due più comuni regimi di condizionamento storicamente utilizzati erano basati o sulla TBI (1200 cGy o 990 cGy) o sul Busulfano.

Sempre il PDWP dell'EBMT pubblicò nel 2017 uno studio retrospettivo che comparava 3 diversi regimi di condizionamento: TBI/Cy, Bu/Cy, Bu/Cy/Mel. Lo studio comprendeva 631 pazienti sottoposti ad allo-TCSE per LAM in RC1, di cui 458 da MSD e 173 da MUD. 109 pazienti furono trattati con TBI/Cy, 389 Bu/Cy e 133 Bu/Cy/Mel. A 5 anni i pazienti sottoposti a Bu/Cy/Mel presentavano un più basso tasso di recidiva (14.7% versus 31.5% in Bu/Cy versus 30% in TBI/Cy, $p < .01$, fig.24), migliori OS (76.6% versus 64% versus 64.5%, $p = .04$, fig. 25) e DSF (74.5% versus 58% versus 61.9%, $p < .01$, fig. 25), con comparabile NRM (10.8% versus 10.5% versus 8.1%, $p = .79$, fig.24). Gli autori concludevano come nella popolazione pediatrica sottoposta ad allo-HSCT per LAM in RC1, un regime di condizionamento basato su Bu/Cy/Mel fosse superiore a TBI/Cy e Bu/Cy nel ridurre il rischio di recidiva e aumentare la DFS (83).

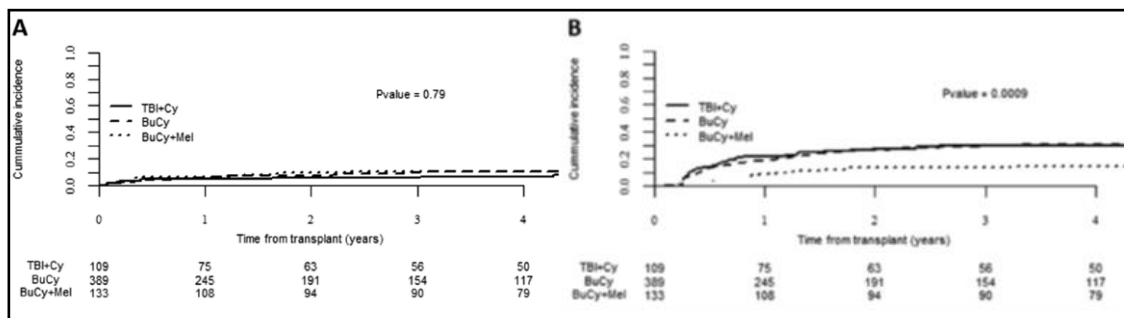


Figura 24: NRM (A) e incidenza cumulativa di recidiva (B) in base al regime di condizionamento (83).

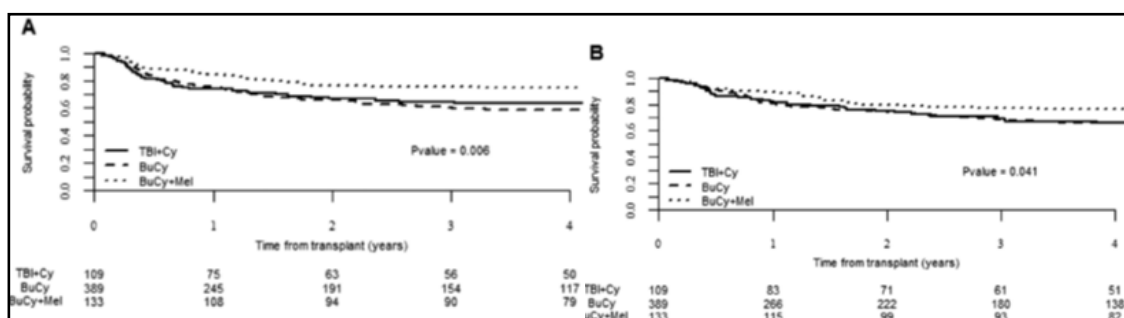


Figura 25: DSF (A) e OS (B) in base al regime di condizionamento (83).

Alla luce di tali dati, confermati da ulteriori lavori, la TBI venne progressivamente abbandonata e Bu/Cy/Mel è diventato il regime di scelta per le LAM in RC1 e RC2, con raccomandazione nel modulare la dose del Busulfano in base a peso e farmacocinetica per ridurre il rischio di tossicità e massimizzare l'efficacia.

Recentemente sono stati pubblicati i risultati del trial randomizzato GITMO AML-R2 che comparava l'associazione Bu/Cy versus Bu/Fluda come regime di condizionamento per pazienti adulti con LAM candidati a TCSE. Con un follow-up mediano di 6 anni, si è evidenziata una NRM significativamente migliore nel gruppo Bu/Fluda (10% versus 20%, $p = 0.0388$), sostenuta fino a 4 anni post trapianto, differenza maggiore nei pazienti sopra i 51 anni (11% versus 27%, $p = 0.0262$). Non si sono riscontrate differenze in termini di recidiva, DFS e OS. Sulla base di tali dati gli autori concludono come la riduzione della NRM, legata ad una ridotta tossicità precoce per il regime di condizionamento con Bu/Fluda, non impatti su maggiori recidive tardive e possa essere quindi usato come terapia standard negli adulti con LAM (85).

Più recentemente, si sono resi disponibili dati sull'uso del Treosulfano come base del regime di condizionamento nei pazienti pediatrici affetti da neoplasie e sembrano essere promettenti in termini di ridotta tossicità, soprattutto relativamente allo sviluppo di

complicanze acute e alterazioni della funzionalità gonadica a lungo termine (86). Negli adulti è stato dimostrato come regimi Treo-based abbiano effetti mieloablativi, immunosoppressivi e antineoplastici associati ad una ridotta NRM (87).

In un lavoro prospettico pediatrico, 65 pazienti con LLA (35,4%), LAM (44,6%), sindrome mielodisplastica (15,4%) o JMML (4,6%) hanno ricevuto Treosulfano per via endovenosa ad una dose variabile in base alla superficie corporea, in combinazione con Fludarabina e Tiothepa. Un chimerismo completo al giorno +28 si è avuto nel 98,4%, con nessun rigetto primario e un solo rigetto secondario. A 36 mesi, l'NRM è stata solo del 3,1%, con un'incidenza di recidiva del 21,7% e una OS dell'83,0%. L'incidenza cumulativa di GvHD acuta è stata del 45,3% per i gradi I-IV e del 26,6% per i gradi II-IV (88). Questi dati confermano l'uso sicuro ed efficace del Treosulfano associato a Fludarabina e Thiotepa come regime di condizionamento mieloablativo nei bambini con neoplasie ematologiche e nel trial AIEOP-BFM AML 2020 per i pazienti candidati a trapianto è stato introdotto il random tra Bu/Cy/Mel versus Treo/Fluda/Thiotepa per definire il miglior regime di condizionamento nei pazienti pediatrici.

Recidive di malattia

Circa il 30-40% dei bambini con LAM de novo recidiva. Per questi pazienti vi è indicazione al TCSE in RC2.

L'outcome dei bambini sottoposti a trapianto per recidiva di malattia è migliorato negli anni. Il gruppo di lavoro AML-BFM ha riportato un aumento della OS a 5 anni dal 39% tra 2009-2013 a 49% tra 2013-2017 (89), con buoni risultati anche con donatori aploidentici in assenza di donatore HLA-identico (82).

Vari fattori prognostici pre trapianto devono essere tenuti in considerazione quali le sedi della recidiva, il tempo intercorso tra diagnosi e recidiva, pregresso trapianto, la risposta alla reinduzione e la dose cumulativa di antracicline ricevuta. Inoltre la presenza di eventuali alterazione genetiche alla diagnosi potrebbe essere target per terapie mirate (84).

Un approccio terapeutico multimodale e personalizzato basato sull'associazione di chemioterapia e nuove terapie target sembrerebbe essere il migliore per ottenere una RC2, che rimane uno dei fattori più importanti per migliorare l'outcome post TCSE.

Nuove terapie

La medicina di precisione rappresenta la nuova frontiera per la cura dei pazienti affetti da leucemia.

Le nuove terapie disponibili nelle LAM si possono dividere in due categorie principali: terapie target *genotype-oriented* e immunoterapia (fig.26), sviluppate in protocolli di seconda linea (relapse o malattie resistenti), sempre con più frequenza vengono incorporate in protocolli frontline (“*triplet regimens*”) o utilizzate in monoterapia come bridge pre-trapianto o come mantenimento nel post trapianto per ridurre il rischio di ricaduta.

Al primo gruppo appartengono agenti ipometilanti (HMA) quali Azacitidina/Decitabina e inibitori di IDH1/2 (Ivosidenib/Vorasidenib), inibitori delle tirosino-chinasi, in particolare inibitori di FLT3 (Midostaurina, Sorafenib, Quizartinib e Gilteritinib), antagonisti di Bcl2 che promuovono l’apoptosi cellulare (Venetoclax/Navitoclax) e una nuova classe di inibitori attualmente in fase di valutazione, non ancora approvati da EMA, “menin inhibitors” (Revumenib il primo farmaco utilizzato), specifici per le forme di LAM KMT2A e NPM1mutate (84). I menin inhibitors sono di particolare interesse in oncologia pediatrica in quanto circa il 20% delle LAM con esordio in età pediatrica presentano mutazione di KMT2A e raggiungono circa il 60% i pazienti infant con esordio ≤ 1 anno di vita (90).

La terapia di mantenimento dopo TCSE con tali farmaci, per le forme ad alto rischio di ricaduta, è a tutt’oggi controversa. Sono stati condotti trial randomizzati versus placebo con utilizzo di inibitori di FLT3, che hanno dimostrato beneficio esclusivamente nei pazienti con persistente positività di MRD. Fra i farmaci testati, Midostaurina è stata meno tollerata e non efficace. Sulla base dei dati disponibili, il gilteritinib dovrebbe essere la prima scelta, mentre il quizartinib dovrebbe essere una ragionevole seconda opzione e il sorafenib dovrebbe essere utilizzato se nessuno di questi farmaci è disponibile per motivi di costo o normativi. Al momento non sono disponibili risultati convincenti/definitivi per raccomandare la terapia di mantenimento con gli altri farmaci target (91).

La durata delle terapie post trapianto non è ben definita, per quanto sia generalmente considerato adeguato un mantenimento di almeno 12-24 mesi al fine di ridurre il rischio di recidiva (84).

L'approccio immunoterapico principale nelle LAM si è articolato attraverso le strade seguenti:

- produzione di Anticorpi monoclonali farmaco-coniugati;
- produzione di anticorpi T-cell Engagers (BiTEs), bispecifici, che costruiscono un ponte fra cellula leucmica e Linfocita T;
- Cellule CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-cell).

Il Gentuzumab Ozogamicin (GO), anti-CD33, è stato il primo anticorpo monoclonale coniugato con l'antraciclina calicheamicina approvato nelle LAM pediatriche ed è ad oggi utilizzato sia in prima che in seconda linea di terapia, particolarmente efficace nelle LAP, in cui CD33 è overespresso (111).

I BiTE sono ad oggi oggetto di sperimentazione clinica nei pazienti adulti con LAM, in sviluppo il Flotetuzumab (anti-CD123xCD3), AMG 330 e AMG 673 (anti CD33xCD3) (112).

Lo sviluppo delle CAR-T nelle LAM rappresenta una sfida per l'assenza di antigeni ristretti ai blasti mieloidi e non espressi o minimamente espressi dalle cellule dei tessuti sani e in particolare dalle cellule staminali emopoietiche e dai linfociti T attivati (92) causa della tossicità *off target* e dell'eliminazione fratricida dei linfociti T (93).

In studi preclinici e in pazienti con Leucemia Linfoblastica Acuta di linea T sono state sviluppate con successo cellule CAR-T anti CD7 e *anti-CD7 protein expression blocker* (PEBL) (PCART7) per downregolare l'espressione di CD7e limitare l'azione fratricida delle cellule CAR nei confronti dei linfociti T. L'antigene CD7 ha una espressione aberrante nel 15-30% delle LAM a prognosi sfavorevole sia in età pediatrica che in pazienti adulti. In sviluppo al momento attuale l'applicazione delle cellule PCART7 nelle LAM con risultati favorevoli e incoraggianti in pazienti adulti (113) e più recentemente in pazienti pediatriche presso l'Ospedale Pediatrico bambino Gesù di Roma (114). Tre pazienti con LAM resistenti a plurime linee di terapia sono stati sottoposti ad infusione di PCART7 autologhe, ottenendo RC con FCM-MRD negativa. Tutti i pazienti sono stati sottoposti successivamente a MUD-TMO rispettivamente 54, 66 e 66 giorni dopo l'infusione di PCART7 con persistente negatività della MRD dopo 18, 9 e 3 mesi dall'infusione di PCART7.

Willier et al. hanno messo in evidenza una espressione prevalente di CD33 e CLEC12A, coespressi nel 60% dei casi, dei blasti delle LAM pediatriche rispetto ai progenitori

sani. Hanno dimostrato inoltre, nei pazienti KMT2A riarrangiati espressione elevata di FLT3, e a differenza delle LAM dell'adulto bassa espressione di CD123. Sulla base di tali dati sono in sviluppo CART dual target CD33/CLEC12A, nelle forme non KMT2A mutate, e di CD33/FLT3, nelle forme KMT2A mutate (94).

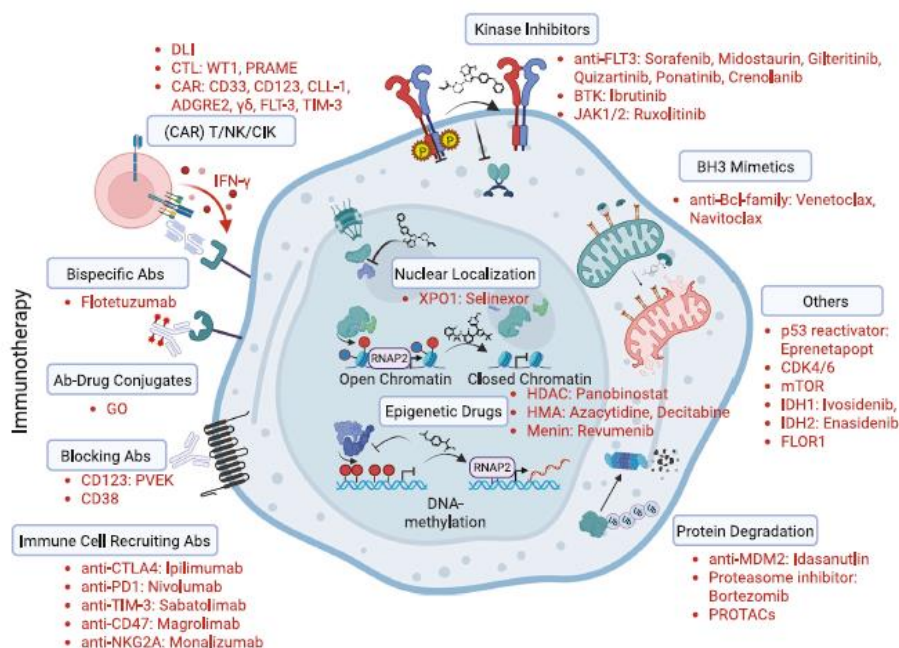


Figura 26: Terapie target disponibili o in fase di studio nelle LAM (84). Immunoterapia: coniugati anticorpo-farmaco (ADC), anticorpi bispecifici, anticorpi monoclonali (mAb), inibitori dei checkpoint (CI), terapie cellulari (DLI, infusione di linfociti del donatore; CTL, linfociti T citotossici; approcci CAR, recettore antigenico chimerico; NK, natural killer; CIK, killer indotti da citochine). Terapie target: inibitori delle tirosin-chinasi recettoriali (RTK), mimetici BH3, piccole molecole selettive per la proteina B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) omologia 3, inibitori coinvolti nella degradazione proteica. WT1, proteina del tumore di Wilms; PRAME, antigene preferenzialmente espresso nel melanoma; ADGRE2, recettore di adesione accoppiato a proteina G E2; FLT3, tirosin-chinasi 3 simile a FMS; TIM-3, proteina 3 contenente domini immunoglobulinici e mucinici delle cellule T; GO, gemtuzumab ozogamicin; PVEK, pivekimab sunirine; CTLA-4, proteina 4 associata ai linfociti T citotossici; PD-1, proteina 1 della morte cellulare programmata; XPO1, exportina 1; HDAC, deacetilasi istoniche; HMA, agenti ipometilanti del DNA; BTK, tirosin-chinasi di Bruton; JAK, chinasi Janus; CDK, chinasi ciclina-dipendenti; mTOR, bersaglio mammaliano della rapamicina; IDH, isocitrato deidrogenasi; FOLR1, recettore alfa del folato; MDM2, omologo 2 di mouse double minute; PROTAC, chimera mirata alla proteolisi.

Leucemia Acuta Promielocitica

Prima degli anni '70, la diagnosi di LAP definiva una condizione estremamente grave con un rischio di mortalità elevatissimo. Oggi con l'acquisizione dell'efficacia dell'ATRA e dell'ATO, la prognosi della LAP è radicalmente cambiata (29).

Il protocollo internazionale ICC APL 02, promosso dal gruppo AIEOP, è stato aperto nel 2019 e chiuso all'arruolamento il 31/10/2025, prevede il trattamento con ATRA

associato ad ATO e solo nei pazienti HR ($GB \geq 100.000/\text{mmc}$) la somministrazione di GO (fig.27).

CLINICAL TRIAL OUTLINE ICC-APL 02 FOR CHILDREN WITH APL

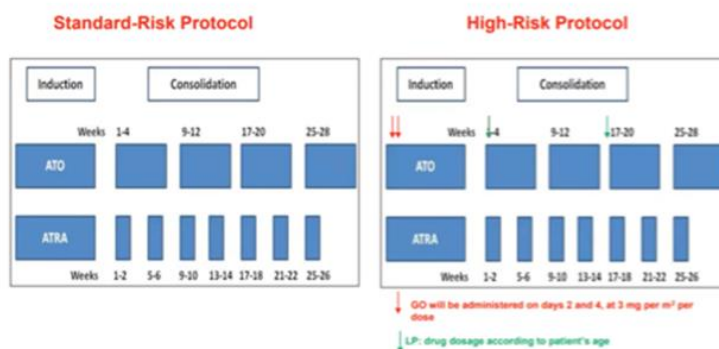


Figura 27: Protocollo ICC-APL 02 (estratto da protocollo ICC-APL02).

Sono stati arruolati al giugno 2025 110 pazienti, 73 SR (66.4%) e 37 HR (33.6%), 49 femmine e 61 maschi, età mediana 12 anni (IQR 1-17 anni), 54 pazienti (49%) presentavano mutazione FLT3-ITD. 109/110 pazienti sono vivi e in CR. Un paziente HR e con mutazione FLT3-ITD è morto a + 30 giorni dall'esordio per emorragia cerebrale. Un solo paziente (HR) non ha raggiunto la remissione molecolare dopo 3 cicli di consolidamento e ha raggiunto la negatività del trascritto di fusione dopo l'attuazione di 2 somministrazioni di GO aggiuntive dopo il completamento del protocollo di prima linea e successivamente è stato sottoposto ad auto-TCSE. Un paziente SR ha presentato relapse a + 1 anno dallo stop terapia e ha raggiunto una seconda remissione con la riesposizione a ATO/ATRA.

Con un follow-up mediano di 21 mesi (intervallo 2-68,7), la OS a 2 anni e l'EFS dell'intera coorte sono rispettivamente del 99% (IC al 95% 93,4-99,9) (SR 100% vs HR 97,1%, $p=n.s.$) e del 96,4% (IC al 95% 88,6-98,9) (SR 97,4% vs HR 94,2%, $p=n.s.$). Diciannove pazienti sono ancora in trattamento (33).

LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA: LA STORIA DEI PAZIENTI TRATTATI PRESSO L'ISTITUTO GIANNINA GASLINI

Lo studio in oggetto è uno studio osservazionale retrospettivo monocentrico che si propone di effettuare una revisione della casistica dei pazienti pediatrici con LAM trattati presso il Dipartimento di Emato-Oncologia e Trapianto di Midollo Osseo dell'Istituto Giannina Gaslini, confrontando i dati ottenuti con quelli riportati in letteratura.

Materiali e Metodi

1. Serie casistica ed eleggibilità

Sono stati inseriti tutti i pazienti trattati presso il Dipartimento di Emato-Oncologia Pediatrica dell'Istituto Giannina Gaslini, di età inferiore a 18 anni con nuova diagnosi di Leucemia Mieloide Acuta effettuata dal 1974 al 31 dicembre 2025. I dati dei pazienti sono stati estratti dal database dell'Istituto CASIGG (Casistica Istituto Giannina Gaslini), integrando con la documentazione presente nelle cartelle cliniche, ove disponibili, e per quanto riguarda gli studi clinici dal 2002 al 2013/01, confrontati con il database dell'AIEOP (Cineca).

Nel 1980 il Dr. Riccardo Haupt, allora medico della Pediatria IV, il reparto dedicato alla cura dei pazienti con patologie ematologiche e oncologiche, diretto e fondato dalla Professoressa Luisa Massimo, ha promosso la creazione del data base dell'Istituto Giannina Gaslini per registrare e valutare retrospettivamente e in follow-up tutti i pazienti con patologie oncologiche (tumori solidi e leucemie) trattati presso l'Istituto dalle origini del reparto Pediatria IV. Sono stati inseriti nel data base, che inizialmente utilizzava la piattaforma DB3, tutti i dati allora disponibili dei pazienti dal primo accesso in Istituto. CASIGG è stato implementato nel tempo con l'inserimento continuo dei nuovi casi e di variabili sempre più complesse relative alla diagnosi, al protocollo di chemioterapia, agli eventi. Alla fine degli anni '90 CASIGG è migrato su piattaforma Access con ulteriore implementazione dei dati registrati e delle funzioni del sistema. Dal 2010 CASIGG è stato orientato in particolare al monitoraggio dei pazienti fuori terapia con l'aggiunta di variabili come le dosi complessive dei chemioterapici/radioterapia per la formulazione del rischio di secondo tumore/patologie secondarie e la realizzazione del così detto passaporto dei guariti/lungosopravvissuti. Dal 2023 è stata realizzata inoltre una connessione con la

piattaforma del registro 101 dell'AIEOP dei pazienti pediatrici con patologie oncologiche, approvata dagli enti regolatori regionali (CER Liguria), che consente l'inserimento automatico in CASIGG del paziente registrato.

244 pazienti con LAM di nuova diagnosi risultano registrati nel CASIGG dal 1974, ed eleggibili per lo studio, di cui 105 femmine (43%) e 139 maschi (57%).

La diagnosi di LAM fino ai primi anni '80 si basava esclusivamente su criteri morfologici e citochimici definiti dalla classificazione franco-americana-britannica (FAB), successivamente veniva implementata con l'attuazione dell'immunofenotipo mediante citofluorimetria eseguito inizialmente esclusivamente in house e dal '2000 centralizzato presso il laboratorio di riferimento AIEOP (Clinica Onco-ematologica Pediatrica, Università di Padova). Nel corso degli anni '90 si costituiva nell'ambito dell'Unità di Ematologia del nostro Istituto il laboratorio di citogenetica dedicato alle patologie emato-oncologiche che consentiva l'attuazione sistematica della citogenetica "convenzionale" all'esordio della leucemia, successivamente perfezionata con tecniche complementari di FISH per l'individuazione delle specifiche alterazioni genetiche di cui abbiamo ampiamente riferito in precedenza. Negli ultimi 15 anni e con l'avvio del protocollo LAM 2002 presso il laboratorio di Padova è stata avviata la completa caratterizzazione delle anomalie genetiche delle cellule leucemiche mediante tecniche di Next Generation Sequencing al fine di stratificare i pazienti e dichiarare l'eleggibilità a trial clinici specifici.

2. Disegno dello studio

Si tratta di uno studio osservazionale retrospettivo monocentrico. La serie casistica è stata suddivisa in 2 gruppi di studio principali: pazienti con diagnosi di LAP, per le specifiche peculiarità che la caratterizzano, e pazienti con altri sottotipi di LAM.

I pazienti con LAM sono stati analizzati per tipo di protocollo di trattamento adottato in base all'epoca di diagnosi (protocolli IGG, 82, 87, 92, 2002/01, 2013/01 e other) e per caratteristiche citogenetiche e molecolari alla diagnosi, se disponibile il dato. Nel gruppo di trattamento other sono stati inclusi pazienti infant trattati con il protocollo Interfant 99, pazienti con Sindrome di Down trattati con il protocollo specifico LAM 2002/02, pazienti affetti da LAM post terapia citotossica trattati nelle varie epoche con protocolli personalizzati, un paziente con fenotipo RAM in cui si è adottato il protocollo

di induzione con CPX-351 e un paziente trasferito da un altro centro non italiano dopo l'induzione e trattato con il protocollo BFM AML 2004.

Ulteriori analisi sono state effettuate in base alla categoria di rischio dall'introduzione nei protocolli della stratificazione per anomalie genetiche e risposta al trattamento: SR/HR per i protocolli LAM 92 e LAM 2002/01, SR/IR/HR per LAM 2013/01.

I pazienti con LAP sono stati stratificati in SR/HR secondo i criteri di Sanz modificati (28) in base ai valori di GB alla diagnosi. In assenza del dato relativo al valore dei globuli bianchi all'esordio, i pazienti sono stati definiti come a rischio non noto "NN", e corrispondono ad una popolazione di pazienti con diagnosi effettuata prima del '90, dei quali non sono disponibili dati clinici completi.

In base al protocollo terapeutico a cui sono stati sottoposti, dipendente dall'anno di diagnosi, i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi di analisi:

- 1) Pazienti dell'era pre-terapia differenziante, che hanno ricevuto solo chemioterapia classica, temporalmente fino al 1992;
- 2) Pazienti sottoposti a trattamento con ATRA associato a chemioterapia, 1993 al 2014;
- 3) Pazienti trattati con un regime chemo-free (ATRA + ATO $\pm$ GO), dal 2015 al 2025.

Infine per entrambi i gruppi LAM e LAP è stata fatta una valutazione dei pazienti sottoposti ad un primo TCSE, sia in prima linea che in seconda linea, analizzando l'impatto sulla survival del trapianto di midollo autologo versus allogenico, della fonte delle cellule staminali utilizzate e del tipo di regime di condizionamento.

3. Obiettivi dello studio e definizioni

Obiettivo dello studio osservazionale è la valutazione della sopravvivenza nel corso degli anni dei pazienti con LAM in età pediatrica, afferenti all'Istituto Giannina Gaslini, trattati con l'utilizzo inizialmente dei protocolli di studio istituzionali, quindi nazionali, dal 1982, con la creazione dell'AIEOP, come descritto in dettaglio nell'Introduzione.

Gli studi clinici e il razionale delle modificazioni terapeutiche attuate nelle varie generazioni dei protocolli sono stati ampiamente illustrati nel paragrafo dell'Introduzione, a cui si rimanda per i dettagli terapeutici.

L'obiettivo primario dell'analisi della serie casistica è quello di valutare come la sopravvivenza e il rischio di ricaduta si sono modificate nel tempo, con l'evoluzione dei protocolli di cura.

Sono state disegnate “curve di sopravvivenza” per esprimere la Overall Survival (OS) e l'Event Free Survival (EFS) globali e stratificate secondo parametri sottoriportati.

Nello specifico, l'OS misura il tempo in anni intercorrente tra la diagnosi e il decesso per qualunque causa. L'EFS rappresenta il tempo in anni tra la diagnosi e il primo evento, definito da recidiva o morte per ogni causa. La sopravvivenza è censita alla data dell'ultimo follow up.

Definizione di Risposta al trattamento:

- la remissione ematologica completa (RC) è definita dalla presenza di un midollo osseo rigenerante con blasti $< 5\%$ valutati in microscopia ottica e associata ad una conta periferica di neutrofili $\geq 1,0 \times 10^9/L$ e di piastrine $\geq 100 \times 10^9/L$;
- la remissione completa molecolare (mRC) è definita dall'assenza di trascritti di fusione o mutazioni di oncogeni specifici, valutata mediante RT-PCR su MO e/o SP.

Definizione di Recidiva:

- la recidiva ematologica è definita dalla ricomparsa di blasti nel MO in quantità $\geq 5\%$;
- la recidiva molecolare è la ricomparsa di trascritti di fusione o mutazione di oncogeni specifici in pazienti precedentemente in remissione completa molecolare (mRC).

I dati ottenuti sono stati confrontati con il benchmark della letteratura al fine di verificare l'efficacia e la concordanza dei dati pubblicati rispetto ai risultati dei protocolli applicati presso il nostro Istituto.

4. Analisi statistica

Per prima cosa sono state effettuate le statistiche descrittive dei pazienti arruolati. Per quanto riguarda i dati raccolti di tipo qualitativo, sono state riportate le frequenze assolute e le percentuali. Per quanto riguarda i dati raccolti di tipo quantitativo, sono state riportate le mediane, i quartili (1° - 3° q) e il valore minimo e massimo (min-max).

Per rappresentare la probabilità cumulativa di sopravvivenza sono state costruite le “curve di sopravvivenza” (OS e EFS) in cui l'evento di interesse è il decesso e/o la

recidiva e il tempo è stato misurato dalla diagnosi (in anni). La sopravvivenza è stata censurata alla data dell'ultimo follow-up clinico e/o anagrafico. Tali curve sono state costruite secondo il metodo di Kaplan-Meier suddividendo i pazienti per gruppo di terapia (protocolli IGG, 82, 87, 92, 2002/01, 2013/01 per i pazienti LAM; protocolli di chemioterapia LAM-oriented "IGG, 87, 92", ATRA + CT, ATO + ATRA per i pazienti LAP), per caratteristiche citogenetiche e molecolari, categoria di rischio (HR, MR, SR a seconda del protocollo) e dati del trapianto (TCSE in RC1 o RC2, autologo vs allogenico e tipo di donatore, regime di condizionamento). Tali curve sono state comparate mediante il test statistico "Log-Rank". Analizzata inoltre la sopravvivenza (OS e EFS) dei pazienti infant (diagnosi < 1 anno di vita), dei pazienti con LAM post terapia citotossica e dei pazienti con Sindrome di Down.

Il follow-up è stato aggiornato a dicembre 2025.

Per la sopravvivenza globale dei pazienti LAM il tempo di osservazione mediano è di 3.4 anni (IQR 1.3 - 13.7).

Per la sopravvivenza globale dei pazienti LAP il tempo di osservazione mediano è di 5.2 anni (IQR 1.3 - 20.6).

Per la sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trapianto il tempo di osservazione mediano è stato di 4,10 anni (IQR 1,02 – 15,17).

Risultati

1. Descrizione della serie casistica

a) Caratteristiche di popolazione

Dal database CASIGG sono stati selezionati 244 pazienti eleggibili allo studio osservazionale: il gruppo delle LAM è rappresentato da 213 pazienti, 91 femmine (43%) e 122 maschi (57%) e quello delle LAP 31 pazienti, 14 femmine (45%) e 17 maschi (55%).

L'età d'esordio mediana di tutta la popolazione è 7.65 anni (IQR 2.29-12.12).

L'età d'esordio mediana dei pazienti LAM è di 6.83 anni (IQR 2.06-11.85): 27 (13%) hanno presentato esordio di malattia nel primo anno di vita (≤ 1 anno); 69 pazienti (32%) età esordio 1-5 anni; 44 pazienti (21%) età esordio 6-9 anni; 59 pazienti (28%) età esordio 10-15 anni; 14 pazienti (7%) età esordio ≥ 15 anni.

L'età d'esordio mediana alla diagnosi dei pazienti con LAP è di 11.05 anni (IQR 8.47-13.08): nessun paziente è stato diagnosticato nel primo anno di vita; 3 pazienti (10%)

età esordio 1-5 anni; 10 pazienti (32%) età esordio 6-9 anni; 16 pazienti (52%) età esordio 10-15 anni; 2 pazienti (6.5%) età esordio ≥ 15 anni.

L'esordio dei pazienti LAP è significativamente maggiore rispetto ai pazienti LAM (p-value = 0.0008).

	LAP	LAM	TOTALE
FEMMINE	14	91	105
MASCHI	17	122	139
ETA' MEDIANA esordio (IQR)	11.05 (8.47-13.08)	6.83 (2.06-11.85)	7.65 (2.29-12.12)
Età esordio < 1° (%)	0	27(13)	27(11)
Età esordio 1-5anni (%)	3 (10)	69(32)	72(29.5)
Età esordio 6-9anni (%)	10(32)	44(21)	54(22)
Età esordio 10-15anni (%)	16(52)	59(28)	75(31)
Età esordio >15anni (%)	2(6.5)	14(7)	16(6.5)
TOT PAZIENTI	31 (13)	213 (87)	244 (100)

Tabella 26: Suddivisione dei pazienti secondo sesso ed età alla diagnosi.

b) Caratteristiche cliniche ed ematologiche all'esordio

La classificazione morfologica FAB è stata valutata su 225 pazienti e di seguito riportata in ordine di frequenza: 51 (23%) M5, 44 (20%) M2, 35 (15%) M1, 31 (14%) M3 (LAP), 26 (12%) M4, 18 (8%) M7, 10 (4%) M0, 6 (3%) M6, 3 (1%) NOS, 1 paziente presentava un fenotipo misto MPAL (0.5%). Inoltre, 4 pazienti (1.6% dell'intera serie casistica) si presentavano esclusivamente con malattia extramidollare (Sarcoma Mieloide) e 15 pazienti (6%) non LAP (compresi 2 pazienti con gene predisposition, che saranno discussi in seguito) presentavano una LAM post terapia citotossica (LAM-PCT) non classificabile secondo FAB (fig.28).

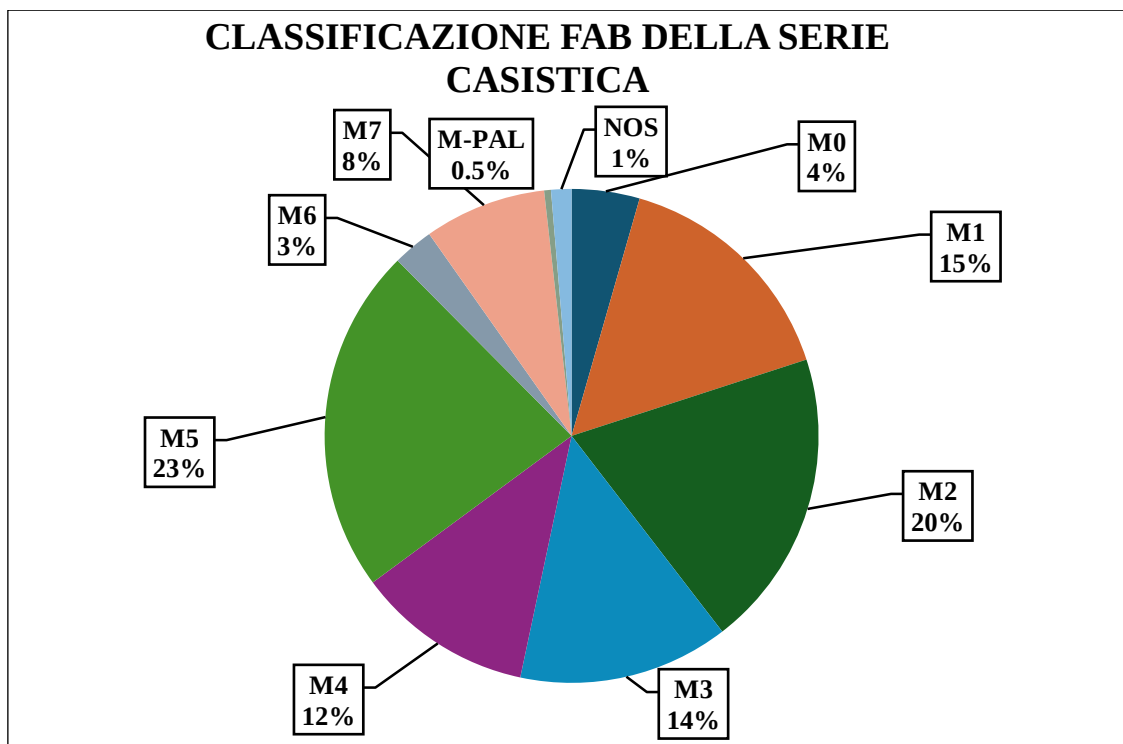


Figura 28: Descrizione dei pazienti secondo la morfologia, valutata su 225/244 pazienti. Esclusi 15 pazienti con LAM pCT e 4 pazienti con sarcoma mieloide.

Dal database risultano 25/244 (10%) pazienti con una storia di patologie antecedenti e/o condizioni predisponenti associate alla LAM: 4/25 (16%) pazienti LAP, 21/25 (84%) pazienti LAM, rispettivamente il 13% e il 10% della casistica LAP e LAM. Di questi 8 presentavano una gene-predisposition: un paziente con Anemia di Fanconi (FA), un paziente con Sindrome Li Fraumeni “delezione germline di TP53” e 6 pazienti con Sindrome di Down, 17 erano pazienti trattati in precedenza con chemioterapia per pregresse patologie tumorali (LAM- pCT) in assenza di altre condizioni predisponenti. Nessun paziente con LAP secondaria era affetto da Sindrome di Down. Quattro su 4 dei pazienti con leucemia secondaria promielocitica erano stati sottoposti a chemioterapia per pregressa Istiocitosi a cellule di Langerhans a base di VP-16, farmaco che è stato valutato essere predisponente lo sviluppo di LAP secondaria (95).

Nel dettaglio le diagnosi oncologiche pregresse:

- 5/17 pazienti (29%) pregressa diagnosi di neuroblastoma (NB);
- 5/17 pazienti (29%) pregressa istiocitosi a cellule di Langerhans (LCH);
- 2/17 pazienti (12%) pregressa diagnosi di Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA);
- 1/17 pazienti (1%) pregresso Linfoma di Hodgkin (LHD);
- 1/17 pazienti (1%) pregressa diagnosi di Linfoma Non-Hodgkin (LNHD);

- 1/17 pazienti (1%) pregresso Sarcoma di Ewing;
- 1/17 pazienti (1%) pregresso Sarcoma dei tessuti molli;
- 1/17 pazienti (5%) pregresso tumore al SNC.

Entrambi i pazienti con *gene predisposition*, eccetto i pazienti con S. di Down, erano stati sottoposti a chemioterapia prima dell'esordio di LAM, rispettivamente a chemioterapia come regime di condizionamento pre-TCSE MUD a causa di insufficienza midollare e a protocollo di chemioterapia aggressiva per il trattamento di LLA HR.

In sintesi, i pazienti classificati come LAM-pCT sono in totale 19: 17 in assenza di altre patologie predisponenti e 2 con mutazioni predisponenti germline. L'età mediana dei pazienti con LAM-pCT è significativamente superiore a quella dei pazienti con LAM de novo: anni 11.05 (IQR 7.18-13.9) vs 7.56 (IQR 2.18-12.09) (p-value = 0.025).

L'età mediana all'esordio del primo tumore è 5.9 anni (IQR 3.45-8.27) e la latenza per lo sviluppo del secondo tumore è di 2 anni (IQR 0.77-5.04).

La figura 29 mostra la suddivisione secondo le diagnosi pregresse di tutti i pazienti con LAM pCT.

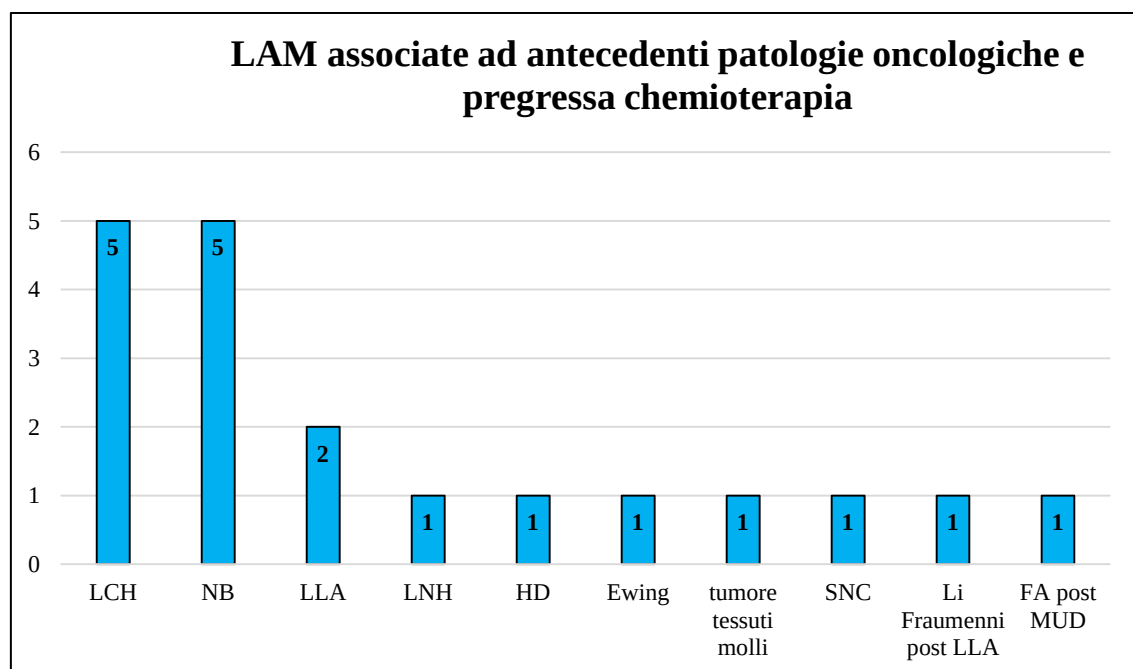


Figura 29: Diagnosi pregresse dei pazienti della nostra serie casistica.

La caratterizzazione citogenetica/molecolare è disponibile per 175 pazienti (72% di 244), 144 LAM e 31 LAP, non disponibile/non effettuata in 69 pazienti. È necessario

ribadire, come già riportato nel paragrafo relativo alla caratterizzazione diagnostica delle LAM, che solo nell'ultimo decennio sono state ricercate in modo sistematico le alterazioni genetiche all'esordio della leucemia utilizzando tecniche di biologia molecolare sempre più avanzate. Di fatto, la diagnosi di leucemia di 59/69 pazienti dei quali non è disponibile il cariotipo era antecedente al 2000.

Si documenta un cariotipo normale in 29/175 (16.5%) pazienti e una anomalia citogenetica/molecolare in 146/175 pazienti (83%), compresi 31 LAP con t(15;17).

La suddivisione per significato prognostico (vedi capitolo "CARATTERISTICHE GENETICHE DELLE LAM PEDIATRICHE E STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO", pag 19) relativo al cariotipo e alle anomalie genetiche dei pazienti con LAM (144/213, 68% dei pazienti LAM) è di seguito riportata (tab.27):

- 24/144 (17%) presentano una anomalia genetica favorevole (SR): età mediana 8.66 anni (IQR 6.72 - 13.31);
- 48/144 (33%) presentano anomalie genetiche con significato prognostico intermedio (IR): età mediana 4.56 anni (IQR 1.90 - 10.12), inclusi i pazienti con cariotipo normale;
- 72/144 (50%) presentano anomalie genetiche sfavorevoli (HR): età mediana 8.13 anni (IQR 2.06 - 13).

Caratterizzazione citogenetica/molecolare dei pazienti LAM	N pazienti (%)	Fascia di rischio per genetica
Cariotipo Normale	29 (20.1)	IR
CBFβ:MYH11 fusion	6 (4.2)	SR
CBFβ: abnormalities RUNX1	14 (9.7)	SR
FLT3-ITD	7 (4.9)	HR
IPERDIPLOIDE	4 (2.8)	IR
KMT2A-rearranged	32 (22.2)	11IR/21HR
Myelodysplasia-related	24 (16.7)	HR
NPM1 MUTATION	4 (2.8)	SR
Rare recurring translocations	24 (16.7)	4IR/20HR
TOTALE	144	24SR/48IR/72HR

Tabella 27: Frequenza delle anomalie citogenetiche/molecolari e significato prognostico dei pazienti del gruppo LAM con genetica disponibile (esclusi pazienti LAP).

Nelle figure 30 e 31 sono illustrate numero e frequenza delle caratteristiche genetiche e molecolari dei pazienti in studio.

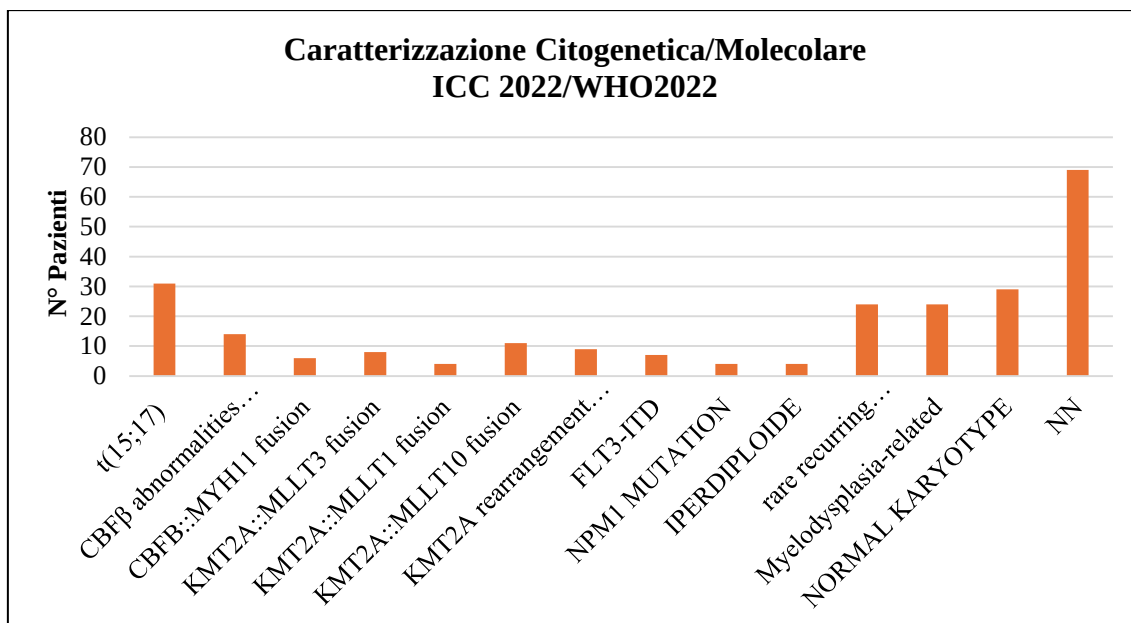


Figura 30: Suddivisione per caratterizzazione citogenetica e molecolare in base ICC 2022/WHO 2022 in numero assoluto.

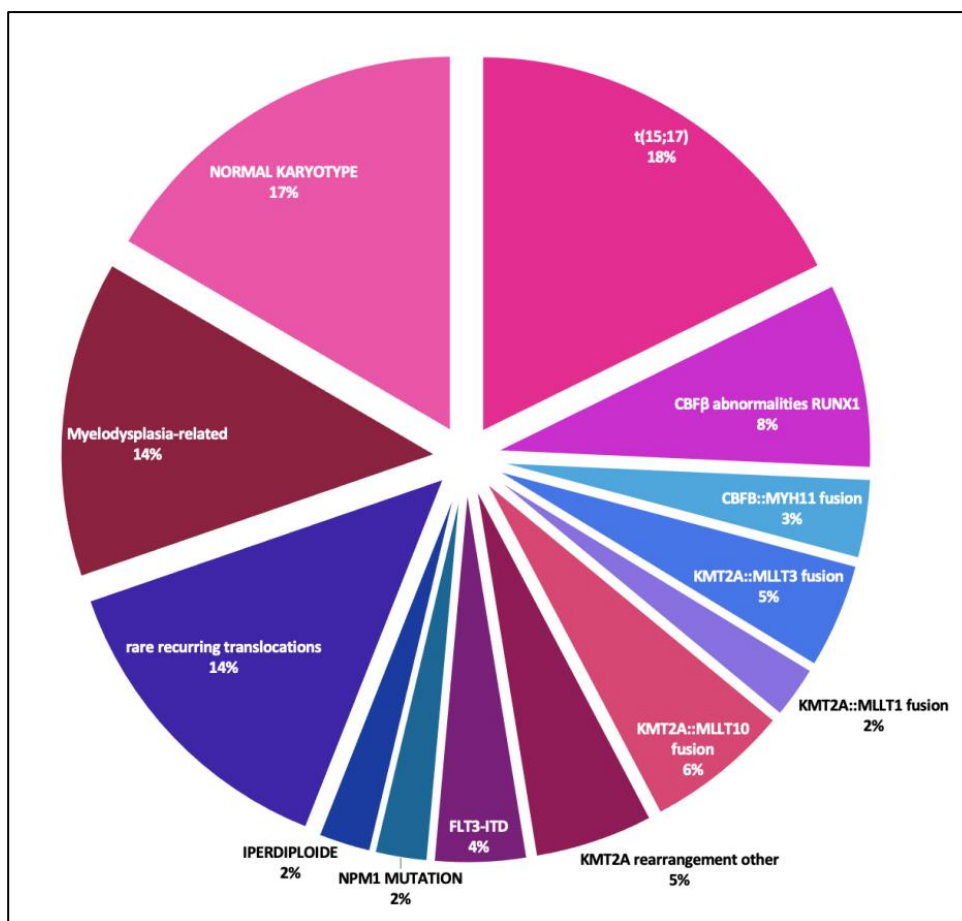


Figura 31: Distribuzione percentuale della caratterizzazione citogenetica e molecolare in base ICC2022/WHO 2022 della serie casistica in studio.

In dettaglio riportiamo nelle tabelle 28 e 29 le anomalie classificate come rare ricorrenti e le MDS-related della serie casistica del gruppo LAM.

Anomalie genetiche rare ricorrenti in 144 pazienti LAM con genetica disponibile	N° pz (%)	Significato prognostico
NUP98-rearranged	4 (3)	HR
t(3;5)(q25;q34), NPM1::MLF1 fusion	2 (1.5)	HR
+14q	1 (1)	HR
t(3;6)(q27;q25)/MECOM	1(1)	HR
t(16;16) CBFA2T3::GLIS2	1(1)	HR
t(11;22)(q24;q12)	1(1)	IR
t(5;6)(q35;q24)+ FLT3-TKD	1(1)	IR
t(16;21)(p11.2;q22.2), FUS::ERG (subclone NPM1)	1(1)	IR
t(1;22)(p13.3;q13.1); RBM15::MRTFA	1(1)	IR
Altre non specificate	11(8)	HR
Totale	24 (17)	HR 20 / IR 4

Tabella 28: Anomalie genetiche classificate come rare ricorrenti con relativo significato prognostico.

Anomalie genetiche Myelodysplasia - Related in 144 pazienti LAM con genetica disponibile	N° pts
CARIOTIPO COMPLESSO	10
46/47/48,xx,-1,-8,+(der)1,t(1;8)(p34;q13),+2(incostante),+1 o 2RING complesso	1
47,XY,t(1;2)(q22;q22),del(2)(q24),-4,+7,i(7)(q10),+8,t(8;8)(q24;q12),+9,add(9)(q34),-10,del(12)(q13),add(15)(q26),-16,add(17)(q25),+20[cp13] complesso	1
48,XX,del(13)(q12q14), del(14) (q22q32),+21,+21 complesso	1
47,XX,+i(8)(q10),der(10)inv(10)(p12q?)?del(10)(?q),add(21)(p1?3) complesso	1
inv(5)(p14p15.3),t(5;13)(q23;q34),t(8;19)(q24.2;q13),t(22;?9;17)(q13;p15;q21) complesso	1
der(7)t(1;7)(q22;q22)/49,idem,+8,+9,+14 complesso	1
45~46,XY,i(1)(q10),der(6)t(1;6)(q21.1;p22.2)dup(6)(p22.2p11.2),-15,add(16)(q25) complesso	1
?der(17)del(17)(p12)del(17)(q11.2q21),+mar[cp16] complesso	1
45,XY,+4,del(4)(q3?2)x2,der(5)t(4;5)(q3?2;q?22),der(7)t(7;20)(q21;?),-18,-20 complesso	1
Cariotipo complesso, non specificato	1
MONOSOMIA 7/DEL 7	5
45,XX,-7	3
46,XX,del(7)(q31)	1
48,XX,-7,+8,+19,+mar	1
TRISOMIA 8	2
47,XX,+8	1
47,XX,+8,inv(9)(p22q12)	1
DELEZIONE 5	2
46,XX,del(5)(q3?),t(11;13)(p15;q1?4)	1
del (5) (q1q31)	1
ALTRE ANOMALIE GENETICHE	5
46,XY,t(5;12)(q14;q24),del(17)(p11.2)	1
46,XY,t(5;17)	1
cromosoma 17 isodicentrico	1
11q deletion	1
der(6)t(1;6)(q21;p22.2)?dup(6)(p22.2p22.2)	1
TOTALE	24

Tabella 29: Anomalie genetiche classificate come MDS-Related.

c) Protocolli di Chemioterapia di prima linea

Di seguito vengono riportate in modo descrittivo le caratteristiche cliniche dei pazienti inseriti nelle diverse generazioni di protocolli LAM di prima linea aperti nell'Istituto Giannina Gaslini dal 1974 ad oggi. In dettaglio è riportato il trattamento eseguito a cui sono stati sottoposti, solo chemioterapia o trapianto di cellule staminali emopoietiche in

prima o seconda remissione, il numero di recidive e di decessi per qualunque causa. Vengono riportati anche i dati relativi ai pazienti Infant, con Sindrome di Down e ai pazienti con LAP trattati per singolo protocollo.

I pazienti con LAM post terapia citotossica non sono inseriti in questa analisi, in quanto trattati con programmi di chemioterapia personalizzati e saranno riportati e analizzati separatamente.

Protocolli IGG

Il primo paziente curato e registrato nel database CASIGG era un bambino di 8 anni con LAP, esordito il 2 aprile 1974 e trattato con un protocollo istituzionale a 2 farmaci, che prevedeva 2 cicli di induzione con Daunoblastina associata a Citarabina (Induzione 3+7 e 2+5) a cui faceva seguito un mantenimento LLA-like della durata di 2 anni. Il paziente rimase in RC per 4 anni, quindi presentò una recidiva midollare, resistente alla riesposizione ai farmaci e morì per progressione di malattia. In totale sono stati trattati con la stessa associazione terapeutica fino al 14 maggio 1982, **8 pazienti (3.2% della serie casistica totale IGG)**: 2 LAP, 1 paziente con Sindrome di Down e 5 LAM de novo. Tre su 8 hanno raggiunto la RC e completato il programma di chemioterapia raggiungendo l'off therapy, di questi 2 erano affetti da LAP e 1 è recidivato, il paziente descritto in precedenza, 1 risulta vivo e in RC all'ultimo follow-up e un paziente affetto da LAM M1 ha presentato una recidiva tardiva dopo 1 anno dallo stop terapia e risulta perso al follow up. 5/8 pazienti sono morti precocemente per progressione di malattia.

Protocollo AIEOP LAM 82

Dal 1° gennaio 1983 al 31 dicembre 1986, 17 pazienti (7% della serie casistica) sono stati trattati con il primo studio nato in ambito AIEOP, il Protocollo AIEOP LAM 82, nessun paziente con LAP è stato arruolato al protocollo. Erano tutti pazienti con LAM de novo, nessun paziente con Sindrome di Down. **Sono stati sottoposti a TMO in 1^a RC 9/17 pazienti (53%)**, di cui 7/9 a trapianto autologo (vivi 2/7) e 2/9 a trapianto allogenico da donatore familiare (vivo 1/2). La causa di morte di tutti i pazienti deceduti dopo trapianto autologo è stata la recidiva e la progressione di malattia. Il paziente deceduto dopo trapianto da donatore familiare è morto per tossicità trapianto-correlata. **Otto pazienti sono stati trattati esclusivamente con chemioterapia e di questi risultano vivi e in RC 6/8 (75%). Overall all'ultimo follow up risultano vivi 9/17 pazienti (53%).**

Protocolli AIEOP LAM 87

Questo protocollo è stato somministrato a **44 pazienti (18% della serie casistica)** dal 1° gennaio 1987 al 31 dicembre 1991, di cui 8 erano affetti da LAP. Un piccolo paziente era affetto da sindrome di Down. Dei 36 pazienti con LAM, all'ultimo follow up risultano vivi 16/36 pazienti (44%), compreso il bambino con sindrome di Down, mentre solo 2/8 (25%) pazienti LAP sono vivi e in RC.

Sono stati sottoposti a TCSE in prima remissione 18/36 (50%) pazienti LAM, di cui 8/18 a trapianto autologo (vivi 2/8, 25%), 10/18 a trapianto allogenico da donatore familiare (FD) (vivi 5/10, 50%). **Diciotto su 36 (50%) pazienti sono stati trattati esclusivamente con chemioterapia** e di questi risultano vivi 9/18 (50%). Hanno presentato una recidiva 19/36 pazienti (53%) (compresi 3 resistenti alla chemioterapia), di questi 8/19 (42%) erano stati sottoposti a TCSE in prima remissione (2/10 allogenici da donatore familiare e 6/8 autologi) e 11/18 (61%) erano del gruppo chemioterapia.

Del gruppo LAP la stessa proporzione di pazienti è stata sottoposta a TCSE e a chemioterapia (4/8, 50%: 2 trapianti autologi e 2 allogenici, di cui 1 MUD). Vivi 1 paziente sottoposto a TCSE da MSD e 1 paziente sottoposto a trapianto autologo. Tutti e 4 i pazienti del gruppo chemioterapia sono recidivati, 3 morti per progressione di malattia, 1 per tossicità trapianto correlata dopo TCSE autologo in RC2.

Protocollo AIEOP LAM 92

Questo protocollo è stato somministrato a **52 pazienti (21,3% della serie casistica)** dal 1° gennaio 1992 al 31 dicembre 2002, solo un paziente affetto da LAP è stato arruolato al protocollo e sottoposto al programma di chemioterapia, no TCSE, ed è ad oggi vivo in RC.

Dal primo gennaio 1993, con l'apertura del protocollo specifico "GIMEMA-AIEOP AIDA" vennero esclusi dal protocollo LAM 92 i pazienti affetti da LAP con t(15;17) (28).

Una bambina trattata con il protocollo LAM 92 e affetta da DS è stata sottoposta esclusivamente a chemioterapia raggiungendo la RC ed è ad oggi viva ed in follow up. **Dei 51 pazienti con LAM, compresa la paziente con DS, all'ultimo follow up risultano vivi 25/51 pazienti (49%).**

Sono stati sottoposti a TCSE 40/51 (78%) pazienti e di questi risultano vivi e in RC 21/40 (52.5%): 19/40 a trapianto autologo (8/19 relapse 42%, vivi 7/19, 37%) e 21/40 a

trapianto allogenico (3/21 relapse 14%, vivi 14/21, 66.6%) e in particolare 12/21 a TCSE-FD, vivi 10/12 (83%), 8/21 a MUD, vivi 4/8 (50%) e 1 a aplo-TCSE, deceduto per tossicità trapianto correlata.

Sono stati trattati esclusivamente con chemioterapia 11/51 pazienti (22%) e di questi risultano vivi e in RC 4/11 (36 %).

Ha presentato una recidiva il 33% dei pazienti (17/51), 11/40 trapiantati (27.5%, 3/21 allo e 8/19 autologi) e 6/11 (54.5%) del gruppo chemioterapia.

Come già riportato nel capitolo dedicato alla descrizione e all'evoluzione dei singoli protocolli, per la prima volta con questo protocollo si introduceva la stratificazione per rischio correlato alle alterazioni del cariotipo delle cellule leucemiche messe in evidenza all'esordio: considerati SR i pazienti con anomalie genetiche favorevoli, t(8;21)(q22;q22), inv16(p13;q22 e t(16;16)(p13;q22), che se raggiungevano la RC dopo il primo ciclo di induzione ICE erano sottoposti dopo un secondo ciclo ICE a 2 cicli di consolidamento ed erano esclusi dal TCSE.

Sono stati stratificati come HR 47 pazienti (esclusi dalla stratificazione il paziente con DS e il paziente con LAP) e SR 3 pazienti con t(8;21). Risultano vivi all'ultimo follow up il 47% dei pazienti HR (22/47) e 2/3 dei pazienti stratificati come SR (67%). Sottoposti a TCSE 37/47 pazienti HR e 3/3 pazienti SR, per non aver raggiunto la RC dopo il primo ICE.

Protocollo AIEOP LAM 2002/01

Questo protocollo è stato somministrato a **53 pazienti (22,7% della serie casistica)** dal 1° gennaio 2003 al 30 giugno 2014. All'ultimo follow up risultano vivi 31/53 pazienti (58.4%).

Sono stati sottoposti a TCSE in RC1 40/53 (75%) pazienti, 6/40 (15%) a trapianto autologo (relapse 4/6, 66.6%; vivi 4/6, 66.6%), 34/40 (85%) a trapianto allogenico (relapse 9/34, 26.4%; vivi 21/34, 62%) e in particolare 9/40 da MSD (relapse 3/9, 33%; vivi 6/9, 64%), 21/40 da MUD, compresi anche 3 trapianti da CB unrelated (CBU), (relapse 5/21, 24%; vivi 15/21, 71%) e 4/40 aploidentici (relapse 2/4, 50%, nessun paziente vivo, 2 deceduti per TRM e 2 per progressione di malattia).

Sono stati trattati esclusivamente con chemioterapia 13/53 (25%) pazienti, 9/13 (69%) sono recidivati e 6/13 (47%) sono vivi e in RC. Di seguito la descrizione di

questo gruppo di pazienti: una paziente è morta per tossicità in RC nel corso della chemioterapia di induzione prima di essere sottoposta a TCSE programmato; 4 pazienti presentavano malattie resistenti a più linee di terapia e sono morti per progressione di malattia; un paziente infant con leucemia megacarioblastica e t(1;22) ha presentato una recidiva dopo il termine del programma di chemioterapia ed è morto per progressione di malattia; una paziente con leucemia congenita e sarcoma mieloidi dell'orbita ha presentato una recidiva SNC precoce ed è stata sottoposta a TCSE da MUD in RC2; 3 pazienti SR per riarrangiamento CBF, 2 dei quali sono stati sottoposti a TCSE in seconda remissione (1 MUD e 1 aplo); una paziente con cariotipo normale è recidivata 6 mesi dopo lo stop terapia ed è deceduta per tossicità nel corso della terapia di reinduzione; 2 pazienti con cariotipo non disponibile hanno concluso il protocollo di chemioterapia e sono off therapy in RC.

Sono stati stratificati come HR 50/53 pazienti e SR 3/53 pazienti (2 pazienti con inv16 e un paziente con t(8;21). Risultano vivi all'ultimo follow up il 56% dei pazienti HR (28/50) e 3/3 dei pazienti stratificati come SR. Tutti i 40 pazienti sottoposti a TCSE in RC1 appartenevano al gruppo HR, 2/3 pazienti SR sono stati sottoposti a TCSE in RC2.

Protocollo AIEOP LAM 2002/02 pazienti con sindrome di Down

Questo protocollo è stato aperto all'arruolamento dal 1° gennaio 2003 per il trattamento dei pazienti con Sindrome di Down ed è tutt'ora attivo. Ad oggi sono stati trattati **3 pazienti (1,2% della serie casistica)**, i quali risultano tutti vivi all'ultimo follow up. Un paziente è stato sottoposto a TCSE da MUD per una risposta non adeguata dopo il primo ciclo di induzione (blasti midollari >1%).

Oltre ai 3 bambini arruolati al protocollo LAM 2002/02, risultano registrati nel CASIGG altri 3 bambini con DS: uno infant, con esordio nel 1977, dopo un tentativo terapeutico con i farmaci allora disponibili, è morto precocemente per progressione di malattia; gli altri 2 trattati rispettivamente con i protocolli 87 e 92, modulati per limitare la tossicità, sono ad oggi vivi e in RC.

L'età mediana dei bambini Down con LAM è di 1.61 anni (IQR 1.13-1.79).

Protocollo AIEOP LAM 2013/01

Questo protocollo è stato aperto all'arruolamento dal 1° luglio 2015 e chiuso ufficialmente il 30 giugno 2022, successivamente utilizzato come *linea guida* prima dell'avvio del nuovo protocollo fino al marzo 2025. Sono stati trattati **27 pazienti con**

LAM de novo (11% della serie casistica). All'ultimo follow-up risultano vivi 24/27 pazienti (90%).

Sono stati sottoposti a TCSE 16/27 (59%) pazienti LAM, 16/18 pazienti HR, nessuno sottoposto a trapianto autologo. Dei pazienti sottoposti a TCSE allogenico sono vivi ad oggi 15/16 (94%) pazienti e in particolare hanno ricevuto TCSE-MSD 4/16 (25%), vivi 4/4 (100%), TCSE-MUD 7/16 (44%), vivi 6/7 (86%) e TCSE-aplo 5/16 (31%), vivi 5/5 (100%). Nessun paziente trapiantato in prima RC è recidivato. Un solo paziente è deceduto per complicanze TCSE-correlate (GvHD cronica).

Sono stati trattati esclusivamente con chemioterapia 11/27 (41%) pazienti, 3/11 (27%) sono recidivati e 9/11 (82%) sono vivi e in RC, 2/11 (18%) entrambi HR sono morti precocemente: uno con iperleucocitosi all'esordio ha presentato un quadro grave di sindrome da lisi tumorale associata a plurime emorragie cerebrali; un altro paziente, FLT3-ITD riarrangiato, non ha mai raggiunto la remissione completa, resistente a più linee di terapia è morto per progressione di malattia. Gli altri 9 pazienti non sottoposti a TCSE in RC1, 5 SR e 4 IR, hanno completato il protocollo di chemioterapia e 7 sono ad oggi in RC, mentre 2 pazienti (1 SR e 1 IR) sono stati sottoposti a trapianto aploidentico in RC2 dopo recidiva extramidollare (sarcoma mieloide a livello delle ossa del bacino e del femore) nel paziente SR e midollare isolata nel paziente a IR, rispettivamente dopo 18 mesi e 8 mesi dal completamento della terapia di prima linea.

I dati descritti relativi all'arruolamento dei pazienti in studio nei protocolli attivi durante il periodo di osservazione sono riassunti nella figura 32 e nelle tabelle 30 e 31.

La figura 32 mostra la suddivisione dei pazienti LAM secondo i protocolli di trattamento e nella tabella 30 è riportata la suddivisione per gruppi di rischio e sopravvivenza.

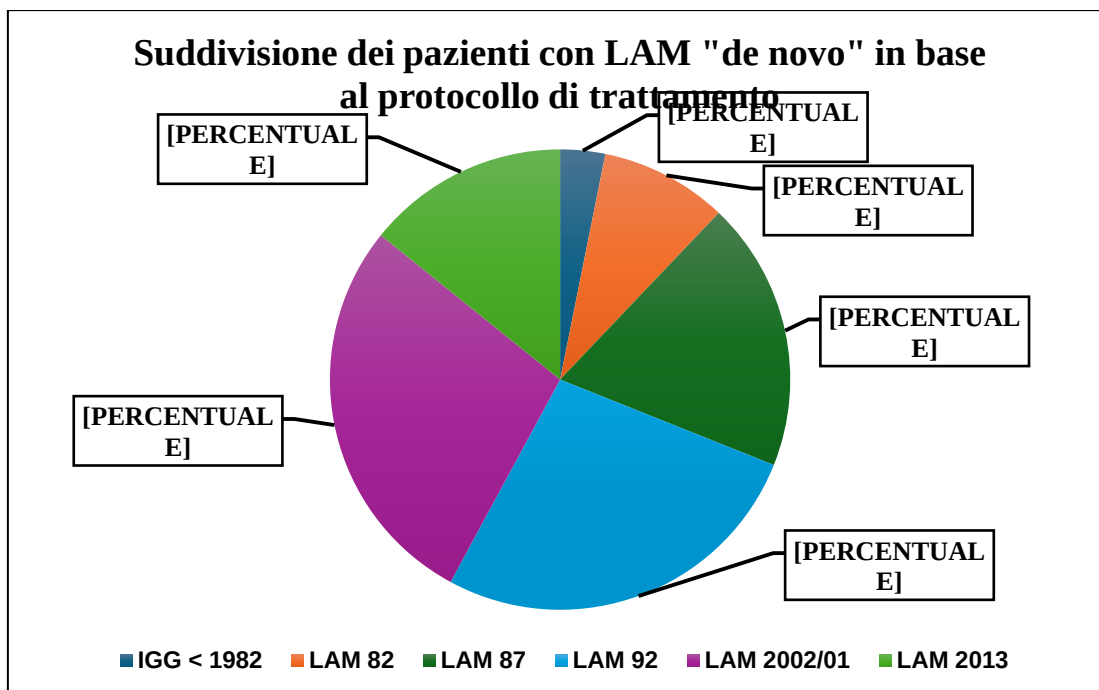


Figura 32: Suddivisione dei pazienti LAM in base ai protocolli di trattamento.

Protocolli	Totale/vivi (%)	SR (vivi) %	IR (vivi) %	HR (vivi) %
IGG	6/1 (17)	-	-	-
LAM 82	17/9 (53)	-	-	-
LAM 87	36/16 (44)	-	-	-
LAM 92	51/25 (49)	4*/3 (75)	-	47/22 (47)
LAM 2002/01	53/31 (58)	3/3 (100)	-	50/28 (56)
LAM 2013	27/24 (90)	5/5 (100)	4/4 (100)	18/15 (93)

Tabella 30: Suddivisione dei pazienti LAM "de novo" per gruppo di rischio correlato al protocollo, ove indicato, e tasso di sopravvivenza grezzo. * paziente con sindrome di Down è stato considerato a Rischio Standard.

Protocollo Interfant 99 e gli altri pazienti infant del registro

Il protocollo Interfant 99, formulato nei primi anni '2000 per il trattamento dei pazienti affetti da LLA di età inferiore a 1 anno, inizialmente era stato aperto all'arruolamento anche ai pazienti infant affetti da LAM. Nel nostro centro sono stati trattati **3 pazienti (1,2% della serie casistica)**, un bambino con leucemia congenita (esordio <1 mese di vita) è morto precocemente per tossicità correlata alla chemioterapia, gli altri 2 bambini hanno raggiunto la RC, sono stati sottoposti rispettivamente a TCSE-MSD e MUD, ma hanno entrambi presentato una recidiva precoce, resistente ad altre linee di trattamento.

Altri 23 pazienti infant sono presenti nel registro, un paziente affetto da LAM in Sindrome di Down ed è descritto nei risultati del gruppo con DS e un paziente con

LAM post terapia citotossica è descritto nel gruppo specifico. **In totale i pazienti infant LAM de novo (esclusi il paziente con Sindrome di Down e il paziente con LAM-pCT), con età ≤ 1 anno sono quindi 24** e sono stati trattati in base all'epoca d'esordio con i protocolli seguenti: 4 con protocollo IGG <1982, 3 con LAM 82, 1 con LAM 87, 5 con LAM 92, 3 con Interfant 99 e 8 con LAM 2002/01 (fig.33).

Vivi e in follow up 8 (43%) (2 LAM 82 e 6 LAM 2002/01), 4 trattati solo con chemioterapia (2 LAM 82 e 2 LAM 2002/01) e 4 con il protocollo LAM 2002/01 e sottoposti a TCSE in prima remissione (1 MSD, 2 MUD, 1 CB), tutti in RC, tranne 2 pazienti recidivati precocemente in corso di chemioterapia e sottoposti successivamente a TCSE allogenico, uno da donatore familiare aploidentico e uno da MUD.

Sono morti 13 pazienti oltre ai 3 del protocollo Interfant 99 descritti prima, tutti per progressione di malattia: 6 pazienti erano stati sottoposti a TCSE in RC1 e 10 a protocollo di chemioterapia.

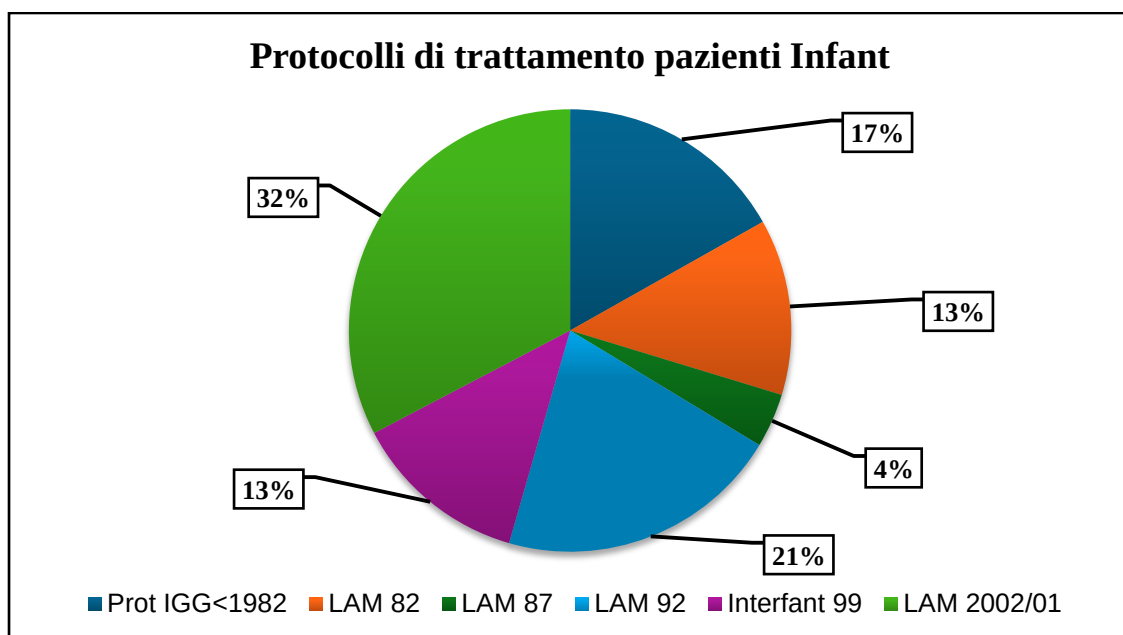


Figura 33: Suddivisione dei pazienti LAM infant in base ai protocolli di trattamento di prima linea, 24 pazienti totali, esclusi 1 paziente con S. di Down e 1 paziente con LAM pCT, sottoposti a chemioterapia personalizzata.

Nella tabella 31 è riportato il tasso di sopravvivenza grezzo dei pazienti per protocollo chemioterapia e/o trapianto di midollo in prima remissione.

PROTOCOLLI	N. PAZIENTI [^]	CT (vivi)	TCSE (vivi)	TCSE ALLOGENICO (vivi)	TCSE AUTOLOGO (vivi)	PAZIENTI VIVI per protocollo
IGG	6	6 (1)	-	-	-	1 14%
LAM 82	17	8 (6)	9 (3)	2 FD (1)	7 (2)	9 53%
LAM 87	36	18 (9)	18(7)	10 (5)	8 (2)	16 44%
LAM 92	51	11 (4)	40(21)	21(14)	19 (7)	25 49%
LAM 2002/01	53	13 (6)	40(25)	34 (21)	6 (4)	31 58%
LAM 2002/02	3	2 (2)	1(1)	1 (1)	-	3 100%
LAM 2013	27	11 (9)	16(15)	16(15)	-	24 96%
INTERFANT 99*	3	1 (0)	2(0)	2 (0)	-	-
Altri protocolli prima linea**	2	1(1)	1(1)	1(1)		2(100%)
TOTALE	198[^]	71 (38) 53.5%	127(73) 57%	87(69) 44%	40(15) 37,5%	111/198 56%

Tabella 31: Suddivisione pazienti LAM secondo tipo di trattamento di prima linea, chemioterapia (CT) o TCSE (Allo o Auto). [^] esclusi i pazienti con LAM pCT (15) e LAP (31). * Gli altri pazienti Infant, per un totale di 21, sono stati arruolati nei protocolli LAM attivi. ** Altri 2 pazienti sono stati trattati con terapie di prima linea differenti: un paziente con LAM a immunofenotipo RAM, trattato con CPX-351 e un paziente trasferito al nostro centro dopo induzione Protocollo BFM LAM2004.

d) Trattamento LAM post terapia citotossica

L'atteggiamento terapeutico delle LAM-pCT è nettamente mutato negli ultimi anni, determinando un incremento sensibile della possibilità di sopravvivere dei pazienti con tale leucemia. In particolare, l'elemento critico è rappresentato certamente dall'attuazione del trapianto di midollo al raggiungimento della prima RC, anche con incompleta ricostituzione ematologica, dopo solo 2 cicli di induzione, riducendo quindi il rischio di tossicità e di morte per tossicità con la riduzione dell'aggressività della chemioterapia di consolidamento pre-TCSE.

Auspicabile, inoltre, per incrementare ulteriormente la possibilità di cura la possibilità di arruolare i pazienti con LAM-pCT in trial clinici innovativi possibilmente *genetica-orientati* (96).

Abbiamo valutato la serie casistica dei bambini con LAM-pCT proprio con l'obiettivo di esaminare l'evoluzione del comportamento rispetto a questo gruppo di pazienti presso il nostro centro, nel corso degli anni.

I pazienti registrati con LAM-pCT, come riferito, sono 19, 4 dei quali con LAP.

Overall i pazienti con LAM-pCT hanno una OS inferiore ai pazienti LAM *de novo*, come evidente dalla figura 34: OS LAM-pCT a 5 anni 34% (95% IC: 14-55), plateau raggiunto a 4 anni, LAM *de novo* a 10 anni 54% (95% IC: 47-61), p-value = 0.036.

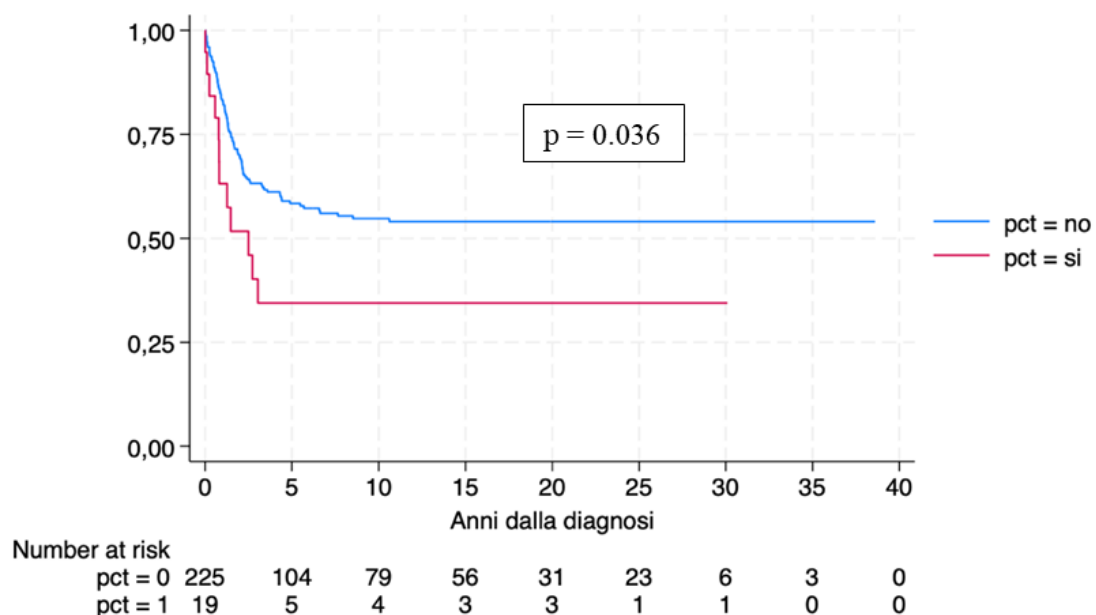


Figura 34: OS di tutti i pazienti con LAM-pCT vs la casistica di tutti i pazienti LAM dello studio.

Ma la prognosi e la possibilità di cura sono risultati differenti per i pazienti trattati prima del 2010 e dopo il 2010, quando l'inquadramento diagnostico veniva effettuato con più accuratezza e si iniziavano ad usare farmaci innovativi e target.

• **Quattordici/19 pazienti hanno esordito prima del 2010**, 13 di questi pazienti sono stati arruolati ai protocolli attivi presso il centro e in dettaglio: 1 paziente protocollo istituzionale IGG, 6 pazienti LAM 87, 3 pazienti LAM 92, 1 paziente LAM 2002/01, 1 paziente LAP è stato trattato con CT + ATRA (protocollo AIDA 0493), un paziente è stato trattato secondo il protocollo FLA, attivo per le LAM in prima recidiva. Una paziente affetta da NB e non in remissione del primo tumore ha eseguito esclusivamente una chemioterapia citoriduttiva (Citarabina/6TG) di mantenimento. Solo 3/14 hanno effettuato un consolidamento con TCSE, 2 autologi (2 pazienti con LAP) e 1 MUD. **Vivi e in RC 3/14 (21%)**: il paziente LAP trattato con l'associazione CT + ATRA, un

secondo paziente con LAP sottoposto ad auto-TCSE dopo protocollo LAM 87 e un paziente LAM trattato con il protocollo LAM 92.

• **La diagnosi di secondo tumore di 5/19 pazienti è stata effettuata dopo il 2010.** Tre/5 sono stati trattati con il protocollo CLARA (Clofarabina /Citarabina), protocollo che era stato sperimentato presso il nostro centro per i pazienti LAM in recidiva, anche dopo la prima recidiva, e che si era dimostrato efficace e con una accettabile tossicità (97). Tutti e 3 i pazienti trattati con regime a base di Clofarabina hanno raggiunto la RC e successivamente sono stati sottoposti a TCSE, 2 da donatore non correlato e 1 paziente da donatore familiare, il quale ha successivamente presentato una recidiva tardiva (dopo 6.5 anni) ed è stato arruolato in un protocollo sperimentale di fase 2 (FLA-GO + Venetoclax primo ciclo, FLA+Venetoclax secondo ciclo e quindi Venetoclax/Azacitidina come bridge al secondo TCSE aploidentico). I 3 pazienti sono ad oggi vivi e in RC. Una paziente è stata trattata con CPX-351(2 cicli di induzione) e successivamente è stata sottoposta a TCSE-MUD. Purtroppo, recentemente, dopo un anno dal trapianto di midollo ha presentato recidiva midollare ed è attualmente in trattamento con protocollo compassionevole target FLA/Revumenib (la bambina presenta un riarrangiamento di KMT2A).

Il quinto paziente era un paziente con Anemia di Fanconi che aveva presentato esordio di LAM dopo 4 mesi da trapianto MUD eseguito per l'insufficienza midollare. Il bambino è stato trattato con cicli Azacitidina/Citarabina che hanno consentito una remissione parziale e la sopravvivenza per 8 mesi. In sintesi **4/5 vivi (80%)**, 3 in RC e 1 paziente attualmente in trattamento di induzione per una prima recidiva midollare e un paziente deceduto per progressione di malattia.

Nella tabella 32 seguente riportiamo le caratteristiche dei pazienti.

Coorte pazienti pCT	19
LAM/LAP	15/4
Età mediana (IQR)	11.05(7.18-13.91)
F/M	9/10
Citogenetica n(%)	
Cariotipo normale	1(5)
Cariotipo complesso	3(16)
KMT2A riarrangiamento	2(10.5)
46,XX,del(7)(q31)	1(5)
45,XY,der(6)t(1;6)(q21;p22.2)?dup(6)(p22.2p22.2)	1(5)
46,XX,t(11;22)(q24;q12) MN1/FLI1	1(5)
t(15;17) PML/RAR alfa	4 (5)
Non noto	6(31.5)
Protocollo di chemioterapia rispetto ad anno diagnosi	
<2010	
n(%), vivi (%)	14(74), 3 (21)
IGG n/vivi	1/0
LAM87 n/vivi	6/1
LAM92 n/vivi	3/1
2002/01 n/vivi	1/0
FLA n/vivi	1/0
Citarabina/Azacitidina n/vivi	1/0
GIMEMA-AIEOP AIDA n/vivi	1/1
TMO n(%), vivi (%)	3(21),1(33)
≥2010	
n(%), vivi (%)	5(26%),4(80)
CLARA n/vivi	3/3
CPX-351 n/vivi	1/1
Azacitidina/Citarabina n/vivi	1/0
TMO n(%), vivi (%)	4(80), 4(100%)

Tabella 32: Caratteristiche dei pazienti in studio con LAM-pCT.

Nella figura 35 è riportata la probabilità di OS dei pazienti con LAM-pCT stratificati per anno di diagnosi, < 2010 o ≥ 2010: OS pazienti con esordio < 2010 a 5 anni 21% (95% CI 5 - 44) e OS con esordio ≥ 2010 a 5 anni 75% (95% CI 12 - 96). La differenza fra i 2 gruppi di pazienti è evidente, ma non raggiunge la significatività statistica a causa della esigua numerosità, p-value = 0.092.

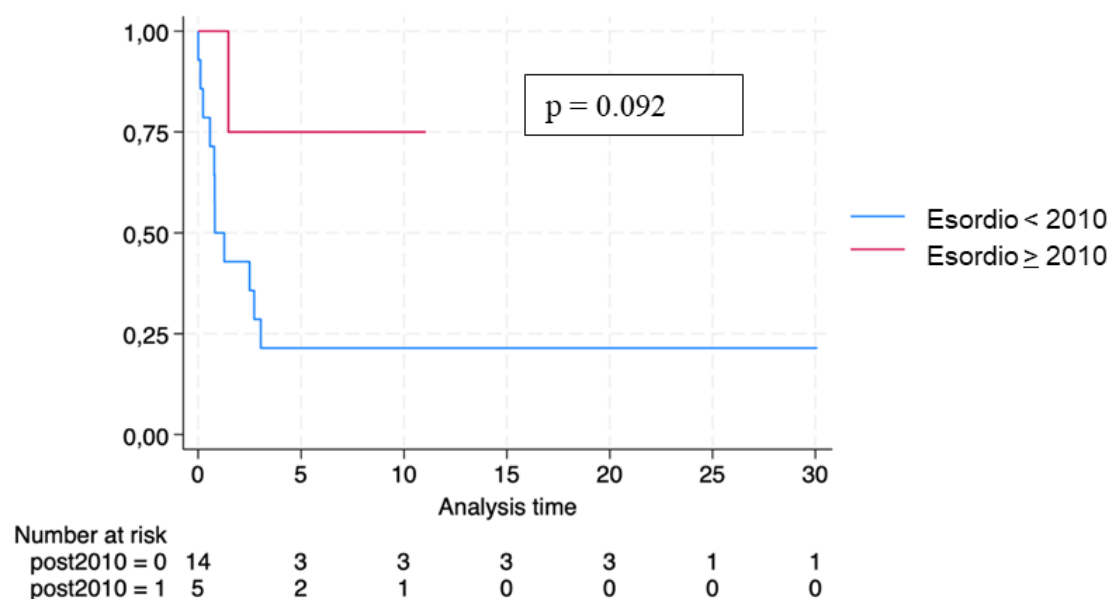


Figura 35: OS di tutti i pazienti con LAM-pCT vs la casistica di tutti i pazienti LAM dello studio.

e) Protocolli LAP

I 31 pazienti con diagnosi di LAP hanno seguito protocolli diversi a seconda dell'evoluzione dei trattamenti terapeutici per questo sottotipo di LAM.

- **11 pazienti** sono stati trattati con protocolli di chemioterapia LAM-oriented (36%), in base all'epoca di diagnosi, ed in particolare:
2 pazienti (6,5% delle LAP) sono stati sottoposti al protocollo istituzionale IGG, all'ultimo follow up risulta vivo un solo paziente (50%);
8 pazienti (26% delle LAP) sono stati sottoposti al protocollo AIEOP LAM 87, all'ultimo follow up risultano vivi 2/8 pazienti (25%).
1 paziente (3% delle LAP) è stato sottoposto a protocollo AIEOP LAM 92 e risulta vivo all'ultimo follow up;
- **14 pazienti (45% delle LAP) hanno ricevuto ATRA associato a CT (protocollo GIMEMA-AIEOP AIDA)**, all'ultimo follow up risultano **vivi 10/14 pazienti (71,4%)**. Dei 4 pazienti deceduti, **1 è morto precocemente** per emorragie cerebrali multiple correlate alla leucemia, **3 pazienti recidivati**, **1 in recidiva precoce** non ha risposto a più linee di terapia, **1 paziente in recidiva molecolare** prima dello stop terapia, raggiunta la RC molecolare con terapia di seconda linea, è stato sottoposto a TCSE-MUD, ma ha presentato un'ulteriore recidiva combinata (midollo + SNC) ed è morto per progressione di malattia, e **un paziente è morto per tossicità** nella fase di reinduzione della remissione.

Dei 10 pazienti vivi e in follow-up, 2 sono stati sottoposti a TCSE, rispettivamente MSD e MUD, uno per una recidiva tardiva midollare e uno per recidiva molecolare midollare + recidiva SNC nel corso del trattamento di prima linea.

- **6 pazienti (19% delle LAP) sono stati trattati secondo il protocollo “Chemo-free” basato sull’associazione ATRA + ATO** adottato dal 2014 ad oggi (protocollo ICC-APL 02), all’ultimo follow-up risultano tutti vivi e in RC.

La figura 36 mostra la suddivisione dei pazienti LAP secondo i protocolli di trattamento.

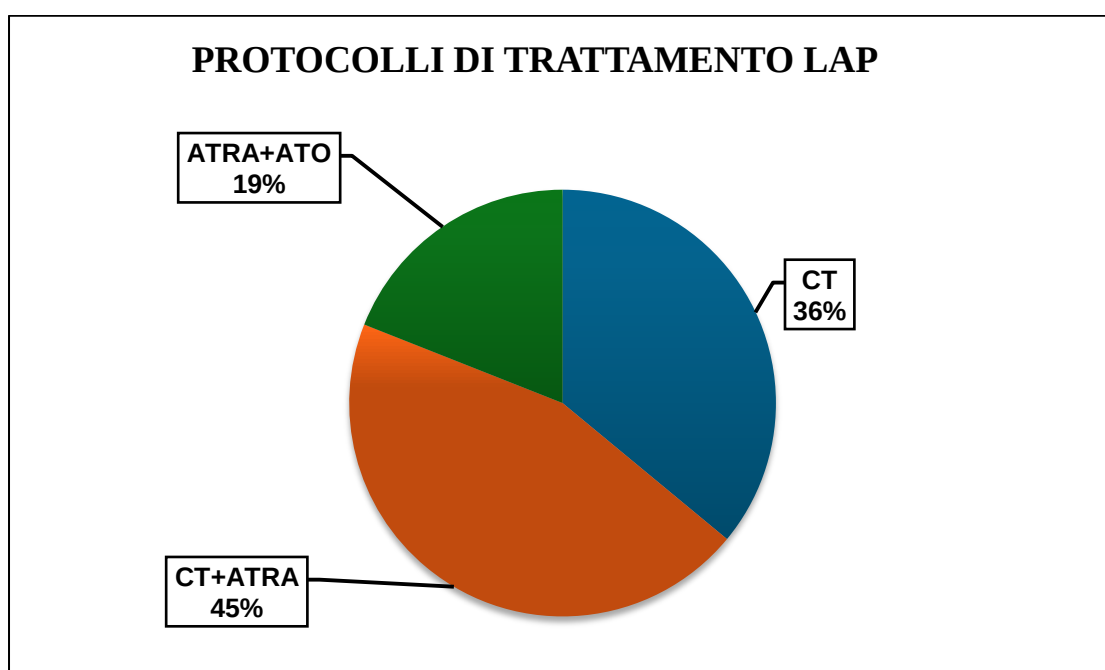


Figura 36: Suddivisione dei pazienti LAP in base ai protocolli di trattamento.

Per quanto riguarda la stratificazione 14 pazienti erano a SR, 13 HR e 4 pazienti non stratificabili (NN) in quanto non note le caratteristiche cliniche d’esordio.

In tabella 33 riportata la stratificazione e il tasso di sopravvivenza per protocollo.

Protocolli	Totale/vivi (%)	SR/vivi (%)	HR/vivi (%)	Rischio NN
CT LAM -oriented	11/4 (36%)	3/1 (33%)	4/2 (50%)	4/1(25%)
CT+ATRA	14/11 (78.5%)	6/5 (83%)	8/6 (75%)	-
ATRA/ATO	6/6 (100%)	5/5 (100%)	1/1 (100%)	-

Tabella 33: Stratificazione dei pazienti LAP e tasso di sopravvivenza per protocollo.

f) Trapianto di cellule staminali emopoietiche

Il Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche è stato introdotto nei primi anni '80 per il trattamento delle leucemie resistenti.

Risale al luglio 1983 il primo trapianto di midollo autologo effettuato presso l'Istituto Giannina Gaslini, in una piccola paziente affetta da LAM, fenotipo FAB M1; il primo trapianto di cellule staminali da donatore familiare in LAM veniva eseguito 18 mesi dopo, nel gennaio 1985. Sei anni dopo, nel maggio 1991 si attuava il primo trapianto da donatore non correlato in una bambina di 8 anni affetta da LAP e resistente alla terapia di induzione e più di 10 anni dopo, nel settembre 2003, il primo trapianto da donatore familiare aploidentico in una bambina di 3 anni affetta da leucemia megacarioblastica ad alto rischio.

Globalmente 159/244 pazienti (65%) sono stati sottoposti a TCSE, di cui 8/159 (5%) LAP e 151/244 (62%) LAM.

138/159 (87%) pazienti sono stati trapiantati in RC1, mentre 21/159 (13%) in RC2. Specificando per gruppo: 1) LAM trapiantate in RC1 134/151 (88%) e in RC2 17/151 (12%); 2) LAP trapiantate in RC1 4/8 (50%) e in RC2 4/8 (50%).

L'età mediana dei pazienti LAP trapiantati in prima remissione è di 8.73 anni (IQR 6.85 – 9.50). L'età mediana dei pazienti LAM trapiantati in prima remissione è di 7.33 anni (IQR 2.65 – 12.45). Nel gruppo LAM 12/151 (7.9%) sono stati trapiantati ad un'età inferiore ad 1 anno, 10 in prima RC e 2 in seconda RC.

Il tempo mediano intercorso tra la diagnosi al trapianto in RC1 è stato per i pazienti con LAM 0.4 anni (IQR 0.3 - 0.6) e per i pazienti con LAP 0.26 anni (IQR 0.26 - 0.27).

L'analisi dei pazienti sottoposti a trapianto è riportata in dettaglio nella precedente descrizione dei protocolli di chemioterapia applicati in successione nel nostro centro.

Nel gruppo LAM sono stati sottoposti a trapianto allogenico (sia in prima che in seconda remissione) 105/151 (69.5%) pazienti e a trapianto autologo 46/151 (30.5%) pazienti. Nel gruppo LAP 5/8 (62.5%) sono stati sottoposti a trapianto allogenico e 3/8 (37.5%) a trapianto autologo.

Complessivamente 49/159 pazienti sono stati sottoposti a **trapianto autologo (31%)** e 110 pazienti su 159 **(69.2%) ad allogenico**, così suddivisi **in base al tipo di donatore** (fig.37):

- 3/110 pazienti (3%) da donatore **UCB**, tutti del gruppo LAM. L'analisi della sopravvivenza di questi pazienti è stata unificata nel gruppo da donatore MUD;
- 13/110 (12%) da donatore **aploidentico**, tutti del gruppo LAM, di cui 9 con piattaforma PT-Cy, 1 con α/β /CD19 deplezione, 1 con selezione CD34 e 2 non noti;
- 45/110 pazienti (41%) da donatore **MSD**, di cui 2 del gruppo LAP e 43 del gruppo LAM;
- 49/110 pazienti (44%) hanno ricevuto il trapianto da donatore **MUD**, di cui 3 del gruppo LAP e 46 del gruppo LAM.

In sintesi, 5 pazienti LAP sono stati sottoposti a trapianto allogenico, 2 (40%) da donatore familiare, 3 (60%) da donatore MUD; 105 pazienti LAM sono stati sottoposti a trapianto allogenico, 13 (13%) da donatore aploidentico, 3 (3%) da donatore UCB, 45 (43%) da donatore MSD, 43 (41%) da donatore MUD.

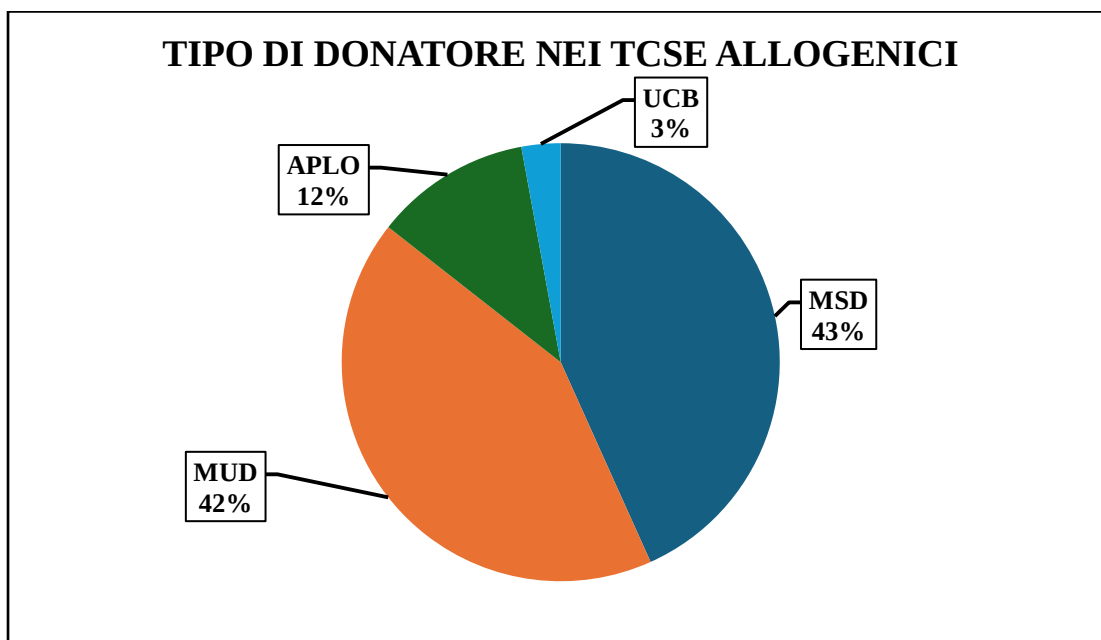


Figura 37: Suddivisione dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico secondo il tipo di donatore

Il numero dei pazienti che venivano sottoposti a TCSE autologo si riduceva progressivamente dall'inizio degli anni 2000, tale procedura veniva completamente abbandonata con l'avvio del protocollo LAM 2013/01 (fig.38).

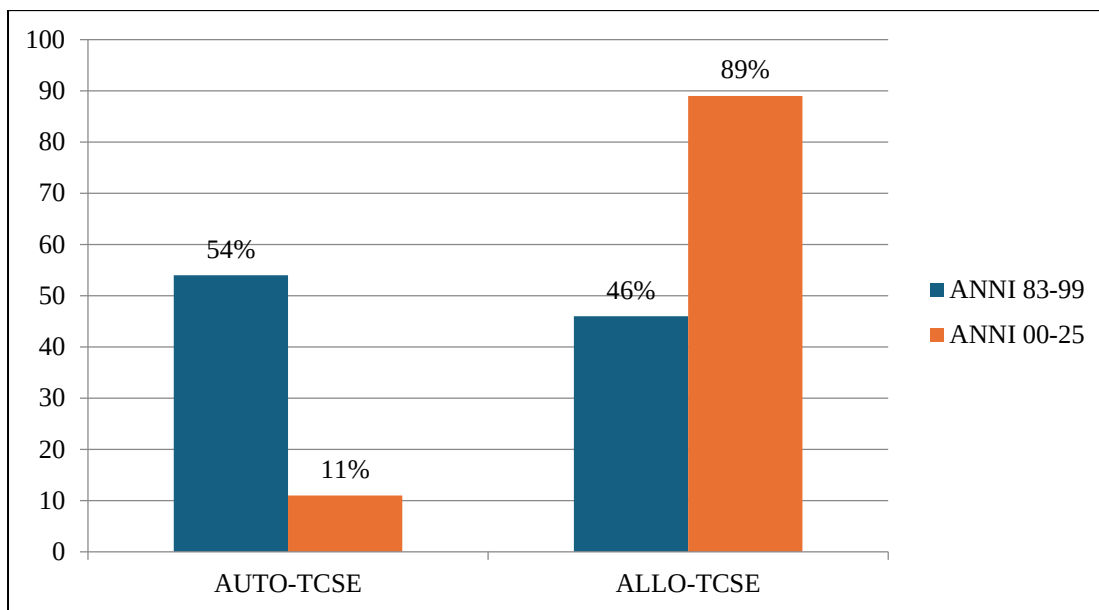


Figura 38: Percentuale di pazienti sottoposti a trapianto negli anni '85-'99 e 2000-2025, suddivisi per tipo di TCSE autologo o allogenico.

I pazienti hanno seguito **diversi regimi di condizionamento**:

- 5/159 (3.1%) sono stati sottoposti a regime **BCNU-BASED**, di cui 4 LAM e 1 LAP, condizionamento che veniva utilizzato inizialmente nei pazienti sottoposti a trapianto autologo;
- 74/159 (46.5%) sono stati sottoposti a regime **BUS-BASED**, di cui 72 LAM e 2 LAP, 7 autologi e 67 allogenici. Da segnalare che per gli allogenici fino a metà del 2012 il **Busulfano veniva associato a Melphalan e Ciclofosfamide** (40 pazienti, 60%) mentre successivamente, sulla base di dati riportati nell'adulto (85), si è iniziato ad associare la **Fludarabina** al posto della Cy (23 pazienti, 34%) perché meno tossica e con outcome sovrapponibili;
- 58/159 (36.5%) sono stati sottoposti a regime **TBI-BASED** (1200 cGy o 990 cGy/Mel), di cui 55 LAM e 3 LAP, 29 trapianti allogenici e 29 autologi;
- 10/159 (6.3%) sono stati sottoposti a regime **TREO-BASED** (Treo/Fluda/Thiotepa), di cui 8 LAM e 2 LAP, tutti TCSE allogenici;
- 12/159 (7.5%) sono stati sottoposti ad altri regimi costituiti da Mel/Etoposide o Thiotepa (8 autologi e 4 allogenici).

La figura 39 mostra la suddivisione di tutti i pazienti trapiantati secondo il regime di condizionamento.

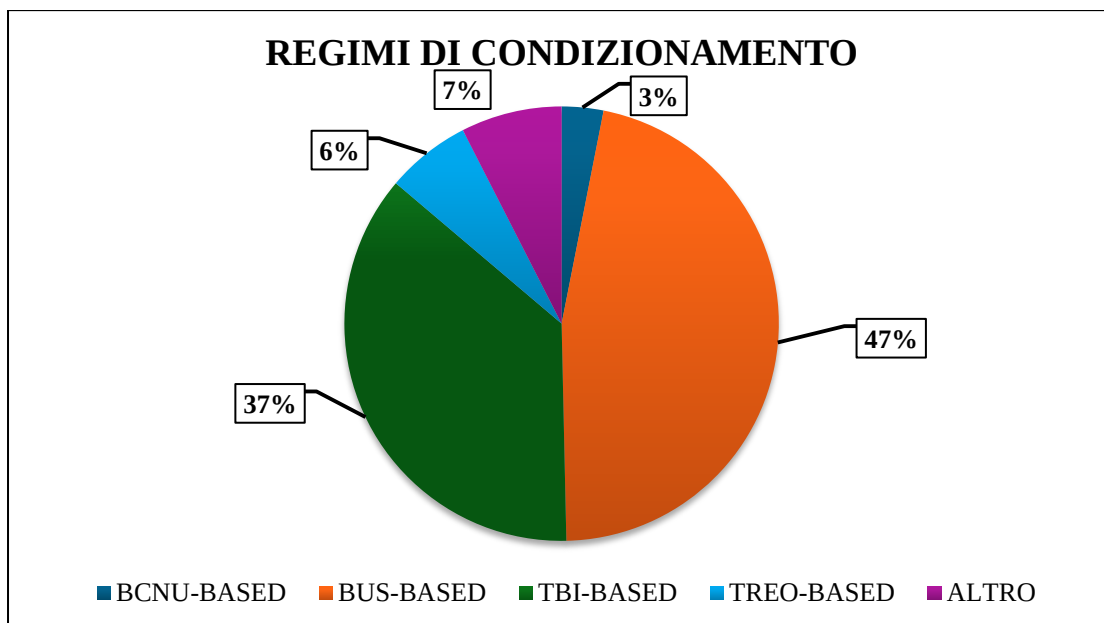


Figura 39: Suddivisione di tutti i pazienti trapiantati secondo il regime di condizionamento.

L'evoluzione dei regimi di condizionamento e il miglioramento delle terapie di supporto unitamente alla qualità della remissione hanno condizionato un significativo decremento della mortalità post trapiantologica in particolare correlata al decremento del rischio di recidiva, come si evince dai dati relativi alla serie casistica dei pazienti sottoposti a trapianto di midollo in RC1 suddivisi per anno di realizzazione del trapianto (< 2000 - ≥ 2000) e mostrati nella tabella 34 e nella figura 40.

Anno TMO	< 2000 (%)	≥2000 (%)	Totale (%)
N. pazienti	63 (46)	75 (54)	138 (100)
Recidive post TMO	25 (40)	20 (27)	45 (33)
Morti post TMO	34 (54)	23 (31)	57 (41)
Morti TRM	8 (13)	8 (11)	16 (11.5)
Morti progressione	26 (41)	15 (20)	41 (30)

Tabella 34: Eventi post TCSE della serie casistica in studio suddivisa per anno del trapianto, < o ≥ 2000.

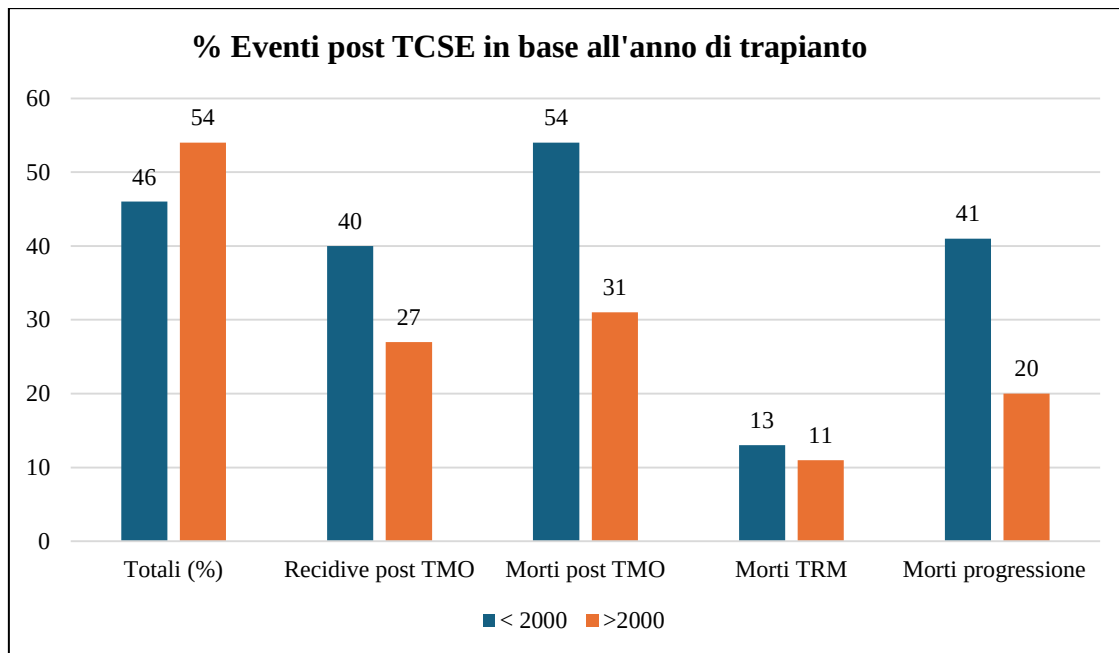


Figura 40: Percentuale di eventi post TCSE della serie casistica in studio suddivisa per anno del trapianto, < o $\geq$ 2000.

2. Analisi delle curve di sopravvivenza

Dei 244 pazienti eleggibili e valutabili, i **pazienti deceduti costituiscono il 44% (n=108)** e i **pazienti vivi il 56% (n=136)** con una **mediana di anni dalla diagnosi all'ultimo follow-up/decesso di 3.6 anni (IQR 1.3 – 14.3)**. Tra i deceduti il 73% (n=79) sono deceduti per progressione di malattia, il 25% (n=25) per tossicità, non nota la causa per 2 pazienti (1.9%).

Dei 213 pazienti con **LAM sono vivi e in follow up il 54.5% (n=116)**, i deceduti sono 45.5% (n=97), con una **mediana di anni dalla diagnosi all'ultimo follow-up/decesso di 3.4 anni (IQR 1.3 – 13.7)**.

Dei 31 pazienti con **LAP sono vivi e in follow up il 64.5% (n=20)**, i deceduti sono 35.5% (n=11) con una **mediana di anni dalla diagnosi all'ultimo follow-up/decesso di 5.2 anni (IQR 1.3 – 20.6)**.

L'Overall Survival (OS) dei pazienti LAP a 1 anno dalla diagnosi è dell'80.1% (95% IC: 61.9 – 90.5) **che si riduce rispettivamente a 3 e a 5 anni al 70% e 62.2%** (95% IC: 50.2- 83.1 e 42.0 – 77.1), plateau stato raggiunto a 5 anni (fig.41).

L'insieme dei pazienti con gli **altri sottotipi di LAM** presenta una **OS a 1 anno di 82%** (95% IC: 76.1- 86.6), mentre a **5 e 10 anni è rispettivamente del 55.7%** (95% IC: 48.5 – 62.3) e **51.8%** (95% IC: 44.5 – 58.6), che è il valore di plateau raggiunto a 11 anni (fig.41).

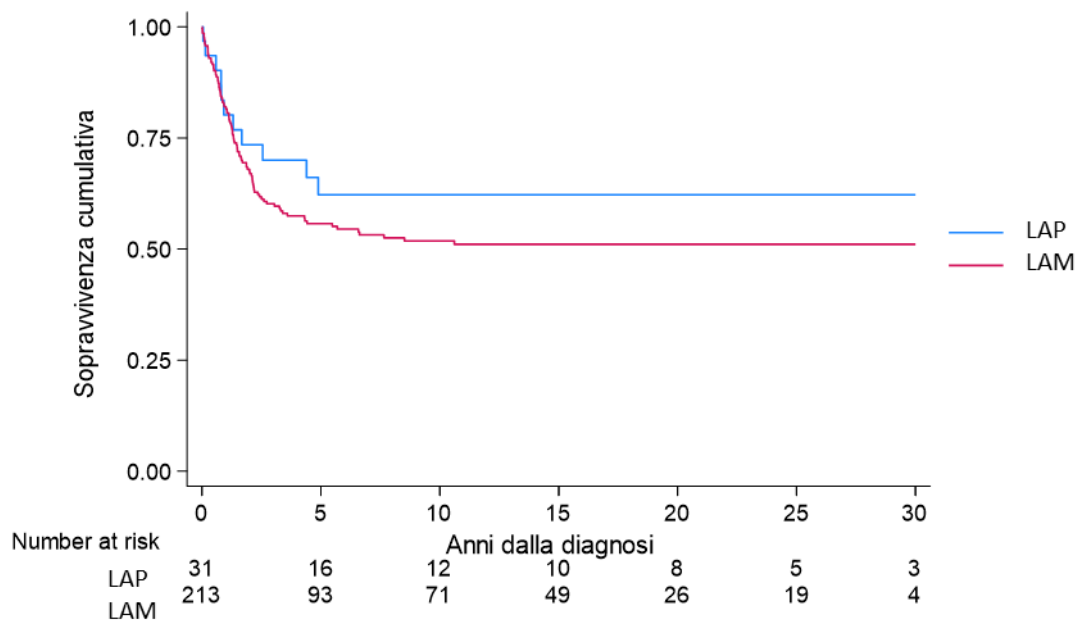


Figura 41: OS per pazienti in studio suddivisa per LAM e LAP.

Per quanto riguarda i dati per *event free survival* il 32% (n=78) dei pazienti ha presentato una prima recidiva, di cui 67 del gruppo LAM (31.5%) e 11 del gruppo LAP (35.5%). La mediana di anni dalla diagnosi alla prima recidiva è di 1.1 anni (IQR 0.7 - 1.8), uguale nei due gruppi di analisi.

Il 52.1% (n=127) dei pazienti ha presentato un evento (prima recidiva/decesso), di cui 114 (53.5%) del gruppo LAM e 13 (41.9%) del gruppo LAP.

L'EFS per i pazienti con LAP a 1 anno è pari al 76.8% (95% IC: 57.4 – 88.2), per poi scendere a 5 anni a 54.8% (95% IC: 34.9 – 70.9), raggiungendo il plateau (fig.46).

L'EFS per tutti gli altri pazienti con altro sottotipo di LAM a 1 anno è pari al 72.5% (95% IC: 66.0 – 78.0), per poi scendere a 5 anni a 46.2% (95% IC: 39.2 – 53.0). La curva si stabilizza e raggiunge il plateau al 43.5% dopo circa 10.5 anni (fig.42).

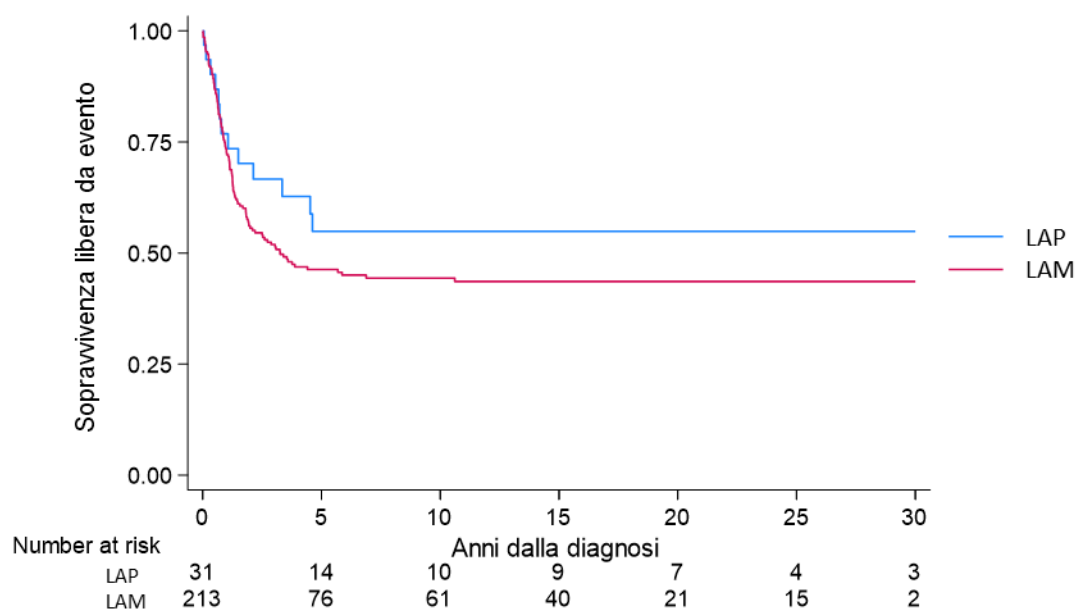


Figura 42: Sopravvivenza libera da evento EFS (evento= recidiva/decesso) per pazienti in studio suddivisi per LAM e LAP.

La Figura 43 mostra la **sopravvivenza globale** in base a **caratteristiche citogenetiche e molecolari** più frequenti all'esordio nella nostra serie casistica per i pazienti per i quali il dato è disponibile (160/244):

- i pazienti con **cariotipo normale** hanno una sopravvivenza a **1 anno del 79.3%** (95% IC: 59.6 – 90.1) che passa a **5 anni al 57.9%** (95% IC: 37.9 – 73.5), valore di plateau raggiunto a 4 anni dalla diagnosi;
- i pazienti con **anomalie del CBF β** presentano una sopravvivenza a **1 anno del 90%** (95% IC: 65.6 – 97.4) che scende a **5 anni al 79.3%** (95% IC: 53.7 – 91.7), valore di plateau raggiunto a 4 anni dalla diagnosi;
- i pazienti con **riarrangiamenti di KMT2A** presentano una sopravvivenza a **1 anno del 90.5%** (95% IC: 73.4 – 96.8) che scende a **5 anni al 62.2%** (95% IC: 41.8 – 77.0), valore di plateau raggiunto a 2 anni dalla diagnosi;
- i pazienti con **anomalie rare ricorrenti** presentano una sopravvivenza a **1 anno del 83.3%** (95% IC: 61.4 – 93.3) che scende a **5 anni al 48.1%** (95% IC: 26.7 – 66.6), valore di plateau pari a 42.7% raggiunto a 7.5 anni dalla diagnosi;
- i pazienti con **anomalie myelodysplasia-related** presentano una sopravvivenza a **1 anno del 79.1%** (95% IC: 56.9 – 90.7) che scende a **5 anni al 48.7%** (95% IC: 27.6 – 66.8), valore di plateau raggiunto a 4 anni dalla diagnosi.

La curva di sopravvivenza globale dei pazienti LAP con t(15;17) è stata già descritta precedentemente.

La differenza tra i gruppi non risulta essere statisticamente significativa (p-value = 0.279).

Questi risultati sono in linea con i dati pubblicati e con la definizione di rischio genetico dettato dalle recenti classificazioni WHO 2022 (2), ICC 2022 (3), ELN 2022 (4) e rivisitata in ambito pediatrico da un gruppo di esperti ematologi, biologi, genetisti delle principali società scientifiche di emato-oncologia pediatrica internazionali (7).

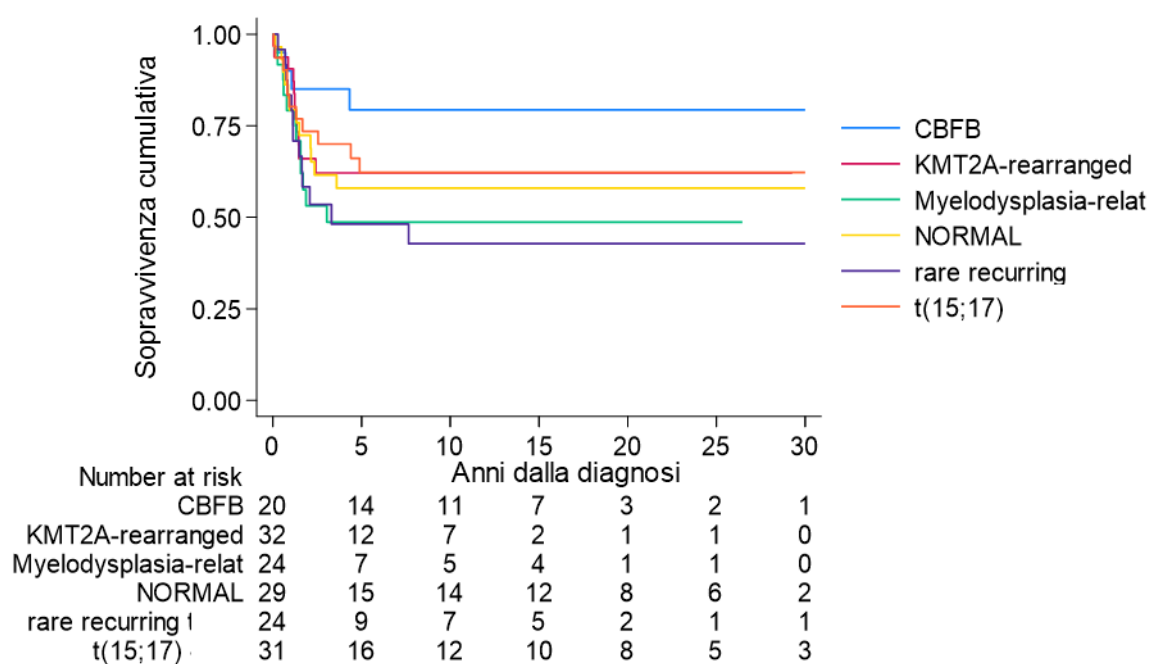


Figura 43: OS in base a caratteristiche citogenetiche e molecolari all'esordio.

La Figura 44 mostra le **curve di EFS** in base a **caratteristiche citogenetiche e molecolari** più frequenti all'esordio nella nostra serie casistica per i pazienti per i quali il dato è disponibile:

- i pazienti con **cariotipo normale** hanno una sopravvivenza libera da eventi a 1 anno del 68.9% (95% IC: 48.8 – 82.4) che passa a **5 anni al 47.8%** (95% IC: 28.9 – 64.4), valore di plateau raggiunto a 2.5 anni dalla diagnosi;
- i pazienti con **anomalie del CBFβ** presentano una sopravvivenza 1 anno dell'80% (95% IC: 55.1 – 91.9) che scende rapidamente a **5 anni a 53.1%** (95% IC: 28.9 – 72.4), valore di plateau raggiunto a 4 anni dalla diagnosi;

- i pazienti con **riarrangiamenti di KMT2A** presentano una sopravvivenza 1 anno del 68.2% (95% IC: 48.9 – 81.5) che scende a **5 anni al 51.3%** (95% IC: 32.6 – 67.3), valore di plateau raggiunto a 2 anni dalla diagnosi;
- i pazienti con **anomalie rare ricorrenti** presentano una sopravvivenza 1 anno del 70.8% (95% IC: 48.3 – 84.8) che scende a **5 anni al 40.1%** (95% IC: 20.3 – 59.2), valore di plateau raggiunto a 3.5 anni dalla diagnosi;
- i pazienti con **anomalie myelodysplasia-related** presentano una sopravvivenza 1 anno del 66.6% (95% IC: 44.2 – 81.7) che scende a **5 anni al 49.1%** (95% IC: 28.0 – 67.1), valore di plateau pari a 42.0% raggiunto a 7 anni dalla diagnosi.

La curva dell'EFS dei pazienti LAP con t(15;17) è stata già descritta precedentemente.

La differenza tra i gruppi non risulta essere statisticamente significativa (p-value = 0.859).

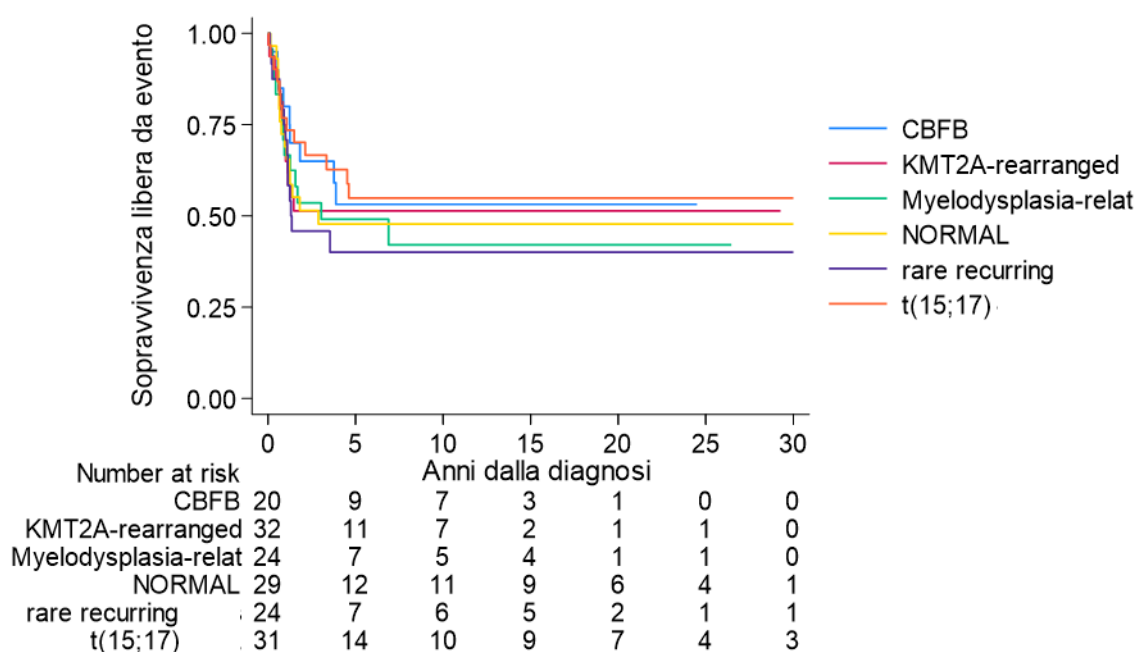


Figura 44: EFS in base a caratteristiche citogenetiche e molecolari all'esordio.

Per quanto riguarda i dati di EFS confrontati ai dati di OS per anomalie genetiche, è da rilevare il significativo incremento di OS rispetto a EFS dei pazienti con riarrangiamento di CBF. Particolarmente evidente dal confronto delle curve di OS (fig.49, 51) e EFS dei pazienti SR del protocollo 2002/01 e 2013 (fig. 50, 52), che di fatto sono pazienti con riarrangiamento di CBF.

La Figura 45 mostra le curve di sopravvivenza dei pazienti **LAP suddivisi in base ai protocolli di trattamento**: la sopravvivenza a **1 anno è pari al 72.7%** (95% IC: 37.0 – 90.2) nel **gruppo CT pre-ATRA** versus **il 78.5% nel gruppo ATRA + CT** (95% IC: 47.2 – 92.5), e il **divario si allarga progressivamente per passare a 5 anni al 36.3%** (95% IC: 11.1 – 62.2), **contro il 71.4% (95% IC: 40.6 – 88.1), rispettivamente**, raggiungendo il plateau. Per quanto riguarda l'ultima generazione di protocollo basato su **ATRA + ATO tutti i pazienti sono vivi e in follow-up**, per quanto il tempo di osservazione mediano sia relativamente breve, 4.25 anni (IQR 0.23- 98.82). La differenza tra i gruppi non risulta essere statisticamente significativa (p-value = 0.077) per il basso campione numerico, ma appare evidente dalle curve come l'introduzione dapprima di ATRA e poi di ATO abbia portato un vantaggio sulla survival.

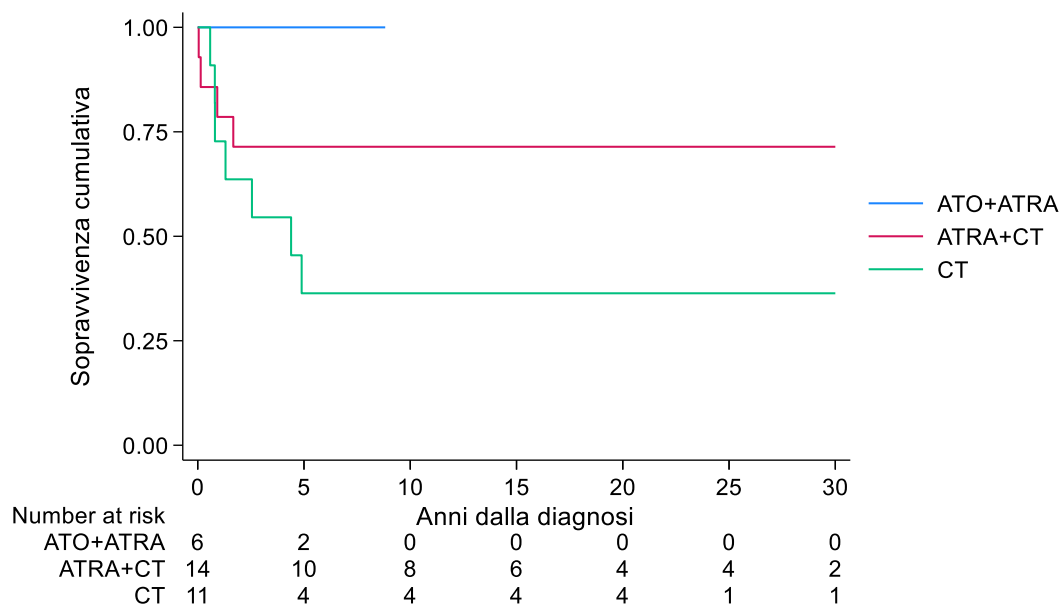


Figura 45: OS dei pazienti con LAP suddivisi in base ai protocolli di trattamento.

La figura 46 mostra l'EFS dei pazienti con **LAP suddivisi per protocollo di trattamento** che a **1 anno è del 63.6%** (95% IC: 29.6 – 84.2) nel **gruppo CT** e del **78.5%** (95% IC: 47.2 – 92.5) nel **gruppo ATRA + CT** (circa 70%), per poi passare **a 5 anni al 36.3%** (95% IC: 11.1 – 62.6) **e al 57.1%** (95% IC: 28.4 – 77.9) **rispettivamente**, valori ai quali raggiunge il plateau. L'EFS del gruppo di trattamento con ATO + ATRA è sovrapponibile alla OS: EFS del 100%. La differenza tra i gruppi non risulta essere statisticamente significativa (p-value = 0.14) per il basso campione numerico, ma risulta evidente il vantaggio che si è realizzato con l'introduzione della

terapia differenziante e l’eliminazione della chemioterapia (protocollo ICC-APL 02).

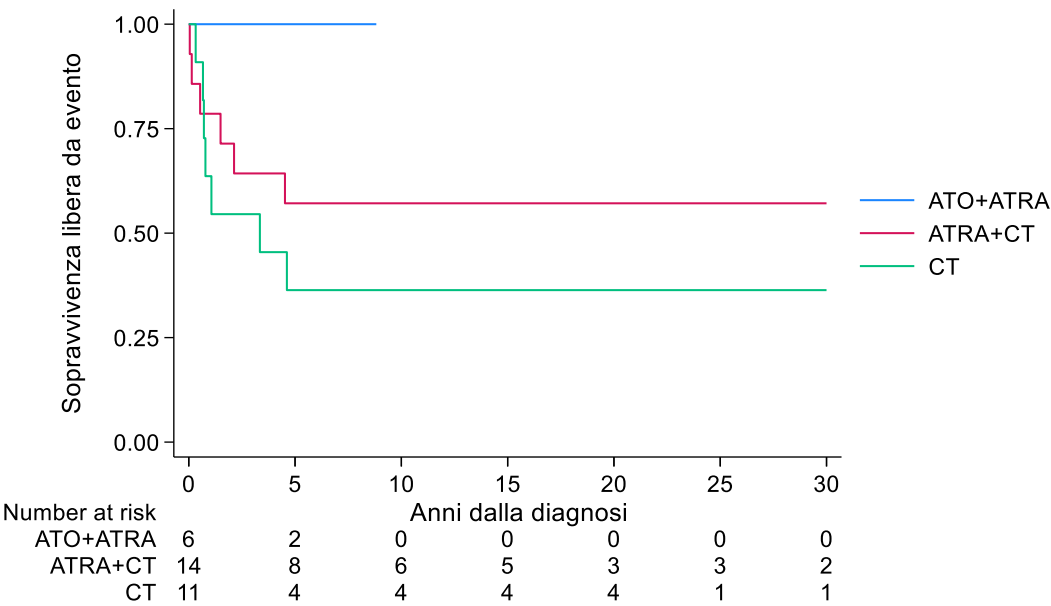


Figura 46: EFS dei pazienti LAP suddivisi in base ai protocolli di trattamento.

I pazienti con **LAP** sono stati stratificati per fascia di rischio in base al valore dei **GB all’esordio** (fig.47). Di seguito la curva di OS dei pazienti con LAP suddivisi in SR, HR e rischio NN 4 pazienti con diagnosi antecedente al 1990, dei quali non sono note tutte le caratteristiche d’esordio. La **OS a 5 anni è rispettivamente 74% (95% IC: 38 - 91), 61% (95% IC: 30 - 81) e 25% (95% IC: 8 - 66).**

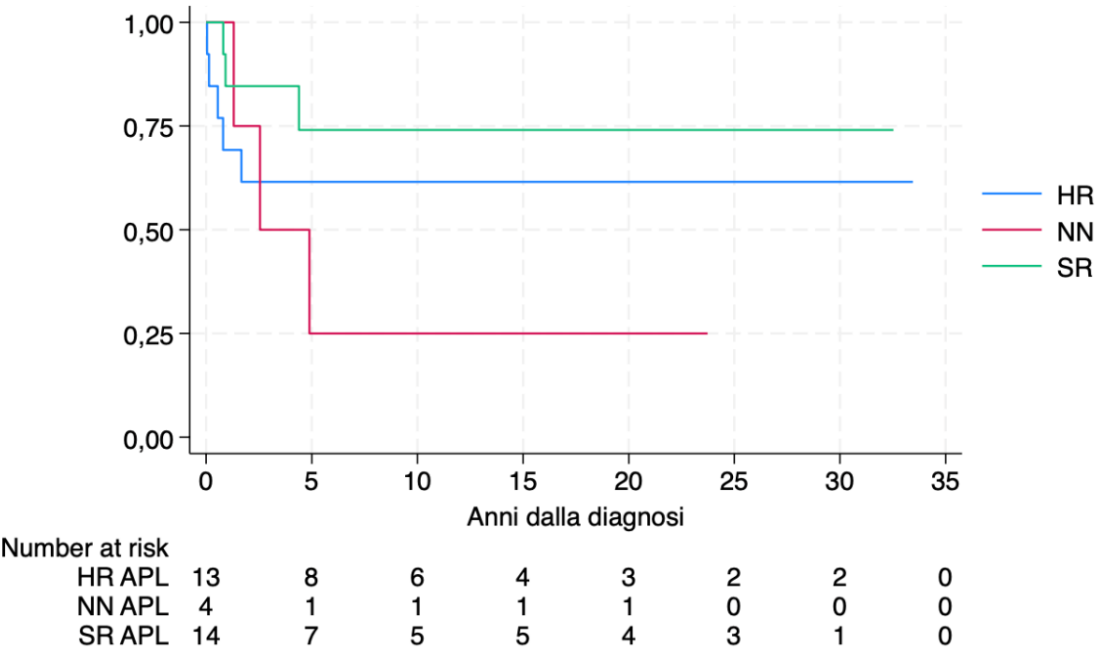


Figura 47: OS dei pazienti con LAP suddivisi in base a fascia di rischio.

Anche in questa analisi non si rileva una differenza statisticamente significativa della OS (p-value = 0.71) a causa della numerosità esigua della popolazione in studio. È comunque evidente una bassa sopravvivenza dei bambini in cui non era noto il rischio e che risalgono a diagnosi precedenti il 1990, la cui prognosi è certamente correlata al trattamento chemioterapico adottato.

La Figura 48 mostra le **curve di sopravvivenza globale** dei pazienti **LAM suddivisi in base ai protocolli di trattamento**:

- dei 6 pazienti sottoposti a **protocolli istituzionali IGG** (prima del 1982) 5 sono deceduti entro i 3 anni dalla diagnosi con sopravvivenza a **5 anni del 16,6%** (95% IC: 0.7 – 51.6), valore di plateau raggiunto dopo 1,5 anni;
- per il protocollo **AIEOP LAM 82** la sopravvivenza a **5 anni è del 70.5%** (95% IC: 43.1 – 86.5), 8 decessi su 17 pazienti. Il plateau è stato raggiunto dopo 8 anni a partire dalla data di diagnosi, con una sopravvivenza del 51.7%;
- per il protocollo **AIEOP LAM 87** la sopravvivenza a **5 anni è del 52%** (95% IC: 34.6 – 66.9), 20 decessi su 36 pazienti. Il plateau è stato raggiunto dopo 11 anni a partire dalla data di diagnosi, con una sopravvivenza del 43.2%;
- nel protocollo **AIEOP LAM 92** la sopravvivenza a **5 anni è del 49.9%** (95% IC: 35.5 - 62.8), 26 decessi su 51 pazienti. Il plateau è stato raggiunto dopo 6 anni a partire dalla data di diagnosi, con una sopravvivenza del 47.9%;
- nel protocollo **AIEOP LAM 2002/01** la sopravvivenza a **5 anni è del 56.2%** (95% IC: 41.4 – 68.6), 22 decessi su 53 pazienti, valore al quale raggiunge il plateau;
- nel protocollo **AIEOP LAM 2013/01** la sopravvivenza a **5 anni è del 88.5%** (95% IC: 68.5 – 96.1), 3 decessi su 27 pazienti, valore al quale raggiunge il plateau dopo 2,5 anni a partire dalla data di diagnosi;
- per quanto riguarda il gruppo eterogeneo “other” in cui sono inclusi pazienti Infant/S. di Down/LAM-pCT sottoposti a protocolli diversi la sopravvivenza a 5 anni è del 36.4% (95% IC: 16.0 – 57.3), valore al quale raggiunge il plateau dopo 3 anni a partire dalla data di diagnosi. Le curve di sopravvivenza di questi pazienti sarà riportata in seguito e commentata separatamente.

La differenza tra i gruppi risulta essere statisticamente significativa ($p\text{-value} < 0.001$), a conferma del vantaggio ottenuto con una migliore stratificazione dei pazienti nei protocolli successivi.

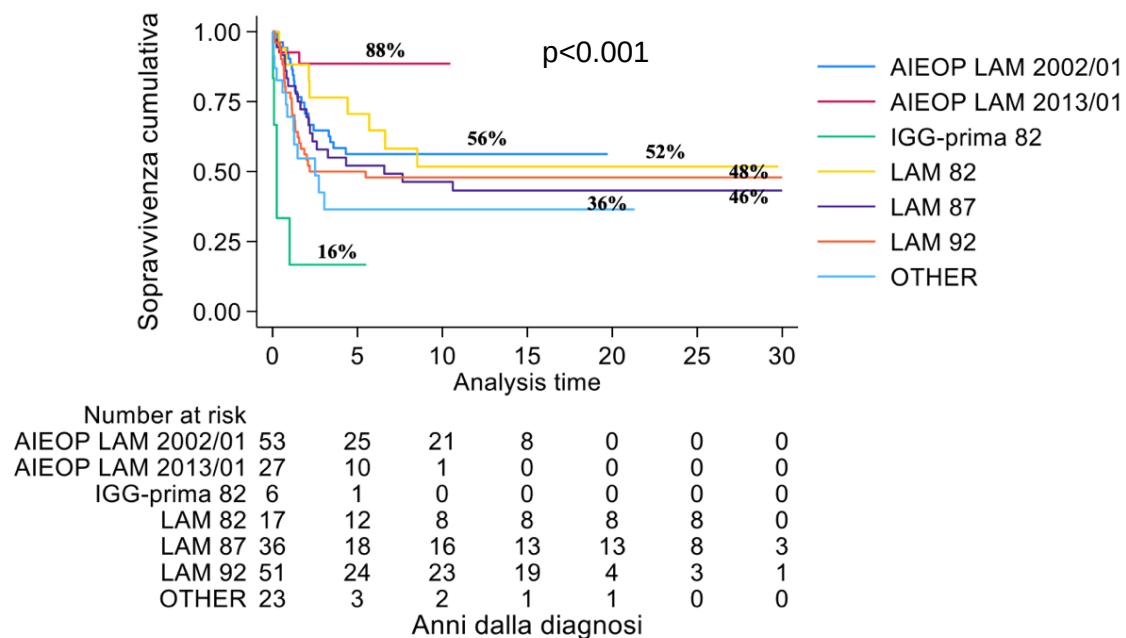


Figura 48: OS dei pazienti LAM suddivisi in base ai protocolli di trattamento.

La Figura 49 mostra le **curve di EFS** dei pazienti **LAM in base ai protocolli di trattamento**:

- su 6 pazienti sottoposti a **protocolli istituzionali IGG (prima del 1982)** si sono verificati 6 eventi entro 3 anni dalla diagnosi con **EFS a 1 anno del 16.6%** (95% IC: 0.7 – 51.6);
- per il **protocollo AIEOP LAM 82** la sopravvivenza a **5 anni è del 64.7%** (95% IC: 37.7 – 82.3), 8 eventi su 17 pazienti. Il plateau è stato raggiunto dopo 5.5 anni a partire dalla data di diagnosi, con una sopravvivenza del 52.9%;
- per il **protocollo AIEOP LAM 87** la sopravvivenza a **5 anni è del 29.4%** (95% IC: 15.5 – 44.7), 26 eventi su 36 pazienti. Il plateau è stato raggiunto dopo 10.5 anni a partire dalla data di diagnosi, con una sopravvivenza del 26.1%;
- nel **protocollo AIEOP LAM 92** la sopravvivenza a 5 anni è del 46.0% (95% IC: 31.8 – 59.1), 27 eventi su 51 pazienti, valore di plateau raggiunto dopo 4.5 anni a partire dalla data di diagnosi;

- nel **protocollo AIEOP LAM 2002/01** la sopravvivenza a 5 anni è del 46.8% (95% IC: 32.6 – 59.7), 27 eventi su 53 pazienti, valore al quale raggiunge il plateau dopo 4 anni;
- nel **protocollo AIEOP LAM 2013/01** la sopravvivenza a 5 anni è del 80.8% (95% IC: 59.7 – 91.5), 5 eventi su 27 pazienti, valore al quale raggiunge il plateau dopo 2 anni a partire dalla data di diagnosi;
- per quanto riguarda il gruppo eterogeneo “other” di chi stato sottoposto a protocolli diversi perché Infant/S. di Down/LAM-pCT la sopravvivenza a 5 anni è del 34.3% (95% IC: 15.0 – 54.7), valore al quale raggiunge il plateau dopo 7.5 anni a partire dalla data di diagnosi. Anche in questo caso la EFS dei pazienti di questo gruppo sarà riportata in seguito e commentata separatamente.

Anche in questo caso la differenza dell'EFS tra i gruppi risulta essere **statisticamente significativa (p-value < 0.001)**.

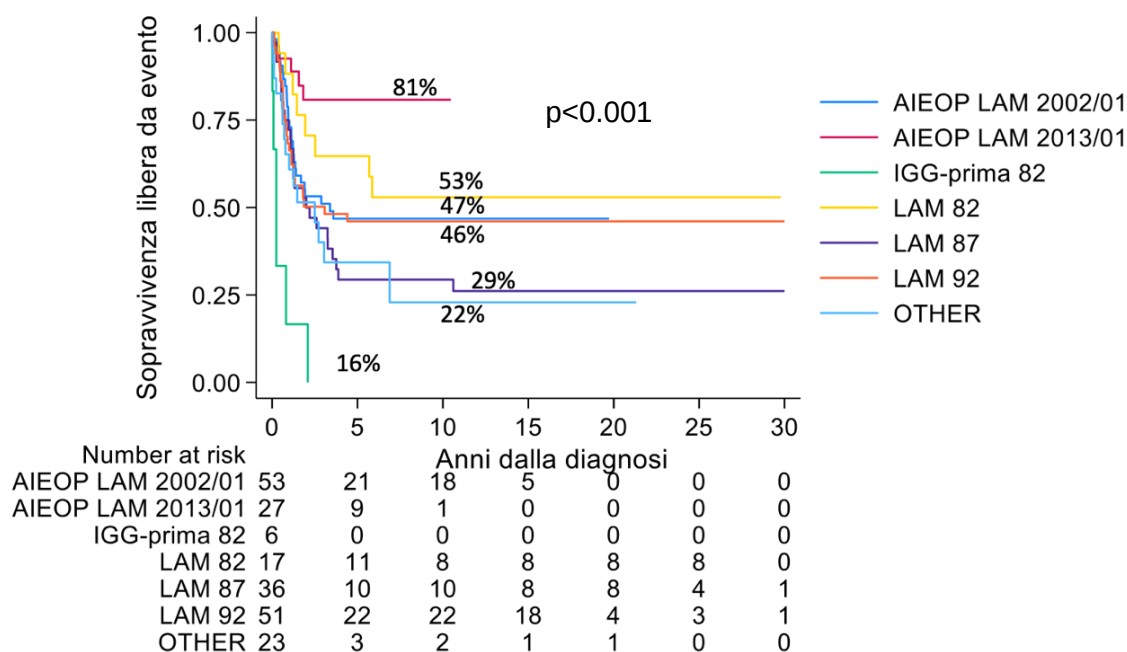


Figura 49: EFS dei pazienti LAM suddivisi in base ai protocolli di trattamento.

A partire dal protocollo LAM 92, come riportato nel capitolo dedicato alla descrizione e all'evoluzione dei singoli protocolli, per la prima volta con questo protocollo si introduceva la stratificazione per rischio, sono state quindi elaborate le curve di survival

stratificate in base al rischio per i pazienti del protocollo LAM 92 e dei successivi protocolli attivati.

Per quanto riguarda i pazienti arruolati nel **protocollo AIEOP LAM 92 divisi per classe di rischio** (fig.50) l'**OS a 5 anni per i pazienti SR** (solo 3 nella nostra serie casistica) è **66.6%** (95% IC: 5.4 – 94.5) corrispondente al valore di plateau raggiunto a 1.5 anni dalla diagnosi, mentre per i pazienti **HR è pari a 47.7%** (95% IC: 32.8 – 61.2), corrispondente al plateau raggiunto a circa 3 anni dalla diagnosi. La differenza tra i due gruppi non risulta essere statisticamente significativa (p-value = 0.572), per numerosità campionarie diverse nei due gruppi.

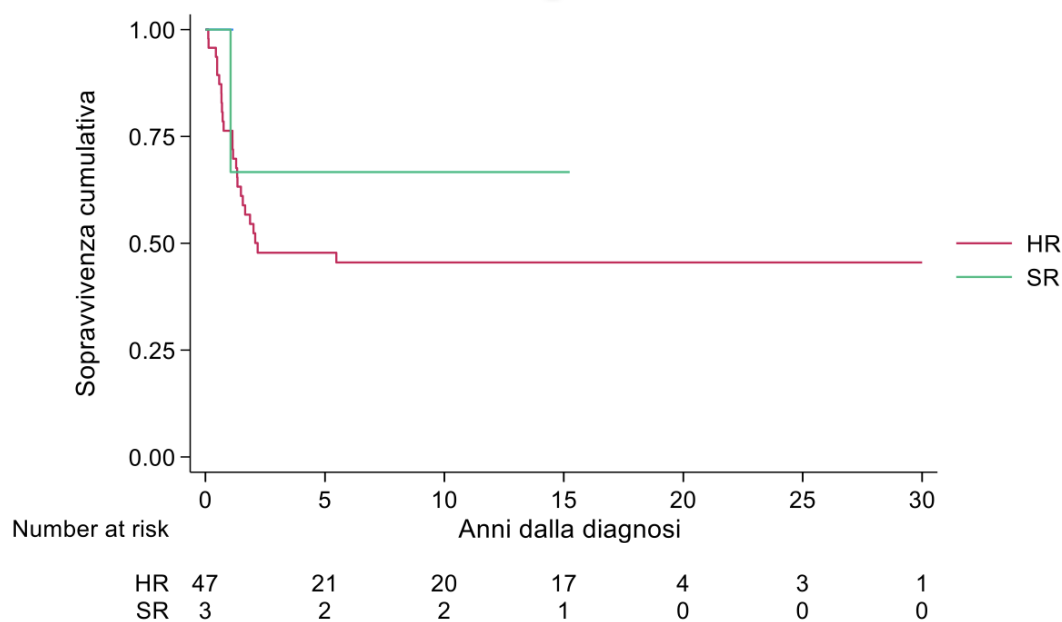


Figura 50: OS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 92 in base a classe di rischio.

Per quanto riguarda l'**EFS** dei pazienti arruolati nel **protocollo AIEOP LAM 92 in base alla classe di rischio** (fig.51) tra i pazienti **SR** 1 su 3 è recidivato **entro il primo anno** dalla diagnosi e la curva si assesta al **66.6%** (95% IC: 5.4 – 94.5), mentre per i pazienti **HR la sopravvivenza a 5 anni è pari al 43.5%** (95% IC: 28.9 – 57.1), corrispondente al plateau raggiunto a circa 4 anni dalla diagnosi (p-value = 0.566, non significativa).

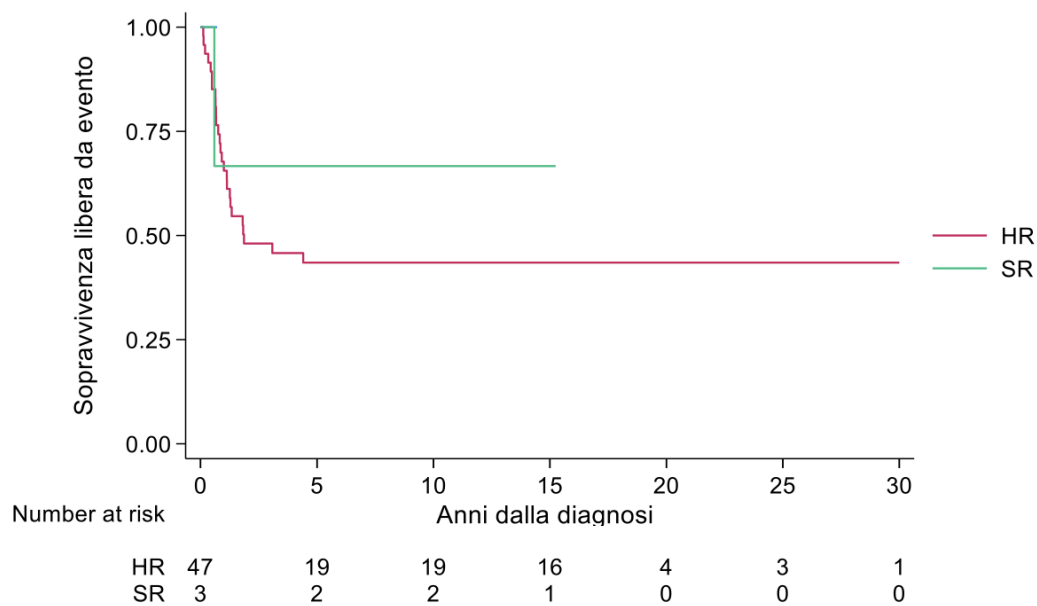


Figura 51: EFS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 92 in base a classe di rischio.

La figura 52 mostra la **sopravvivenza globale** dei pazienti arruolati nel **protocollo AIEOP LAM 2002/01 divisi per fasce di rischio**. Tutti i pazienti SR (solo 3 nella nostra serie casistica) sono **vivi e in follow up**, mentre per i pazienti HR l'OS a 5 anni è **53.4%** (95% IC: 38.2 – 66.4), corrispondente al plateau raggiunto a circa 4 anni dalla diagnosi. La differenza tra i due gruppi non risulta essere statisticamente significativa (p-value = 0.173), per numerosità campionarie diverse nei due gruppi.

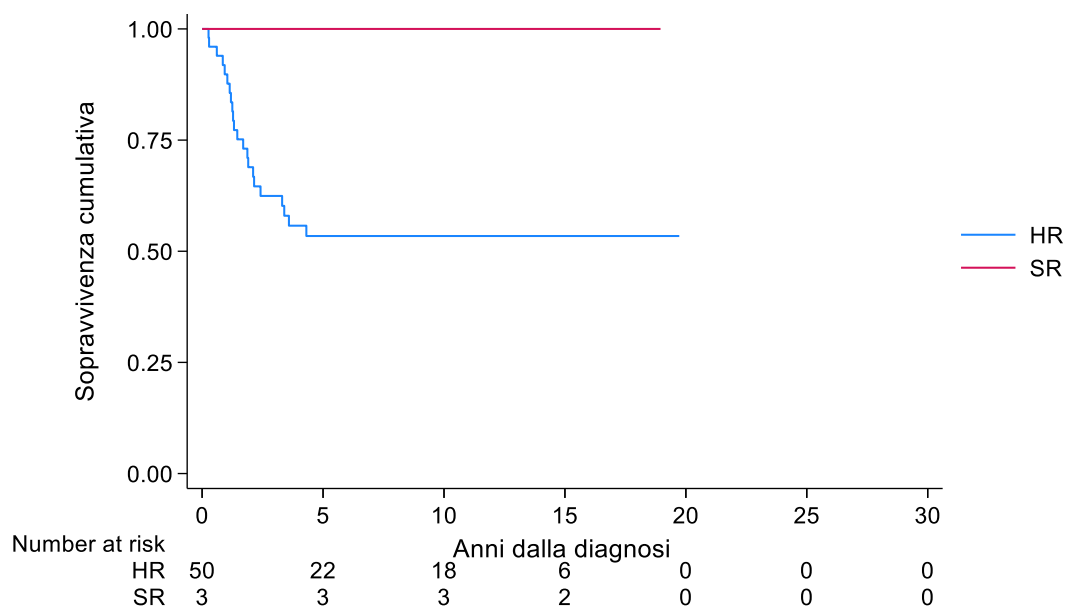


Figura 52: OS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2002/01 in base a classe di rischio.

La figura 53 mostra l'EFS dei pazienti arruolati nel **protocollo AIEOP LAM 2002/01 divisi per fasce di rischio**. Per i pazienti SR (solo 3 nella nostra serie casistica) l'EFS a

5 anni è 33.3% (95% IC: 0.9 – 77.4) valore di plateau raggiunto a 1.5 anni, mentre per i pazienti **HR l'EFS a 5 anni è 47.6%** (95% IC: 32.9 – 60.9), plateau raggiunto a circa 3.5 anni dalla diagnosi (p-value = 0.608, non significativa).

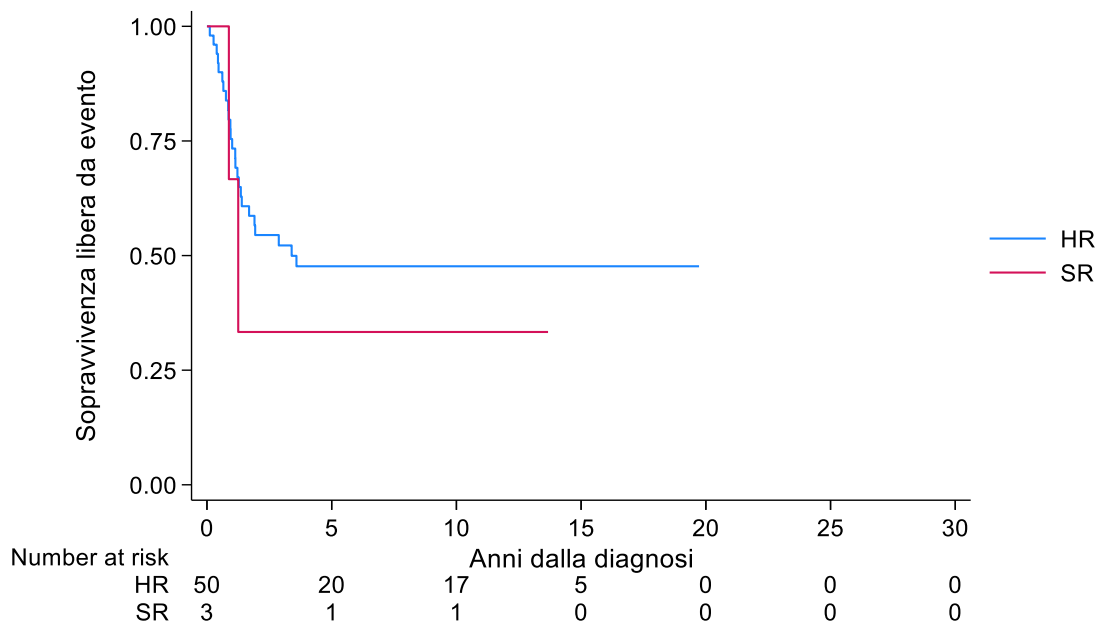


Figura 53: EFS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2002/01 in base a classe di rischio.

Per quanto riguarda **la sopravvivenza globale** (max 10 anni circa) dei pazienti arruolati nel **protocollo AIEOP LAM 2013/01 in base alla classe di rischio** (fig.54) **tutti i pazienti SR e MR sono vivi**, mentre per i pazienti **HR l'OS a 5 anni è pari al 82.5%** (95% IC: 54.9 – 94.0), corrispondente al plateau raggiunto a circa 1.5 anni dalla diagnosi. La differenza tra i tre gruppi non risulta essere statisticamente significativa (p-value = 0.434), per ridotto numero campionario.

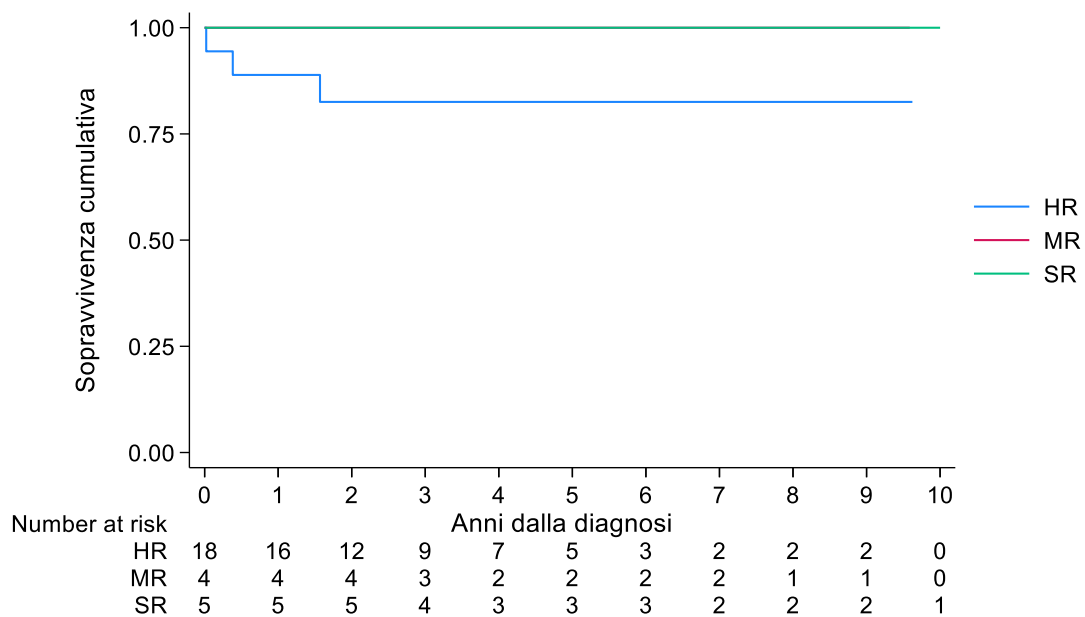


Figura 54: OS pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2013/01 in base a classe di rischio (curve MR e SR sovrapposte).

Per quanto riguarda l'EFS dei pazienti arruolati nel **protocollo AIEOP LAM 2013/01 in base alla classe di rischio** (fig.55) si è verificata 1 recidiva nel gruppo **SR** (n=5) con EFS che si stabilizza all'**80%** (95% IC: 20.3 – 96.9) **a 2 anni dalla diagnosi**, 1 recidiva nel gruppo **MR** (n=4) con EFS che si stabilizza al **75%** (95% IC: 12.7 – 96.0) **dopo circa 1 anno** dalla diagnosi, mentre nel gruppo **HR** si sono verificati 3 decessi ma nessuna recidiva con EFS sovrapponibile alla OS, **a 5 anni pari a 82.5%** (95% IC: 54.9 – 94.0) e plateau raggiunto a 1 anno dalla diagnosi (p-value = 0.948, non significativa).

È necessario sottolineare e ricordare il comportamento della OS dei pazienti SR e MR in questo gruppo di pazienti: tutti i pazienti che hanno presentato una recidiva sono stati recuperati con protocolli di seconda linea e TCSE raggiungendo una OS del 100% (fig.54).

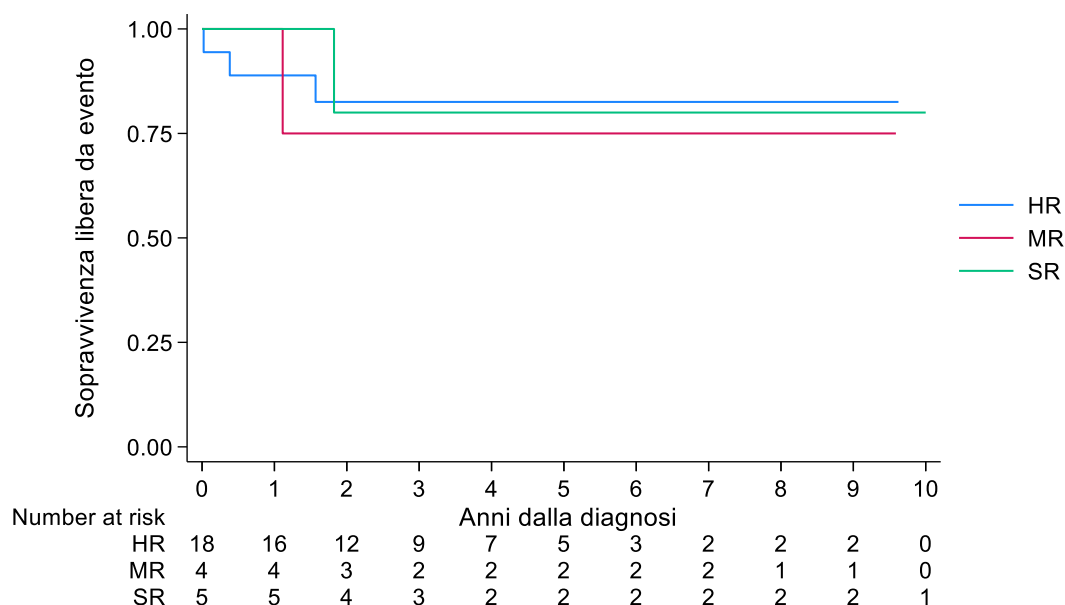


Figura 55: EFS dei pazienti LAM arruolati nel protocollo AIEOP LAM 2013/01 in base a classe di rischio.

La figura 56 mostra la **sopravvivenza globale** dei **pazienti Infant** della nostra serie casistica (n=25, escluso 1 paziente con S. di Down), che a 1 anno è pari al 51.4% (12 decessi entro 1 anno dalla diagnosi) (95% IC: 30.5 – 68.8) e scende rapidamente per assestarsi **a 2 anni al 30%** (95% IC: 13.4 – 48.5) (totale 17 decessi).

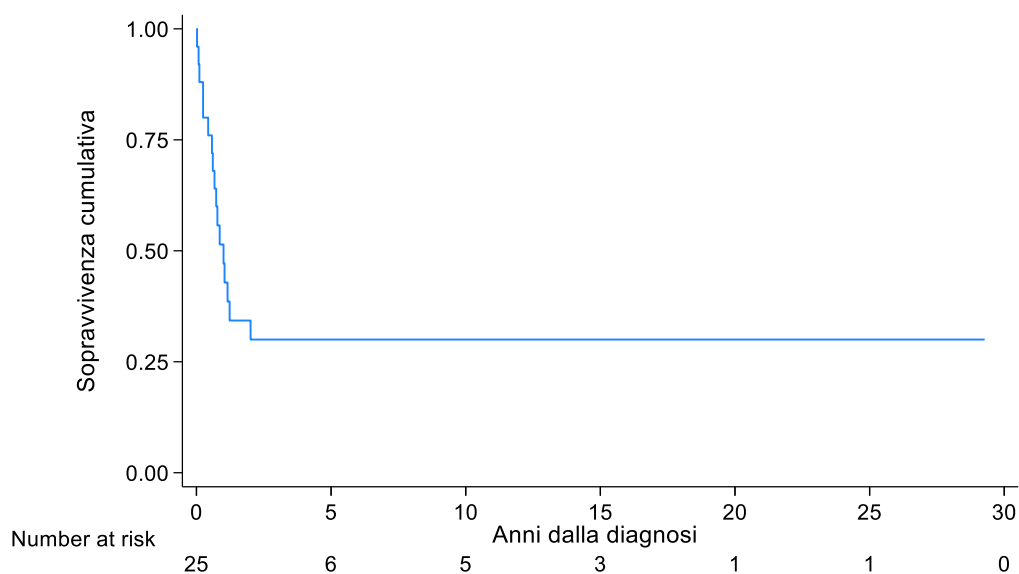


Figura 56: OS dei pazienti Infant (no S. Down).

La figura 57 mostra l'**EFS** dei **pazienti Infant** della nostra serie casistica (n=25, esclusi quelli affetti da S. di Down), che a **1 anno è pari al 30.5%** (17 eventi entro 1 anno dalla diagnosi) (95% IC: 13.8 – 49.0) e **si assesta a 2 anni al 21.8%** (95% IC: 8.0 – 39.8) (totale 19 eventi). Con la terapia di seconda linea il recupero in termini di survival è minimo (OS a 2 anni 30%, fig.56).

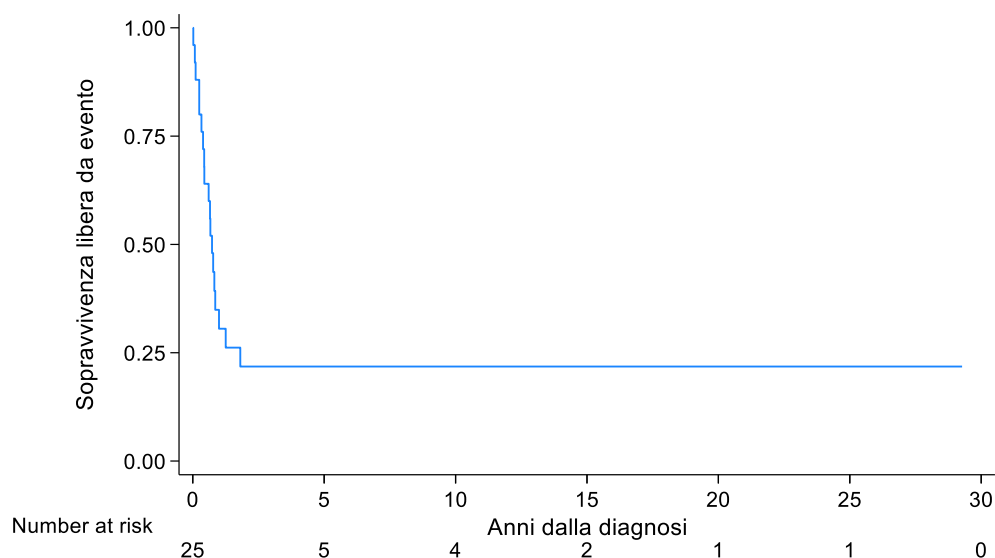


Figura 57: EFS globale dei pazienti Infant (no S. Down).

La figura 58 mostra la **sopravvivenza globale** dei **pazienti con LAM-pCT** (n=15, esclusi quelli con diagnosi di LAP), che a 1 anno è pari al 66.6% (5 decessi entro 1 anno dalla diagnosi) (95% IC: 37.5 – 84.5) e scende ulteriormente per assestarsi a **5 anni al 29.6%** (95% IC: 9.3 – 53.6), plateau raggiunto a circa 3.5 anni (totale 10 decessi).

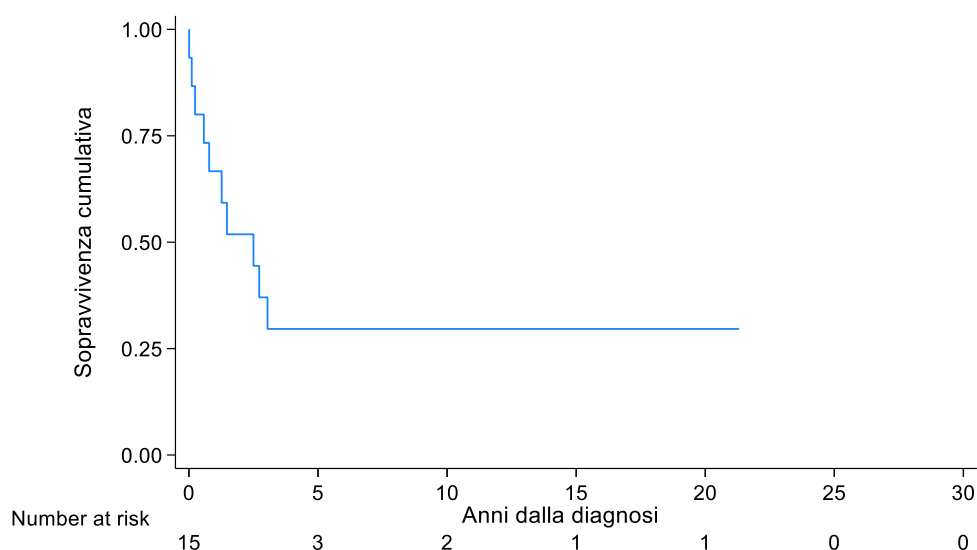


Figura 58: OS dei pazienti con diagnosi di LAM-pCT.

La figura 59 mostra la **sopravvivenza libera da eventi** dei **pazienti con LAM-pCT** (n=15, esclusi quelli con diagnosi di LAP), che a **1 anno è pari al 66.6%** (5 eventi entro 1 anno dalla diagnosi) (95% IC: 37.5 – 84.5) e **scende a 5 anni al 29.6%** (95% IC: 9.3 – 53.6), per poi **assestarsi al 19.7%** (95% IC: 3.0 – 44.8) a **7 anni** (totale 11 eventi). EFS e OS (fig.58) sono sostanzialmente sovrapponibili confermando, come riportato anche dai dati della letteratura che il recupero con protocolli di seconda linea dopo la recidiva è estremamente difficile.

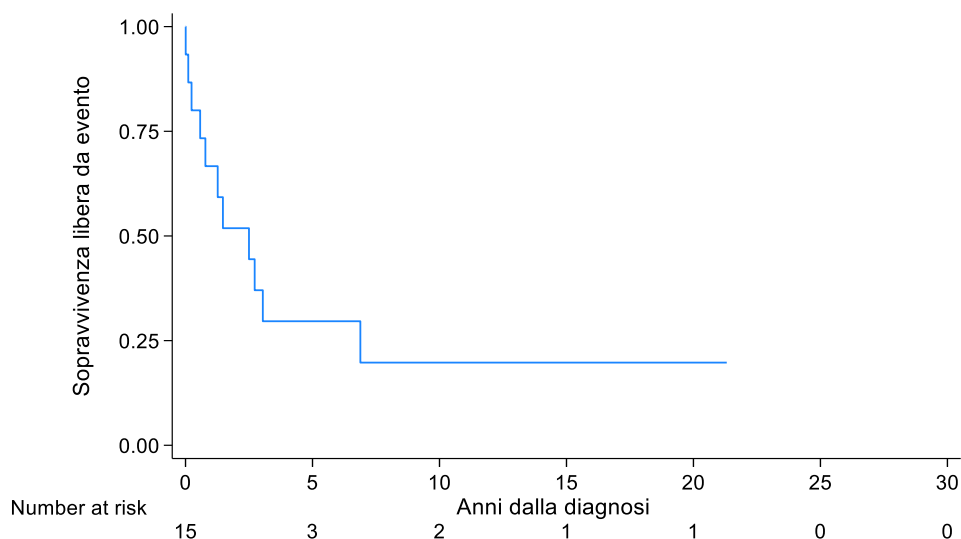


Figura 59: EFS dei pazienti con diagnosi di LAM-pCT.

In precedenza, nel capitolo dedicato a questo gruppo di pazienti, abbiamo riportato la curva di survival di tutti i pazienti con leucemia pCT, compresi i 4 pazienti con LAP. La curva di OS globale è simile, ma significativamente diversa la prognosi dei pazienti con leucemia post chemioterapia diagnosticati negli ultimi quindici anni.

La figura 60 mostra la **OS dei bambini con Sindrome di Down e LAM**. Nessun paziente con LAP. Solo un paziente con diagnosi antecedente al 1980 è deceduto per progressione, tutti gli altri sono in RC, come riportato precedentemente, OS e EFS sono sovrapponibili: a 5 anni 83% (95% CI: 27-97).

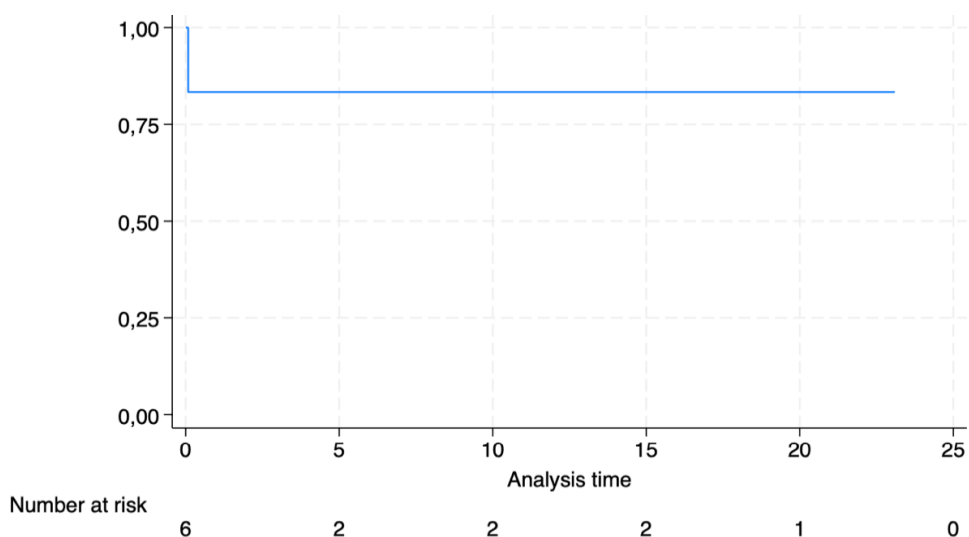


Figura 60: OS dei pazienti con LAM in Sindrome di Down.

Nella tabella 35 riportata di seguito sono riassunti i dati di OS e EFS dei pazienti della serie casistica per protocollo e per i sottotipi in precedenza definiti (LAM/LAP/Infant/LAM-pCT/sindrome di Down).

	5 anni OS %	10 anni OS%	5 anni EFS %	10 anni EFS %
Pazienti LAM	55.7	51.8	46,29	44.36
Pazienti LAP	62.2	62.2	54.89	54.89
Protocolli				
IGG<1982	16.67	-	16.67	16.67
LAM 82	70.59	51.76	65	53
LAM 87	52	46	29	29
LAM 92	49	48	46	46
LAM 2002/01	56	56	47	47
LAM 2013	88	88	81	81
Sottotipi pazienti				
Pazienti INFANT	30	30	21	21
Pazienti Down	83	83	83	83
LAM-pCT (escluse LAP)	29	29	29	19
Tutte le LAM- pCT	34	34	34	34
Pazienti LAP per protocollo e fascia di rischio				
LAP CT	36	36	36	36
LAP ATRA-CT	71	71	57	57
LAP ATRA-ATO	100	-	100	-
LAP SR	74	74	-	-
LAP HR	61	61	-	-
LAP NN	25	25	-	-

Tabella 35: OS e EFS dei pazienti della serie casistica per protocollo, per i sottotipi e per LAP anche fascia di rischio.

3. Ruolo del Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche

Dei 159 pazienti sottoposti a TCSE sono vivi dopo trapianto, qualunque tipo di trapianto, il 58% (n=93) dei bambini dell'intera serie casistica, con un follow up mediano di 4.10 anni (IQR 1.02-15.17), il 50% dei pazienti trapiantati per LAP (4/8), con un follow up mediano di 7.14 (IQR 0.52-21.7), e il 59% dei pazienti trapiantati LAM (89/151), con un follow up mediano di 4.06 anni (IQR 1.05-15.14).

Tra i pazienti trapiantati per LAP in RC1 ci sono stati 2 decessi su 4 e la **sopravvivenza globale a 5 anni è del 50%** (95% IC: 5.7 – 84.4), corrispondente al valore di plateau raggiunto a 4 anni dalla diagnosi (fig.61).

Tra i pazienti con altri sottotipi di **LAM trapiantati in RC1** 55/134 sono deceduti e **l'OS a 5 anni è del 59.5%** (95% IC: 50.4 – 67.4). Il plateau è stato raggiunto a 6.5 anni con una probabilità di sopravvivenza del 56.5% (fig.61).

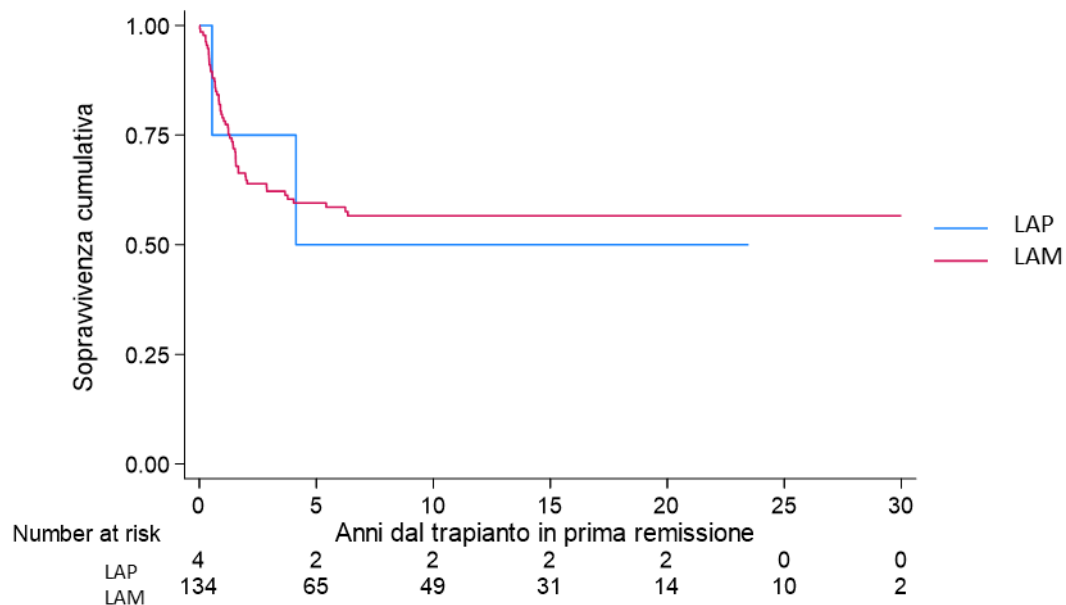


Figura 61: Sopravvivenza globale per pazienti trapiantati in RC1 nei due gruppi LAP e LAM.

Il 31.1% (n=43) dei pazienti sono stati sottoposti a TCSE autologo in RC1, 2/4 pazienti LAP e 41/134 pazienti LAM.

Il trapianto autologo con purging con Mafosfamide ha costituito un elemento terapeutico innovativo nei primi anni '80, ma successivamente è progressivamente sostituito dal trapianto allogenico, inizialmente esclusivamente da donatore familiare HLA identico e successivamente da donatore non correlato e più recentemente da donatore aploidentico in pazienti selezionati.

Di fatto la maggior parte dei pazienti (68.8%, n=95) sono stati sottoposti a trapianto allogenico in RC1, 2/4 pazienti LAP e 93/134 LAM.

Risulta significativa la differenza della survival fra TCSE autologo vs allogenico (fig.62). La sopravvivenza globale a **1, 5 e 10 anni è 74.4%** (95% IC: 58.5 – 84.9), **44.1%** (95% IC: 29.6 – 58.2) e **39.5%** (95% IC: 25.1 – 53.6) nei pazienti sottoposti a trapianto **autologo** (26 decessi/43) e **80.8%** (95% IC: 71.3 – 87.4), **66.4%** (95% IC:

55.4 – 75.2) e **64.9%** (95% IC: 53.8 – 73.9) nei pazienti sottoposti a trapianto **allogenico** (31 decessi/95) (p-value = 0.007), il plateau è raggiunto per rispettivamente a circa 5.5 e 6.5 anni.

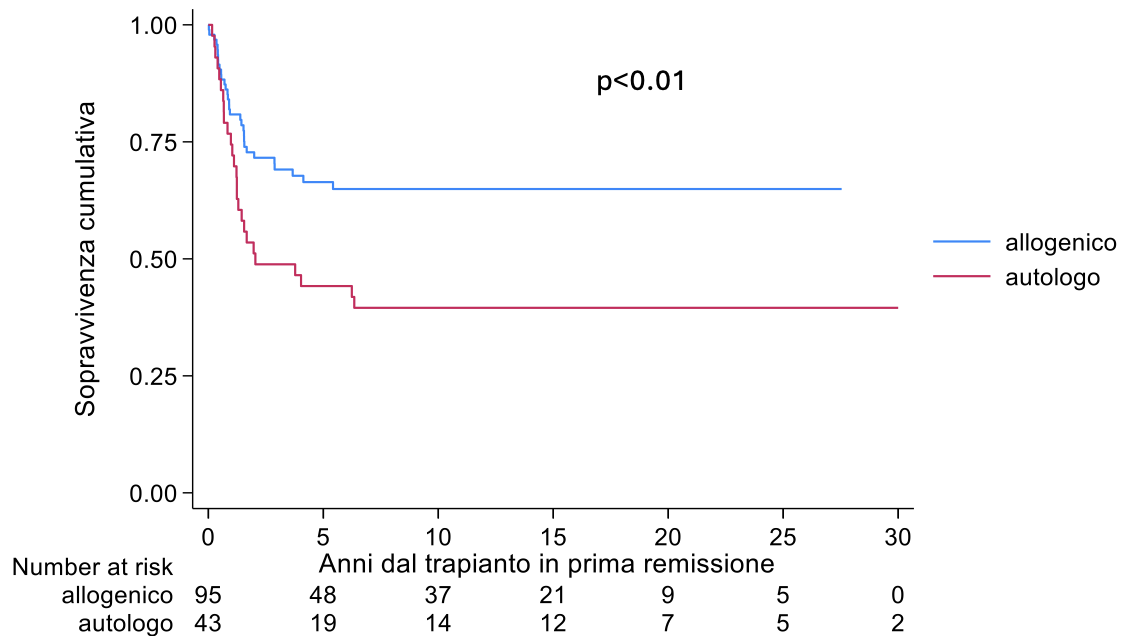


Figura 62: Sopravvivenza globale per TCSE autologo versus allogeneico dei pazienti trapiantati in RC1.

Nella figura 63 è analizzata la **sopravvivenza globale** in base al **tipo di donor** nei TCSE allogeneici:

- i trapianti da **MSD** sono stati il 42.1% (n=40) e sono deceduti 12 pazienti con una sopravvivenza a 1 anno dell'82.5% (95% IC: 66.7 – 91.2) che scende **a 5 anni a 71.3%** (95% IC: 54.2 – 83.0) raggiungendo un **plateau di 68.5% a circa 5.5 anni** dalla diagnosi;
- i trapianti da **MUD** (compresi 3 UCB) sono stati il 47.4% (n=45) con 14 decessi (1 da UCB, recidivato post trapianto). La sopravvivenza a 1 anno è 79.6% (95% IC: 66.5 – 88.8) che scende **a 5 anni a 66.1%** (95% IC: 49.2 – 78.5), **valore di plateau raggiunto a circa 4.5 anni**;
- i TCSE **aploidentici** sono stati il 10.5% (n=10, di cui 7 con piattaforma PT-Cy, 1 con α/β /CD19 deplezione, 1 con selezione CD34 e 1 non noto) con 5 decessi (di cui 2 PT-Cy, 1 non noto e i 2 con manipolazione ex vivo del graft). La sopravvivenza a 1 anno è 80% (95% IC: 40.8 – 94.5) che scende **a 5 anni al 50%** (95% IC: 18.3 – 75.3), valore di plateau raggiunto a circa 4.5 anni.

La differenza tra i gruppi non risulta statisticamente significativa (p-value = 0.4548), ma si evidenziano risultati sovrapponibili tra MSD e MUD. Per gli aploidentici l'OS risulta più bassa nel gruppo degli aploidentici, ma da considerare il ridotto campione.

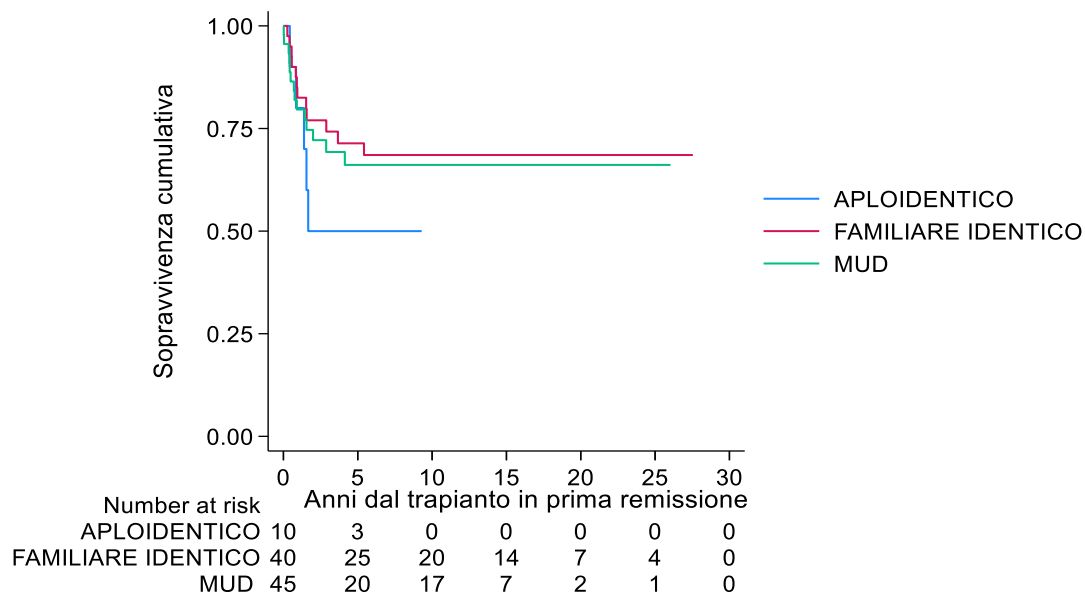


Figura 63: Sopravvivenza globale per tipo di donatore nei TCSE alloigenici dei pazienti trapiantati in RC1.

La figura 64 mostra la **sopravvivenza globale** dei pazienti trapiantati in RC1 suddivisi secondo il **regime di condizionamento**:

- Il 35.5% (n=49) ha seguito regime di condizionamento **TBI-BASED** e 28 (20%) sono deceduti. **La sopravvivenza a 1 e 5 anni è del 75.5% (95% IC: 60.9 – 85.2) e del 46.9% (95% IC: 32.5 – 60.0), rispettivamente.** Il plateau è stato raggiunto a 6.5 anni dalla data di trapianto ed è pari a 42.6%.
- Il 51.5% (n=71) ha seguito regime di condizionamento **BUS-BASED** (Bus/Cy/Mel 48 pazienti, Bus/Fluda/Mel 23 pazienti), 21 decessi (15%, 18 del gruppo Bus/Cy/Mel, 3 del gruppo Bus/Fluda/Mel). **La sopravvivenza a 1 e 5 anni è del 83.0% (95% IC: 72.1 – 90.0) e del 70.3% (95% IC: 57.7 – 79.7), rispettivamente.** Il plateau è stato raggiunto a 6.5 anni dalla data di trapianto pari a 68.2%.
- Il 3.6% (n=5) è stato sottoposto a regime di condizionamento **TREO-BASED** e **tutti i pazienti sono vivi con sopravvivenza a 10 anni del 100%.**
- Il 9.4% (n=13) è stato sottoposto a un differente regime (BCNU-based o altro), di cui 8 deceduti (5.8%). La sopravvivenza a 1 e 5 anni del 61.5% (95% IC: 30.8

– 81.4) e del 38.4% (95% IC: 14.0 – 62.8), rispettivamente. Il plateau è stato raggiunto a 4 anni dalla data di trapianto.

La differenza tra i gruppi risulta essere statisticamente significativa (p-value = 0.01), con survival superiore nel gruppo di condizionamento Bus-BASED rispetto al TBI-BASED. Nessuno dei pazienti sottoposti a condizionamento con Treosulfano è ricaduto.

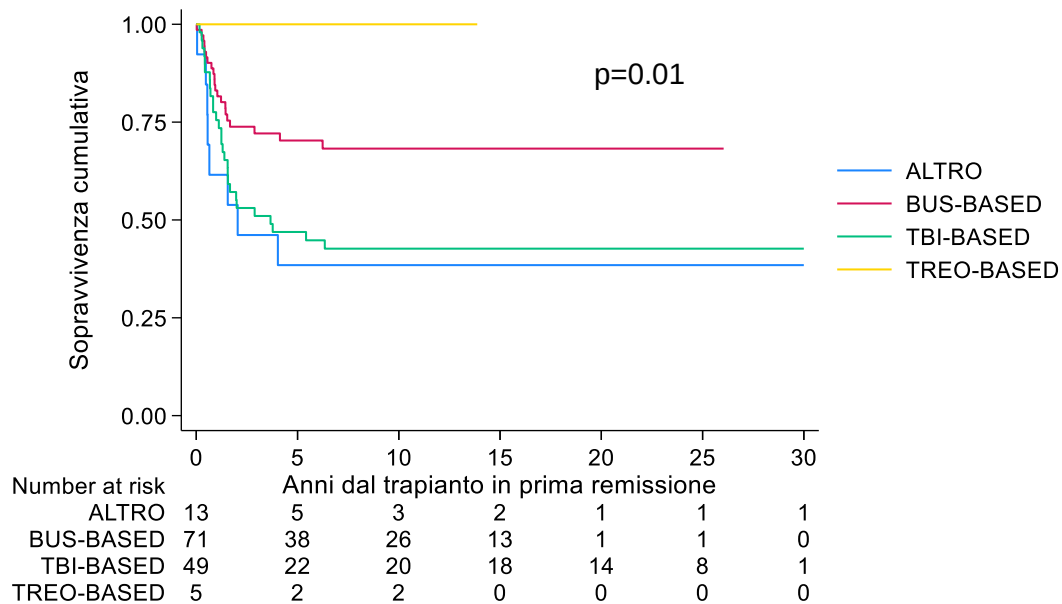


Figura 64: Sopravvivenza globale dei pazienti trapiantati in RC1 suddivisi per regime di condizionamento.

Nella figura 65 è riportata la OS di tutti pazienti della nostra serie casistica sottoposti a trapianto allogenico con regime di condizionamento Bus-BASED, confrontando **Bus/Cy/Mel** (n=44) versus **Bus/Fluda/Mel** (n=23). Con i limiti della diversità campionaria e delle diverse epoche in cui sono stati eseguiti i trapianti, la OS a **5 anni** nel gruppo **Bus/Cy/Mel** è **pari al 69.8%** (95% IC: 53 – 81.6), plateau raggiunto a 4 anni, mentre nel gruppo **Bus/Fluda/Mel** è **85.2%** (95% IC: 60 – 95), plateau raggiunto a 2 anni (p-value = 0.206).

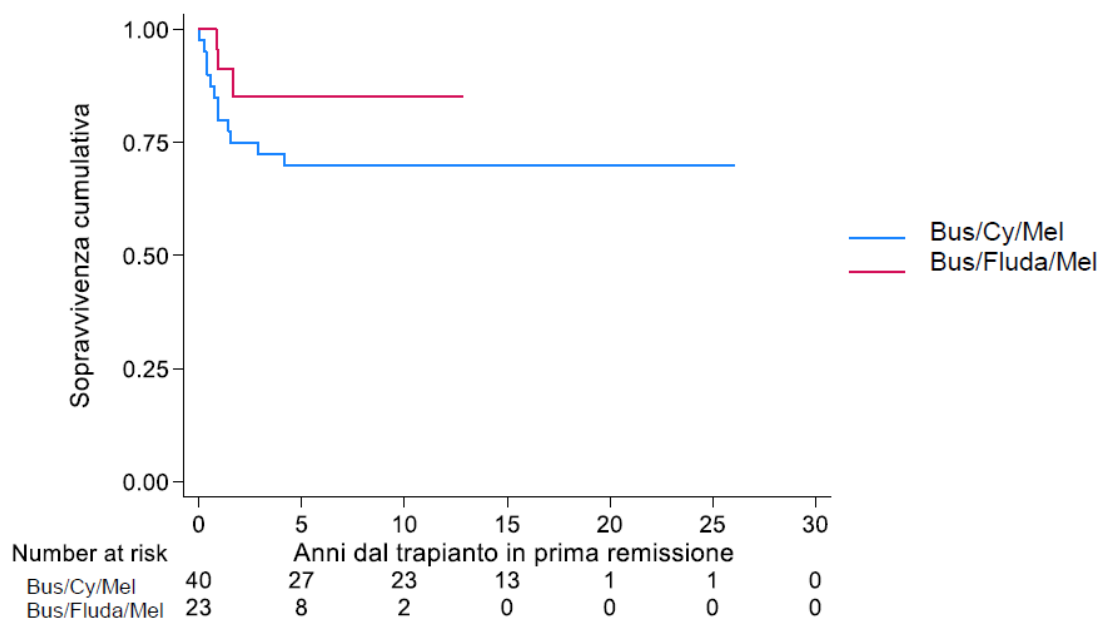


Figura 65: Sopravvivenza globale dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico con regime di condizionamento Bus-BASED, Bus/Cy/Mel versus Bus/Fluda/Mel.

La figura 66 è riassuntiva dei risultati e dei progressi ottenuti con l'implementazione delle procedure trapiantologiche. La serie casistica è stata suddivisa in due periodi temporali in base all'epoca del trapianto in RC1: < 2000 , ≥ 2000 . Nel **periodo < 2000** sono stati eseguiti 63 trapianti su 138 (45.7%) con 34 decessi e la OS a **5 e 10 anni è rispettivamente 50.7% (95% IC: 37.9 – 62.3) e 46.0% (95% IC: 33.4 – 57.1), plateau raggiunto a 6.5 anni**. Nel **periodo ≥ 2000** ci sono stati 23 decessi su 75 trapianti (54.3%), con una **OS di 67.2% (95% IC: 54.7 – 76.9) a 5 anni** e plateau raggiunto a circa 3 anni. La differenza tra i gruppi risulta essere statisticamente significativa (**p-value = 0.028**).

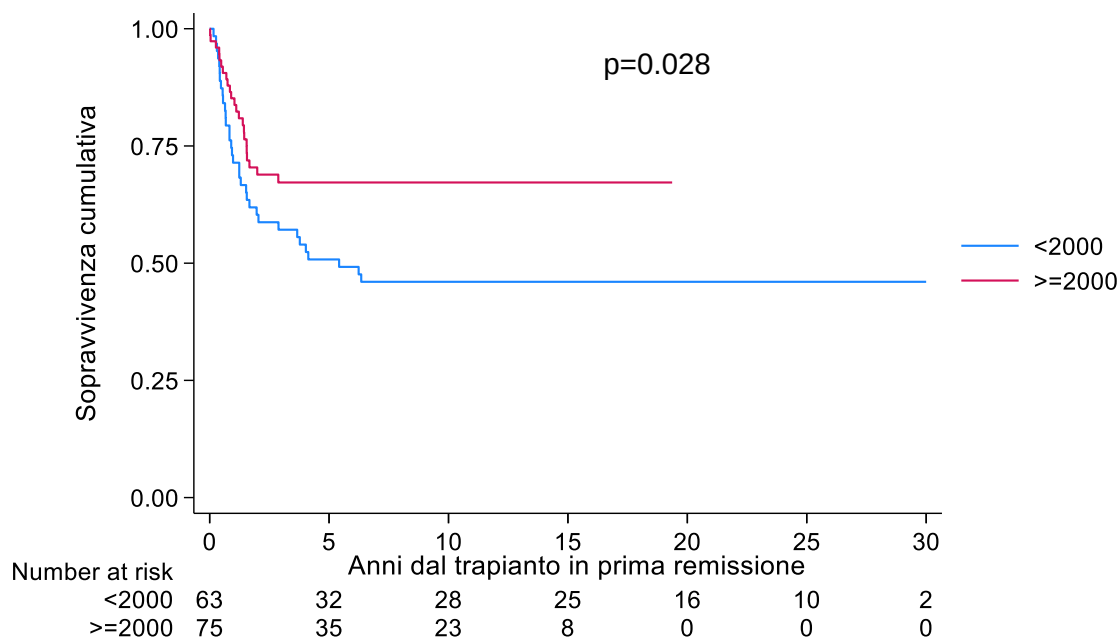


Figura 66: Sopravvivenza globale nei pazienti trapiantati in RC1 per “epoca di trapianto” (< 2000; $\geq$ 2000).

Nella figura 67 si è confrontata la sopravvivenza globale tra pazienti trapiantati in RC1 (n=138, 86.7%) e quelli in RC2 (n=21, 13.2%). Nel primo gruppo ci sono stati 57 decessi con una sopravvivenza a 5 anni e 10 anni rispettivamente pari a 59.1% (95% IC: 50.1 – 67.0) e 56.3% (95% IC: 47.2 – 64.4). Nel secondo gruppo ci sono stati 9 decessi con OS a 5 anni e 10 anni rispettivamente pari a 61.9% (95% IC: 38.0 – 78.8) e 55.7% (95% IC: 31.7 – 74.2). Il plateau è stato raggiunto a 6.5 anni circa per entrambi i gruppi. La differenza tra i gruppi non risulta essere statisticamente significativa (p-value = 0.633), per numerosità campionarie diverse nei due gruppi.

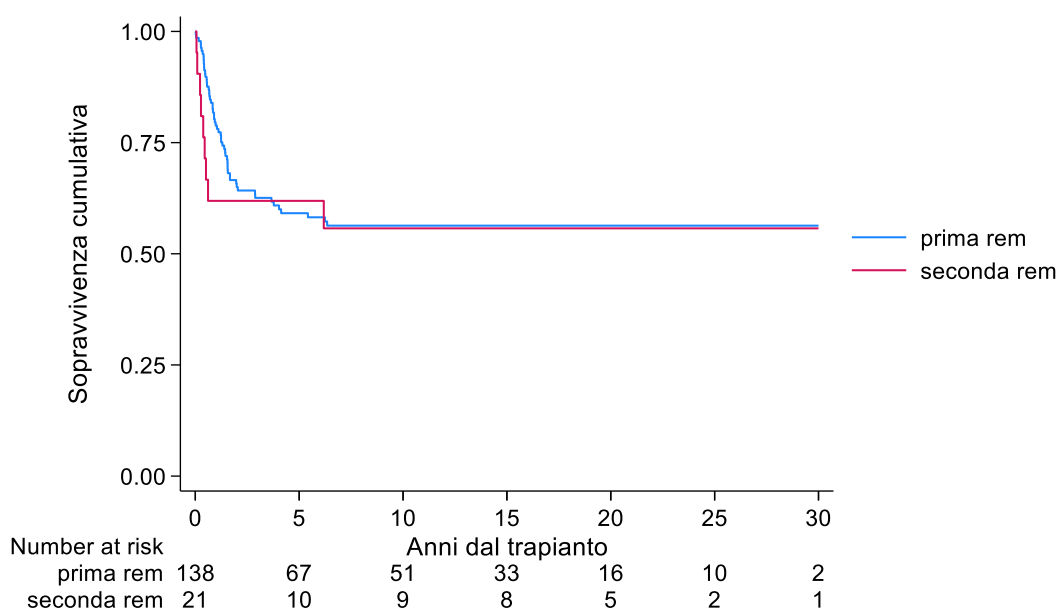


Figura 67: Sopravvivenza globale dal trapianto nei pazienti trapiantati in RC1 versus RC2.

Nella tabella seguente (tab.36) sono riassunti i dati di OS relativi a pazienti sottoposti a Trapianto di Midollo in prima RC.

Caratteristiche TMO pazienti serie casistica in studio	5 anni OS % (SE)
Pazienti LAP	50 (25)
LAM	59 (4.3)
Trapianto Allogeneico	66 (5.0)
Trapianto Autologo	44 (7.5)
Tipo di donatore	
FD	71 (7.3)
MUD	66 (7.5)
Aploidentico	50 (15.8)
Regime di Condizionamento	
Treosulfano	100
Busulfano	70 (5.6)
TBI	46 (7.1)
Altro	38 (13.4)
Epoca attuazione TMO	
TMO < 2000	50 (6.3)
TMO $\geq$ 2000	67 (5.6)
Stato dei pazienti al TMO	
TMO in 1° RC	59 (4.3)
TMO in 2° RC	62 (10.6)

Tabella 36: OS a 5 anni relativa ai pazienti sottoposti a TCSE in RC1.

Discussione, osservazioni conclusive

I risultati complessivi a lungo termine di tutti i pazienti trattati presso l'Istituto Giannina Gaslini evidenziano il miglioramento progressivo della sopravvivenza globale dagli anni '70, quando è stato registrato il primo paziente con LAM, fino al 2025 e sono sostanzialmente in linea con i dati pubblicati (40) (45) (46) (55) (65). Critico soprattutto l'incremento della sopravvivenza con l'ultimo protocollo costruito in ambito AIEOP, il protocollo LAM 2013/01 (52).

I primi protocolli, come riportato e ampiamente ribadito nell'introduzione della tesi e nella descrizione dei risultati, prevedevano la somministrazione dei pochi farmaci disponibili, soprattutto negli anni '70, uguali a quelli utilizzati per il trattamento delle leucemie linfoblastiche acute e a dosi complessive non elevate, e fino ai primi anni '80 quasi tutti i bambini che si ammalavano di LAM morivano per progressione di malattia.

Solo un paziente con LAP fra quelli trattati nei primi anni della storia della Pediatria IV, come allora era denominata la divisione di Emato-Oncologia Pediatrica dell'Istituto Giannina Gaslini, è sopravvissuto, probabilmente grazie alle caratteristiche di basso rischio della leucemia da cui era affetto.

Nel corso degli anni '80 si idearono i primi 2 protocolli di chemioterapia AIEOP, LAM 82 e LAM 87. Con il primo protocollo (LAM 82) si dimostrò che era indispensabile, una volta raggiunta la RC morfologica, effettuare una terapia prolungata di consolidamento post remissione, una sorta di mantenimento rotazionale, per evitare, o quantomeno ridurre il rischio di recidiva. I farmaci che si utilizzavano erano quelli canonici per i tempi e di cui era nota l'efficacia: di base un antraciclinico e la Citarabina associati a Thioguanina e Etoposide, variamente combinati. In tal modo si raggiunse la guarigione nel 40% dei bambini trattati (57). Negli stessi anni venivano effettuate le prime procedure di trapianto di midollo autologo o allogenico da donatore familiare compatibile (TCSE-MSD), e si costruì il protocollo LAM 87, di fatto una prosecuzione del protocollo LAM 82, ma con l'indicazione randomizzata di procedere con trapianto di midollo autologo dopo 2 cicli di consolidamento vs la prosecuzione dell'intero programma di chemioterapia o con TCSE-MSD se disponibile (55) (58).

Negli anni '80, quando erano attivi questi protocolli nel nostro centro, furono arruolati con diagnosi di LAM *de novo* (escludendo dall'analisi i bambini con LAP e i bambini con LAM-pCT) rispettivamente 17 bambini nel protocollo LAM 82 e 36 bambini nel

protocollo LAM 87. Di fatto ci fu una sorta di anticipazione dei tempi e già nel protocollo LAM 82 alcuni pazienti furono sottoposti a TCSE (tab.37).

Protocollo	LAM 82	Pz vivi ultimo FU (%)	LAM 87	Pz vivi ultimo FU (%)	TOTALE pz vivi (%)
N° Pz	20	12/20	42	15/42	27/62 (43.5)
Solo CT	8	7/8 (87.5)	16	5/16 (31.25)	12/24 (50)
CT + TCSE autologo	8	3/8 (37.5)	12	4/12 (33)	7/20 (35)
CT + TCSE MSD	4	2/4 (50)	14	6/14 (43)	8/18 (44)

Tabella 37: Disposizione dei pazienti trattati secondo i protocolli LAM 82 e LAM 87 e tasso di sopravvivenza, esclusi dall'analisi i pazienti con LAP e LAM-pCT.

L'effetto sulla sopravvivenza del trapianto, in particolare del trapianto autologo, fu scarsamente evidente rispetto alla chemioterapia. Per il trapianto autologo certamente l'elemento negativo fu la non attuazione all'epoca del *purging* delle staminali autologhe, responsabile di un eccesso di relapse, mentre per il trapianto allogenico pesò soprattutto la morte per tossicità trapianto-correlata (58).

Proprio in quegli anni si pubblicava l'esperienza positiva ottenuta da Wolff negli Stati Uniti al DFCI (59) con l'utilizzo per la prima volta di Citarabina ad alte dosi associata a Daunoblastina come ciclo di consolidamento unico dopo i 2 cicli classici di induzione, e successivamente sospensione completa della chemioterapia e non attuazione del TCSE, con risultati in termini di EFS decisamente migliorativi, con DFS nei pazienti con età <25 anni di 85% ad un follow up mediano di 3.5 anni. Il protocollo LAM 87M emendato con l'inserimento del ciclo di HD-AraC non replicò i risultati riportati da Wolff in termini di persistenza di RC (EFS 16%, con oltre il 70% delle recidive nel corso del primo anno dallo stop terapia) e fu rapidamente abbandonato.

L'innovazione della Citarabina ad alte dosi come consolidamento dopo i cicli di induzione, per migliorare lo stato della remissione completa pre-trapianto o attuata in cicli di consolidamento successivi, fu da allora sempre utilizzata e rappresentò un elemento cardine di tutti i protocolli internazionali e del protocollo AIEOP successivo, LAM 92, unitamente al cambiamento dell'induzione (60) (61). Con la generazione del LAM 92 si introdusse per la prima volta l'ICE per 2 cicli come induzione, in cui la Daunoblastina era sostituita dall'Idarubicina per la sua migliore farmacocinetica, come già riportato nel capitolo dell'introduzione. Con il protocollo LAM 92 veniva nuovamente indicata l'opzione trapiantologica dopo 1 o 2 cicli di consolidamento in cui

era inserita HD-AraC associata ad antraciclinici e/o Etoposide, prima dell'attuazione del trapianto di midollo autologo, ma con purging in vitro, o allogenico nei pazienti che per la prima volta venivano stratificati come HR sulla base dei risultati della citogenetica. **Si introduceva inoltre la TBI come regime di condizionamento.** Venivano considerati pazienti a rischio standard, con l'indicazione ad eseguire solo chemioterapia i pazienti con anomalie del CBF, come riportato nella parte introduttiva.

Per la prima volta si introduce il concetto di scelta terapeutica correlata al rischio di relapse, intuizione che nel tempo si perfezionerà con l'intento e l'ambizione di disegnare protocolli sempre più specifici e con aggressività modulata sul rischio.

Nel registro del nostro istituto risultano arruolati al protocollo LAM 92 51 pazienti LAM *de novo* (non LAP, non pCT): di fatto i risultati ottenuti non sono stati migliorativi rispetto a quelli dei 2 protocolli precedenti: la OS a 10 anni è del 48%, con un plateau raggiunto a 6 anni, rispetto a OS di 52% del protocollo LAM 82 e 46% del LAM 87 (fig.48). Ma inizia ad essere evidente la differenza della prognosi fra i 2 gruppi di pazienti stratificati come SR o HR: 5 anni OS rispettivamente 66% e 47% e EFS sostanzialmente sovrapponibile 66% e 43% (fig. 50, 51). Dati della nostra serie casistica, assolutamente in linea con i risultati del protocollo pubblicato (55).

Arriviamo quindi ai primi anni 2000. I protocolli AIEOP di ultima generazione e i protocolli internazionali da anni non si discostano da EFS e OS comprese fra 40% e 60% (fig.14, tab.21).

L'indicazione al trapianto e il mantenimento del trapianto autologo sono aspetti estremamente controversi, con disaccordo a livello internazionale (77).

Ma la novità è rappresentata dal progresso degli studi di genetica e di biologia molecolare integrati da pannelli di NGS e da RNA sequencing, che da quegli anni consentiranno una sempre più precisa e integrata diagnosi per la definizione del gruppo di rischio. Inoltre per la prima volta, come per la LLA, si dà un peso alla risposta al trattamento al primo ciclo e al secondo ciclo di induzione, risposta che viene comunque ancora valutata in morfologia, rappresentando questo un limite evidente.

Il protocollo AIEOP LAM 2002/01 prevede quindi una stratificazione per genetica e raggiungimento della RC dopo il primo ciclo di chemioterapia e il mantenimento della RC dopo il secondo ciclo. Come per il protocollo LAM 92 esclusivamente i pazienti HR saranno sottoposti a TCSE, **e ancora l'indicazione a trapianto autologo**

persiste, ma cambia lo schema del condizionamento con **l'eliminazione della TBI e l'introduzione del Busulfano**.

Nel registro IGG sono stati trattati con il protocollo 2002/01 53 pazienti, la OS globale è tendenzialmente migliorativa rispetto a quella dei precedenti protocolli, 56% con il raggiungimento del plateau a 5 anni e una EFS del 47%. Eccellente il risultato dei pazienti SR, OS 100%, ma evidente la discrepanza con EFS (33%). Tutti i pazienti recidivati furono recuperati con TCSE in seconda remissione. Questo comportamento si osservò anche nella popolazione di tutti i pazienti arruolati allo studio in tutti i centri AIEOP e fu inaspettato e peggiore rispetto ai protocolli attivi negli stessi anni nei gruppi internazionali. Differenti cofattori possono aver contribuito, in primo luogo una non corretta valutazione dello stato di RC, che si basava esclusivamente sul dato morfologico, e quindi una non corretta attribuzione del rischio. A posteriori e dopo le più recenti acquisizioni sulle caratterizzazioni molecolari delle leucemie mieloidi è possibile ipotizzare la concorrenza nella definizione del rischio di altri fattori biologici/genetici.

Indubbiamente una stratificazione più accurata e l'introduzione della valutazione dello stato di remissione sono stati due elementi chiave nello sviluppo di questo protocollo e dei protocolli successivi. In più, durante questo studio si sono messe a punto le tecniche per la valutazione della risposta alla terapia mediante citofluorimetria multiparametrica (43), che ha costituito la base per il disegno dell'ultimo protocollo attuato in ambito nazionale AIEOP, il protocollo LAM 2013/01.

Nel protocollo LAM 2013/01 si sono definite meglio le anomalie genetiche con valenza prognostica sia favorevole che sfavorevole, consentendo una migliore stratificazione dei pazienti.

La valutazione della MRD è diventata obbligatoria per la definizione del rischio, come elemento con valore indipendente e **finalmente il trapianto autologo è stato definitivamente abbandonato**. Introdotta inoltre da questo protocollo la triplice terapia intratecale (TIT) al posto della Citarabina in monoterapia.

I risultati del protocollo che si è appena concluso sono clamorosi e significativamente migliori rispetto al protocollo precedente e anche migliori della maggior parte dei trial clinici internazionali ad oggi pubblicati (tab.20) (65).

Nel nostro Istituto abbiamo arruolato al protocollo LAM 2013/01 28 pazienti con una OS di 84% a 5 anni, plateau raggiunto a 2.5 anni. Nessun paziente è deceduto per recidiva (fig.52).

Nella figura sottostante abbiamo riportato i dati di OS e EFS del protocollo AIEOP LAM 2013/01 presentati al congresso ASH 2023 (lavoro in fase di pubblicazione) (52) e i risultati della nostra serie casistica trattata con il medesimo protocollo.

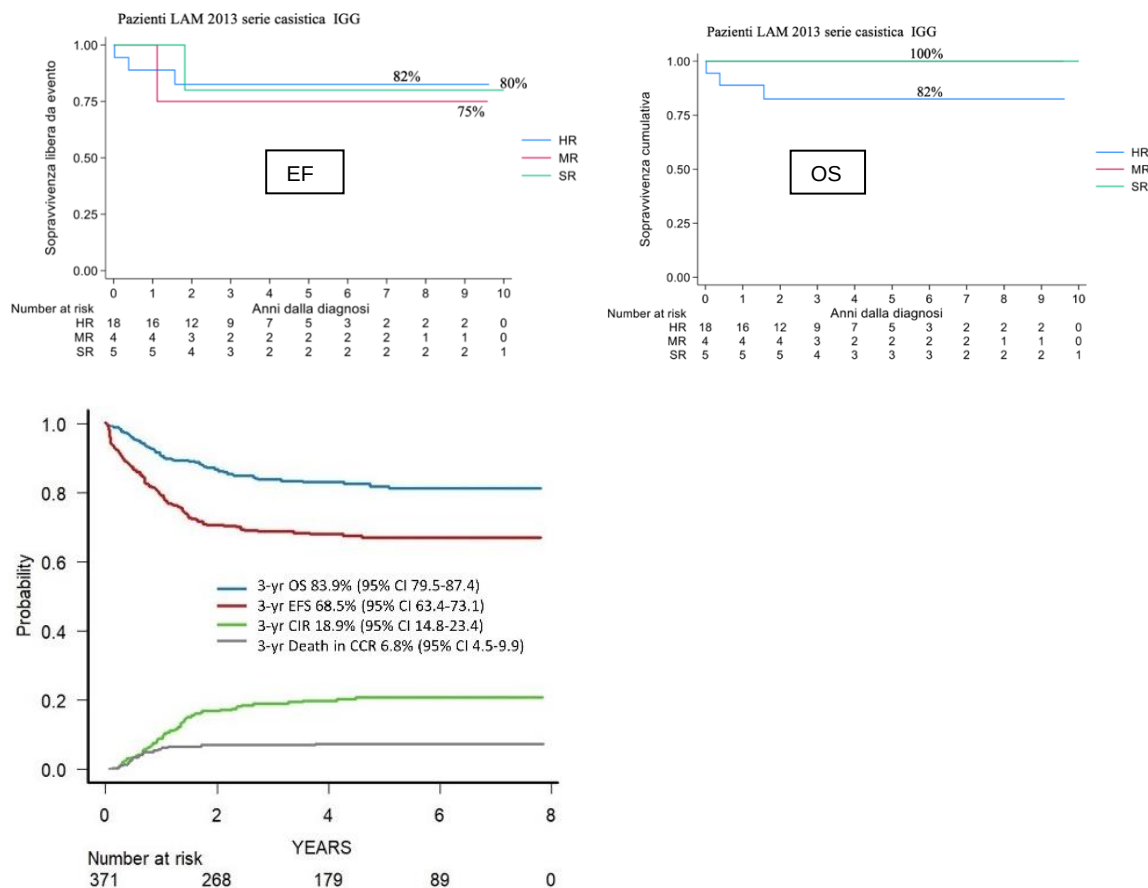


Figura 68: EFS e OS dei pazienti della nostra serie casistica arruolati al protocollo LAM 2013 suddivisi per fascia di rischio e confrontati con le curve pubblicate di EFS e OS del protocollo (dati presentati all'ultimo congresso ASH 2023 e in fase di pubblicazione) (52).

Per quanto riguarda i pazienti SR valgono le medesime considerazioni fatte per il protocollo 2002/01, ma la EFS è certamente migliorata.

Con il protocollo 2013/01 si chiarisce definitivamente il ruolo del trapianto di midollo allogenico nell'ambito delle LAM pediatriche, in particolare la DFS dei pazienti IR sottoposti a TCSE se disponibile MSD è stata significativamente migliore rispetto ai non trapiantati ($p=0.07$).

La nostra serie casistica per i limiti della numerosità è stata valutata globalmente per quanto riguarda la procedura trapiantologica e conferma i dati della letteratura riguardo all'efficacia del trapianto allogenico rispetto al trapianto autologo, abbandonato come abbiamo già ribadito dal protocollo LAM 2013/01, come si evince dalla figura in precedenza riportata (fig.62). Da sottolineare come vi sia stato un miglioramento della sopravvivenza in base all'epoca del trapianto ($<$ o $\geq$ anni 2000), grazie sia ad una migliore stratificazione dei pazienti candidati a trapianto sia ai progressi ottenuti con l'implementazione delle procedure trapiantologiche: a 5 anni 50.7% nel periodo $<$ 2000 versus 67.2% $\geq$ 2010 (p-value = 0.028).

Anche per quanto riguarda il tipo di donatore allogenico l'OS è sovrapponibile per il trapianto da donatore familiare compatibile rispetto a donatore non correlato. L'OS è inferiore per TCSE da donatore aploidentico, ma tale dato è da correlare certamente alla ridotta numerosità del campione e all'epoca in cui si è avviata tale procedura (fig.67).

Come regime di condizionamento anche nella nostra casistica risulta evidente il vantaggio della mieloablazione con Busulfano rispetto alla TBI. Nel nostro centro a partire da metà del 2012, partendo da esperienze dell'adulto (85), si è iniziata ad associare la Fludarabina a Bus/Mel, al posto della Ciclofosfamide, con risultati favorevoli in termini di OS (85.2% Bus/Fluda/Mel versus 69.8% Bus/Cy/Mel) (fig. 69). Per quanto siano presenti limiti relativi alla diversa numerosità campionaria e alle epoche differenti di attuazione dei trapianti, si conferma quindi essere tale associazione valida in termini di efficacia, mentre è necessario attendere per la definizione dell'impatto su sequele a lungo termine. Infine risultati incoraggianti sono stati ottenuti con il regime di condizionamento basato sul Treosulfano al posto del Busulfano, che non possono essere conclusivi in quanto esiguo il numero dei pazienti trattati (fig.65).

Il nuovo protocollo recentemente attivato sfrutta tutte le innovazioni ottenute dai protocolli precedenti e prevede il timing di introduzione di nuovi farmaci in prima linea e nelle linee successive (fig.22).

Per quanto riguarda il trapianto di midollo si testerà in maniera randomizzata il regime di condizionamento Busulfano-based (indicato nel precedente protocollo) rispetto al Treosulfano-based, che sembrerebbe associato a pari efficacia a discapito di una minore tossicità a lungo termine, come si evince da esperienze preliminari, anche adottate presso il nostro centro (86) (88) (fig.64).

Purtroppo, la speranza che si riponeva nell'incrementare la possibilità di cura dei pazienti LAM con l'utilizzo del CPX-351, approvata da FDA per i bambini con nuova diagnosi di neoplasia mieloide-pCT e che si era dimostrata efficace nell'indurre la seconda remissione in pazienti pediatrici con LAM recidivate (COG AAML 1421) (72), si è dimostrata inefficace condizionando una chiusura precoce del random in induzione dopo pochi mesi dall'avvio del nuovo protocollo similmente a quanto avvenuto per il protocollo COG1831 (54).

È comunque evidente come dagli anni '80, quando i primi pazienti venivano sottoposti ai primi protocolli di chemioterapia e fino al 2010 non si è ottenuto un significativo incremento della sopravvivenza, mentre significativa è la differenza della survival dei pazienti trattati con l'ultima generazione dei protocolli.

Riguardo alla medicina di precisione e alle opzioni terapeutiche target, la terapia differenziante con ATRA e ATO) nella LAP è già una realtà e come mostrato nei risultati preliminari del protocollo ICC-APL Study 02 e dall'analisi della nostra serie casistica (fig.43) per la prima volta si ottiene la guarigione della leucemia senza chemioterapia e con una riduzione significativa degli effetti tossici.

L'utilizzo dell'anticorpo monoclonale GO, oltre che nella LAP, è ancora oggetto di valutazione. Attualmente è inserito in protocolli di seconda linea, utilizzato in maniera randomizzata nell'ambito del protocollo AIEOP-BFM LAM 2020 per i pazienti resistenti o recidivati dopo la prima linea di terapia e nel nostro centro è utilizzato nell'ambito del protocollo ITCC 101 APAL 2020D, in associazione con Fludarabina e Citarabina ad alte dosi.

I farmaci target o *di precisione* sono incorporati in protocolli frontline ("*triplet regimens*") o utilizzati in monoterapia come bridge pre-trapianto o come mantenimento nel post trapianto.

L'inibitore di FLT3 *Midostaurina*, è utilizzato in protocolli specifici per il trattamento dei pazienti con riarrangiamento di FLT3 in associazione a protocolli di induzione standard. Attualmente nel nostro centro è aperto all'arruolamento il protocollo di fase II CPKC412A2218 che prevede il trattamento con Midostaurina per os associato al trattamento di chemioterapia della LAM. In precedenza, nel protocollo di fase I, che prevedeva la somministrazione in monoterapia di Midostaurina in pazienti resistenti a più linee di terapia, erano stati arruolati 4 pazienti presso il nostro centro e una paziente

dopo l'ottenimento della remissione completa, anche molecolare, è stata sottoposta a TCSE allogenico da MSD ed è ad oggi viva dopo 13 anni di follow up.

Di interesse gli inibitori di BCL2, che condizionano la morte cellulare, come il Venetoclax in associazione all'approccio *epigenetico*, con farmaci demetilanti come l'Azacitidina per il trattamento di LAM a bassa percentuale di blasti midollari o in associazione a chemioterapia ad alte dosi nelle forme di LAM resistenti. Il protocollo ITCC 101 APAL 2020D, citato in precedenza, prevede una randomizzazione per l'utilizzo di Venetoclax in associazione ai cicli di chemioterapia fino al trapianto e come mantenimento associato ad Azacitidina in cicli ripetuti in pazienti non eleggibili al trapianto. Un paziente del nostro è stato trattato con questo protocollo ed è ad oggi vivo in Remissione Completa dopo 2 anni dalla recidiva.

Una nuova e promettente classe di inibitori attualmente in fase di valutazione, non ancora approvati da EMA, sono i “menin inhibitors” (Revumenib il primo farmaco utilizzato), specifici per le forme di LAM KMT2A e NPM1 mutate (84). I menin inhibitors sono di particolare interesse in oncologia pediatria in quanto circa il 20 % delle LAM con esordio in età pediatrica presentano mutazione di KMT2A e raggiungono circa il 60% i pazienti infant con esordio < 1 anno di vita (90). Attualmente presso il nostro centro è in trattamento con Revumenib associato al blocco FLA, una piccola paziente con LAM-pCT KMT2A riarrangiata recidivata a 1 anno da TCSE MUD.

Per ultimo le terapie cellulari, che sono state sviluppate con successo nell'ambito delle leucemie e dei linfomi di linea B, rappresentano una concreta speranza per il controllo delle LAM ad alto rischio e resistenti al trattamento convenzionale. Certamente nelle LAM l'immunoterapia con *gene-engineered* CAR-T o CAR-NK possono costituire una concreta possibilità di controllo della leucemia e un valido bridge al trapianto di cellule staminali emopoietiche per la ricostituzione dell'emopoiesi. Sono oggi in studio differenti target per debellare le cellule staminali leucemiche.

La Leucemia Mieloide è una patologia eterogenea e non è pensabile un approccio univoco per debellare la malattia di tutti i pazienti, sono necessari più presidi terapeutici, possibilmente multitarget, soprattutto per affrontare forme particolarmente aggressive.

A questo proposito una forma rara, praticamente inguaribile, tipica del bambino sotto i 4 anni di vita, è la LAM che presenta il gene di fusione CBFA2T3-GLIS2, risultato della inversione criptica del cromosoma 16. GLIS2 è l'oncogene maggiormente identificato nei bambini con leucemia megacarioblastica in non-Down syndrome (non-DS AMKL). È stata identificata l'iperespressione di *folate oxidase receptor 1* (FOLR1) nei bambini con questa caratteristica genetica. STRO-002 (Luvelta) è un anticorpo con una specificità anti-recettore FOLR α in fase di sviluppo per il trattamento di tumori solidi che esprimono FOLR α . In studi preclinici si è dimostrato che STRO-002 ha una citotossicità specifica target-dipendente contro le cellule LAM che esprimono FOLR α . Risultati preliminari di bambini con LAM trattati con questo farmaco sono incoraggianti: Luvelta è in grado di indurre RC in pazienti resistenti o in recidiva di malattia nel 50% circa dei casi e di indurre RC con completa negatività della Malattia Residua Minima nel 70% dei pazienti con una quota di blasti all'avvio del farmaco inferiore al 5%. Presso il nostro Istituto abbiamo trattato con Luvelta un piccolo bambino di 2 anni per ridurre la MRD pre-TCSE. Il bambino è stato sottoposto a trapianto da MUD ed a oggi è in RC (+ 18 mesi dal trapianto).

Esistono programmi di ricerca per utilizzare lo stesso recettore come costruito chimerico per la produzione di CAR-T specifiche per la leucemia CBFA2T3-GLIS2 riarrangiata.

Un gruppo di pazienti LAM a prognosi particolarmente infausta è rappresentato dai bambini definiti come *leucemie infant* che presentano esordio di LAM in base agli studi prima del compimento del primo anno di vita o prima del compimento del secondo anno di vita. La prognosi è condizionata dalla presenza di elementi clinici sfavorevoli (iperleucocitosi, malattia extramidollare, citogenetica sfavorevole). La curva di survival della nostra serie casistica in cui abbiamo compreso pazienti di età inferiore a un anno all'esordio è estremamente bassa (OS a 5 anni 30%, EFS a 5 anni 22%). Certamente i dati sono migliorati con l'approccio utilizzato negli ultimi protocolli (LAM 2002/01 e LAM 2013/01) e con l'attuazione del TCSE post-remissione: vivi 2/16 pazienti trattati con i protocolli precedenti il 2002/01 e 6/8 dei pazienti infant trattati con il protocollo LAM 2002/01 e LAM 2013/01. In considerazione dell'alta frequenza di mutazioni di KMT2A (nella nostra serie casistica 8/25 bambini presentavano mutazione di KMT2A) l'integrazione dei protocolli con i "menin inhibitors" potrà costituire una opzione valida per la cura di questi piccoli pazienti.

I bambini con sindrome di Down al contrario costituiscono un gruppo di pazienti a prognosi favorevole, con spiccata chemiosensibilità. Sono pazienti fragili in cui è necessaria la modulazione del trattamento per il rischio di tossicità correlato alla chemioterapia. OS e EFS della nostra serie casistica sono sovrapponibili e pari a 83%, solo un paziente è stato sottoposto a TCSE da MUD per positività dell'MRD dopo il primo e il secondo ciclo di induzione.

Un'altra categoria di pazienti LAM esaminata nell'ambito della serie casistica è costituita dalle forme post terapia citotossica. Si tratta di forme associate ad una ridotta risposta alle terapie standard con una sopravvivenza $\leq 10\%$ se non trattate con TCSE. Il miglioramento della prognosi si è raggiunto nell'ultima decade con l'acquisizione di elementi clinici, derivati dall'esperienza, che indicavano come favorevole l'attuazione del TCSE in RC anche se incompleta ricostituzione ematologica e la riduzione dell'aggressività della terapia pre-TCSE in pazienti già pesantemente pre-trattati con chemioterapia per il tumore primitivo. Il riflesso del cambiamento dell'atteggiamento terapeutico è evidente dai dati di survival dei pazienti della nostra serie casistica trattati prima o successivamente al 2010: OS pazienti a 5 anni 21% se esordio < 2010 versus 75% se esordio ≥ 2010 (fig.39).

In conclusione, progressi significativi sono stati compiuti, che hanno consentito di modificare la prognosi della Leucemia Mieloide Acuta dell'età pediatrica, i dati dei protocolli pubblicati e i dati relativi al nostro centro descrivono il percorso (fig. 69, 70).

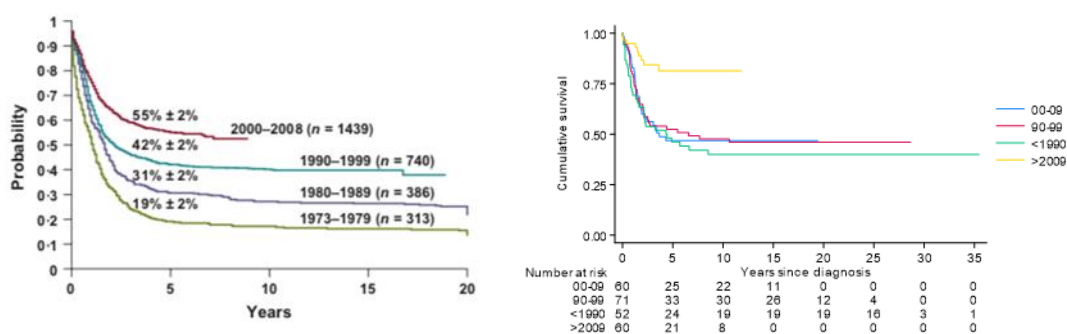


Figura 69: Sopravvivenza suddivisa nelle epoche successive di diagnosi dei pazienti arruolati nei protocolli AIEOP LAM del nostro centro e del St. Jude Children's Research Hospital.

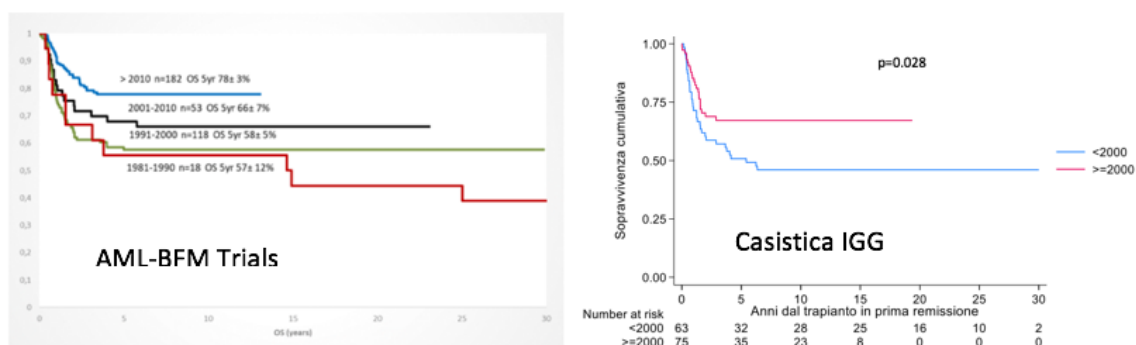


Figura 70: Incremento OS in pazienti pediatrici LAM sottoposti a TCSE in CR1, qualunque tipo di donatore. Confronto tra trials BFM e nostra serie casistica dal 1983 ai giorni nostri (65).

La cooperazione scientifica internazionale fra gruppi di emato-oncologia pediatrica ad oggi è stata l'elemento che ha contribuito a migliorare la prognosi di una malattia così aggressiva e polimorfa. In ambito I-BFM-SG si è costruito negli ultimi anni un backbone pan-Europeo per tutti i pazienti con lo scopo di concentrare le risorse per attuare approcci standardizzati e consentire il confronto intergruppo e la realizzazione di studi clinici con *domande randomizzate*, quando possibile, fondamento per il progresso e il miglioramento ulteriore dell'outcome dei bambini con LAM.

Nell'epoca della “rivoluzione genomica” anche il concetto di *cura* deve essere *rivoluzionario*. Cura non deve essere assimilata alla *sopravvivenza*, ma alla guarigione completa senza *complicanze*. È necessario curare di più, curare meglio per meglio far guarire i nostri bambini.

Ogni bambino con la sua storia ha contribuito al progresso della terapia. I risultati e le curve riportate sono le loro storie.

BIBLIOGRAFIA

1. AIRTUM Working Group, CCM, AIEOP Working Group. Italian cancer figures, report 2012: Cancer in children and adolescents. *Epidemiol Prev*. 2013 Jan-Feb; 37(1 Suppl 1): 1–225.
2. Khoury JD, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1703-1719.
3. Arber DA, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1200-1228.
4. Dohner H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022 Sep 22;140(12):1345-1377.
5. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute Myeloid Leukemia: 2025 Update on Diagnosis, Risk-Stratification, and Management. *Am J Hematol*. 2025 May;100(5):860-891.
6. Grob T, et al. Molecular characterization of mutant TP53 acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2022 Apr 14;139(15):2347-2354.
7. Zwaan CM, et al. Diagnosis and Management of AML in Pediatric Patients: Consensus Recommendations from an International Expert Panel. *Blood*, 2025 Oct 17: blood.2024027904.
8. Ferrara F, Candoni A. Leucemia mieloide acuta. *Ematologia in Progress*. 2023 Aug.
9. Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012 Oct 18;120(16):3187–3205.
10. Creutzig U, Dworzak MN, Zimmermann M, et al. Characteristics and outcome in patients with central nervous system involvement treated in European pediatric acute myeloid leukemia study groups. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Dec;64(12).
11. Bennett JM et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*. 1976 Aug;33(4):451–458.
12. McGowan-Jordan J, Hastings R, Moore S. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN 2020). *Cytogenet Genome Res*. 2021 Aug 18;161(5):225-226.
13. Pigazzi M, Meshinchi S, Locatelli F and Using genomics to refine pediatric AML risk stratification. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2025 Dec 5;2025(1): 270–278.
14. De Rooij JD, Branstetter C, Ma J, et al. Pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia is characterized by distinct genomic subsets with varying outcomes. *Nat Genet*. 2017 Mar;49(3):451–456.
15. Masetti R, Pigazzi M, Togni M, et al. CBFA2T3-GLIS2 fusion transcript is a novel common feature in pediatric, cytogenetically normal AML, not restricted to FAB M7 subtype. *Blood*. 2013 Apr 25;121(17):3469-3472.
16. Le Q, Hadland B, Smith JL, et al. CBFA2T3-GLIS2 model of pediatric acute megakaryoblastic leukemia identifies FOLR1 as a CAR T cell target. *J Clin Invest*. 2022 Nov 15;132(22):e157101.

17. Tang T, Le Q, Castro S, et al. Targeting FOLR1 in high-risk CBF2AT3-GLIS2 pediatric AML with STRO-002 FOLR1-antibody-drug conjugate. *Blood Adv.* 2022 Nov 22;6(22):5933-5937.
18. Lambie AJ, Hagiwara K, Gerbing RB, et al. CREBBP alterations are associated with a poor prognosis in de novo AML. *Blood.* 2023 Apr 27;141(17):2156–2159.
19. Coenen EA, et al. Pediatric acute myeloid leukemia with t(8, 16)(p11, p13), a distinct clinical and biological entity: a collaborative study by the International-Berlin-Frankfurt-Munster AML-study group. *Blood.* 2013 Oct 10;122(15):2704-13.
20. Conneely SE, Rau RE. The genomics of acute myeloid leukemia in children. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2020 Mar;39(1):189-209.
21. Tarlock K, Gerbing RB, Ries RE, et al. Prognostic impact of cooccurring mutations in FLT3-ITD pediatric acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2024 Oct 22;8(9):2094–2103.
22. Mullighan CG, et al. Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia.* 2007 Sep;21(9):2000-9.
23. Hollink I.H.I.M, et al. Characterization of CEBPA mutations and promoter hypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2011 Mar;96(3):384-92.
24. Tarlock K, et al. Prognostic impact of CSF3R mutations in favorable risk childhood acute myeloid leukemia. *Blood.* 2020 Apr 30;135(18):1603-1606.
25. Tarlock K, et al. CEBPA-bZip mutations are associated with favorable prognosis in de novo AML: a report from the Children's Oncology Group. *Blood.* 2021 Sep 30;138(13):1137-1147.
26. Hara Y, et al. Clinical Features of Pediatric Acute Myeloid Leukemia with TP53 and CDKN2A/2B copy Number Alterations. *Blood.* 2019;134 (Supplement_1): 2727.
27. Sainty D, et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. *Blood.* 2000 Aug;96(4):1287–1296.
28. Testi AM, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia: results from the International Consortium for Childhood APL. *Blood.* 2018 Jul;132 (4): 405–412.
29. Lo Coco F, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N. Engl J Med.* 2013 Jul 11;369:111-21.
30. Huang DP, Yang LC, Chen YQ, et al. Long-term outcome of children with acute promyelocytic leukemia: a randomized study of oral versus intravenous arsenic by SCCLG-APL group. *Blood Cancer J.* 2023;13(1):178.
31. Kutny MA, Alonzo TA, Ablan O, et al. Assessment of Arsenic Trioxide and All-trans Retinoic Acid for the Treatment of Pediatric Acute Promyelocytic Leukemia: A Report from the Children's Oncology Group AAML1331 Trial. *JAMA Oncol.* 2022;8(1):79–87.
32. Zheng H, Jiang H, Hu S, et al. Arsenic Combined With All-Trans Retinoic Acid for Pediatric Acute Promyelocytic Leukemia: Report From the CCLG-APL2016 Protocol Study. *J Clin Oncol.* 2021;39(28):3161–3170.
33. Strocchio L, et al. Chemotherapy-free treatment for children and adolescents with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): Results of the prospective ICC-APL-02 study. *Blood.* 2025;146 (Supplement_1): 880.

34. Advani PG, et al. Risk of therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia after childhood cancer: a population-based study. *Leukemia*. 2019 Dec;33(12):2947-2978.
35. Waack K, et al. Treatment - Related Acute Myeloid Leukemia in Children. *Blood*. 2019, 134(Supplement_1):1322–1322.
36. Creutzig U, Reinhardt D, Diekamp S, Dworzak M, Stary J, Zimmermann M. AML patients with down syndrome have a high cure rate with AML-BFM therapy with reduced dose intensity. *Leukemia*. 2005 Aug;19(8):1355-1360.
37. Uffmann M, Rasche M, Zimmermann M, et al. Therapy reduction in patients with Down syndrome and myeloid leukemia: the international ML-DS 2006 trial. *Blood*. 2017;129(25):3314– 3321.
38. Taga T, Tanaka S, Hasegawa D, et al. Post-induction MRD by FCM and GATA1-PCR are significant prognostic factors for myeloid leukemia of Down syndrome. *Leukemia*. 2021;35(9):2508–2516.
39. Hitzler J, Alonzo T, Gerbing R, et al. High-dose AraC is essential for the treatment of ML-DS independent of postinduction MRD: results of the COG AAML1531 trial. *Blood*. 2021;138(23):2337–2346.
40. Rasche M, et al. Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. *Leukemia*. 2018 Oct;32(10): 2167-2177, 2018.
41. Campana D, et al. Immunophenotyping of childhood leukemia. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1-2):59-75.
42. Rubnitz JE, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncology*. 2010 Jun;11(6):543-52.
43. Buldini B, et al. Prognostic significance of flow-cytometry evaluation of minimal residual disease in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP-AML 2002/01 study protocol. *British Journal of Hematology*. 2017 Apr;177(1):116-126.
44. Gary V, et al. Preventive Central Nervous System Irradiation in Children with acute NonLymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1978 Nov;42(5):2187-92.
45. Alexander TB, et al. Decreased relapse rate and treatment-related mortality contribute to improved outcomes for pediatric acute myeloid leukemia on successive clinical trials. *Cancer*. 2017 Oct;123(19): 3791–3798.
46. Zwaan CM, et al. Collaborative Efforts Driving Progress in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 20;33(27):2949-62.
47. Rubnitz JE, Lacayo NJ, Inaba H, et al. Clofarabine Can Replace Anthracyclines and Etoposide in Remission Induction Therapy for Childhood Acute Myeloid Leukemia: The AML08 Multicenter, Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2019;37(23):2072–2081.
48. Rasche M, Steidel E, Kondryn D, et al. Impact of a Risk-Adapted Treatment Approach in Pediatric AML: A Report of the AML-BFM Registry 2012. *Blood*. 2019;134:293.
49. Tierens A, Arad-Cohen N, Cheuk D, et al. Mitoxantrone Versus Liposomal Daunorubicin in Induction of Pediatric AML With Risk Stratification Based on Flow Cytometry Measurement of Residual Disease. *J Clin Oncol*. 2024;42(18):2174–2185.

50. Tomizawa D, Matsubayashi J, Iwamoto S, et al. High-dose cytarabine induction therapy and flow cytometric measurable residual disease monitoring for children with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2024;38(1):202–206.
51. Li J, Gao J, Liu A, et al. Homoharringtonine-Based Induction Regimen Improved the Remission Rate and Survival Rate in Chinese Childhood AML: A Report From the CCLG-AML 2015 Protocol Study. *J Clin Oncol*. 2023;41(31):4881–4892.
52. Locatelli F, Buldini B, Pigazzi M et al. Final Results of the AIEOP (Associazione Italiana Ematologia/Oncologia Pediatrica) AML 2013 Prospective Randomized Trial in Childhood Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2023;142 (Supplement_1):728.
53. Gibson B, Baruchel A, Moore A, et al. Favourable Outcomes in Newly Diagnosed Paediatric AML with Gemtuzumab Ozogamicin and Risk-Stratified Therapy: Results from the International Phase III Myechild 01 Trial. *Blood*. 2024;144:968.
54. Pollard JA et al. A Phase 3 Randomized Trial for Patients with De Novo AML Comparing Standard Therapy Including Gemtuzumab Ozogamicin (GO) to CPX- 351 with GO - a Report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2024;144(Supplement_1):967–967.
55. Pession A et al. AML Strategy & Study Committee of the Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP). Treatment and long-term results in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP AML protocols. *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2043-2053.
56. Weinstein HJ et al. Chemotherapy for acute myelogenous leukemia in children and adults: VAPA update. *Blood*. 1983 Aug;62 (2):315–319.
57. Amadori S et al. Treatment of acute myelogenous leukemia in children: results of the Italian Cooperative Study AIEOP/LAM 8204. *J Clin Oncol*. 1987 Sep;5(9):1356–1363.
58. Amadori S et al. Prospective comparative study of bone marrow transplantation and postremission chemotherapy for childhood acute myelogenous leukemia. The Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 1993 Jun;11:1046–1054.
59. Wolff SN et al. High-dose cytarabine and daunorubicin as consolidation therapy for acute myeloid leukemia in first remission: long-term follow-up and results. *J Clin Oncol*. 1989 Sep;7:1260–1267.
60. Berman E, McBride M. Comparative cellular pharmacology of daunorubicin and idarubicin in human multidrug-resistant leukemia cells. *Blood*. 1992 Jun 15;79(12):3267–3273.
61. Carella AM et al. Idarubicin in the treatment of acute leukemias. An overview of preclinical and clinical studies. *Haematologica*. 1990 Mar-Apr;75(2):159–169.
62. Pession A et al. Results of the AIEOP AML 2002/01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Jul;122(2):170–178.
63. Breems DA et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol*. 2008 Aug;26(29):4791-7.
64. Hasle H et al. Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study *Blood*. 2007 Jun;109(11):4641–4647.
65. Reinhardt D et al. Pediatric Acute Myeloid Leukemia – Past, Present and Future. *J Clin Med*. 2022 Jan 19;11(3):504.

66. Sievers EL et al. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003 May;101(9): 3398–3406.
67. Langebrake C et al. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol*. 2006 Aug;24(22):3686-92.
68. Van Der Velden VHJ et al. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol. *Leukemia*. 2010 Sep;24(9):1599-606.
69. Tierens A et al. Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia: results of the NOPHO-AML 2004 study. *British Journal of Hematology*. 2016 Apr;174(4):600-9.
70. Inaba H et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Oct;30(29):3625-32.
71. Creutzig U et al. Second induction with high-dose cytarabine and mitoxantrone: different impact on pediatric AML patients with t(8, 21) and with inv(16). *Blood*. 2011 Nov;118(20):5409–5415.
72. Cooper TM et al. Phase I/II Study of CPX-351 Followed by Fludarabine, Cytarabine, and Granulocyte-Colony Stimulating Factor for Children With Relapsed Acute Myeloid Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2020 Jul 1;38(19):2177.
73. Lancet JE et al. CPX-351 versus 7+3 cytarabine and daunorubicin chemotherapy in older adults with newly diagnosed high-risk or secondary acute myeloid leukaemia: 5-year results of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2021 Jul;8(7):e481-e491.
74. Pigazzi M et al. Impatto prognostico del monitoraggio della malattia minima residua molecolare durante il trattamento: studio retrospettivo del protocollo AIEOP LAM2013/01. Comunicazione orale congresso AIEOP 2024.
75. Pigazzi M et al. Minimal residual disease monitored after induction therapy by RQ-PCR can contribute to tailor treatment of patients with t(8, 21) RUNX1-RUNX1T1 rearrangement. *Haematologica*. 2015 Mar;100(3):e99-101.
76. Masetti R et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for pediatric acute myeloid leukemia in first complete remission: a meta-analysis. *Annals of Hematology*. 2022 Nov;101(11):2497-2506.
77. Woods WG et al. Children's Cancer Group. A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission. *Blood*. 2001 Jan;97(1):56-62.
78. Niewerth D et al. A review on allogeneic stem cell transplantation for newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Sep;116(13):2205-14.
79. Moore J et al. Equivalent survival for sibling and unrelated donor allogeneic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Biology of Blood Marrow Transplant*. 2007 May;13(5):601-7.
80. Lee DH et al. Comparable outcomes of HLA-matched unrelated and HLA-identical sibling donor bone marrow transplantation for childhood acute myeloid leukemia in first remission. *Pediatric Transplantation*. 2009 Mar;13(2):210-6.

81. Bertaina A et al. Unrelated donor vs HLA-haploidentical a/b T-cell– and B-cell–depleted HSCT in children with acute leukemia. *Blood*. 2018 Dec 13;132(24):2594-2607.
82. Ruggeri A, et al. Matched unrelated donor transplantation versus haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide in children with acute myeloid leukemia: a PDWP-EBMT study. *Haematologica*. 2024 Jul 1;109(7):2122-2130.
83. Lucchini G, et al. Impact of Conditioning Regimen on Outcomes for Children with Acute Myeloid Leukemia Undergoing Transplantation in First Complete Remission. An Analysis on Behalf of the Pediatric Disease Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood Marrow Transplant*. 2017 Mar;23(3):467-474.
84. Rettinger E, et al. Pediatric Diseases Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. The hallmarks of hematopoietic stem cell transplantation for pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2025 Oct;39(10):2313-2328.
85. Cavallaro G, et al. Busulfan-fludarabine versus busulfan-cyclophosphamide for allogeneic transplant in acute myeloid leukemia: long term analysis of GITMO AML-R2 trial. *Blood Cancer J*. 2024 Aug 21;14(1):141.
86. Saglio F, et al. AIEOP BMT Group. Long-Term Complications after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Treosulfan- or Busulfan-Based Conditioning in Pediatric Patients with Acute Leukemia or Myelodysplastic Syndrome: Results of an Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica Retrospective Study. *Transplant Cell Therapy*. 2024 Apr;30(4):433.
87. Casper J, et al. Treosulfan and fludarabine: a new toxicity-reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004 Jan;103:725-31.
88. Kalwak K, et al. Treosulfan-fludarabine-thiotepa-based conditioning treatment before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for pediatric patients with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplantation*. 2020 Oct;55(10):1996-2007.
89. Rasche M, et al. Survival Following Relapse in Children with Acute Myeloid Leukemia: A Report from AML-BFM and COG. *Cancers (Basel)*. 2021 May 12;13(10):2336.
90. Thakur RK, Wang ES. The promise of menin inhibitors: from approval to triplet regimens. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2025. 2025 (1):599–606.
91. Levis M. Post-HCT maintenance therapy for AML: who, when, why, how long?. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2025. 2025 (1):531–536.
92. Mardiana S, Gill S. CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions. *Front Oncol*. 2020 May 6;10:697.
93. Vanhooren J, et al. CAR-T in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: Barriers and How to Overcome Them. *Hemasphere*. 2023 Aug 18;7(9):e937.
94. Willier S, et al. CLEC12A and CD33 coexpression as a preferential target for pediatric AML combinatorial immunotherapy. *Blood*. 2021 Feb 25;137(8):1037-1049.
95. Horibe K, et al. Acute promyelocytic leukemia with t(15, 17) abnormality after chemotherapy containing etoposide for Langerhans cell histiocytosis. *Cancer*. 1993 Dec;72(12):3723-6.
96. Sendker S, et al. Improved outcomes and treatment guidance in pediatric therapy-related AML: AML-BFM study group recommendations. *Blood Adv*. 2025 Jun 10;9(11):2831-2841.

97. Miano M, et al. Clofarabine, cyclophosphamide and etoposide for the treatment of relapsed or resistant acute leukemia in pediatric patients. *Leuk Lymphoma*. 2012 Sep;53(9):1693-8.
98. Zangrando A, Cavagnero F, Scarparo P, Varotto E, Francescato S, Tregnago C, Cuccurullo R, Fagioli F, Nigro LL, Masetti R, Putti MC, Rizzari C, Santoro N, Pession A, Pigazzi M, Locatelli F, Basso G, Buldini B. CD56, HLA-DR, and CD45 recognize a subtype of childhood AML harboring CBFA2T3-GLIS2 fusion transcript. *Cytometry A*. 2021 Aug;99(8):844-850.
99. Orfao A, Chillon MC, Bortoluci AM, et al. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica*. 1999; 84(5):405-412.
100. Van Weelderen RE, Harrison CJ, et al. Optimized cytogenetic risk-group stratification of KMT2A-rearranged pediatric acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2024 Jun 25;8(12):3200–3213.
101. Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*. 2009;114(12):2489-2496.
102. Coenen EA, Raimondi SC, Harbott J, et al. Prognostic significance of additional cytogenetic aberrations in 733 de novo pediatric 11q23/MLL- rearranged AML patients: results of an international study. *Blood*. 2011;117(26):7102-7111.
103. Van Weelderen RE, Klein K, Harrison CJ, et al. Measurable residual disease and fusion partner independently predict survival and relapse risk in childhood KMT2A-rearranged acute myeloid leukemia: a study by the International Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *J Clin Oncol*. 2023;41(16):2963-2974.
104. Tregnago C, Benetton M, Ries RE, Peplinski JH, Alonzo TA, Stirewalt D, Othus M, Duployez N, Sonneveld E, Abrahamsson J, Fogelstrand L, von Neuhoff N, Hasle H, Reinhardt D, Meshinchi S, Locatelli F, Pigazzi M. Influence of Nucleophosmin (NPM1) Genotypes on Outcome of Patients With AML: An AIEOP-BFM and COG-SWOG Intergroup Collaboration. *J Clin Oncol*. 2025 Mar 10;43(8):972–984.
105. Zhang X, Sun J, Yu W, Jin J. Current views on the genetic landscape and management of variant acute promyelocytic leukemia. *Biomark Res*. 2021 May 6;9(1):33.
106. Noguera NI, Catalano G, Banella C, Divona M, Faraoni I, Ottone T, Arcese W, Voso MT. Acute Promyelocytic Leukemia: Update on the Mechanisms of Leukemogenesis, Resistance and on Innovative Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 18;11(10):1591.
107. Guarnera L, Ottone T, Fabiani E, Divona M, Savi A, Travaglini S, Falconi G, Panetta P, Rapanotti M, Voso MT. Atypical Rearrangements in APL-Like Acute Myeloid Leukemias: Molecular Characterization and Prognosis. *Front. Oncol.*, 12 April 2022 Volume 12 – 2022.
108. Boztug H, Schumich A, Pötschger U, et al. Blast cell deficiency of CD11a as a marker of acute megakaryoblastic leukemia and transient myeloproliferative disease in children with and without Down syndrome. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(6):370–378.
109. Goemans BF, Noort S, Blink M, et al. Sensitive GATA1 mutation screening reliably identifies neonates with Down syndrome at risk for myeloid leukemia. *Leukemia* (2021) 35:2403–2406.
110. Laszig S, Diederichs A, Salzmann- Manrique E, et al. CPX- 351 in Down syndrome-associated myeloid leukemia: results and prognostic factors from the phase 3 ML-DS 2018 trial. *Blood*. 2026 Jan 15;147(3):229–240.

111. Lo Coco F, Ammatuna E, Noguera N. Treatment of acute promyelocytic leukemia with gemtuzumab ozogamicin. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2006 Jan;4(1):57-62, 76-7.
112. Arslan S, Aribi A, Stein A, Aldoss I. Current status and future potential of CD123-based targeted therapies for acute leukemia. *Expert Opin Biol Ther*. 2025 Dec;25(12):1299-1312.
113. Hu Y, Zhang M, Yang T, et al. Sequential CD7 CAR T-Cell Therapy and Allogeneic HSCT without GVHD Prophylaxis. *N Engl J Med*. 2024;390(16):1467-1480.
114. Becilli M, Merli P, Algeri M, et al. Anti-CD7 fratricide-resistant chimeric antigen receptor T cells for relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2026 Mar 3:blood.2025032299.