

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “CAROL DAVILA”
BUCUREȘTI**

ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

**„ IDENTIFICAREA MUTAȚIILOR ȘI
GENELOR DE FUZIUNE PATOLOGICE
ÎN LEUCEMII ACUTE MIELOIDE:
IMPLICAREA ACESTORA
ÎN ALEGEREA
TERAPIEI ADAPTATE RISCULUI”**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. ANCA ROXANA LUPU

Doctorand:

CÎRSTEA MIHAELA

2018

LISTA DE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE DIN ACTIVITATEA DOCTORALĂ

Lucrări publicate în calitate de prim autor:

În cadrul activității doctorale am realizat în calitate de prim autor:

- 2 articole în extenso în reviste ISI
- 2 prezentări orale la congrese naționale
- 2 postere la congrese naționale

ARTICOLE IN EXTENSO:

1. *Mihaela Cîrstea, Adriana Coliță și colab.* Chronic myelomonocytic leukemia 'myelodysplastic type' in transformation to acute myeloid leukemia - diagnostic and therapeutic options: case report and literature review. Revista Română de Medicină de Laborator. 2016 Septembrie; 24(3): 263-277. ISSN1841-6624; eISSN:2284-5623, Impact Factor= 0,32.

Link către publicație http://www.rrml.ro/articole/2016/2016_3_1.pdf

2. *Mihaela Cîrstea, Adriana Coliță și colab.* Therapy-related myelodysplastic syndrome after successful treatment of acute promyelocytic leukemia: case report and literature review. Revista Română de Medicină de Laborator. 2017 Aprilie; 25(2): 165-179. ISSN1841-6624; eISSN:2284-5623, Impact Factor= 0,32

Link către publicație http://www.rrml.ro/articole/2017/2017_2_5.pdf

PREZENTĂRI ORALE LA CONFERINȚE NAȚIONALE:

1. **Mihaela Mustață, Rodica Talmaci, Mihaela Dragomir, Adriana Vulpe, D. Jordan, Adriana Coliță, Anca Lupu, Daniel Coriu.** IMPACT OF MOLECULAR BIOLOGY ON PROGNOSIS IN ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA. A XXI Conferință Națională de Hematologie Clinică și Transfuzională Sinaia 2013. Abstract publicat în Documenta Haematologica, vol XXX, nr 1-2, 2013. Abstracts, pages 32-33.

Link către publicație: http://srh.org.ro/wp-content/uploads/2016/08/document_47.pdf

2. **Mihaela Cîrstea, Anca Gheorghe, Catalin Nicu Serban, Rodica Talmaci, Mihaela Dragomir, Cerasela Jordan, , Anca Colita, Daniel Coriu.** Correlations of immunophenotypic, cytogenetic and molecular biology data in acute leukemias: Fundeni Clinical Institute Experience. Al X-lea Congres Național de Citometrie, București 2014. Abstract publicat în Documenta Haematologica, vol XXXI, nr 3-4, 2013. Abstracts, pagina 41-42, ISSN: 1582-196X.

Link către publicație http://srh.org.ro/wp-content/uploads/2016/08/Documenta-Haematologica-vol_XXXI-nr_3-42013.pdf

**POSTERE LA CONGRESUL UNIVERSITĂȚII DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
CAROL DAVILA BUCUREȘTI:**

1. **Mihaela Cîrstea, Adriana Coliță și colab.** The importance of monitoring minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. Congresul Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila București, Ediția a V-a, 29-31 mai 2017, abstract publicat în revista Maedica. A Journal of Clinical Medicine, Volume 12 (15), Supplement, 2017. Abstracts, pagina 65, ISSN: 2501-6903.

Link către publicație

http://www.congresumf.ro/wp-content/uploads/2017/12/supp_Maedica.pdf

2. **Mihaela Cîrstea, Adriana Coliță și colab.** The impact of cytogenetic and molecular analysis on survival of patients with acute myeloid leukemia. Congresul Universității de Medicină și Farmacie Carol Davila București, Ediția a IV-a, 2-4 iunie 2016. abstract publicat în revista Maedica.

CUPRINS

INTRODUCERE	7
I. PARTEA GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Definiție. Delimitare	9
2. Istoric	11
3. Incidența	11
4. Etiologie	11
5. Patogeneza	12
5.1 Celulele stem leucemice	13
5.2 Istoric mutațional	13
5.3 Mutațiile somatice	14
6. Clasificarea LAM	15
7. Manifestările clinice	20
8. Diagnostic	21
8.1 Morfologia	21
8.2 Citochimia	22
8.3 Imunofenotiparea	22
8.4 Citogenetica	24
8.5 Genetica moleculară	25
8.5.1. Mutația în CCAAT/ enhancer binding protein (CEBPA)	27
8.5.2. Mutația genei nucleophosminei: NPM1	27
8.5.3. Mutația FLT3	28
8.5.4. Mutația CBF (Core-binding-factor)	30
8.5.5. Mutațiile IDH1 și IDH2	31
8.5.6. Mutația c-KIT	32
8.5.7. Mutația MLL-PTD	32
8.5.8. Mutația WT1	32
8.5.9. Mutația TET2	32
8.5.10. Mutația TP53	33
8.5.11. Mutația ASXL1	33
8.5.12. Mutația RAS	34
8.5.13. Mutația DNMT3A	34
9. Factori de prognostic în LAM	
9.1 Factorii de prognostic legați de pacient	35
9.1.1. Scorul de performanță Karnofsky și statusul ECOG	35
9.1.2. Comorbidități	35
9.2 Factori de prognostic legați de boală	36
10. Managementul LAM	
10.1. Principii de tratament în LAM	39
10.2 Managementul pacienților tineri adulți cu LAM: 18-60 ani	40
10.2.1. Terapia de inducție	40
10.2.2. Terapia postremisiune	41
10.2.3. Terapia postremisiune în acord cu riscul citogenetic și molecular	42
10.3 Managementul pacienților vârstnici cu LAM ≥ 60 ani	44
10.4 Pacienți cu vâsta 60-75 ani	45
10.4.1 Terapia de inducție	45
10.4.2 Terapia postremisiune	45
10.5 Managementul pacienților cu LAM cu vârsta ≥ 75 ani	47
11. LAM legate de terapie (LAM-t)	48

12. LAM refractară / recădere	50
13. Terapii țintite în LAM	55
13.1 LAM cu aspecte citogenetice adverse.....	55
13.2 LAM cu core binding factor (LAM-CBF).....	55
13.3 LAM cu mutația genei NPM1.....	56
13.4 LAM cu IDH mutant.....	56
13.5 LAM cu mutația genei FLT3.....	56

II. PARTEA SPECIALĂ

Obiectivele studiului	57
Material și metode	59
Analiza parametrilor și metodele statistice.....	74
II.2 Rezultatele lotului de pacienți cu LAM-nonLAP	75
II.3 Rezultatele lotului de pacienți cu LAP	147
II.4 Discuții	157
II.5 Concluzii	176
Bibliografie	182
Anexe	

LISTA DE ABREVIERI

ALFA	Asociația Franceză de Leucemie Acută
ATO	trioxidului de arsenic
ATRA	acid all trans retinoic
BMR	bolii minime reziduale
BR	boală refractară
CALGB	Grupul B de Cancer și Leucemie
CGH	comparative genomic hybridization
CSH	celule stem hematopoietice
EBMT	European Bone Marrow Transplantation
ELN	European LeukemiaNet
EFS	Event free survival
FAB	grupul Franco-Americo-Britanic
FISH	fluorescent in situ hybridization
FLT	Fms-like tirozin-kinaza
GOELAM	Groupe Ouest Est Leuemies Aigues Myeloblastiques
HOVON	Grupul Cooperativ Hemato-Oncologic Olandez-Belgian
ITD	Internal tandem duplication
LAM	leucemia acută mieloidă
MDR	rezistența multidrog
MGG	colorația May Grumwald Giemsa
MPO	mieloperoxidază
MT	metil transferază
NMP	neoplasm mieloproliferativ
OMS	Organizația Mondială a Sănătății (WHO)
OS	overall survival
PCR	polymerase chain reaction
RC	remisiune completă
RFS	relapse free survival
RP	remisiune parțială
SAKK	Grupul elvețian pentru cercetarea clinică a cancerului
SMD	sindrom mielodisplazic
SNC	sistem nervos central

INTRODUCERE

Leucemia acută mieloidă (LAM) sau leucemia acută mielogenă sunt termeni echivalenți pentru un neoplasm hematopoietic, care este caracterizat prin prezența unei clone maligne de celule mieloidă în măduva osoasă cu arest de maturare la nivel de blast. Leucemia acută mieloidă este termenul utilizat de clasificarea neoplasmelor mieloidă a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS 2003, 2008, 2016) (*Vardiman JW*, 2002, 2009, 2010; *Arber DA*, 2016, *Askan E*, 2015).

LAM poate urma unui sindrom mielodisplazic (SMD) sau unui neoplasm mieloproliferativ (NMP). LAM este heterogenă clinic, morfologic, imunofenotipic, citogenetic și molecular. LAM apare la orice vârstă, dar este mai frecventă la adult și frecvența crește cu avansarea în vârstă. Pacienții se prezintă cu manifestări de anemie, neutropenie și trombocitopenie care rezultă din tulburarea hematopoiezei datorită înlocuirii sau supresiei elementelor normale ale măduvei prin blastii maligni. Numărul total de leucocite este variabil, de la cazuri care se prezintă cu leucopenie la cazuri care au hiperleucocitoză cu un număr crescut de blasti în sânge, ceea ce reprezintă o urgență medicală datorită leucostazei.

Celula malignă în LAM este un blast care cel mai frecvent arată diferențiere mieloidă și monocitică. În 5-10% din cazuri blastii prezintă diferențiere eritroidă sau megacariocitară. Blastul mieloid poate fi identificat prin colorația May Grumwald Giemsa (MGG) prin prezența de granule și/sau Corpi Auer, prin colorații de citochimie (Negru Sudan, mieloperoxidazei, cloroacetat esteraze) sau/și prin imunofenotipare demonstrând expresia de antigene mieloidă. Procentul de blasti pentru diagnosticul de LAM este egal sau mai mult de 20% mieloblasti și/sau monoblasti/ promonocite și/sau megacarioblasti în sânge periferic sau măduva osoasă.

Diagnosticul de LAM poate fi stabilit și atunci când procentul de blasti în sânge periferic sau măduva osoasă este $\geq 20\%$ sau sub această cifră în situația în care se asociază cu t(8;21) (q22-q22), inv(16) (p13.1q23), t(16;16) (p13.1;q22), t(15;17) (q22;q12) sau în unele cazuri de leucemie acută eritroidă când precursorii eritroidi reprezintă $> 50\%$ din celule din măduva osoasă și blastii reprezintă mai mult de 20% din celule noneritroide. Diagnosticul de sarcom mieloid este sinonim cu LAM indiferent de numărul de blasti din sânge sau măduva osoasă, indiferent dacă pacientul a avut un istoric anterior de neoplazie

mieloproliferativă sau sindrom mielodisplazic (SMD), în care caz sarcomul este evidență de transformare acută (*Vardiman JW, 2008*).

Imunofenotiparea prin flow citometrie a arătat că LAM este heterogenă exprimând variabil antigene exprimate pe celula stem și pe celule mieloides mai mature și au mai puțin frecventă co-expresia de antigene limfoide (*Khalidi HS, 1998*). LAM exprimă un “pattern” aberant de antigene în comparație cu celule mieloides normale. Detectarea unui fenotip aberant prin flow citometrie este utilizat pentru monitorizarea bolii minime reziduale (BMR).

Anomaliile citogenetice sunt prezente la ~50% dintre pacienții cu LAM și sunt cei mai puternici factori de predicție ai evoluției. Din cauza importanței citogeneticii în diagnostic și prognostic în LAM o serie de anomalii recurente citogenetice au fost încorporate în clasificarea OMS. Anomaliile citogenetice au fost clasificate ca favorabile, intermediare și nefavorabile (*Grimwade D, 2010; Pffirmann M, 2013*). Aceste informații sunt utilizate în alegerea terapiei de inducție și postinducție. Noi metode de diagnostic, incluzând FISH, PCR, CGH și microarray analysis au crescut sensibilitatea detectării anomaliilor genice și capacitatea de a subclasifica LAM și de a detecta boala reziduală. Anomaliile moleculare demonstrate în LAM pot, de asemenea, prezice răspunsul la tratament, în special în LAM cu cariotip normal. Anomaliile moleculare au servit de asemeni pentru dezvoltarea unor terapii țintite.

În ultimele două decade cele mai notabile rezultate s-au obținut în leucemia acută promielocitară (LAP). Rata vindecării în LAP este foarte înaltă (>70%) prin introducerea acidului all trans retinoic (ATRA) pe lângă chimioterapie și regimuri incluzând în recădere dar și de primă linie (în cazurile cu risc scăzut) a trioxidului de arsenic (ATO) (*Dombret, 2016*). În alte tipuri de LAM evoluția a fost semnificativ îmbunătățită pentru tineri, dar nu pentru pacienții vârstnici. Rata supraviețuirii la 5 ani în LAM-nonLAP conform SEER (Surveillance Epidemiology End Results) a fost 27,4%.

Îmbunătățirea supraviețuirii pacienților cu LAM ține de aplicarea terapiei postremisiune (doza mare de citarabină) și indicația de allo-HCST pentru cazurile cu risc crescut de recădere. Noi terapii au fost testate în LAM și rolul lor rămâne să fie determinat (*Askan E, 2015*).

Avansul recent în biologia și genetica LAM trebuie să ducă în cele din urmă la o terapie specifică subseturilor de LAM, care ideal ar trebui să fie croită după boala fiecărui pacient. Deși un număr în creștere de subseturi distincte de LAM au fost din ce în ce mai mult caracterizate, managementul pacienților a rămas “dezamăgitor” de uniform.

Dacă excludem LAP, managementul curent al LAM se bazează încă în mare pe chimioterapie intensivă și allo-TCSH cel puțin pentru pacienți tineri, care pot tolera tratament intensiv. Totuși, progrese au fost făcute, în special în intensificarea dozei medicamentelor standard promițând pacienților să atingă o *remisiune durabilă*. În plus, identificarea îmbunătățită a pacienților cu risc relativ mic de recădere trebuie să limiteze expunerea exagerată la riscul allo-TCSH în prima remisiune completă. Rolul agenților noi și eficienți ca analogii de purină sau gemtuzumab ozogamicin, este încă în investigații. Agenții noi cu ținte precise sunt în dezvoltare clinică.

Lucrarea este structurată în două părți: partea generală cu date din literatură prezentate selectiv și concis și partea specială cuprinzând cercetarea personală.

PARTEA GENERALĂ:

În partea generală sunt prezentate date actuale privind delimitarea și definiția LAM, incidența, etiologia, patogeniza (cu referire la celula stem leucemică, istoricul mutațional, mutațiile somatice), clasificarea LAM (clasificarea FAB și clasificarea WHO 2016), manifestările clinice, diagnosticul LAM ce a inclus investigația morfologică, citochimică, flow-citometrie, examenul citogenetic și biologie moleculară. Factorii de prognostic în LAM au fost analizați atât privind datele legate de pacient (vârstă, status de performanță, comorbidități) cât și factorii de prognostic legați de boală (numărul de leucocite, existența sindromului mielodisplazic, LAM post terapie, anomaliile citogenetice și moleculare).

Privind *managementul LAM* deciziile de tratament se bazează pe vârstă, istoricul anterior SMD sau terapie citotoxică, statusul de performanță, cariotipul și markerii moleculari. Cariotipul și markerii moleculari sunt factori puternici de predicție ai supraviețuirii. Factorii citogenetici și moleculari permit adaptarea strategiilor terapeutice în funcție de riscul de recădere. Descoperirea anomaliilor moleculare au permis identificarea unor subseturi de LAM ce au condus la dezvoltarea de terapii țintite (inhibitorii de FLT3, inhibitori de IDH).

PARTEA SPECIALĂ

OBIECTIVELE STUDIULUI

În leucemia acută mieloblastică cariotipul reprezintă cel mai important factor de predicție pentru rata remisiunii, riscul de recădere și supraviețuirea globală (OS). Dezvoltarea rapidă a geneticii moleculare a dus la încorporarea markerilor moleculari în modelele predictive pentru LAM pentru selectarea unei terapii adaptate riscului.

Obiectivele studiului actual a fost identificarea de anomalii moleculare (mutații de gene, prezența de gene de fuziune) în cazurile de leucemie acută mieloblastică și s-a urmărit stabilirea rolului lor în:

- a) diagnosticul corect al subtipului de leucemie acută mieloblastică.
- b) în stratificarea pacienților pentru riscul de recădere și alegerea terapiei de consolidare postinducție în combinație cu datele citogenetice.
- c) în urmărirea răspunsului la tratament prin detectarea bolii minime reziduale (BMR).

MATERIAL ȘI METODE:

Materialul de studiu îl reprezintă 151 pacienți diagnosticați și tratați cu leucemie acută mieloblastică (LAM) în Centrul de Hematologie și Transplant Medular Institutul Clinic Fundeni în perioada 2012-2016. Pacienții au fost urmăriți personal în timpul stagiului de pregătire a tezei de doctorat. Cele 151 cazuri de leucemie acută mieloblastică sunt reprezentate de 109 cazuri de leucemie acută mieloblastică de novo (LAM “de novo”), 39 cazuri de leucemie acută mieloblastică post sindrom mielodisplazic (LAM post SMD) și 3 cazuri de leucemie acută mieloblastică post terapie citotoxică (LAM-t).

Diagnosticul de leucemie acută mieloblastică a fost stabilit conform criteriilor Franco-American-Britanic (FAB) și a criteriilor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) (2008,2017).

Pentru a evalua importanța analizei citogenetice și a markerilor moleculari pentru stabilirea diagnosticului, a alegerii terapiei și a monitorizării postterapie s-au împărțit cele 151 cazuri în două loturi: un lot de 135 pacienți cu leucemie acută mieloblastică excluzând cazurile de leucemie acută promielocitară (cazurile de LAM nonLAP) și al doilea lot format din 16 pacienți cu leucemie acută promielocitară.

Am ales acest lot de LAP fiind tipul de LAM cel mai bine caracterizat din punct de vedere citogenetic și molecular. Translocația genei PML de pe cromozomul 15 la gena RARA de pe cromozomul 17 (t:15;17) (q24.1;q21.1) duce la apariția genei de fuziune PML-RARA și a proteinei de fuziune PML-RARA care a putut fi monitorizată cantitativ prin PCR. Identificarea genei de fuziune PML-RARA în LAP a dat un biomarker genetic puternic pentru diagnostic și a dus la dezvoltarea unei intervenții terapeutice eficiente, bine tolerate transformând acest subset de boală care era letală anterior în leucemie acută “curabilă”.

METODELE DE LABORATOR:

Metodele de laborator utilizate în cursul studiului au fost efectuate în laboratoarele Centrului de Hematologie și Transplant Medular Institutul Clinic Fundeni. Investigațiile utilizate în cursul studiului au fost următoarele: hemograma, examenul citomorfologic al frotiului de sânge periferic, teste de citochimie, examenul măduvei osoase (cu aprecierea la toți pacienții a procentul de blaști și a modificărilor displazice), puncție biopsie osoasă, imunofenotiparea, examenul citogenetic, testul FISH și teste de biologie moleculară.

Examenul citogenetic

S-a efectuat analiza citogenetică standard și bandare G. Anomaliile cromozomiale au fost denumite în conformitate cu ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Examenul citogenetic a fost efectuat la 102 pacienți diagnosticați cu leucemie acută mieloblastică de către Dna Dr Cerasela Jordan în cadrul departamentului de Citogenetica al Institutului Clinic Fundeni. Pacienții au fost clasificați ca având rezultate anormale, normale sau „failed cytogenetic result”. Cariotipul a descris anomalii structurale și numerice și anomalii cromozomiale clonale. Examenul citogenetic a fost concludent la 88 pacienți și la 22 pacienți rezultatul nu a putut fi valorificat.

Testul FISH a fost necesar în cazurile diagnosticate cu LAM care au prezentat un număr insuficient sau lipsa metafazelor sau calitatea slabă a cromozomilor prin tehnica standard de bandare. Testul FISH a permis detectarea anomaliilor cromozomiale structurale incluzând translocațiile echilibrate și neechilibrate, inversiuni, amplificări sau deleții ale genelor sau regiunilor genomice. Testul FISH a fost o opțiune pentru a detecta următoarele gene de fuziune RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA, CBF β -MYH11, EVI1 și MLL și deleții (del 5q, del 7q).

Teste de biologie moleculară: au fost realizate în cadrul departamentului de biologie moleculară al Institutului Clinic Fundeni la 133 de pacienți. Anomaliile moleculare puse în evidență în laboratorul nostru în perioada studiului au fost: PML-RARA; FLT3-ITD; AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1); CBFβ-MYH11; NPM1; MLL-AF4; MLL-AF9.

TRATAMENTUL LAM:

Am utilizat pentru tratamentul pacienților cu LAM-nonLAP cu vârsta sub 65 ani fără comorbidități și cu status de performanță bun terapie de inducție intensivă urmată de tratament postremisiune la cei care au obținut RC (vezi Tabel 2.1.2: Protocol de terapie de inducție intensivă “3+7” și al terapiei postinducție (de consolidare). Pentru pacienții cu vârsta peste 65 ani, cu status de performanță modificat, cu comorbidități (unfit) am utilizat terapie non-intensivă: doze mici de citarabină sc, agenți hipometilanți, hydroxyuree și terapie de susținere (masă eritocitară, masă trombocitară, antibioterapie cu spectru larg, antifungice). Pentru pacienții cu boala refractară sau cu recădere s-au utilizat regimuri de salvare: MEC, FLAG-IDA, DAV, ADE, CALG-M (vezi Tabel 2.1.4).

Definirea răspunsului la tratament s-a făcut conform criteriilor internaționale *Dohner H*, 2010 (vezi Tabel 2.1.5).

În managementul pacienților noștri cu LAM am ținut cont în permanență de factori de prognostic legați de pacient (vârsta, comorbidități, status de performanță) și factori legați de boală: numărul de leucocite, LAM de novo/ secundară (post SMD/ post terapie), grupa de risc pe baza anomaliilor citogenetice și moleculare.

Analiza parametrilor și metodele statistice:

În lucrarea prezentă au fost analizați următorii factorii de prognostic: factorii ce țin de pacient (vârsta, statusul ECOG, comorbidități) și o serie de factori ce țin de boală (numărul de leucocite; statusul bolii: de novo, post SMD, leucemii acute mieloidă post terapie leucemogenă; anomaliile citogenetice și moleculare, valoarea LDH-ului). Prelucrarea datelor a fost realizată cu programul Microsoft Office 2010 - EXCEL 2010 și analiza datelor s-a făcut folosind statistica - SPSS 20.0.

Pentru statistica descriptivă s-au utilizat diverși indicatori statistici: frecvența, media, mediana, deviația standard, etc. Acești indicatori au fost calculați folosind SPSS și EXCEL. În reprezentarea grafică a acestor s-a folosit, de asemenea, EXCEL și SPSS.

Pentru analiza cantitativă și calitativă a datelor s-a folosit SPSS pentru diversele teste statistice: testul Fisher, testul Chi pătrat, testul t (Student), analiza variantei (ANOVA), teste neparametrice.

Analiza supraviețuirii globale și a supraviețuirii fără boală a fost făcută cu testul Kaplan-Meyer și modelul Cox folosind SPSS.

REZULTATE:

Studiul de față cuprinde 151 pacienți internați în Centrul de Hematologie și Transplant Medular Institutul Clinic Fundeni în perioada ianuarie 2012-iunie 2016. Pacienții au fost selectați în lucrare pe baza criteriilor OMS 2008, 2016. Cazurile selectate au fost investigate citogenetic și în biologie moleculară. Repartiția pe ani a cazurilor investigate este ilustrată în figura 2.2.1. Cele 151 cazuri de LAM au fost împărțite în două loturi: un lot de 135 (89,4%) pacienți cu leucemie acută mieloblastică non leucemie promielocitară (LAM-nonLAP) și al doilea lot este format din 16 (10,6%) pacienți cu leucemie acută promielocitară (LAP). Markerul citogenetic t(15;17) și evidențierea markerului molecular: transcriptul de fuziune PML-RARA și-au dovedit importanța practică pentru diagnosticul LAP, pentru stabilirea criteriului RC după tratament și monitorizarea bolii minime reziduale pentru a preveni recăderea hematologică.

LAM este o boală a adultului vârstnic. Pe lotul nostru de LAM-non LAP *vârsta mediană* a fost de 52,7 ani (limite 31-64 ani). 80% (108 pacienți) din pacienții din lotul LAM-nonLAP au avut vârsta < 65 ani. Vârsta mediană în lotul cu LAP a fost 41,5 ani (limite 31-64 ani). LAP este un subtip de leucemie care afectează adultul tânăr.

În LAM, datele din literatură raportează incidența mai mare de cazuri *la bărbați* față de femei. Rata incidenței bărbați/femei pentru toate rasele: 4,3/3,0; pentru albi: 4,5/3,1; pentru negri: 3,5/2,8.

Repartiția *pe sexe* în lotul LAM-nonLAP a fost în favoarea femeilor (53,83% femei 72 din 135) față de 46,67% bărbați (63 din 135). Și în lotul LAP, procentul cazurilor înregistrate la femei a fost mai mare 62,5% femei (10 din 16) față de 37,50% bărbați (6 din 16).

Particularitatea lotului studiat față de datele din literatură este procentul crescut al pacienților cu vârsta sub 65 ani, vârsta mediană pe întregul lot mai mică decât mediana din literatură și predominanța cazurilor la femei față de bărbați. Vârsta pacientului cu LAM

este un determinant major de risc. Datele epidemiologice au arătat că supraviețuirea scade pe măsură ce vârsta crește peste 65 ani.

Timpul median de supraviețuire la pacienții din lotul LAM-nonLAP pe baza vârstei ≤ 65 și > 65 ani a demonstrat o diferență semnificativă statistic ($p=0,028$) la testul log Rank. Timpul median de supraviețuire este de 14 luni (CI 95% între 7 și 20 luni) pentru pacienții cu vârsta ≤ 65 ani și de 9 luni (CI 95% 3 și 15 luni) pentru vârsta > 65 ani. Vezi tabelul 2.2.45 și graficul 2.2.18.

Ghidurile oncologice pentru *statusul de performanță (SP)* ECOG sau Karnofsky Performance Score (KPS) larg utilizate, sunt utile în identificarea acelor adulți vârstnici cu risc crescut pentru complicații (ex pacienții “frail”) în cursul terapiei intensive pentru LAM. Pacienții adulți vârstnici cu un scor ECOG nefavorabil la momentul tratamentului (ECOG 3 sau 4, indiferent de cauză) au o mare probabilitate de toxicitate la tratament și un beneficiu redus. Există o strânsă relație între SP ECOG la diagnostic, vârsta și mortalitatea la 30 zile în cursul inducției intensive.

OS scade dacă scorul SP este “prost” la momentul diagnosticului și tratamentului.

Pe lotul de 135 pacienți cu LAM-nonLAP, *statusul de performanță (SP)* ECOG a fost ≤ 2 la 85,82% (115 din 135) pacienți și > 2 la 14,1% (19 din 135) pacienți. Timpul median de supraviețuire a fost de 14,5 luni (CI 95% între 7,7 și 21,3 luni) pentru pacienții cu SP ECOG ≤ 2 și de 5 luni pentru pacienții cu SP ECOG > 2 (CI 95% între 1 lună și 14 luni). Testul long Rank a arătat o diferență semnificativ statistică între pacienții cu SP ECOG ≤ 2 și > 2 ($p=0,001$).

SP ECOG prost la diagnostic este un factor de risc pentru complicațiile legate de tratament indiferent de vârstă, dar impactul negativ al SP crește cu vârsta. Limita scorului oncologic ECOG este că nu este destul de sensibil pentru a diferenția pacienții cu vulnerabilități subclinice de cei care sunt eligibili (“fit”) pentru tratament.

Comorbiditățile sunt frecvente pentru pacienții adulți vârstnici cu LAM și influențează toleranța la tratament. Comorbiditățile au un impact independent de statusul functional și oferă informații prognostice adiționale în cancer. Comorbiditățile sunt tipic măsurate utilizând indici standardizați pentru a stabili severitatea bolii. Cele mai utilizate în practică sunt Indicele de Comorbidități Charlson (ICC) și Indexul de Comorbidități pentru Transplantul de Celule Stem Hematopoietice (HCT-CI) adoptat special pentru

pacienții eligibili pentru allotransplant de celule stem hematopoietice. Se apreciază funcția pulmonară, cardiacă, hepatică, renală.

Pe lotul nostru de 135 cazuri de LAM nonLAP a existat următoarea evaluare pentru comorbidități: 45,2% (61 din 135) nu au avut comorbidități, 39,3% (53 din 135) au avut o comorbiditate, 9,6% (13 din 135) au avut 2 comorbidități și 4,4% (6 din 135) au avut 3 comorbidități. Riscul de deces este semnificativ mai mare de 1 ($\lambda=3,04$ cu $p=0,022$) (CI 95% 1,178-7,880) pentru pacienții cu LAM-nonLAP care au 3 comorbidități, comparativ cu pacienții cu LAM non-LAP fără nici o comorbiditate. Modelul nu este acceptabil ($p=0,096$ pentru testul Omnibus), din cauza numărului mic de pacienți cu 3 comorbidități. Supraviețuirea mediană a fost pentru pacienții fără comorbidități de 13,9 luni (CI 95% între 3,7 și 24,14 luni), pentru cei cu 1 comorbiditate de 12,3 luni (CI 95% între 6,8 și 17,9 luni), pentru cei cu 2 comorbidități de 10,4 luni (CI 95% între <1 lună și 35,88 luni), iar cei cu 3 comorbidități 2,2 luni (CI 95% între < 1 lună și 6,2 luni).

Există o relație între încărcătura mare de comorbidități și evoluția clinică nefavorabilă. Fiecare pacient cu LAM a fost evaluat cu grijă privind comorbiditățile și SP atât la diagnostic cât și pe parcursul evoluției bolii. Evaluarea pretratament a fiecărui pacient adult și în special a celui vârstnic trebuie să identifice dacă este “fit” (eligibil) (de ex. va tolera și beneficia de tratament) sau este “vulnerabil” (de ex. pacientul se află în risc de declin clinic și funcțional în cursul tratamentului sau după tratament ceea ce va reduce beneficiile tratamentului) sau este “frail” (fragil) (de ex. pacientul va avea numeroase complicații semnificative după terapie). Sunt necesare mai multe investigații pentru a identifica adulții vulnerabili.

În lotul studiat de noi, de 151 cazuri, 16 cazuri (10%) au fost cazuri de LAP “de novo”. Din 135 cazuri de LAM-nonLAP: 93 (68,9%) au fost LAM de novo, 39 (28,9%) LAM-postSMD și 3 (2,2%) din cazuri LAM-t. LAM-postSMD și LAM-t sunt încadrate adesea împreună formând grupul LAM secundare. În lotul nostru au fost 42 LAM secundare (32,1%). Calcularea duratei de supraviețuire nu a arătat diferențe semnificative între LAM de novo și LAM secundar (LAM-postSMD și LAM-t) ($p=0,678$) posibil din cauza numărului mic de pacienți cu LAM-t. Durata de supraviețuire în LAM de novo a fost de 10,3 luni (CI 95% între 3,4 și 17,3 luni), iar în LAM secundar a fost 10,9 luni (CI 95% între 5,6 și 16,2 luni).

Cele 3 cazuri de LAM-t au fost diagnosticate la 2 paciente care au fost tratate pentru cancer de sân cu scheme incluzând antraciline și iradiere și la un bărbat tratat pentru cancer pulmonar cu chimioterapie.

Cariotipul în LAM este cel mai important factor de predicție pentru rata remisiunii, riscul recăderii și supraviețuirea globală (*Dohner H, 2010*). Studiul citogenetic concludent s-a obținut la 88 cazuri (58,3%) din totalul de LAM (vezi tabelul 2.2.9 și tabelul 2.2.10 analizate în acest studiu). Încadrarea în grupele citogenetice de risc s-a făcut după criteriile clasificării prognostice ale Medical Research Council 2010 (*Grimwade D, 2010*). Pacienții adulți tineri <65 ani au fost categorisiți în 3 grupe de risc: favorabil, intermediar și advers.

Grupa citogenetică de risc favorabil în lotul nostru de 151 pacienți a inclus 15 pacienți: 6 cu t(8;21), 2 cu inv(16) și 7 pacienți cu t(15;17). Cei 15 pacienți au reprezentat 17% din totalul de LAM cu cariotip concludent. Vârsta mediană: 46 ani (limite 20-58 ani). Acești pacienți au avut SP ECOG bun și nu au avut comorbidități.

Pentru LAM-nonLAP grupa de risc favorabil planul terapeutic a fost inducție "3+7" urmată de chimioterapie intensivă post inducție (3-4 cicluri HIDAC/IDAC. Allo-TCSH numai în RC2.

Grupa de risc intermediar după citogenetică a inclus 53 pacienți din lotul de 88 pacienți cu anomalii citogenetice concludente.

Grupa citogenetică de risc nefavorabil "high" a inclus 5 pacienți din care 3 cu cariotip complex, 2 cu deleție (5q). Cei 5 pacienți au reprezentat 5,6% din totalul de LAM cu cariotip concludent. Vârsta mediană a fost de 51 ani (41-57 ani).

Timpul median de supraviețuire pe grupe de risc citogenetice a fost de 15,2 luni (CI 95% între 6,8 și 27,7 luni) pentru pacienții cu cariotip intermediar și de 7 luni (CI 95% < 1 lună și 14,5 luni) pentru cei cu cariotip nefavorabil. Diferența este semnificativă statistic $p=0,013$ la testul log Rank. Pacienții din grupa de risc favorabil sunt în viață cu excepția unui caz.

Diagnosticul cariotipic este unul dintre indicatorii prognostici independenții foarte puternici în LAM. El servește pentru identificarea subseturilor biologice distincte ale bolii și este larg adoptat pentru a oferi cadrul pentru tratamentul adaptat la factorii de risc.

Analiza citogenetică a fost utilă pentru stratificarea pacienților după riscul de recădere și reprezintă un important factor în determinarea tratamentului postremisiune.

Identificarea unor mutații moleculare specifice este importantă la pacienții cu cariotip normal pentru încadrarea în categoria de risc cea mai exactă și pentru a ajuta în aceste cazuri la decizia de tratament postremisiune.

Din totalul de 132 pacienți testați (LAP și LAM-nonLAP) 46 au avut anomalii moleculare și 86 nu au prezentat anomalii moleculare. Din anomaliile moleculare detectate PML-RARA 16 pacienți; AML-ETO 8 pacienți; CBFβ-MYH11 4 pacienți; NPM1 fără FLT3-ITD s-a notat la 1 pacient. FLT3-ITD + a fost prezentă la 16 pacienți, MLL-AF9 a fost notat la un pacient. Toți cei 16 pacienți cu LAP au avut teste pentru PML-RARA pozitiv. 19 din 135 pacienți din grupa LAM nonLAP nu au fost evaluați în biologie moleculară.

Din combinația studiului citogenetic cu testele pentru markeri moleculari s-au produs modificări în numărul de pacienți din grupa cu risc crescut. 16 pacienți cu cariotip normal încadrați în grupa de risc intermediar au fost mutați în grupa high risk ca urmare a detectării în biologie moleculară a FLT3-ITD. Grupa high risk a crescut de la 5 la 21 pacienți.

În managementul pacienților noștri cu LAM am ținut cont în permanență de factori de prognostic legați de pacient (vârstă, comorbidități, status de performanță) și factori legați de boală (numărul de leucocite, LAM de novo/ secundară, grupa de risc pe baza anomaliilor citogenetice și moleculare).

Selectarea pacienților LAM-nonLAP pentru terapia de inducție s-a efectuat ținând cont de vârsta ≤ 65 ani și > 65 ani, scor ECOG < 2 și > 2 , comorbidități, funcția pulmonară, cardiacă, hepatică, renală. 121 pacienți cu LAM-nonLAP au fost eligibili pentru terapie de inducție intensivă (schema "3+7") și 12 pacienți "non-fit" au primit terapie non-intensivă: 6 pacienți au primit mini-doze ARA-C și 6 pacienți au primit un agent hipometilant: Dacogen. O pacientă în vârstă de 54 ani, tratată în urmă cu 8 ani pentru cancer de sân cu antracicline și iradiere a primit cura DAV ca terapie de inducție. Un pacient după precizarea diagnosticului a fost tratat în Centrul teritorial de Hematologie.

Frecvența RC după ciclul I de inducție "3+7" a fost de 28,1% (34 pacienți din 121 cu LAM-nonLAP).

Repartiția pe grupe de risc a RC a fost de: 41,7% în grupa de risc favorabil, 28,4% în grupa de risc intermediar și 4% în grupa de risc nefavorabil. Nu a existat o diferență semnificativă statistic privind rata RC după ciclul I "3+7" de inducție pe baza grupei de risc. În literatură, frecvența RC după ciclul I de inducție "3+7" este de 40-60%.

RC după ciclul I de inducție "3+7" pe lotul de LAM-nonLAP cu vârsta <65 ani a fost următoarea: 33,3% (4 din 12) pacienți din grupa de risc favorabil; 29,3% (22 din 75) din grupa de risc intermediar; 19% (4 din 21) din grupa de risc nefavorabil.

RC după ciclul II de inducție "3+7" pe lotul de LAM-nonLAP cu vârsta <65 ani a fost următoarea: RC 52,9% (54 cazuri din 102), RP 29,4% (30 cazuri din 102) și boală refractară (BR) 13,7% (14 cazuri din 102). 3,9% (4 cazuri) nu au fost evaluate. 19 cazuri au fost pierdute la inducție.

Procentul RC pe grupe de risc după ciclul II de inducție "3+7" a fost următorul: 100% (11 din 11 cazuri) în grupa de risc favorabil; 49,3% (36 din 73 cazuri) din grupa de risc intermediar și 38,9% (7 din 18 cazuri) din grupa de risc nefavorabil. Există diferențe semnificativ statistic privind obținerea RC după ciclul II de inducție "3+7" în funcție de grupa de risc ($p=0,04$). 24 pacienți (32,88%) încadrați în grupa de risc intermediar au obținut RP și 9 pacienți (12,33%) au prezentat rezistență la tratament. În grupa de risc nefavorabil 33,33% (6 pacienți) au obținut RP și 27,78% (5 pacienți) au prezentat boală refractară.

Din lotul de 135 pacienți cu LAM-nonLAP 121 au fost eligibili pentru chimioterapie de inducție intensivă și RC au obținut 69 pacienți (56,55%). 54 pacienți după inducție "3+7", 14 pacienți după curele de salvare și 1 pacient după cura DAV.

Pacienții care au atins RC au primit în continuare în funcție de grupa de risc chimioterapie intensivă \pm allo-TCSH. Terapie de consolidare intensivă cu HIDAC (2-3 g/m² la 12 ore în zilele 1,3,5) au primit 41 pacienți. IDAC (1-1,5 g/m² la 12 ore în zilele 1,3,5) au primit 25 pacienți. Cura NOVE 1 pacient, cura cu ARA-C 500 mg/m² 2 pacienți. Regim de consolidare cu HIDAC au primit: 10 (76,9%) din pacienții încadrați în grupa de risc favorabil, 26 (26%) din pacienții încadrați în grupa de risc intermediar, 5 (23,8%) din grupa de risc nefavorabil. Regim de consolidare IDAC au primit: 2 (15,4 %) din pacienții din grupa de risc favorabil, 20 (20%) din pacienții din grupa de risc intermediar, 3 (14,8%) din grupa de risc nefavorabil.

În grupa de risc favorabil, 83,3% (10 pacienți) au primit consolidare cu HIDAC și 16,7% (2 pacienți) au primit consolidare cu IDAC. În grupa de risc intermediar, 55,1% (27 pacienți) au primit consolidare cu HIDAC și 44,9% (22 pacienți) au primit consolidare cu IDAC. În grupa de risc nefavorabil, 62,5% (5pacienți) au primit cure de consolidare cu HIDAC și 37,5% (3 pacienți) cure de consolidare cu IDAC.

Grupa de risc favorabil a inclus 13 cazuri din care 12 cazuri cu LAM-CBF: 8 cazuri LAM-CBFA cu t (8;21) ce asociază (AML-ETO) (RUNX1/RUNX1T1), 1 caz cu inv(16) ce asociază CBF-B-MYH11 + 3 cazuri CBF-B-MYH11 + 1 caz NPM1 cu cariotip normal. Din 13 cazuri, un caz a decedat la ciclul I de inducție "3+7". Remisiunea completă a fost atinsă după inducția "3+7" în 12 cazuri (100%). 10 (83,3%) cazuri au primit consolidare intensivă cu 3-4 cicluri HIDAC și 2 (16,6%) au primit IDAC. RC cu BMR negativă s-a obținut în 10 cazuri. Pacienții din grupa de risc favorabil aflați în RC moleculară sunt monitorizați prin controale secvențiale pentru markerul molecular pentru a controla remisiunea și a preveni recăderea.

Grupa de risc nefavorabil a inclus 21 cazuri: 3 cazuri cu cariotip complex, 2 cazuri cu del(5q), 16 cazuri cu cariotip normal și FLT3-ITD+. 3 cazuri au decedat în timpul inducției "3+7". După două cicluri de inducție "3+7" s-au obținut RC în 38,9% (7 cazuri din 18), RP în 33,33% (6 cazuri din 18) și boală refractară 27,78% (5 din 18 cazuri). 5 cazuri în RC au efectuat terapie de consolidare cu HIDAC/ IDAC și allo-TCSH. Patru din 11 cazuri cu RP și BR au obținut RC după terapie de salvare. Allo-TCSH s-a efectuat la 7 cazuri din grupa de risc nefavorabil.

În statistica noastră FLT3-ITD s-a diagnosticat la 16 cazuri cu LAM de novo și cariotip normal reprezentând 30% din cazurile cu cariotip normal. În literatura de specialitate FLT3-ITD se găsește în 20% din LAM și la 28-34% la pacienții cu LAM cu cariotip normal. FLT3-ITD este asociat cu evoluție defavorabilă în special la cei cu raportul alela mutant/ wild > 0,51. Allo-TCSH trebuie luat în considerare la pacienții cu LAM FLT3-ITD în prima remisiune completă și utilizarea de inhibitori de TK în combinație cu chimioterapia au dus la progrese în obținerea remisiunii complete și supraviețuirii globale.

Grupa de risc intermediar a inclus 68 cazuri cu cariotip concludent (din 121 cazuri de LAM-nonLAP) care au primit terapie de inducție "3+7". În cursul celor două cicluri "3+7" s-au înregistrat 17 decese. Remisiunea completă după două cicluri de inducție "3+7"

au atins 36 cazuri (49,3%). RP au obținut 24 cazuri (32,88%) și rezistență la tratament au prezentat 9 pacienți (12,33%). Pacienții cu RP și BR au primit terapie de salvare și s-a obținut RC în 10 cazuri. În cele 46 cazuri (52,27%) în care s-a obținut RC s-a instituit tratament de consolidare: HIDAC în 27 (55,1%) și IDAC în 22 (44,9%) cazuri. 17 pacienți au fost eligibili pentru allo-TCSH.

Impactul asupra supraviețuirii pe care îl au factorii de prognostic legați de pacient și factorii de prognostic legați de boală au fost analizați. Mediana de supraviețuire pentru pacienții cu LAM-nonLAP cu *vârsta* ≤ 65 ani a fost de 13,9 luni, iar pentru pacienții cu *vârsta* > 65 ani a fost de 9,1 luni ($p=0,028$).

Durata de supraviețuire a depins de *statusul ECOG*. Mediana de supraviețuire pentru pacienții cu status ECOG < 2 a fost de 14,5 luni, iar pentru cei cu status ECOG > 2 a fost de 5,1 luni ($p=0,001$).

În lotul studiat, 135 cazuri LAM-nonLAP, riscul de deces este semnificativ mai mare de 1 ($\lambda=3,04$ cu $p=0,022$) (CI 95% 1,178-7,880) pentru pacienții cu LAM-nonLAP care au 3 *comorbidități*, comparativ cu pacienții cu LAM non-LAP fără nici o comorbiditate. Modelul nu este acceptabil ($p=0,096$ pentru testul Omnibus), din cauza numărului mic de pacienți cu 3 comorbidități. Supraviețuirea mediană a fost pentru pacienții fără comorbidități de 13,9 luni (CI 95% între 3,7 și 24,14 luni), pentru cei cu 1 comorbiditate de 12,3 luni (CI 95% între 6,8 și 17,9 luni), pentru cei cu 2 comorbidități de 10,4 luni (CI 95% între < 1 lună și 35,88 luni), iar cei cu 3 comorbidități 2,2 luni (CI 95% între < 1 lună și 6,2 luni).

Durata de supraviețuire a fost influențată de *anomaliile citogenetice* ($p=0,013$). Pacienții cu cariotip favorabil au avut durata medie de supraviețuire de 46,4 luni (CI 95% 37,1 și 55,7 luni). Durata mediană de supraviețuire este de 15,2 luni (CI95% între 8,6 luni și 21,7 luni) pentru grupa de risc citogenetic intermediar și 7 luni (CI 95% între < 0 lună și 14,3 luni) pentru grupa de risc nefavorabil.

Supraviețuirea a fost influențată în mod semnificativ statistic în funcție de *grupa de risc* care a însumat markerii citogenetici și moleculari (criteriile NCCN versiunea 2-2016) ($p=0,008$). Pacienții încadrați în grupa de risc favorabil au avut durata medie de supraviețuire 40,8 luni (CI 95% între 29,6 și 51,4 luni). Pacienții încadrați în grupa de risc intermediar au avut durata mediană de supraviețuire de 10,3 luni (CI95% între 6,8 și 13,8 luni), iar pacienții din grupa de risc nefavorabil au avut durata mediană de supraviețuire de 7 luni (CI95% < 1 lună și 21,4 luni).

În lotul studiat de 135 cazuri LAM-nonLAP durata de supraviețuire depinde semnificativ de *valoarea leucocitelor* ($p=0,019$). Valorile crescute ale *creatininei* reduc semnificativ supraviețuirea ($p=0,000$). Durata de supraviețuire nu depinde semnificativ de următorii parametri: valoarea blaștilor periferici ($p=0,905$), a hemoglobinei ($p=0,305$), trombocitelor ($p=0,890$), blaștilor din măduva osoasă ($p=465$) și valoarea LDH-ului ($p=0,261$).

Doza de citarabină utilizată postremisiune (HIDAC sau IDAC) a influențat semnificativ supraviețuirea ($p=0,003$) pe lotul nostru. Pacienții care au primit doze mari de citarabină (HIDAC) au avut durata mediană de supraviețuire de 38,3 luni, iar pentru pacienții care au primit doze intermediare de citarabină (IDAC) durata mediană de supraviețuire a fost 15,1 luni (CI 95% între 9,8 și 20,4 luni).

Supraviețuirea pe întreg lotul de 151 pacienți cu LAM în funcție de grupa de risc a fost următoarea: Media duratei de supraviețuire pentru grupa de risc favorabil LAM-nonLAP a fost de 40,5 luni (CI 95% 29,6 și 51,4 luni). Durata mediană de supraviețuire pentru pacienții din grupa de risc intermediar a fost de 10 de luni, (CI 95% între 6 și 13 luni) și de 7 luni pentru pacienții cu cariotip nefavorabil, (CI 95% între <1 lună și 21 luni). Pentru lotul de 16 pacienți cu leucemie acută promielocitară durata mediană de supraviețuire a fost de 50,7 luni, (CI 95% între 45,5 și 55,9 luni). Diferența este semnificativ statistic la testul log Rank, $p = 0,000$.

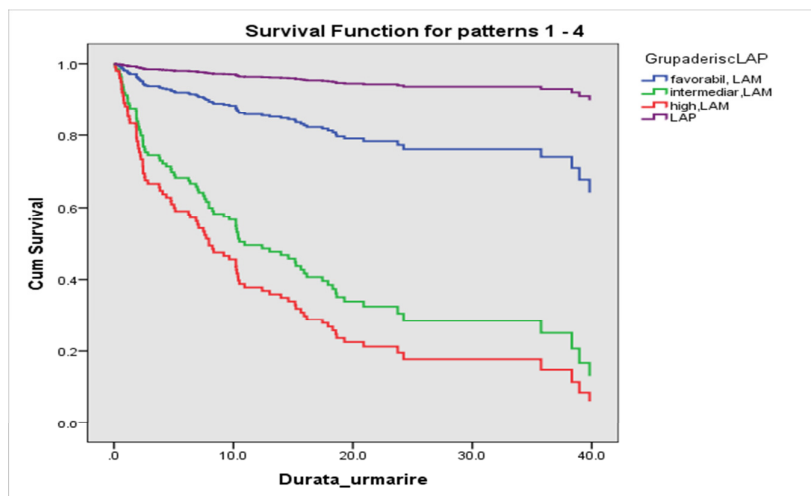


Fig 2.3.2: Graficul Kaplan Mayer pentru supraviețuirea întregului lot: 135 pacienți cu LAM-nonLAP încadrați pe grupe de risc după markeri citogenetici și moleculari și LAP.

Supraviețuirea fără evenimente (EFS) depinde semnificativ statistic în funcție de grupa de risc ($p=0,036$). Pacienții încadrați în grupa de risc favorabil au avut media duratei de supraviețuire fără evenimente de 33,5 luni. Durata mediană de supraviețuire fără evenimente pentru pacienții din grupa de risc intermediar a fost de 8,8 luni (CI 95% între 5,7 și 11,9 luni), iar pentru pacienții din grupa de risc nefavorabil a fost de 5,2 luni (CI 95% între 2,7 și 7,7 luni).

Allo-TCSH a fost recomandat ca terapie de consolidare în cazurile eligibile de LAM încadrate în grupa de risc nefavorabil și intermediar în prima remisiune completă (RC1). În cazurile de LAM încadrate în grupa de risc favorabil allotransplantul are indicație după obținerea a celei de a doua remisiune completă (RC2). În LAP în ultima perioadă s-a recomandat efectuarea autotransplantului după obținerea a celei de a doua remisiuni complete (RC2). În lotul studiat Allo-TCSH s-a efectuat ca terapie de consolidare în 25 cazuri de LAM-nonLAP. În grupa de risc favorabil un singur pacient care a recăzut la 22 luni de la obținerea RC1 și la care s-a obținut RC2 s-a efectuat allo-TCSH. În grupa de risc intermediar procedura a fost efectuată în 17 cazuri (36,95%), iar în grupa de risc nefavorabil în 7 cazuri (33,33%).

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Recenta clasificare OMS reflectă faptul că un număr în creștere de LAM pot fi categorisite pe baza anomaliilor citogenetice și de genetică moleculară. Aceste modificări genetice formează entități clinico-patologice-genetice distincte.
2. Pentru corecta clasificare a LAM în acord cu WHO este nevoie de mai multe informații:
 - a) istoricul bolii (după SMD sau MDS/MPN overlap sau legat de tratament).
 - b) pentru diagnostic: investigații morfologice, citochimie, histologie, imunofenotipare. Pe lângă numărul de blaști este necesară aprecierea modificărilor displazice.
 - c) analiza bandării cromozomiale.
 - d) investigarea mutațiilor în NPM1, FLT3-ITD, CEBPA.
3. Anomaliile citogenetice și de biologie moleculară ne-au permis încadrarea diagnostică în subgrupe conform ultimei clasificării OMS a cazurilor urmărite de noi. În grupa LAM cu anomalii citogenetice recurente am încadrat 8 cazuri cu t(8;21) AML-ETO, 4 cazuri cu inv(16) CBF-MYH11, 1 caz cu mutația NPM1 fără FLT3-ITD, 16 cazuri cu t(15;17) PML-RARA. În grupa leucemiilor acute cu modificări mielodisplazice am încadrat 39 cazuri. LAM legate de tratament am diagnosticat în 3 cazuri. 83 cazuri au fost încadrate în categoria NOS.
4. Prognosticul în LAM depinde de factorii legați de pacient și factorii legați de boală. Factorii de prognostic legați de pacient includ: vârsta, statusul de performanță și comorbiditățile. Factori de prognostic legați de boală includ: numărul de leucocite, existența sindromului mielodisplazic anterior, terapia citotoxică anterioară, anomaliile citogenetice și moleculare. Cariotipul este cel mai important factor după vârstă pentru predicția ratei remisiunii, a riscului de recădere și a supraviețuirii globale.
5. Citogenetica și biologia moleculară ne-au permis stratificarea pacienților în grupe de risc cu importanță în decizia terapeutică postinducție. Însurarea datelor de citogenetică și biologie moleculară a crescut precizia în determinarea grupei de risc.

Cele 88 de cazuri de LAM cu cariotip concludent au fost repartizate în următoarele grupe de risc:

- a) Risc favorabil: 15 pacienți: 7 pacienți cu t(15;17), 6 pacienți cu t(8;21), 2 pacienți cu inv(16).
- b) Risc nefavorabil: 5 pacienți: 3 cu cariotip complex, 2 cu del(5q)
- c) Risc intermediar: 68 pacienți cu cariotip normal.

După efectuarea testelor de biologie moleculară s-a produs o modificare a stratificării în grupa de risc. Din grupa de risc intermediar, 1 caz cu mutația NPM1 fără FLT3-ITD și cariotip normal a urcat în grupa de risc favorabil. 16 cazuri cu cariotip normal dar FLT3-ITD+ au trecut în grupa de risc nefavorabil.

Identificarea de markeri moleculari specifici (mutații moleculare specifice) este importantă la pacienții cu citogenetică normală pentru categorisirea lor în categoria de risc potrivită și pentru a ajuta în alegerea tratamentului postremisiune.

- 6. Pacienții eligibili pentru terapia de inducție au fost selectați ținând cont de factori ca vârsta < 65 ani și > 65 ani, prezența comorbidităților, statusul de performanță ECOG, starea funcțională a cordului, plămânului, ficatului, rinichiului. 121 pacienți cu vârsta < 65 ani și 15 pacienți ≥65 ani au fost eligibili pentru terapie de inducție intensivă “3+7”. Pacienții non-fit au primit tratament non-intensiv cu agenți hipometilanți, doze mici de citozin-arabinozidă, terapie suportivă.
- 7. Grupa de risc favorabil a inclus 13 cazuri: 8 cazuri cu t(8; 21)+ AML-ETO/RUNX1-RUNX1T1, 1 caz cu inv(16)+ CBFβ-MYH11 + 3 cazuri CBFβ-MYH11, 1 caz NPM1 cu cariotip normal. Programul terapeutic conform ghidurilor ELN și NCCN a constat din inducția standard (protocolul “3+7”). Postremisiune au primit consolidare cu HIDAC și IDAC. RC a fost atinsă după inducție I +II “3+7” în 12 cazuri (100%). 10 (83,3%) cazuri au primit consolidare intensivă cu 3-4 cicluri HIDAC și 2 (12%) cu IDAC. RC cu BMR negativă s-a obținut în 10 cazuri. Pacienții din grupa de risc favorabil aflați în RC moleculară sunt monitorizați prin controale secvențiale pentru markerul molecular pentru a controla remisiunea și a preveni recăderea.
- 8. Grupa de risc nefavorabil a inclus 21 cazuri: 3 cazuri cu cariotip complex, 2 cazuri cu del(5q), 16 cazuri cu cariotip normal și FLT3-ITD+. Pentru grupa de risc nefavorabil ghidurile recomandă la pacienții ce obțin remisiunea completă chimioterapie urmată în cazurile eligibile de allo- TCSH. După două cicluri de

inducție “3+7” s-au obținut RC în 38,9% (7 cazuri din 18), RP în 33,33% (6 cazuri) și boală refractară 27,78% (5 din 18 cazuri). 5 cazuri în RC au efectuat terapie de consolidare cu HIDAC/ IDAC și allo-TCSH. Patru din 11 cazuri cu RP și BR au obținut RC după terapie de salvare. Allo-TCSH s-a efectuat la 7 cazuri din grupa de risc nefavorabil. O strategie care se dezvoltă este utilizarea inhibitorilor de tirozin-kinază de generația I/II la pacienții cu LAM cariotip normal FLT3-ITD+. Sorafenib este un inhibitor neselectiv de FLT3. A fost administrat la un pacient cu LAM FLT3-ITD+ în combinație cu cura de reinducție urmat după obținerea RC de allo-TCSH și la al doilea pacient din lotul nostru cu LAM FLT3-ITD+ tratat cu chimioterapie și allo-TCSH. Actualmente primește Sorafenib post allo-TCSH.

9. Grupa de risc intermediar a inclus 68 cazuri cu cariotip normal. Ghidurile recomandă pentru grupa de risc intermediar pentru pacienții eligibili chimioterapie intensivă urmată de allo-TCSH. Remisiunea completă după două cicluri de inducție “3+7” au atins 36 cazuri (49,3%). RP au obținut 24 cazuri (32,88%) și rezistență la tratament au prezentat 9 pacienți (12,33%). Pacienții cu RP și BR au primit terapie de salvare și s-a obținut RC în 10 cazuri. În cele 46 cazuri (52,27%) în care s-a obținut RC s-a instituit tratament de consolidare: HIDAC în 27 (55,1%) și IDAC în 22 (44,9%) cazuri. 17 pacienți au fost eligibili pentru allo-TCSH. Grupa de risc intermediar este o grupă heterogenă, noile anomalii moleculare ce vor apărea vor desprinde noi entități.

10. În lotul studiat de 135 cazuri LAM-nonLAP s-a analizat impactul asupra supraviețuirii pe care-l au factorii legați de pacient. Supraviețuirea mediană depinde semnificativ statistic de vârsta de 65 ani și statusul ECOG.

Mediana de supraviețuire pentru pacienții cu LAM-nonLAP cu **vârsta ≤65 ani** a fost de 13,9 luni, iar pentru pacienții cu vârsta > 65 ani a fost de 9,1 luni (**p=0,028**).

Mediana de supraviețuire pentru pacienții cu **status ECOG < 2** a fost de 14,5 luni, iar pentru cei cu status ECOG > 2 a fost de 5,1 luni (**p=0,001**).

Riscul de deces este semnificativ mai mare de 1 ($\lambda=3,04$ cu $p=0,022$) (CI 95% 1,178-7,880) pentru pacienții cu LAM-nonLAP care au 3 comorbidități, comparativ cu pacienții cu LAM non-LAP fără nici o comorbiditate. Modelul nu este acceptabil (**p=0.096** pentru testul Omnibus), din cauza numărului mic de pacienți cu 3 comorbidități. Supraviețuirea mediană a fost pentru pacienții fără comorbidități de 13,9 luni (CI 95% între 3,7 și 24,14 luni), pentru cei cu 1 comorbiditate de 12,3 luni (CI 95% între 6,8 și 17,9 luni), pentru cei cu 2 comorbidități de 10,4 luni (CI 95%

între <1 lună și 35,88 luni), iar cei cu 3 comorbidități 2,2 luni (CI 95% între < 1 lună și 6,2 luni).

În lotul studiat de 135 cazuri LAM-nonLAP durata de supraviețuire depinde semnificativ de valoarea leucocitelor (**p=0,019**).

11. În lotul studiat am analizat impactul asupra supraviețuirii pe care-l au factorii legați de boală. Durata de supraviețuire a fost influențată de **anomiile citogenetice (p=0,013)**. Pacienții cu cariotip favorabil au avut durata medie de supraviețuire de 46,4 luni (CI 95% 37,1 și 55,7 luni). Durata mediană de supraviețuire este de 15,2 luni (CI95% între 8,6 luni și 21,7 luni) pentru grupa de risc citogenetic intermediar și 7 luni (CI 95% între < o lună și 14,3 luni) pentru grupa de risc nefavorabil. Supraviețuirea a fost influențată în mod semnificativ statistic de **grupa de risc pe baza markerilor citogenetici și moleculari** (criteriile NCCN versiunea 2-2016) (**p=0,008**). Pacienții încadrați în grupa de risc favorabil au avut durata medie de supraviețuire 40,8 luni (CI 95% între 29,6 și 51,4 luni). Pacienții încadrați în grupa de risc intermediar au avut durata mediană de supraviețuire de 10,3 luni (CI95% între 6,8 și 13,8 luni), iar pacienții din grupa de risc nefavorabil au avut durata mediană de supraviețuire de 7 luni (CI95% < 1 lună și 21,4 luni).

Durata de supraviețuire a pacienților cu LAM-nonLAP depinde semnificativ statistic de valoarea leucocitelor (**p=0,019**) și a creatininei (**p=0,000**).

Durata de supraviețuire nu depinde semnificativ de următorii parametri:

- valoarea blaștilor periferici (p=0,905)
- hemoglobina (p=0,305)
- trombocitelor (p=0,890)
- blaști MO (p=0,465)
- blaști PBO (p=0,725)
- valoarea LDH-ului (p=0,261).

12. Doza de citarabină utilizată postremisiune (HIDAC sau IDAC) influențează semnificativ supraviețuirea (**p=0,003**). Pacienții care au primit doze mari de citarabină (HIDAC) au avut durata mediană de supraviețuire de 38,3 luni, iar pentru pacienții care au primit doze intermediare de citarabină (IDAC) durata mediană de supraviețuire a fost 15,1 luni (CI 95% între 9,8 și 20,4 luni).

13. Supraviețuirea pe întreg lotul de 151 pacienți cu LAM în funcție de grupa de risc a fost următoarea: Media duratei de supraviețuire pentru grupa de risc favorabil

LAM-nonLAP a fost de 40,5 luni (CI 95% 29,6 și 51,4 luni). Durata mediană de supraviețuire pentru lotul studiat LAM-nonLAP a fost de 10 de luni, (CI 95% între 6 și 13 luni) pentru pacienții din grupa de risc intermediar și de 7 luni pentru pacienții cu cariotip nefavorabil, (CI 95% între <1 lună și 21 luni). Pentru lotul format din 16 pacienți cu leucemie acută promielocitară durata mediană de supraviețuire a fost de 50,7 luni, (CI 95% între 45,5 și 55,9 luni). Diferența este semnificativ statistic la testul log Rank **p = 0, 000**.

13. Supraviețuirea fără evenimente (EFS) depinde semnificativ statistic în funcție de grupa de risc (**p=0,03**). Pacienții încadrați în grupa de risc favorabil au avut media duratei de supraviețuire fără evenimente de 33,5 luni. Durata mediană de supraviețuire fără evenimente pentru pacienții din grupa de risc intermediar a fost de 8,8 luni (CI 95% între 5,7 și 11,9 luni), iar pentru pacienții din grupa de risc nefavorabil a fost de 5,2 luni (CI 95% între 2,7 și 7,7 luni).
14. Toți pacienții cu leucemie acută promielocitară au atins remisiune completă morfologică și moleculară și au fost urmăriți prin BMR. Boala minimă reziduală reprezintă “standard of care” în leucemia acută promielocitară.
15. Îmbunătățirea tratamentului și a tratamentului suportiv a scăzut mortalitatea legată de tratament (TRM) cu chimioterapie și allo-TCSH. Avansuri în stratificarea riscului și în dezvoltarea de ghiduri bazate pe evidența pentru alegerea tratamentului postremisiune sunt responsabile de îmbunătățirea evoluției.
16. Fiindcă studiile genetice sunt fundamentale în stratificarea riscului și determinarea tratamentului potrivit post remisiune la acești pacienți, examinarea pentru diagnostic a măduvei osoase la pacienți suspecți a avea LAM trebuie să includă studii citogenetice și moleculare.
17. Pe baza acestor date, allo-TCSH a fost larg și rezonabil recomandat pentru pacienții din grupul de risc intermediar și grupul de risc citogenetic nefavorabil fiind singura opțiune curativă.
18. Tipul de transplant a fost decis în funcție de scorul EBMT, caracteristicile pacientului și tipul de donator HLA compatibil disponibil.
19. Diagnosticul de LAM este un diagnostic complex ce necesită pe lângă examenul morfologic al frotiurilor de sânge periferic și de măduvă osoasă, imunofenotiparea folosind flow citometria multiparametrică, teste de citogenetică pentru identificarea

anomaliilor cromozomiale și teste de biologie moleculară cu o importanță deosebită în special la pacienții cu LAM cu cariotip normal. Încadrarea pacienților cu LAM în grupa de risc este obligatorie în vederea stabilirii conduitei terapeutice. Allo-TCSH este singura opțiune terapeutică cu intenție curativă.

În concluzie, acest studiu folosește experiența unui centru cu mare experiență în diagnosticul și tratamentul leucemiei acute mieloblastică și deschide calea spre cercetări ulterioare într-un domeniu care cunoaște o dezvoltare spectaculoasă în biologia moleculară, dar în care este permanent nevoie de studii medicale în vederea terapilor țintite în leucemia acută mieloblastică.

* * *

Bibliografie selectivă:

Arber, D. A., Orazi, A., et al. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391-405.

Emadi, A. & Baer, M.R., 2014. Acute myeloid leukemia in adults. In Greer, J.P., Arber, D.A., eds, *Wintrobe's Clinical Hematology*. 13th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 3602–3642.

Dohner, H., Estey, E. H., et al. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net *Blood*, 115(3), 453-74.

Dombret, H., and Gardin, C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(1):53-61.

Grimwade, D., Hills, R. K., et al. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, 116(3), 354-65.

Khalidi, H. S., Medeiros, L. J., et al. (1998). The immunophenotype of adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, French-American-British classification, and karyotypic abnormalities. *Am J Clin Pathol*, 109(2), 211-220.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Acute myeloid Leukemia: Version 2.2016

Pfirschmann, M., Ehninger, G., et al. (2012). Prediction of post-remission survival in acute myeloid leukaemia: a post-hoc analysis of the AML96 trial. *Lancet Oncol*, 13(2), 207-214.

SEER <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>

Vardiman, J. W., Brunning, A. D., et al. (2008). Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms, Swerdlow S, Campos E, Lee Harris NL, Jaffe ES, Stefano PA, Stein H, et al, editors. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues: Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2008:19-30

Vardiman, J. W., Harris, N. L., et al. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), 2292-302.

Vardiman, J. W., Thiele, J., et al. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937-51.

Vardiman, J. W. (2010). The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact*, 184(1-2), 16-20.

