

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ GENERALĂ- PEDIATRIE

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător științific: Prof. Dr. ARION CONSTANTIN-VIRGILIU

Prof Dr ORAȘEANU DUMITRU

Doctorand: ȘERBĂNICĂ ANDREEA NICOLETA

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

SCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ GENERALA-PEDIATRIE

***EVALUAREA BOLII MINIME REZIDUALE ÎN CEEA CE
PRIVEȘTE ATITUDINEA TERAPEUTICĂ ȘI PROGNOSTICUL LA
COPIII CU LEUCEMIE ACUTĂ LIMFOBLASTICĂ***

Conducător științific: Prof. Dr. ARION CONSTANTIN

Prof. Dr. Dumitru Orașeanu

Doctorand: SERBĂNICĂ ANDREEA NICOLETA

BUCUREȘTI 2020

CUPRINS

INTRODUCERE.....	Error! Bookmark not defined.
1.1. DEFINIȚIE.....	Error! Bookmark not defined.
1.2. EPIDEMIOLOGIE.....	Error! Bookmark not defined.
1.3. ETIOLOGIE	Error! Bookmark not defined.
1.4. DIAGNOSTIC.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.1. Diagnostic clinic	Error! Bookmark not defined.
1.4.2. Diagnosticul paraclinic:.....	Error! Bookmark not defined.
1.5. Caracterizarea formelor de LAL.....	Error! Bookmark not defined.
1.5.1. Clasificarea morfologică.....	Error! Bookmark not defined.
1.5.2. Clasificarea imunofenotipica	Error! Bookmark not defined.
1.5.3. Clasificare genetică	Error! Bookmark not defined.
1.6. TRATAMENT.....	Error! Bookmark not defined.
1.6.1. Scurt istoric.....	Error! Bookmark not defined.
1.6.2. Actualitate terapeutică:	Error! Bookmark not defined.
1.6.3 Parametrii de incadrare grupe de risc.	Error! Bookmark not defined.
1.6.4 Etapele tratamentului standard.....	Error! Bookmark not defined.
1.6.5 Terapii specifice:	Error! Bookmark not defined.
1.6.6 Recăderea.....	Error! Bookmark not defined.
1.6.7. Transplantul de celule stem hematopoietice.....	Error! Bookmark not defined.
1.7. COMPLICAȚII.....	Error! Bookmark not defined.
1.7.1. Complicații ale caror cauză generatoare este patologia malignă	Error! Bookmark not defined.
1.7.2. Complicații legate de tratament.....	Error! Bookmark not defined.
1.8 BOALA MINIMA REZIDUALĂ (BMR).....	Error! Bookmark not defined.
1.8.1. DEFINIȚIE.....	Error! Bookmark not defined.
1.8.2. SCURT ISTORIC	Error! Bookmark not defined.
1.8.3. METODELE DE DETERMINARE BMR	Error! Bookmark not defined.
1.8.3.1 Metode clasice.....	Error! Bookmark not defined.
1.8.3.2. Metode inovative	Error! Bookmark not defined.
1.8.3.2.1 NGF (next generation flow).....	Error! Bookmark not defined.
1.8.3.2.2. ASO-PCR & ddPCR.....	Error! Bookmark not defined.
1.8.3.2.3. NGS (next generation sequencing)	Error! Bookmark not defined.

1.8. IMUNOFENOTIPAREA PRIN FLOW-CITOMETRIE (FCM)	Error! Bookmark not defined.
1.9.1 Scurt istoric	Error! Bookmark not defined.
1.9.2. Principiul FCM	Error! Bookmark not defined.
1.9.3 Utilizarea FCM în medicină: Hematologie	Error! Bookmark not defined.
1.9.4 IMUNOFENOTIPAREA LAL PRIN FLOW-CITOMETRIE (FCM)	Error! Bookmark not defined.
1.9.5. FCM utilizare în LAL-B :	Error! Bookmark not defined.
1.9.6. Situații provocatoare pentru FCM: Diagnosticul și monitorizarea LAL-B	Error! Bookmark not defined.
1.9.7. FCM utilizare LAL-T	Error! Bookmark not defined.
1.9.9. FCM în diagnosticul LAL cu afectare SNC- evaluare LCR	Error! Bookmark not defined.
1.9.10. Standardizarea metodei FCM în monitorizarea pacenților cu LAL	Error! Bookmark not defined.
1.9.11 Sensibilitatea metodei FCM	Error! Bookmark not defined.
1.10. Tehnica Polymerase chain reaction (PCR)	Error! Bookmark not defined.
1.10.1 Scurt istoric	Error! Bookmark not defined.
1.10.2. Principiul tehnicii	Error! Bookmark not defined.
1.10.3. Tipuri de reacție PCR	Error! Bookmark not defined.
1.10.3.1. qPCR	Error! Bookmark not defined.
1.10.3.2. Nested PCR	Error! Bookmark not defined.
1.10.3.3. Multiplex-PCR (M-PCR)	Error! Bookmark not defined.
1.10.3.4. RT-PCR (Real time PCR)	Error! Bookmark not defined.
1.10.4. Metoda FISH	Error! Bookmark not defined.
1.10.3.5. RT-qPCR	Error! Bookmark not defined.
1.10.3.6. ASO-PCR	Error! Bookmark not defined.
1.10.5. Standardizarea determinării BMR prin metode ce implică tehnica PCR	Error! Bookmark not defined.
1.10.6. Sensibilitatea metodei RT-qPCR	Error! Bookmark not defined.
1.10.7. METODE INOVATIVE BMR	Error! Bookmark not defined.
1.10.7.1 ddPCR	Error! Bookmark not defined.
1.11 CONCLUZII BMR:	Error! Bookmark not defined.
2.PARTEA SPECIALA	Error! Bookmark not defined.
2.1. SCOPUL	Error! Bookmark not defined.

2.2. OBIECTIVELE PROPUSE	Error! Bookmark not defined.
2.3. Materiale și Metode	Error! Bookmark not defined.
2.4. METODOLOGIA DE LUCRU	Error! Bookmark not defined.
2.5. REZULTATE.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.1. Dinamica de inrolare a subiecților	Error! Bookmark not defined.
2.5.2 Principalele forme de diagnostic LAL-B / LAL-T	Error! Bookmark not defined.
2.5.3. CARACTERISTICI DEMOGRAFICE :	Error! Bookmark not defined.
2.5.3.1 Descrierea lotului în funcție de sexul pacienților incluși.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.3.2 Descrierea lotului în funcție de mediul de proveniență.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.3.3 Descrierea lotului în funcție de vârstă	Error! Bookmark not defined.
2.5.4 CARACTERIZAREA DATELOR PARACLINICE EVIDENȚIATE LA DIAGNOSTIC...	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.1 Analiza hemogramei din ziua diagnosticului.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.1.1 Distribuția valorilor leucocitare în raport cu alți parametrii	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.1.2 Distribuția valorilor hemoglobinei în raport cu alți parametrii	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.1.3 Distribuția valorilor trombocitare în raport cu alți parametrii..	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.2 Analiza Frotiului de sange periferic în ziua diagnosticului.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.3 CARACTERIZAREA ASPIRATULUI MEDULAR DIN ZIUA DIAGNOSTICARII.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.3.1 Analiza examenului citomorfologic	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.3.2 Analiza Imunofenotipării.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.3.3 Analiza examenului citogenetic.....	Error! Bookmark not defined.
2.5.4.3.4 Analiza de Biologie Moleculară	Error! Bookmark not defined.
2.5.5 MONITORIZAREA PACIENTILOR	Error! Bookmark not defined.
2.5.5.1 Evaluarea răspunsului la prednison	Error! Bookmark not defined.
2.5.6 ÎMPĂRȚIREA SUBIECȚILOR PE GRUPE DE RISC	Error! Bookmark not defined.
2.5.5.2 Monitorizarea subiecților prin analiza examenului citomorfologic	Error! Bookmark not defined.
2.5.5.3 Monitorizarea subiecților prin BMR efectuată prin IFT	Error! Bookmark not defined.
2.5.5.4 Monitorizarea subiecților prin BMR efectuată prin BM	Error! Bookmark not defined.
2.5.5.4.1 Analiza examenului MO z15,33,78 în raport cu BMR-BMz15,33,78	Error! Bookmark not defined.
2.5.5.4.2 Analiza între bolile minime reziduale BMR-IFT de z15,33,78 și BMR-BM de z 15,33,78	Error! Bookmark not defined.

2.5.6 EVALUAREA COHORTEI d.p.d.v a REMISIUNII COMPLETE (RC) Error! Bookmark not defined.

2.5.7 EVALUAREA COHORTEI d.p.d.v a RECADERII bolii hematologice Error! Bookmark not defined.

2.5.8 EVALUAREA COHORTEI d.p.d.v a SUPRAVIETUIRII subiectilor inclusi in studiu Error! Bookmark not defined.

2.5.9 EVALUAREA COHORTEI d.p.d.v a SUPRAVIETUIRII fără EVENIMENTEError! Bookmark not defined.

2.5.10 EVALUAREA COHORTEI d.p.d.v a MORTALITĂȚII GLOBALE ... Error! Bookmark not defined.

2.5.11 EVALUAREA COHORTEI d.p.d.v a SUPRAVIETUIRII GLOBALE. Error! Bookmark not defined.

2.6 DISCUȚII Error! Bookmark not defined.

2.7 CONCLUZII FINALE Error! Bookmark not defined.

INTRODUCERE

Leucemia acută limfoblastică deși este o afecțiune rară în cadrul populației pediatrice, ea reprezintă cea mai frecventă malignitate întâlnită la copii. Rafinarea continuă a metodelor de diagnostic, evaluare și tratament au crescut mult supraviețuirea și rata de vindecare. Dezavantajul major al patologiei îl reprezintă recăderea, cu aceeași clonă sau cu o clonă diferită, de aceea monitorizarea atentă a acestor pacienți ce au obținut o remisiune completă reprezintă provocarea de bază în obținerea curabilității acestei afecțiuni pediatrice. Evaluarea uzuală clasică presupunea doar examinarea citomorfologică a aspiratului medular. Limitările metodei, mai ales cu privire la sensibilitatea de detecție, cu descoperirea tardivă a recăderilor, când măduva osoasă era deja plină de celule maligne, a condus la o supraviețuire scăzută pacienților cu recădere. Odată cu introducerea metodelor cu sensibilitate crescută: imunofenotipare, polymerase chain reaction (PCR) în diagnosticul și monitorizarea acestor copii a crescut atât rata de supraviețuire generală cât și cea post-recădere. Identificarea precoce a recăderilor a permis intervenția rapidă cu adaptarea intensității tratamentului, obținerea unor remisiuni secundare cu oferirea alternativei terapeutice de susținere a remisiunii: transplantul de celule stem hematopoietice. Se impune deschidere spre cercetare continuă în vederea obținerii unei rate maxime de vindecare a leucemiei. Analiza genomul uman pentru identificarea anomaliilor genetice ce stau la baza patogeniei acestei afecțiuni, pentru identificarea predispoziției de a dezvolta malignități în încercarea elucidării acelor cazuri ce dezvoltă clone derivate pe parcursul chimioterapiei, utilă și

pentru evaluarea răspunsului la tratament folosind ca target chiar anomalia de bază, reprezintă viitorul în ceea ce privește BMR. Clinica IC Fundeni depune efort susținut și continuu în adaptarea la noile metode de diagnostic, monitorizare și tratament, în abordarea patologiei similar centrelor hematologice pediatrice de referință.

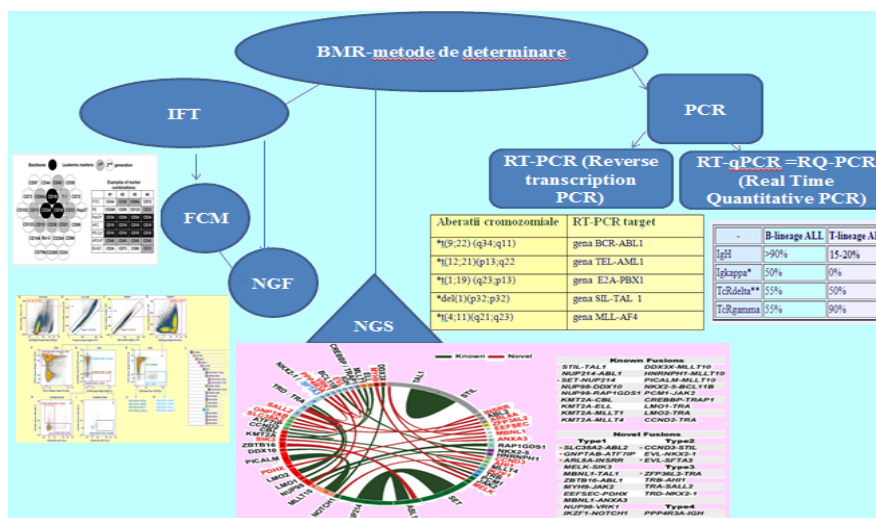
Eforturile continue ale unei echipe multidisciplinare, cu scopul raportării rezultatelor, similar centrelor hematologice de referință a fost obiectivul clinicii de Pediatrie, IC Fundeni. Astfel încă dinaintea anului 2014 s-au aplicat protocoalele de chimioterapie generate de Asociația Italiană de Hematologie și Oncologie pediatrică - Berlin-Frankfurt-Münster (AIEOP-BFM). În încercarea standardizării monitorizării prin boala minimă reziduală (BMR), sub atenta coordonare a dlui prof.univ. dr Arion, C^{tin} și a dnei conf dr Coliță, am început studiul de față în ianuarie 2014. Obiectivul principal, propus și atins, subliniază contribuția personală ce denotă din faptul că am efectuat primul studiu prospectiv, de acest tip pe teritoriul României ce a evaluat valoarea prognostică a monitorizării prin BMR la copii cu LAL efectuată în zilele: 15,33,78 de tratament. Rezultatele obținute: remisiunea, recăderea, mortalitatea și supraviețuirea pe o durată de 5 ani, sunt reperele de bază ce evaluează efectele unei monitorizări standard, similar cu centrele de referință, de hematologie pediatrică. Până în anul 2014 aceasta monitorizare nu se făcea în România. Se încerca o evaluare « modestă », neomogenă și nestandardizată în zilele 33, 78 de tratament. Am urmărit atent 147 de pacienți diagnosticați complet: morfologic, imunofenotipic și genetic, evaluați în aceleași etape terapeutice, zile prestabilite (time point-uri: z15,z33,z78), prin BMR efectuată prin imunofenotipare și/sau PCR și tratați uniform, conform protocolului standard ALL-BFM-IC 2002/2009 începând din ianuarie 2014. Monitorizarea s-a încheiat în decembrie 2018 ca să includă un pas de minim 12 luni de monitorizare inclusiv la ultimii pacienți diagnosticați în decembrie 2017, când am încheiat perioada de înrolare.

Rezultatele sunt referință deoarece centrul pediatric-hematologic IC Fundeni are cea mai mare adresabilitate din România scopul propus al studiului a fost atins: toți pacienții, încă din 2016, au o monitorizare standard a BMR efectuată prin tehnici cu sensibilitate crescută, conform recomandărilor consorțiului BFM. Supraviețuirea din cadrul cohortei studiate, este în concordanță cu AIEOP-BFM 2009 și cu literatura de specialitate curentă.

Cazurile particulare prezentate în analiza cohorței, provocatoare din punct de vedere terapeutic și monitorizare, au demonstrat un bun management medical, experiența clinică și paraclinică continuă, dovadă fiind și multitudinea opțiunilor terapeutice accesate: transplant de celule stem, imunoterapie (Blinatumumab), terapie salvage, noi terapii: nelarabină, ce susțin un act medical și terapeutic de nivel înalt prezent și în România. (vezi cazuri particulare descrise la «discuții»)

Lucrarea prezentă este compusă din două părți: partea generală prezintă LAL în populația pediatrică trecând în revistă noțiunile de bază cu referire la definiție, epidemiologie, etiologie, diagnostic, clasificare, tratament, complicații, recădere cu completarea de noi noțiuni obținute din meta-analiza personală efectuată în literatura de specialitate curentă existentă publică. Lucrarea analizează metodele de monitorizare a pacienților pediatrici cu LAL, mai ales prin analiza **Bolii Minime Reziduală (BMR)**, denumire generică utilizată pentru detectarea celulelor maligne restante/ persistente în organismul unui pacient cu LA în timpul/ după tratamentul chimioterapic, la un nivel sub capacitatea de detecție a examenului citomorfologic clasic. [1] Determinarea BMR la copii cu LAL este extrem de importantă, conform studiilor actuale reprezintă factor independent de prognostic, cu valoare direct proporțională cu riscul de recădere. [3] Instrumentele utilizate pentru determinarea BMR sunt împărțite în două mari categorii: clasice, uzuale și inovative. [1-4, 5-9]

Figura nr. 1: Metodele de determinare BMR [10-14]



1. “Cele mai utilizate tehnici” pentru monitorizarea BMR la pacienții pediatrici cu LAL, rămân și în prezent așa zisele “metode clasice” BMR: IFT, RQ-PCR (identificarea „rearanjărilor clonale” ale Ig & TCR) și RT-PCR. [1-3] BMR efectuate pe parcursul acestui studiu au fost majoritatea determinate prin IFT (peste 80% din probe) și/sau prin RT-PCR.

2. Diagnosticul IFT al LAL se poate considera primul pas în monitorizarea BMR, deoarece metoda identifică de la început caracterele fenotipice ale celulei maligne, tipul și subtipul limfoblastului, utilizând markerii specifici de pe suprafață sau din interiorul celulei. Un dezavantaj al BMR-IFT, important de menționat este: căutarea blastilor bazată pe identificarea celulelor cu aceeași markeri de la debut, provocator în cazul formelor de LAL ce își schimbă fenotipul pe parcurs sau a formelor ce recad cu altă clonă decât cea inițială. Sensibilitatea actuală a metodei IFT, utilizată de rutină la scară internațională, este de 10^{-4} , max 10^{-5} . [15-18]

3. Pentru diagnosticul complet al formei de LAL se utilizează și *tehnica PCR* pentru analiza moleculară a limfoblaștilor. Se identifică rearanjările clonale genice (RQ-PCR=real time quantitative polymerase chain reaction) și/sau prezența genelor de fuziune (RT-PCR=reverse transcription PCR).

În cazul prezenței genelor de fuziune, monitorizarea BMR se efectuează prin monitorizarea transcriptului patologic BMR-RT-PCR. Avantajele majore fiind: sensibilitate crescută 10^{-5} - 10^{-6} și limitarea manevrelor invazive de puncționare a MO. [19]

4. În ceea ce privește alegerea metodei de determinare a BMR, aceasta depinde de mai mulți factori: forma de LAL, de prezența/ absența anomaliilor genetice, de cunoașterea avantajelor și dezavantajelor metodelor (sensibilitate, specificitate, cost, timp, experiență, buget etc). Cele trei metode utilizate și în prezent pe scară largă prezintă următoarele avantaje și dezavantaje conform tabelului alăturat:

Figura nr. 2 : Avantajele/Dezavantajele metodelor clasice BMR

Tehnici "Clasice" de determinare BMR	FC-conventionala	RQ-PCR (Ig&TCR,regiuni jonct= target)	RT-PCR (transcripte genice/ alte anomalii genice)
Sensibilitate	3-4culori 10^{-3} - 10^{-4} 6-8 culori 10^{-4}	10^{-4} - 10^{-5}	10^{-4} - 10^{-5}
Aplicabilitate	LAL-B >90% LAL-T >90%	LAL-B >95% LAL-T 90-95%	LAL-B 25-40% (depinde de varsta pacientului LAL-T 10-15%
Avantaie	Rapida Analiza la nivel celular/ populatie clonale Stocare de date facila Informatii despre toate celulele din "proba"	Sensibila Standardizata	Relativ simpla Sensibila Aplicabila la un subgrup de LAL
Deiavantaie	Sensibilitate variabila, limitata de markeri celulari similari de pe suprafata/ din interiorul celulelor normale/vs maligne Nestandardizata	Rezultatele dureaza Scumpa Necesita experienta si cunoastere indelungata	Standardizare limitata Aplicabilitate limitata Risc contaminare proba

Utilizând aceste metode s-a demonstrat că: riscul de recădere a unui pacient cu LAL, raportat la sensibilitatea metodei de determinare BMR, este direct proporțional cu nivelul acesteia, (valoarea de 10^{-3} fiind pragul limită minim admis pentru un rezultat fiabil) motiv pentru care s-a impus dezvoltarea continuă de noi metode BMR, mai sensibile, mai rapide și cat mai accesibile. [20]

5. BMR din sânge periferic (SP) sau din aspirat medular MO?

Acest aspect dezbătut intens a condus la cunoașterea scenariului diferit între proliferările clonale de linie B sau T. Indiferent de tehnica clasică utilizată nivelul BMR din SP în LAL-B, tinde să fie mai scăzut cu $1\log$ până la $3\log$ comparativ cu cel din MO. În LAL-T s-a demonstrat că SP este o sursă fiabilă pentru monitorizarea BMR, atât la populația pediatrică cât și la adult, nivelul BMR în SP fiind cu până la $1\log$ mai crescut comparativ cu cel din MO. Cu toate acestea studiile demonstrează că este de preferat că BMR atât în LAL-B cât și în LAL-T să fie determinată din MO. [21]

6. BMR-LAL a devenit un marker de anticipare prognostică, puternic și independent, atât în formele de LAL pediatrie cât și la adulți deoarece recoltat în timpul/după tratamentul chimioterapic, în evaluările pre/post transplant de celule stem hematopoietice are sensuri prognostice diferite corelându-se cu contextul clinic. [22] Pacienții cu BMR detectabilă au risc crescut de recidivă după chimioterapia convențională. Riscul variază cu multiplii factori printre

care și momentul evaluării BMR, sensibilitatea metodei de determinare a BMR și caracteristicile clinice și paraclinice complementare ale pacientului.

7. Studiul de față a urmărit BMR la pacienții pediatrici cu LAL, conform protocolului standard ALL-BFM 2002, respectiv 2009.

- Prima evaluare prin BMR, s-a efectuat în ziua 15 prin IFT. Nivelul detectat a încadrat pacienții în grupa de risc astfel:

BMR-IFT z15 < 0.1% => SRG

BMR-IFT z15 0.1-10%=>IRG

BMR-IFT z15 >10%=>HRG

BMR-IFT z33 > 0.01% => HRG

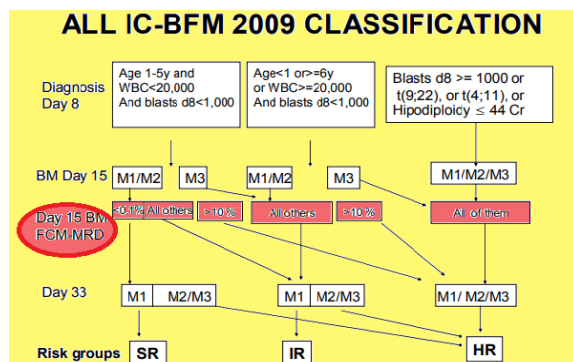
- A doua metodă de determinare BMR-PCR presupune, conform protocolului standard, evaluări inițiale în zilele: 33,78.

BMR-RT-PCR: TEL-AML1+ => SRG;

BMR-RT-PCR: BCR-ABL1+ => HRG

- Clasificarea pacienților în grupa de risc în funcție de BMR, conform protocolului ALL- BFM 2002/ 2009:

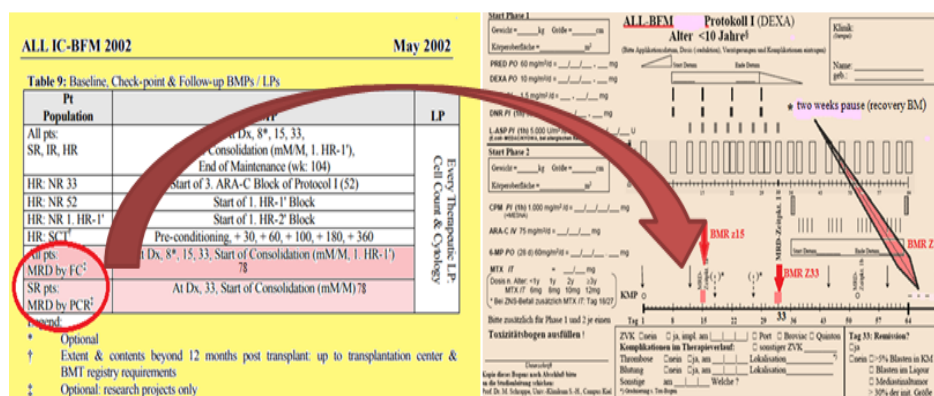
Figura nr. 3 Clasificarea conform ALL-BFM-2009



8. Evaluarea răspunsului la tratament, prin BMR, în anumite momente prestabilite, conform protocolului standard a condus la adaptarea atitudinii terapeutice următoare. BMR dictează

escaladarea/ minimalizarea intensității chimioterapiei.

Figura nr.4: Efectuarea BMR conform protocolul ALL-BFM2002-2009:



9. Majoritatea anomaliilor cromozomiale au valoare prognostică, de aceea detectarea lor trebuie efectuată în toate cazurile încă de la diagnostic, astfel încât fiecare pacient să poată fi monitorizat pe parcursul bolii prin BMR-RT-PCR utilizând markerul predefinit.

- Rezultatele BMR-PCR se definesc d.p.d.v calitativ ca fiind: +/- și/ sau prezența/ absența produsului de fuziune.

- Evaluarea răspunsului terapeutic vs nivelul BMR

IFT: BMR-IFT z15 => Răspuns terapeutic foarte bun < 0.1%

Răspuns terapeutic bun 0.1-10%

Răspuns terapeutic slab >10%

Eșec terapeutic BMR IFT z33 > 0.01%

RT-PCR: BMR-PCR z33,z78 => negativ/pozitiv

10. Nivelul BMR definește remisiunea la nivel molecular.

Remisiunea completă conform ALL-BFM 2002: Tabel nr. 1

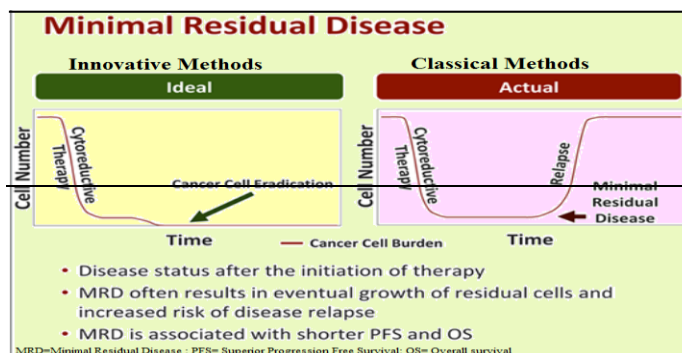
Remisiune completă 1= RC1	Clinic și Paraclinic - Criterii
Clinica	Fără semne de infiltrare blastică
Hematologica	M1, exam morfologic < 5% blaști (MO cu celularitate scăzută/ normală și cu semne de refacere a hematopoiezei

La nivel molecular	BMR-IFT z15 < 0.1% BMR-IFT z33 < 0.0% BMR-RT-PCR = fără gene de fuziune detectate
SNC	LCR z33- fără blaști
Remisiune completă 2= RC2	BMR + după o RC1= Recădere

11. Conform studiilor există o corelație semnificativă între nivelul BMR și riscul de recădere ulterioară. [24, 25] Rezultatele multiplelor studii focusate pe nivelul BMR în monitorizarea pacienților pediatrici cu LAL sunt în concordanță cu cele obținute și de studiul Italian AIEOP. Acesta a inclus 830 copii cu LAL, iar nivelul BMR din ziua 15 de sub 0.1 % (valoare întâlnită la 42% dintre pacienții incluși în studiu) a fost corelat cu un risc mic de recădere la 5 ani de 7,5% comparativ cu cei cu nivelul BMR din ziua 15 de peste 10%, încadrați în grupul HRG, unde recăderea a fost întâlnită în 47,2% din cazuri. [26]

Utilizarea BMR în identificarea recăderilor moleculare, ce preced cu câteva luni recăderea hematologică este extrem de importantă în vederea intervenției terapeutice mai rapide pentru a crește șansa obținerii unei a doua remisiuni (RC2) și a creșterii supraviețuirii. [27]

Figura nr.5: Nivel de detectie BMR raportat la metoda de determinare [28]



Creșterea sensibilității reprezintă provocarea continuă a metodelor de determinare a BMR. Metodele inovative ca: NGF, ddPCR și NGS au potențial ridicat deoarece depășesc limitările metodelor standard. [29]

12. BMR și noile terapii

În martie 2018, FDA aprobă prima imunoterapie pentru pacienții adulți cu LAL-B aflați în remisiune, dar cu BMR detectabil. Blinatumomab-ul a indus o rată de răspuns complet, în peste 80% din cazurile cu LAL-B, RC, BMR+. Deoarece pacienții cu nivel detectabil de BMR sunt mai susceptibili la recădere această opțiune terapeutică nouă elimină cantități mici de celule leucemice reziduale susținând mai mult timp remisia. [31]

13. Studiile multicentrice susțin rolul BMR în evaluarea răspunsului la tratament cu încadrarea pe grupe de risc a pacienților hematologici cu individualizarea chimioterapiei/ grupa de risc; monitorizarea clonei prin BMR pentru identificarea recăderilor și/sau evaluarea pre și post SCT (stem cells transplantation) cu impact major asupra creșterii ratelor de supraviețuire a acestor pacienți. [30, 32]

14. BMR-NGS probabil va deveni standardul de monitorizare al LAL deoarece tehnica este extrem de sensibilă și identifică multiple caractere ale clonei/ clonelor maligne (Ig/TCR, rearanjari genice) prin secvențierea întregului genom al pacientului. Metoda a generat noi ipoteze și în ceea ce privește patogenеза LAL și a condus la aplicarea, în cazuri selecționate, de noi terapii individualizate. [4]

15. Cercetarea bolii remanente în timpul/ după tratament rămâne un domeniu activ continuu.

„BMR va reprezenta principalul instrument în viitor pentru a proiecta algoritmi de tratament inovator, inclusiv strategii imunoterapeutice și limitarea chimioterapiei și/sau a transplantului de SCT, cu scopul final de a vindeca mai mulți pacienți cu LAL”. [22]

Figura nr. 6 : Metodele curente de determinare a BMR [33]

Metoda de determinare BMR	Aplicabilitate	Sensibilitate	Avantaje	Dezavantaje
FCM (Imunofenotipare celule maligne > 8 culori)	>90%	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶	-Sensibilitate relativ crescuta -Disponibilitate larga -Rapida (3-4h) -Obtinere informatii la nivel celular -Cuantificare absoluta -Aplicabilitate crescuta	-Dificil de standardizat -Necesita experienta -Schimbarea fenotipului (Expresia variabila a antigenelor poate conduce la rezultate fals negative) -Sensibilitate medie sub 8 culori -Timp indelungat necesar
RQ-PCR (Rearanjari Ig/TRC)	>90%	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶	-Sensibilitate crescuta -Aplicabilitate crescuta -Metoda standardizata	-Necesita experienta in domeniu -Timp crescut -Target instabil
RT-PCR (Gene de fuziune)	30-40%	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶	-Sensibilitate crescuta -Metoda rapida si usor de folosit -Target bine stabilit	-Risc de contaminare "incrucisata" -Aplicabilitate limitata
ASO PCR		10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶	-Sensibilitate crescuta	-consum mare de timp necesar desing-ului de gruduri specifice/pacient -necesita proba viabila: ADN calitativ/cantitativ in limite
dPCR	>90%		-Sensibilitate crescuta -Cuantificare absoluta -Evita "inhibitorii PCR" pe parcursul segmentarii tintei	-Fara standardizare -Nu identifica "alte variante" deoarece este dependenta de design-ul alelelor specifice
NGS	>95%	>10 ⁻⁶	-Foarte sensibila -Aplicabilitate crescuta -Metoda versatila -Nu necesita primeri specifici/pacient -Identifica oligoclonalitate	-Lipsa standardizarii -Scumpa -Necesita experienta crescuta in domeniul bioinformaticii -Limitata la cateva laboratoare -Timp indelungat Validare in curs

A doua parte a lucrării este partea specială, studiul personal, ce cuprinde: scopul, criteriile de includere, excludere și de discontinuitate, metodologia de înrolare a subiecților și de calcul și analiză a datelor, rezultatele finale, discuțiile și concluziile.

Obiectivul principal *propus*:

Evaloarea valorii prognostice a monitorizarii standard a subiecților pediatrici cu LAL prin BMR efectuată cu sensibilitate crescută în zile prestabilite de tratament, zilele: 15,33,78 în raport cu remisiunea, recaderea, mortalitatea și supraviețuirea la 5 ani într-o cohortă reprezentativă tratată uniform

Obiectivele secundare propuse au fost următoarele:

- Descrierea caracterelor epidemiologice și hematologice în rândul copiilor diagnosticați cu LAL în clinica IC Fundeni
- Analiza acestor caractere și corelațiile existente între ele în ceea ce privește prognosticul și atitudinea terapeutică
- Identificarea și analiza particularității lotului studiat
- Compararea rezultatelor obținute cu date din literatură de specialitate

Protocolul de înrolare a pacienților a presupus următoarele **criterii de includere**:

- Copii diagnosticați cu LAL în cadrul clinicii IC Fundeni în perioada menționată, conform fișei de diagnostic pozitiv *****
- Copii cu vârstă peste 1 an și sub 18 ani

- Copii cu LAL tratați conform protocolului ALL-BFM 2002
- Monitorizare prin examen citomorfologic al MO și prin BMR (IFT=FCM și/ sau BM) până la finalul studiului, decembrie 2018

Toți pacienții incluși în studiu au îndeplinit toate aceste criterii, iar părinții/ tutorele legal al fiecărui copil (în funcție de caz) și-au exprimat acordul în scris semnând consimțământul de informare. Monitorizarea prin BMR reprezintă monitorizarea actuală, obligatorie, a tuturor pacienților diagnosticați cu LAL conform protoalelor ALL-BFM 2002/2009.

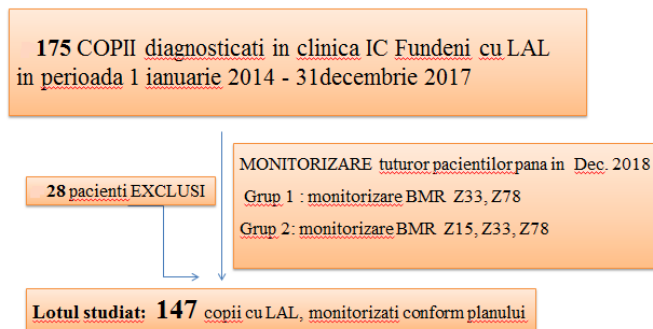
Criteriile de excludere stabilite au fost următoarele:

- Copii cu LAL cu vârstă sub 1 an, deoarece au urmat alt protocol de chimioterapie. (ALL-IC-BFM-INTERFANT)
- Copii cu diagnostic de: LAL cu celula B matur (Burkitt like), LAL bifenotipică, LAL bilineală
- Copii cu LAL a căror monitorizare nu a fost efectuată strict în time point-urile prestabilite
- Pacienții a căror monitorizare a presupus doar examen citomorfologic al MO, fără BMR (BMR-IFT=BMR-FCM și/ sau BMR-BM)
- Copii decedați/ emigrați înainte de prima evaluare BMR (înainte de z15 sau z33)
- Orice pacient inclus în studiu ce a îndeplinit minim un criteriu din cele mai sus menționate a fost exclus.

Criterii de discontinuare:

- Pacienții pediatrici cu LAL în remisiune (RC1) ce au prezentat recădere, deoarece au primit alt tip de tratament chimioterapic.
- Copii cu LAL cu evoluție nefavorabilă sub tratamentul chimioterapic standard, LAL refractar, la care s-a impus escaladarea la un tratament chimioterapic mai agresiv.
- Copii cu LAL la care s-a impus efectuarea procedurii de transplant de celule stem hematopoietice.
- Copii cu LAL a căror parinți au optat pentru continuarea tratamentului în altă clinică din țara/ din străinătate.
- Copii cu LAL ce au împlinit vârsta de 18 ani pe parcursul tratamentului și au fost transferați în serviciul de hematologie adulți.

Figura nr 7 : Dinamica de inrolare a subiecților



METODOLOGIE:

- Includerea pacienților pediatrici diagnosticați cu LAL în perioada ianuarie 2014- decembrie 2017 și monitorizați prin BMR până în decembrie 2018
- Descrierea caracterelor epidemiologice ale cohortei
- Stabilirea diagnosticului complet și complex al formei de LAL parcurgând toate cele trei etape (morfologic, imunofenotipic și genetic). Analiza acestor date în detaliu
- Analiza caracterelor morfologice (L1,L2), imunofenotipice (B: preB, proB, Bcom / T: preT, proT, Tcortical) și genetice (cariotip, anomalii de gene)
- Evaluare FSP, efectuată în ziua 8 de tratament = Prima monitorizare a răspunsului terapeutic (PGR / PPR)
- Includerea pacienților în grupe de risc conform criteriilor standard protocolului ALL-BFM 2002 (Nr Leucocite, Z8, MO, genetica) alături de BMR_{ALL-BFM2009}
- Evaluare prin examen morfologic al MO (z15,33,78) cât și prin BMR (z15,33,78) în aceleași puncte ale tratamentului conform protocolului de chimioterapie.
- Evaluare BMR prin IFT și/ sau PCR: Z15, Z33, Z78
- Calcularea ratei de remisiune, de supraviețuire fără evenimente (Event Free Survival =EFS), de supraviețuire globală (Overall Survival=OS) etc.
- Identificarea pacienților cu recădere, calcularea ratei de recădere și compararea rezultatelor cu rezultatele studiilor de specialitate.
- Calcularea ratei de mortalitate altă decât cea dată de progresia bolii (TRM), mortalitate dată de progresia bolii.

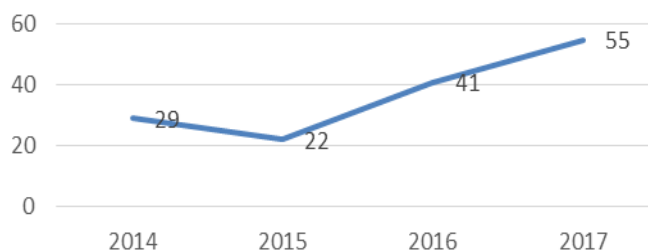
- Compararea tuturor rezultatelor obținute cu studiile internaționale care au utilizat același protocol de chimioterapie ALL-BFM 2002- 2009 și/ sau cu alte studii din literatura de specialitate.
- Stabilirea importanței unei monitorizării standardizate prin BMR la pacienții pediatrici diagnosticați cu LAL. Limitarea procedurii invazive de recoltare a MO vs BMR-BM (Boala minima reziduală - prin biologie moleculara) la eșantionul selecționat.
- Discuții&Concluzii

Fișa pacientului pediatric cu diagnostic de LAL, inclus în studiu- vezi anexa 2

REZULTATE și DISCUȚII:

Pe parcursul studiului s-au înrolat 147 pacienți în număr progresiv crescând începând cu ianuarie 2014 și până în decembrie 2017.

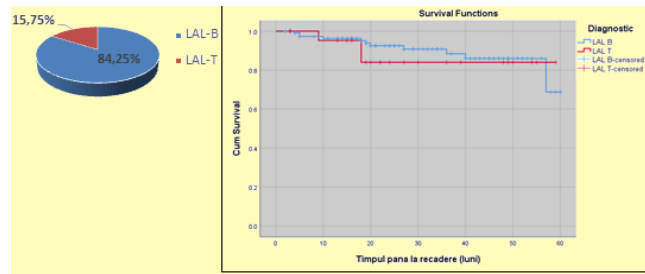
Figura nr 8: Dinamica lotului



În România Centru de Hematologie Pediatrică IC Fundeni are cea mai mare adresabilitate, astfel ca rezultatele studiului devin referință la nivel național.

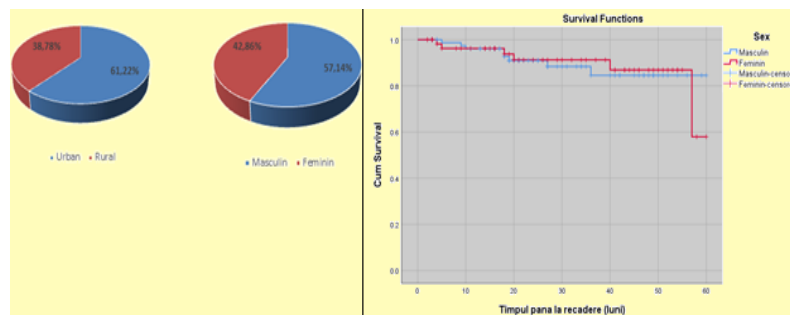
Rezultatele obținute au fost în concordanță cu datele din literatura de specialitate la care fac referire prin notele bibliografice, astfel: cea mai frecventă formă de diagnostic de LAL la copii incluși în studiul prezent este LAL-B, 84,25% (n=124) din cazuri. [36] LAL-T fiind de 5 ori mai rară (15,75%, n=23). [37] Conform OMS 2017 peste 80-85% dintre cazurile de LAL sunt cele cu precursori B și 10-15% cele cu fenotip T rezultatele obținute în urma analizei cohortei studiate fiind similare. [36]

Figura nr 9: Distribuția tipului de diagnostic; EFS-ul raportat la tipul de diagnostic



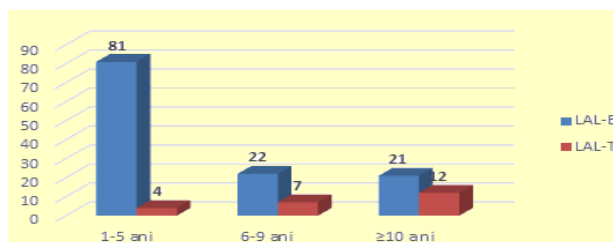
A predominat LAL la subiecții pediatrici de sex masculin, proveniți din mediul urban [39]; cu precădere la formele de LAL-T cu o corelație semnificativă statistic, între distribuția tipului de LAL și sexul subiecților ($p = .03$).

Figura nr 10: Distribuția mediului de proveniență și a sexului subiecților; EFS-ul raportat la sexul subiecților



Intervalul de vârstă cu frecvență cea mai mare în cadrul cohortei a fost 1.5-2.5 ani, iar raportat la tipul de diagnostic: LAL-B a predominant în intervalul de vârstă 1-5 ani (81/124), iar LAL-T ($n=12/23$) incidență mai mare la subiecții cu vârstă peste 10 ani similar cu literatura. [40] SEER Cancer statistics review & Children with cancer UK citează același interval de vârstă predominant, 2-3 ani, pentru diagnosticul de LAL la copii. [41, 42]

Figura 11: Distribuția tipului de diagnostic în raport cu categoriile de vârstă stabilite



Conform WHO 2017, peste 75% dintre cazurile cu LAL-B sunt la copii cu vârstă sub 6 ani. [36] Corelațiile semnificativ statistic între categoriile de vârstă și tipul de LAL ($p = .00$); și categoriile de vârstă și mediul de proveniență ($p = .04$) susțin datele de mai sus.

Descrierea cohorței studiate d.p.d.v al *caracteristicilor hematologice* reprezintă prima etapă în diagnosticul LAL, conform protocolului ALL-BFM2002/2009. Datele obținute în urma analizei HLG sunt în concordanță cu studiile recente cum relevă și studiul efectuat de José Carlos Jaime-Pérez & co, publicat în 2018 cu titlul ”Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center”. [43]

Analizând FSP în z0 am observat că rezultatul cu 0% blaști în sângele periferic a fost prezent în 8.84% ($n=13$) din cazuri, ceea ce atrage atenția și demonstrează că lipsa acestora pe FSP nu exclude un diagnostic de LAL, conform literaturii de specialitate [44]; cum nici restul valorilor hematologice normale nu exclud un diagnostic de LAL. Important de remarcat deoarece se poate întârzia diagnosticul de LAL, impunându-se examinarea aspiratului medular, fără întârziere.

b) *Diagnosticul* complet și complex al formelor de LAL din clinica este în concordanță cu etapele de diagnostic conform protocolului standard aplicat cohorței ALL-BFM2002/2009 și cu sablonul internațional generat de clasificările limfoblastilor date de WHO2017. Acestea presupun diagnostic morfologic, imunofenotipic și genetic. [34-36]

Diagnosticul morfologic a identificat cele trei tipuri, conform clasificării FAB a limfoblastilor (L1,L2,L3). [45] S-a exclus din cohorta pacientul cu LAL- L3 deoarece conform clasificării WHO, LAL-L3 este încadrat ca și entitate distinctă, Burkitt Leukemia presupunând alt regim chimioterapic. [46] Cel mai frecvent tip morfologic, asociat și cu un prognostic favorabil este limfoblastul tip L1. Rezultatul cohorței: L1 întâlnit în 95,24% ($n=140$) din cazuri, fiind superior

celui citat de literatura de specialitate: LAL-L1 peste 85% din cazuri, iar pentru tipul L2 rezultat inferior 4,08% (n=6) vs 14%. [46, 47]

Diagnosticul imunofenotipic a presupus recoltare de aspirat medular și analizare prin FCM cu aplicarea „protocolului ALOT-ul” conform Euroflow & ALL-BFM 2002/2009. [34, 35, 49]

Figura nr 12: „Protocolul ALOT-ul” [34, 35, 49]

TABLE 1. Single tube EuroFlow screening combinations for acute leukemias (ALOT)*							
Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
cyCD3	CD45	cyMPO	cyCD79a	CD34	CD19	CD7	smCD3

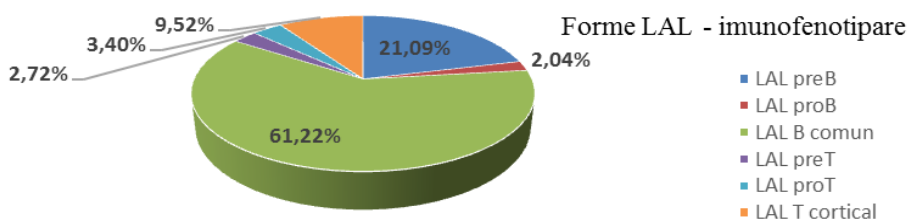
* Further information about the markers and the availability of hybridoma clones is summarized in Appendix A. Backbone markers are indicated in bold; cy= cytoplasmic; sm= surface membrane.

© ESLHO-EuroFlow™: The EuroFlow™ antibody panels are property of the EuroFlow Consortium and can not be reproduced or published without prior written permission by the EuroFlow coordinator (www.euroflow.org)

4/18

S-au identificat subclasele imunofenotipice de limfoblaști, conform WHO 2017, și s-a stabilit următoarele rezultate:

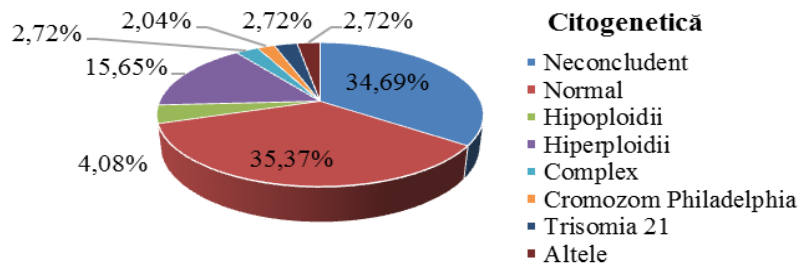
Figura nr 13: Distribuția tipurilor și subtipurilor identificate în cohorta



Valorile sunt asemănătoare cu cele citate de literatura: cea mai frecventă formă fiind LAL-B comun până la 63% dintre cazuri, LAL-preB 16% și proB sub 5%, iar LAL-T până la 20%. [50]

Deoarece identificarea anomaliilor numerice și structurale, ce stau la baza patogeniei proliferarilor hematologice din LAL, conduc la o încadrare pe grupe de risc cu adaptarea terapiei și cu posibilitatea monitorizării utilizând ca target chiar anomalia identificată, diagnosticul genetic a presupus: examen citogenetic dublat de raportul FISH, pentru validarea analizei genetice și un plus de sensibilitate, și analiză de biologie moleculară (RT-PCR)

Figura nr 14: Distribuția modificărilor genetice identificate în cohorta



Analiza de biologie moleculară a fost efectuată prin RT-PCR. Aceasta a identificat prezență genelor de fuziune în 29.45% (n=43) din cazuri. Gena de fuziune TEL-AML1+ se citează ca fiind cea mai frecventă modificare din analiza moleculară a pacienților pediatrici cu LAL, iar în cazul coortei s-a decelat în 21.23% (n=31). A fost cea mai frecventă modificare genică și în studiu prezent. Asocierea ei, în 20-25% din cazurile cu LAL-B, imprimă un prognostic favorabil, chiar și după o posibilă recădere tardivă; impune un screening uzual. [51] În cadrul coortei din cei n=31 de pacienți cu LAL-TEL-AML1+ majoritatea au avut vârstă între 1-5 ani (n=23), au fost încadrați în categoria de risc scăzut și au asociat un prognostic bun evidențiat de rezultatele finale: remisiunea celor cu TEL-AML1+ a fost de 100%, n=31/31, o singură recădere tardivă n=1/31(3.2%); la finalul studiului acest copil era în viață, în RC2. Mortalitatea în cadrul acestui grup TEL-AML1+ a fost de n=2/31, cauza decesului fiind sepsis-ul și nu progresia bolii hematologice, iar alți n=2/31 au emigrat/ transferat în alt centru. Literatura citează diferite rate scăzute de recădere pentru copii cu LAL-TEL-AML1, similare cu cele ale LAL-B fără gene 5-10%. [52-54]

Prezența BCR-ABL1+ la copiii mai mari, adolescenții cu LAL cu prognostic rezervat, cu răspuns slab la chimioterapie candidați la allotransplant de CSH este citată în 10-13% din cazuri, ajungând chiar până la 21% la adolescenți. [55, 56] Rezultatul studiului este mai scăzut, 5.48% din cazuri BCR-ABL1+. Acești subiecți au avut vârstă mediană 7 ani, comparativ cu cei cu TEL-AML1+ a căror mediană de vârstă a fost 4 ani și au fost încadrați în grupa de risc crescut. Cifrele ratei de recădere: 30% vs 6.45% (n=3/9_{BCR-ABL1+} vs n=2/31_{TEL-AML1+}) și de mortalitate au fost mai mari comparativ cu a celorlalți, confirmând că aceste forme necesită tratament mai agresiv și monitorizare mai atentă. Același număr de subiecți cu BCR-ABL1+ au recăzut n=3/9 și au decedat n=3/9. D.Kumar și colaboratorii au efectuat un studiu în 2015 pe 97 pacienți pediatrici cu LAL au identificat prin RT-PCR prezența genelor de fuziune în 20% TEL-AML1+ și 8%

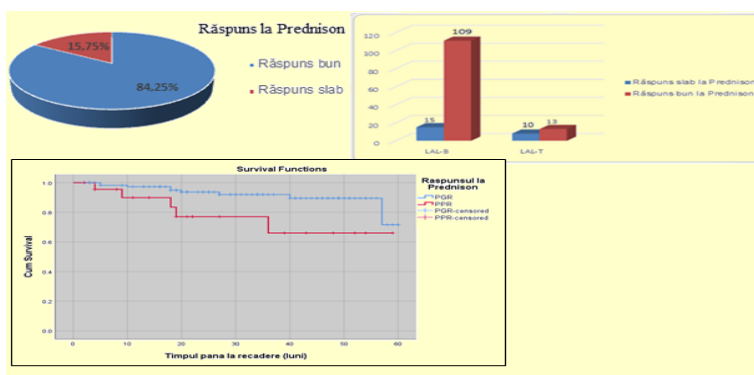
BCR-ABL1+. Rezultatele finale, similare, cu privire la remisiune, recădere, mortalitate concluzionează: o atenție sporită pentru formele BCR-ABL1+[57-59]

Descrierea cohortei studiate d.p.d.v. a monitorizării subiecților:

S-a aplicat chimioterapia, conform protocolului ALL-BFM 2002. Monitorizarea a presupus etapele de evaluare impuse de protocolul chimioterapeutic standard alături de BMRz15,33,78 astfel:

Prima evaluare s-a efectuat în ziua 8, după administrarea a 7 zile de cortizon, prednison p.o. 60mg/m². Este esențială deoarece încadrează pacientul precoce în grupa de risc, evaluează primul răspuns terapeutic și trasează coordonatele prognosticului. Studii recente susțin importanța acestei evaluări J.Gao 2018 & Girish Kamat 2019. [60, 61] Cei mai mulți subiecți au avut răspuns bun la terapia cu cortizon 84.25% din cazuri. Răspunsul slab prezent în 15.75% (n=23) din cazuri a fost mai frecvent întâlnit la pacienții cu LAL-T 56.5% (n=13) comparativ cu LAL-B 12.09% (n=15) rezultat cu semnificație statistică (p=.00). În concluzie tipul de LAL se corelează cu răspunsul la prednison, mai ales în cazul celor cu LAL-T, dar și cu valorile leucocitelor de la debut. Răspunsul evaluării din z8 este direct proporțional cu cel din z15 J.Gao 2018 & Girish Kamat 2019& Borowitz 2015. [60-62]

Figura nr 15: Distribuția răspunsului din z8; Distribuția evaluării din z8 în raport cu tipul de diagnostic; EFS raportat la răspunsul la prednison



A doua etapă în evaluarea răspunsului la tratament a fost examinarea aspiratului medular din z15,33,78 atât citomorfologic MO cât și imunofenotipic IFT.

Conform protocolului ALL-BFM2002 valoarea blaștilor determinată din examinarea citomorfologica a aspiratului medular se împarte în trei categorii: M1(sub 5% blaști), M2(5-25% blaști), M3 (peste 25% blaști). Categoriile stabilite sunt criterii de încadrare pe grupe de risc. Valoarea fiind direct proporțională cu gradul de risc, cu răspunsul la tratament și cu supraviețuirea. [34, 35]

Rezultatele **MO z15** demonstrează răspunsul la chimioterapie. Răspunsul cel mai favorabil este considerat M1; M2 răspuns bun, iar M3 răspuns slab, cazuri candidate la chimiorezistență. M1 și M2 încadrează pacientul în categoria de risc SRG/IRG, iar M3 în grupul cu risc crescut de recădere HRG. Cel mai frecvent rezultat obținut în cadrul studiului a fost M1 în toate cele trei puncte de evaluare z15,33,78. [34,35]

Un singur subiect a avut la MOz33 rezultat M3 (65% blaști). Este același subiect care și în z15 la examinarea citomorfologica MOz15 a avut 80% blaști. Acest caz refractar este un subiect în vârstă de 15 ani, de sex masculin, provenit din mediu urban, LAL-proT, PPR, HRG, RC1.= caz1

Clasificare rezultat citomorfologic	<i>Nu s-a efectuat</i>	Explicații, Observații
MO z15: M1(sub 5%) = 60.27% (n=88) M2(5-25%) = 15,07% (n=22) M3(peste 25%) = 6,85% (n=10) (MOz15>60% blasti = 4,11% (n=6/10))	13,7% (n=20)	- sunt cei diagnosticați în 2014-2015 când monitorizarea presupunea BMR-MOz33 și 78
MO z33: - M1 95,21% (n=139) - M2 0.68% (n=1) - M3 0.68% (n=1) MOz33 > 60% blasti = 0.68% (n=1/1)	3,42% (n=5)	n= 1 (0.68%) a decedat înainte de evaluarea din z33 n= 4 (2.73%) au avut gene de fuziune prezente la diagnostic (n= 3 TEL-AML1+, n=1 E2a-BPX+), iar în cazul acestora evaluarea din z 33 s-a efectuat prin BMR-BMz33.
MO z78: - M1 95,21% (n=139) - M2 0.68% (n=1) - M3 0.68% (n=1)	15,07% (n=22)	n=6 pacienti (4,12%) au decedat înainte de evaluarea din Z78 n=8 (5,47%) pacienți au emigrat înainte de evaluarea din ziua78 n=8 pacienți (5,47%) au avut decelate la diagnostic prezență genelor de fuziune: 7 pacienți TEL-AML1+, 1 pacient E2A-PBX1+ și evaluarea din z78 s-a efectuat prin BMR-BMz78.

Indiferent de protocolul aplicat examinarea citomorfologica a maduvei și încadrarea nivelului detectat în cele trei categorii de risc, rămâne gold standardul și în prezent. Studiul efectuat de Schrappe M & colaboratorii în 2012, relevă faptul că recăderea pacienților pediatrici este direct proporțională cu nivelul blaștilor detectat în MO în time-point-urile prestabilite, doar că EFS-ul

obținut la pacienții monitorizați doar prin MO a fost inferior comparativ cu alte studii ce au presupus monitorizare BMR-IFT, aceasta fiind evident de sensibilizată mai ridicată.

-A treia etapă de monitorizare și cea mai importantă a presupus evaluarea răspunsului la tratament prin imunofenotipare=**BMR-IFT**. Aceasta a reprezentat metoda de bază. Evaluările, prin BMR-IFT, la pacienții incluși în anii 2014-2015 erau efectuate cu flowcitometrul Navios (Beckmann Coulter) - 4 culori și software-ul Kaluza și presupunea analiza în zilele 33 și 78, excepțional și în ziua 15. Începând cu anii 2016 experiența profesională câștigată treptat și dotarea laboratorului a permis IFT-8 culori, Software Infinicy pentru interpretarea datelor și-a dovedit eficiența astfel că tuturor pacienților diagnosticați în clinica li s-a efectuat monitorizare standard prin BMR-IFT=BMR-FCM în zilele 15,33,78 cu o sensibilitate crescută.

BMR-IFT z15 evaluează răspunsul la tratament, după primele doze de chimioterapie. Nivelul acestuia este direct proporțional cu răspunsul la tratament, Borowitz M.J. 2015. [62] Conform protocolului standard ALL-BFM2002/2009 aplicat cohortei nivelul BMR-IFTz15 < 0.1% este considerat răspuns bun, nivelul BMR-IFTz5 0.1%-10% este răspuns bun/ favorabil, iar BMR-IFTz5 >10% relevă un răspuns slab și este rezervat formelor cu risc crescut de recădere, Uma H. 2016. [34, 63]

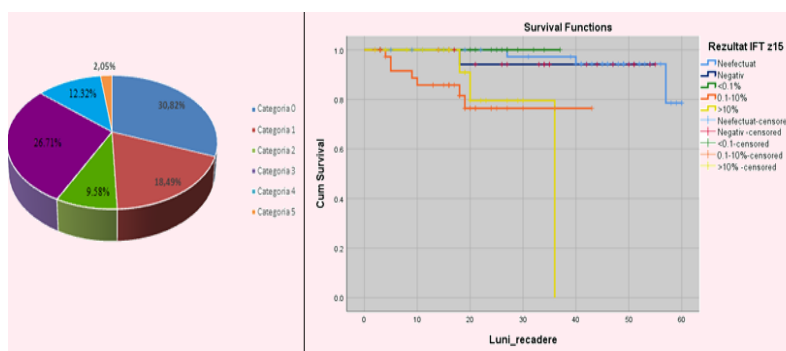
Evaluarea cohortei a condus la: un răspuns bun, favorabil terapeutic în 55.48% din cazuri eșalonat astfel: 18.49% (n=27) pacienți au avut BMR-IFTz15=negativă, 8.22% (n=12) pacienți au avut BMR-IFTz15 detectabilă, dar sub 0.1% blasti, iar 28.77% (n=42) BMR-IFT z15 cu nivel între 0.1-10%. Toți acești pacienți cu răspuns bun/favorabil la chimioterapie au intrat în remisiune completă, RC1 începând cu z15. Majoritatea au fost încadrați în grupul de risc SRG respectiv MRG/IRG, excepție cazurile cu genetică pozitivă (BCR-ABL1+) detectată la diagnostic. Conform protocolului ALL-BFM 2002 acestea sunt formele agresive de LAL, cu un prognostic rezervat prin asocierea unui răspuns terapeutic slab și a unui risc crescut de recădere. [49] Au fost trei pacienți n=3 (2.05%) care deși au avut răspuns bun terapeutic evaluat prin BMR-IFTz15=negativă (n=2 cazuri) și BMR-IFTz15 între 0.1-10% (n=1 caz) având la diagnostic gena de fuziune BCR-ABL1 au fost încadrați în HRG și au urmat tratament cu doze adaptat, crescute de chimioterapie obținând un rezultat final favorabil, pacienții au obținut RC1 în z33 și au menținut-o până la finalul studiului. Adaptarea chimioterapiei în funcție de nivelul

BMR-IFT cu creșterea ratelor de remisiune moleculară cu impact asupra supraviețuirii este dovedit și de alte studii precum Short 2017 & Bruggemann 2017 & Vora A 2013 & Campana 2010 [11, 55-57] Supraviețuirea medie a celor cu răspuns favorabil a variat în funcție de nivelul BMR astfel $EFS_{52luni}^{BMR_{z15sub\ 0.1\%}}=100\%$, $EFS_{52luni}^{BMR_{z15sub\ 0.1\%-10\%}}=82.1\%$. Rata medie de recădere a acestora a fost de 8.8%, iar mortalitatea 11.25%.

Pacienții cu nivel crescut de BMR-IFT_{z15} > 10%, au fost 11.64% (n=17) din cazuri. Dintre aceștia 2.05% (n=3) au prezentat un nivel extrem al BMR-IFT_{z15} > 80%, fiind considerate cazuri refractare/ chimiorezistente. Au fost încadrați în HRG: un subiect (n=1), sex masculin, provenit din mediu urban, vârstă peste 6 ani diagnosticat în 2014 LAL-B, BCR-ABL1+, RC1, recădere moleculară în octombrie 2017, chimioterapie intensivă salvage urmată de AlloTMX, RC2, în viață la finalul studiului (caz 2); al doilea subiect (n=1) de sex feminin, vârsta 2 ani, LAL-Bcom, PPR, HRG, RC1 până la finalul studiului, iar al treilea subiect (n=1) de sex feminin, diagnosticat în 2017 cu LAL-B, Sdr Down asociat, PPR, HRG, RC1, a decedat la aproximativ 1 an (august 2018) după diagnostic prin sepsis. Discuție face acest pacient cu Sdr Down, deoarece aceasta patologie predispune la hemopatii maligne mai uzual LAM, iar când asociază LAL deși dezvoltă forme cu răspuns favorabil la tratament mortalitatea rămâne crescută prin boala genetică de bază ce implică afecțiuni la nivelul mai multor aparate și sisteme (malformații cardiace, deficite imune etc). Particular, acest pacient nu a prezentat o formă standard risc de LAL [64, 65] Concluzia: pacienții cu nivel extrem al BMR-IFT_{z15} au prezentat ca rezultat final: o recădere, un deces și o remisiune. Pacienții cu BMR-IFT_{z15} peste 10%, au avut rata crescută de recădere =14.28%, mortalitatea mare de 23.8% și supraviețuirea medie fără evenimente scăzută $EFS_{52luni}=85.7\%$. Aceste valori sunt cele mai nefavorabile între categoriile din cohortă.

Rezultatele au fost relevante: un singur pacient a recăzut dintre cei cu BMR-IFT_{z15} sub 0.1%, $EFS=93.3\%$ comparativ cu cei zece pacienți recăzuți cu BMR-IFT_{z15} peste 0.1%, $EFS=82\%$. În concluzie: rata de recădere a cohortei este direct proporțională cu nivelul BMR din ziua 15 similar cu Centrele mari de referință St Jude Children's Research Hospital și Asociația Italiană de Hematologie și Oncologie pediatrică - Berlin-Frankfurt-Münster (AIEOP-BFM) ALL 2009. [62, 66, 67]

Figura nr 16: Distributia BMR-IFTz15 in cohorta; EFS raportat la BMR-IFTz15



Cei mai mulți dintre subiecți 30.82% (n=45) nu au avut evaluare prin BMR-IFTz15. Dintre acestia 26.02% (n=38) pacienti au fost inclusi in studiu in 2014 (n=21, fara BMR-IFTz15), iar 11.64% (n=17) in 2015 cand prima evaluare prin BMR era efectuata in ziua 33. Dintre cei fara BMR-IFTz15, n=9 subiecti au avut monitorizare prin BMR-BMz15.

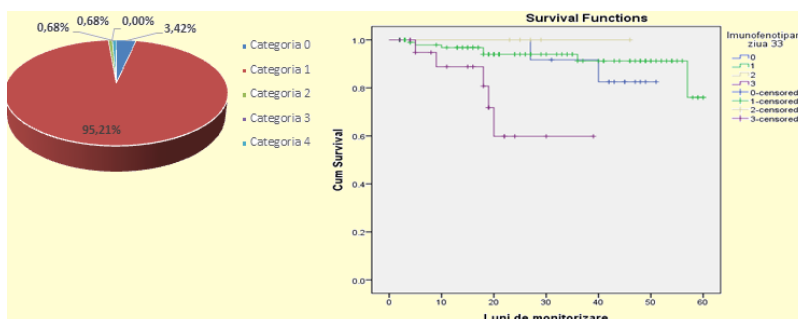
Analizand BMR-IFT in raport cu prezenta genei de fuziune TEL-AML1+ s-a observat ca: n=3 BMR-IFTz15=negativa si LAL-TEL-AML1+, n=3 cu BMR-IFTz15 sub 0.1% si LAL-TEL-AML1+, n=9 BMR-IFTz15 intre 0.1-10%, dar n=2 BMR-IFTz15>10% si LAL-TEL-AML1+;. Acesti doi pacienti au efectuat protocol ALL-BFM-HRG, au obtinut RC1 in-z33 si respectiv z78, nu au prezentat recadere pe parcursul studiului, iar in decembrie 2018 erau in viata si in RC1. Discutie face prezenta unor gene de fuziune asociate cu un prognostic favorabil conform protocolului ALL-BFM2002, de exemplu TEL-AML1+, dar care la evaluarea din z15 au avut nivel crescut de BMR-IFTz15>10%, situatie intalnita in 1,36% din cazuri (n=2). Ambii pacienti cu evolutie favorabila sub tratament HRG, au obtinut remisiunea completa in ziua 78 si si-au mentinut-o pana la finalul studiului, se poate considera o particularitate de caz. Este important de urmarit molecular, pe termen lung acesti pacienti in vederea identificarii eventualelor recaderi, deoarece literatura sustine ca formele cu TEL-AML1+ desi au raspuns favorabil, au risc de recadere tardiva, iar prin interventie rapida terapeutic se obtin rate crescute de supravietuire chiar si dupa a doua remisiune completa. [68, 69] Discordante intre BMR-IFT/BM sunt citate si de alte studii, Hector Sarmiento Palao 2019. [70]

Analizând rezultatele **BMR-IFTz33**: am observat că cei mai mulți pacienți 71.92% (n=105) au avut BMR-IFTz33 = negativă și 3.42% (n=5) dintre subiecți au avut nivelul BMR-IFTz33 sub

0.01%=negativă, dar detectabilă. Toți acești pacienți au avut răspuns favorabil la chimioterapie. Dintre cei cu $BMR-IFTz33 < 0.01\%$ nu a recăzut nici un pacient. Studiile susțin că evaluarea BMR de la sfârșitul inducției este un marker important de prognostic asociat unei rate scăzute de recădere. [65, 66] Cei 15.07% (n=22) cu nivel $BMR-IFTz33 \geq 0.01\%$ au fost încadrați în grupa HRG. Aceștia au asociat și alți parametrii de încadrare în grupa HRG de exemplu: n=8 LAL-T; n=4 pacienți au avut genetica modificata: n=1 hipodiploidie, n=1 trisomie 7, n=1 Monosomie 11, si n=1 complex, n=1 BCR-ABL1+. Evaluarea in z33 impune ajustarea intensitatii tratamentului si escaladarea chimioterapiei la cei cu raspuns nefavorabil. [71] Acestia, inclusi in HRG au primit tratament chimioterapic intensiv, conform ALL-BFM-HRG si au obtinut un $EFS_{HRG}=76.9\%$, scazut comparativ cu literatura de specialitate. Studiul „Stronger intensity but not prolonged duration of post induction intensification improved outcome for patients with higher-risk ALL” efectuat pe 2000 de copii si adolescenti cu raspuns nefavorabil in ziua 33 si ajustarea chimioterapiei postinductie a ridicat supravietuirea la 5 ani de la 72% la 89%. [72]

Totusi, dintre cei cu $BMR-IFTz33 \geq 0.01\%$, unii au asociat parametrii de incadrare cu prognostic favorabil: n= 8 au avut LAL-B com, n=2 au avut hiperdiploidie si n=1 TEL-AML1+. Aceste cazuri cu parametrii cu prognostic favorabil in ciuda unui raspuns terapeutic neadecvat devin provocatoare pentru hematolog. Desi sunt exceptii, fac parte din procentul de LAL cu prognostic rezervat prin riscul mare de recadere asociat unui BMR crescut ce traduce nivel crescut de blasti dupa administrarea blocurilor de chimioterapie si impune tratament escaladat, intensiv; Literatura citeaza astfel de situatii dovada este si studiul Hala M.& co, 2018. [73]

Figura nr 17: Distributia BMR-IFTz33 in cohorta; EFS raportat la BMR-IFTz33



Din urmatoarea evaluare **BMR-IFTz78** a rezultat: majoritatea 77.40% (n=113) au avut BMR-IFTz78= negativa; iar 2.74% (n=4) au avut BMR-IFTz78> 0.01%, pozitiva. Dintre cei cu

raspuns slab in z78, n=3 au avut LAL-T (n=2: LAL-proT,PPR,RC1 (caz1) si n=1: LAL-Tcortical,PGR,RC1) si n=1 pacient LAL-preB,PGR,**BCR-ABL1**+,RC1 (caz4). Doi dintre pacientii cu BMR-IFTz78 pozitiva si LAL-proT au efectuat Allo transplant pana la finalul studiului, unul a decedat deoarece a recazut cu alta clona, chimiorezistenta (caz3), iar celalalt a obtinut remisiunea si a mentinut-o pana la finalul studiului (caz1). Literatura mentioneaza ca pacientii cu raspuns nefavorabil la chimioterapie pana in ziua 78 sunt candidati la trasplantul de celule stem hematopoietice in prima remisiune completa ca unica solutie terapeutica pentru sustinerea acestora pe timp indelungat Flohr et al., 2008. [70] Cel de-al treilea pacient cu BMR-IFTz78>0.01% a ales sa continue tratamentul in alt centru hematologic, iar al patrulea pacient cu BMR-IFTz78 pozitiv, LAL-B,BCR-ABL1+, a recazut molecular la peste 18 luni de la diagnostic, a efectuat chimioterapie intensiva si a obtinut RC2, ulterior a efectuat AlloTMX.La finalul studiului era in viata, in RC2 (caz2). In concluzie dintre cei cu BMR-IFTz78 pozitiva la finalul studiului: o remisiune, doua recaderi, un deces si un pacient pierdut din evidenta.

Un procent de 19.86% (n=29) au fost pacienti la care nu s-a efectuat BMR-IFTz78 din cauza decesului (n=7) sau a emigrarii pacientului (n=7) inainte de evaluarea din z78 sau s-a efectuat prin RT-PCR, BMR-BMz78 (n=15).

La pacientii cu gene de fuziune prezente la diagnostic monitorizarea s-a efectuat prin BMR-IFT si/sau prin RT-PCR (BRM-BM). [10, 74] Majoritatea dintre subiecți 82.88% (n=121) nu au avut BMR-BMz15 deoarece 67.35% (n=98) nu au necesitat evaluare prin BMR-BMz15, acesti pacienti nu au prezentat gene de fuziune la diagnostic. Dintre cei 15.53% (n=23) la care BMR nu a fost efectuata prin RT-PCR au avut BMR-IFTz15.

Cele 17,12% (n=25) BMR-BMz15 examinate au avut BMR-BMz15= negativa 11.64% (n=17) si BMR-BMz15= pozitiva 5.48% (n=8): n=5 BMR-BMz15_{TEL-AML1+} și n=3 BMR-BMz15_{BCR-ABL1+}. Dintre acestia s-au mentinut pozitivi si in z33 urmasorii: n=2 TEL=AML1+ si n=1 BCR-ABL1+. Cei cu TEL-AML1+ au avut BMR-IFTz33= negativ, deci au continuat tratamentul conform SRG si au obtinut remisiunea pe care si-au mentinut-o pana la finalul studiului. Pacientul cu BCR-ABL1+ a fost incadrat in grupa HRG si a raspuns la tratamentul cu TKI, obtinand RC1 in z78; nu a prezentat recadere pana la finalul studiului. Roberts si colaboratorii au demonstrat sensibilitatea TKI si la cele de generatie a doua (dasatinib), asupra celulelor maligne cu

ABL+,JAK2+,CRLF2+ obtinand un raspuns favorabil si generand o alternativa terapeutica la astfel de pacinti. [75]

Majoritatea dintre subiecti 76.71% (n=112) nu au avut **BMR-BMz33**. La n=98 BMR-BMz33 nu a fost necesară analiza, iar la n=14 subiecti fara BMR-BMz33 a survenit decesul/emigrarea inainte de evaluarea din z33. La n=29 dintre subiecti BMR-BMz33= negativa (fără gene de fuziune), iar restul de n=3 au avut un rezultat pozitiv. (n=2 TEL=AML1+ si n=1 BCR-ABL1+). (vezi mai sus BMR-BMz15).

Majoritatea dintre subiecti 78,77% (n=115) nu au avut **BMR-BMz78** efectuata prin RT-PCR/ nu a fost necesară. La 19.18% (n=28) dintre subiecti BMR-BMz78 au avut un rezultat negativ (fără gene de fuziune), iar restul de 3.42% (n=3) au avut un rezultat pozitiv,acestia au fost discutati la BMR-IFTz78. Rezultatele privind corelatii semnificative statistic intre evaluari: MOz15,33,78 vs BMR-IFTz15,33,78 au fost relevante astfel:

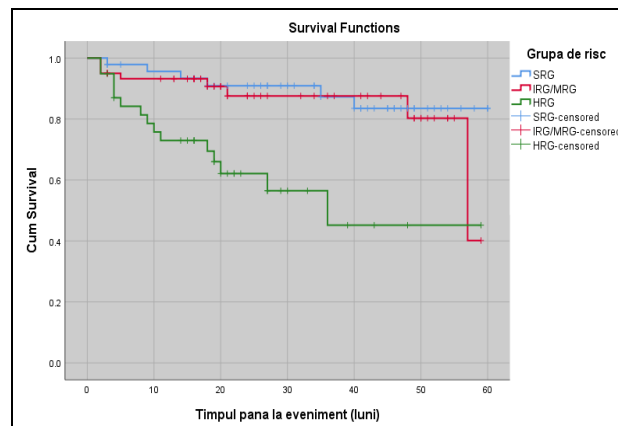
Corelatie intre MO si IFT	Semnificatie statistica: p<0.05
MO z15 vs BMR- IFTz15	p = .00
MO z33 vs BMR-IFTz33	p = .00
MO z78 vs BMR-IFTz78	p = .00
MO z15 vs Evaluare z8	p = .01
BMR-IFTz15 vs Evaluare z8	p = .00
BMR-IFTz15 vs BMR-IFTz33	p = .00
BMR-IFTz15 vs BMR-IFTz78	p = .01
BMR-IFTz33 vs BMR-IFTz78	p = .00
MOz33 vs BMR-BMz33	p = .00
BMR-IFTz33 vs BMR-BMz33	p = .00

Analizand incadrarea pe grupe de risc a pacientilor ce a presupus aplicarea criteriilor conform protocoalelor ALL-BFM 2002-2009, cu urmatoorii parametrii: varsta, valoarea leucocitelor in ziua 0, tipul morfologic, subtiul imunofenotipic, genetica, status SNC si evaluarile: Raspuns la prednison (E1_{FSP}), Examinarea citomorfologica a aspiratului medular: MOz15,z33: M1,M2,M3 si monitorizare prin: BMR-IFT z15,33,78 sau BMR-BMz15,33,78 s-au obtinut rezultatele: SRG=32.19% (n=47), IRG=40.41% (n=59) și HRG=27.40% (n=40).

Analizand pe rand parametrii de incadrare pe grupe de risc: varsta, nr leucocite la debut, fenotip, BCR-ABL/TEL-AML am observat ca rezultatele au avut semnificatie statistica ($p=.00-.02$) si sunt in concordanta cu ALL-BFM2002-2009:

Stratificarea pe grupe de risc ramane un punct important in adaptarea intensitatii chimioterapiei acestor copii in ideea scaderii morbiditatii si mortalitatii date de alte cauza exceptand progresia bolii cu impact direct asupra cresterii supravietuirii. Studiul meu a relevat o supravietuire fara evenimente, recadere, a celor din grupul HRG inferioara $EFS_{HRG}=76.9\%$ celorlalte doua grupari $EFS_{SRG}=95.7\%$; $EFS_{IRG}=95\%$ Comparand cu studiul efectuat de A.V Mooman & co, UK 2014, rezultatele cohortei de studiu au avut valori similare: $EFS_{SRG}=94\%$, iar $EFS_{HRG}=80\%$. [63, 77]

Figura nr 18: EFS raportat la grupele de risc



Durata monitorizarii si dinamica cohortei

17.24% dintre subiecți ($n=25$) au fost monitorizati mai puțin de un an de zile (12 luni). Dintre acesti subiecți $n=12$ pierduti din evidenta, iar $n=13$ desi au decedat au avut un raspuns bun terapeutic evaluat prin BMR-IFT z15/z33, cauza mortalitatii fiind infectia. (vezi interpretare date „mortalitatea globala a cohortei”).

33.56% ($n=46$) au fost monitorizati între 12 și 24 de luni; Dintre acestia $n=3$ pacienti pierduti din evidenta, iar $n=3$ pacienti au decedat din cauza progresiei bolii hematologice $n=2$ si $n=1$ sepsis. (vezi interpretare date „mortalitatea globala a cohortei”)

51.04% (n=74) au supraviețuit între 24 și 36 de luni; Dintre acestia n=2 pacienti pierduti din evidenta, n=2 pacienti au decedat, cauza principala de mortalitate fiind infectia. (vezi interpretare date „mortalitatea globala a cohortei”)

In total n=18 pacienti au decedat, iar n=19 pacienti pierduti din evidenta.

Analizand aceasta variabila „pierduti din evidenta” in cadrul cohortei am observat ca acesti pacienti fie au fost transferati in alt centru de hematologie adulti din tara, dupa implinirea varstei de 18 ani, cei nescolarizati, fie parintii au optat pentru continuarea tratamentului in alt centru european de hematologie pediatrica. Important pentru clinica este ca toti acesti pacienti aveau deja raspuns favorabil prin aplicarea protocolului nostru standard de chimioterapie dovada este rezultatul monitorizarii prin BMR cu obtinerea unei rate crescute de remisiune moleculara a tuturor acestor subiecti ”emigrati”. Dintre acesti pacienti **94,7%** (n=18) se aflau in RC1 la momentul emigrarii/transferului si doar 5,2% (n=1) nu intrase in RC. Acest pacient de sex feminin, 13 ani, diagnosticat cu LAL-B, PPR, HRG, BMR-IFTz33>30%, BMR-IFTz78>0.1% a emigrat imediat dupa ziua 78(caz5).

Analiza **Remisiunii Complete (RC)** in raport cu **Recaderea** a relevat ca pacientii pediatrici cu LAL au un raspuns mai favorabil, cu un prognostic superior adultilor cu acest diagnostic evidentiat si de rezultatul studiului nostru cu privire la rata crescuta a obtinerii remisiunii complete. Un numar de n=146 pacienti, **99.31%** erau in remisiune moleculara la finalul acestui studiu. Rezultat in concordanta cu literatura de specialitate: Möricke A citeaza o remisiune de 98% in randul copiilor cu LAL, iar conform WHO2017, remisiunea la copii cu LAL are o valoare peste 95%, comparativ cu adultii care abia ating 80%. [36, 40]

La **89,72%** (n=131) s-a obtinut RC1 prin aplicarea tratamentului chimioterapic standard ALL-BFM 2002. Remisiunea la finalul studiului RC1+RC2 raportata la tipul de diagnostic are rezultat: LAL-B n=124/ LAL-T n= 22. S-a obtinut o asociere semnificativa statistic intre tipul de LAL si remisiune (p=.04). Cei ce au prezentat recadere dintre cei cu LAL-B (n=11) au raspuns mai favorabil, obtinand si o a doua remisiune pe care si-au pastrat-o pana la finalul studiului comparativ cu cei cu LAL-T(n=3) care au decedat, prin progresia bolii. Un singur pacient cu LAL-T si cu recadere SNC, a obtinut RC2 si a supravietuit pana la finalul studiului. Concluzia

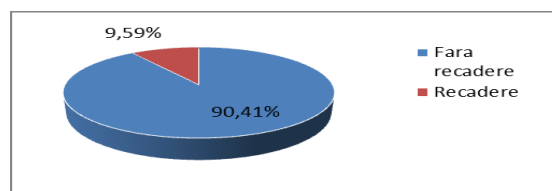
mea este in concordanta cu literatura de specialitate: formele de LAL-B au un prognostic favorabil dovada este: rata crescuta de remisiune, rata scazuta de recadere si raspunsul pozitiv terapeutic chiar si dupa recadere. BFM raporteaza EFS $_{LAL-B,RC2}=15-60\%$ vs EFS $_{LAL-T,RC2}=15-20\%$. [78-81]

Un procent de 10.27% (n=14) au obtinut si a doua remisiune completa, acestora li s-a aplicat alt regim chimioterapic conform ALL-BFM-REZ. Rata de recadere a celor cu LAL-B 8.87% este mai scazuta comparativ cu cea a celor cu LAL-T 13.04%, date citate si in literatura de specialitate. [82]

Un singur subiect (n=1) nu a inregistrat remisiunea completa: acesta este un pacient de sex masculin, in varsta de 7 ani, provenit din mediul urban, diagnosticat in noiembrie 2014 cu LAL-L1,Bcomun,PPR,HRG,BCR-ABL1+, recadere moleculara in octombrie 2017, efectueaza cura FLAG, se obtine BMR-IFT<0.01%, se efectueaza in februarie 2018 allotransplant de celule stem hematopoietice (AlloTMX), iar in martie 2018 BMR-IFT si BMR-BM negativa=RC2, se mentine in remisiune RC2 pana la finalul studiului.

La evaluarea cohortei d.p.d.v a **recaderii** bolii hematologice s-a observat o rata scazuta de recadere de 9.59%, datele generate de literatura de specialitate situeaza recaderea intre 10%-20% Rosenberg A. 2017 & Gayon P.2005 & Franco L. 2012 & Bhojwani 2013. [78, 83-85]

Figura nr 19: Distributia recaderii in cohorta



Scopul studiului cu privire la importanta monitorizarii BMR este demonstrat si sustinut si de rezultatele recaderii. Cel mai frecvent tip de recadere identificat pe parcursul studiului este recaderea identificata la nivel molecular 57.1% dintre recaderi, identificata fie prin IFT, majoritatea, fie prin RT-PCR. Cele mai multe recaderi au fost cele precoce si foarte precoce avand aceeasi valoare 35.71%. Mortalitatea celor cu recadere este de doar 14.28%, valoarea sustine importanta evaluarii prin BMR cu detectarea rapida a acestor pacienti in vederea

interventiei chimioterapice prompte, chimioterapie intensiva si TMX deoarece exista posibilitatea obtinerii unei rate de vindecare a bolii si dupa recadere de 30-50%. [78, 86] Asa cum am discutat si mai sus la fiecare etapa analizata concluzia punctata despre recaderea este:

- LAL-T este o forma agresiva comparativ cu LAL-B, cu raspuns mai slab la tratament si cu un risc crescut de recadere fapt sustinut si demonstrat si de rezultatele din cohorta: rata recaderii LAL-T= 13.04% (23/3) fiind mai mare comparativ cu rata recaderii-LAL-B=8.87% (124/11). De mentionat ca dintre pacientii cu recadere, cinci (n=5) au fost cu LAL-B,HRG,BCR-ABL+, diagnostic care, prin prisma prezentei mutatiei genice, au prognostic rezervat si risc crescut de recadere [75]

-Rezultatele recaderii raportate la grupele de risc sunt si ele relevante: SRG 4.44% (2/45); IRG/MRG 5.26% (3/56) si HRG 30% (9/30). Inca din 2006 Bruggemann si colaboratorii au restratificat grupele de risc in functie de nivelul BMR si riscul de recadere, astfel au citat: SRG 0% risc de recadere; IRG 47% si HRG 94%. [87] Analizand monitorizarea pacientilor in raport cu recaderea am observat ca:

a) un procent de 35.71% (n=5) cu PPR(in ziua 8) au recazut, iar n=3 dintre acestia erau LAL-T. Concluzia: cei cu LAL-T au raspuns slab la prednison, acesta este primul marker de prognostic, au risc crescut de recadere, iar atunci cand recad prognosticul lor este si mai rezervat comparativ cu LAL-B (Vezi si discutii Evaluare z8). [88]

b) Toti cei care au recazut au avut BMR pozitiva atat in ziua 15 (nivel intre 0.1-10%) 78.57% dintre cei recazuti, cat si in ziua 33: 42.85% dintre cei recazuti. De remarcat ca cei mai multi pacienti cu recadere au avut BMR-IFTz15 peste 10%.Concluzionand datele cohortei releva: ca nivelul BMR este direct proportional cu riscul de recadere, la fel ca si Borowitz 2016 & Short N. 2017 (Vezi si discutii BMR-IFTz15 si BMR-IFTz33). [89, 91]

c) Majoritatea subiectilor cu BMR-IFTz78>0.01% au prezentat recadere, au efectuat alloTMX. Un singur pacient pozitiv in ziua78 a ramas in RC1 pana la finalul studiului. (Vezi si discutii BMR-IFTz78)

La evaluarea cohortei d.p.d.v a **supravietuirii** subiectilor inclusi in studiu s-a esalonat perioada de 60 de luni de monitorizare in 5 etape, utilizand pasul de 12 luni. S-a considerat, initial ca fiind

eveniment recaderea ulterior si recaderea si decesul si s-au calculat curbele de supravietuire obtinand urmatoarele rezultate: Valoarea medie a supravietuirii fara evenimente

$EFS_{\text{recadere}}=90.4\%$ la 54.03luni, valoare citata si de alte studii similare.

	EFS1 (recadere)	EFS2 (recadere+ deces)	Test statistic
EFS medie	90.4% 54.03luni	80.1% 48.7 luni	-
LAL-B /LAL-T	91.1% vs 87% 54.3 vs 52.0 luni	78.9% vs 87% 47.94 vs 52.02 luni	EFS1(p = .621) EFS2(p = .362)
Grupe de risc	EFS_{SRG}95.7% EFS_{IRG}95% EFS_{HRG}76.9%	EFS_{SRG}87.2% EFS_{IRG}86.7% EFS_{HRG}61.5%	EFS1(p = .00) EFS2(p = .00)
Evaluare z8	EFS_{PGR} 92.7% EFS_{PPR} 78.3%	-	EFS1(p = .02)
BMR-IFTz15	EFS_{BMRnegativ}93.3% EFS_{BMR>10%}82.1%	EFS_{BMR0IFTz15negativ}82.1% EFS_{BMR0IFTz15>10%}69%	EFS2(p = .26)

Analizand *mortalitatea globala* a cohortei (n=18) 12.24% am observat ca un procent de 10.95% (n=16) pacienti au decedat de orice alta cauza exceptand progresia bolii hematologice (NRM =Non relapse mortality). Dintre cauzele frecvente literatura citeaza infectia, ca prim trigger de deces urmata de reactiile produse de chimioterapie: Tromboza/ Hemoragie cerebrala, Enteropatie neutropenica s.a. [91]

Mortalitatea data de infectie (IRM= infection related mortality) s-a observat in 7.53% din cazuri (n=11). Principala cauza de deces a fost sepsisul. Acesta este urmare a activarii cercului vicios al oricarui pacient hematologic creat de chimioterapia ce conduce la imunodepresie (cu aplazie postchimioterapie, neutropenie) asociata germenilor plurirezistenti (ESBL+,CARBA+,VRE+) ce precipita infectiile severe. Numarul celor decedati din cauza infectiilor este n=10. Etiologiile bacteriene identificate pe ultima hemocultura: BGN=bacili gram negativi=3, Gram pozitivi=2, n=3 neidentificati si respectiv coprocultura: n=2 Clostridium difficile. Un pacient a decedat de cauza infectioasa de etiologie virala, Gripa porcina.

D.p.d.v al localizarii focarului infectios am concluzionat: n=5/15 punct de plecare digestiv; n=3/15 punct de plecare respirator si n=1/15 punct de plecare ORL (Mastoidita); n=1/15(Meningoencefalita), n=3/15 nu se cunoaste punctul de plecare al infectiei.

Analizand mortalitatea d.p.d.v a celorlalte cauze, exceptand progresia bolii hematologice am observat ca 10.22% au decedat din cauza reactiilor adverse postchimioterapie (TRM =Treatment related mortality) astfel: un număr de n=2/15 pacienti au decedat de Enteropatie neutropenica, Perforatie intestinala, Clostridium difficile; Relatia stransa de tip cauza efect, bilaterala, intre TRM si IRM, este sustinuta si in acest studiu. Acesti doi pacienti cu LAL au decedat in final de sepsis cu Clostridium desi initial au dezvoltat Enteropatie Neutropenica post administrare chimioterapie. Statusul lor precar s-a complicat cu megacolon toxic, perforatie intestinala cu evolutie fulminanta cu peritonita si sepsis cu Clostridium Difficile. De aici si diferenta de procent 2.92%. ($n=5 \pm 2 \Rightarrow 7.3\% \pm 2.92\% = 10.22\%$). Enterocolita neutropenica ramane o comorbiditate frecvent asociata LAL,ce creste mortalitatea acestei patologii. Un studiu efectuat pe 118 copii cu LAL a evidenciat o frecventa a acestei complicatii la peste 50% dintre acestia. [89] Literatura de specialitate intruneste ambele segmente sub denumirea generica de TRM in prezent, exceptional pentru evidentierea infectiei ca si cauza secundara importanta de deces la acesti pacienti se foloseste TRM+/-IRM. Stabilirea exactă a cauzei de deces pentru fiecare pacient este dificil de identificat datorită multitudinii complicațiilor postchimioterapie per pacient ce precipită infecția/infectarea, demonstrând astfel relația strânsă de tip cauză-efect între TRM și IRM. [92]

b) n=2/15 pacienti au decedat de Tromboza cerebrala neresponsiva farmacologic/ Hemoragie cerebrala incompatibila cu viata,n=1 pacient decedat, este un caz complex de sex feminin cunoscuta in APP cu Atrezie de valva pulmonara operata, diagnosticata si tratata in clinica IC Fundeni pentru LAL-B,BCR-ABL1+,PGR,HRG,RC1, intoleranta la Imatinib, tratament cu Dasatinib, recadere,FLAG, RC2,AlloTMX, GVHD sever (cutanat,ocular),RC2-deces.

Alte afectiuni asociate, prezente anterior diagnosticului de LAL,cu posibil rol in precipitarea decesului, sunt afectiunile ce implica aparatul cardiovascular: n=3/17 Sdr Down, n=1/17 Atrezie de valva pulmonara operata in prima copilarie a unei paciente adolescente. Este cunoscuta cardiotoxicitatea pacientilor cu LAL tratati cu antracicline, de aceea pacientii ce asociaza si patologie cardiaca implica un risc crescut de mortalitate, independent de hemopatia maligna sau de chimioterapie. [93]

Rezultatele: NRM=TRM+/-IRM atat din punct de vedere al identificarii cauzelor cat si a procentelor obtinute se corelează cu cele ale studiilor internaționale, Tran K. 2020 & David O'Connor 2014. [94, 95]

Evaluarea mortalitatii data de progresia bolii a avut o valoare scazuta 1.36% (n=2).

Se remarca aceste doua cazuri (n=2) extrem de complexe: un subiect n=1 de sex masculin, provenit din mediu urban, in varsta de 7 ani, diagnosticat in iulie 2017 cu LAL-T(NK),PPR,HRG,BMR-IFT in dinamica a evidentiat: BMR-IFT z15= 2% limfoblasti T,BMR-IFTz33=0.97%, limfocite atipice cu acelasi profil imun de la debut, BMR-IFTz78=0.03% limfocite T-NK like (CD56-,CD16-). S-a continuat tratamentul HRG si s-a monitorizat atent clona limfocitara. Evaluarea BMR efectuata dupa protocolul de chimioterapie bloc HR3 a evidentiat BMR-IFT=1.36% T-NK like si 0.14% o noua clona de limfocite T. S-a considerat recadere la nivel molecular cu alta clona s-a instituit tratament chimioterapic salvage- FLAG cu un raspuns mai favorabil, dar fara obtinerea unei “remisiuni moleculare” (BMR-IFT NK-LIKE 0.53%, dar noua clona T: 0.9%). In iunie 2018 se decide, ca unica atitudine terapeutica efectuarea AlloTMX 10/10, dar a grefat in ziua +17 (chimerism 87% celule de la donator,dar si limfoblasti tip T, diferiti d.p.d.v. imunofenotipic fata de clonele anterior identificate. S-a administrat: Nelarabina, DLI, Bortezomib VXLD in incercarea stoparii proliferarii progresive a limfoblastilor, dar fara succes hematologic.Pacientul a decedat prin progresia bolii hematologice la 12 luni de la diagnostic. (caz3).

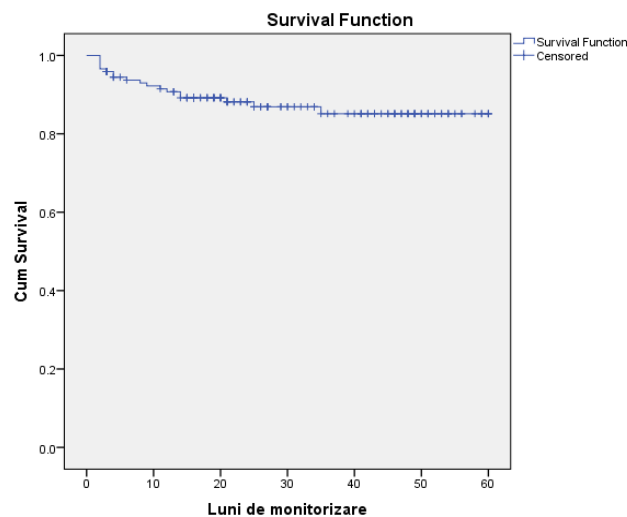
Al doilea pacient decedat ca urmare a progresiei bolii n=1, de sex masculin, provenit din mediul urban, in varsta de 2 ani, diagnosticat in septembrie 2017 cu LAL-T,PPR,HRG,RC1, a prezentat recadere precoce dupa HR2 (mai 2018), s-a instituit cura salvage FLAG, fara obtinerea remisiunii moleculare, s-a insistat si s-au administrat doua cure CLOVE, cu obtinerea unui raspuns favorabil BMR-IFT < 0.01%, RC2, iulie 2018 AlloTMX, recadere post TMX septembrie 2018, deces in octombrie 2018. (caz 6). Aceste cazuri particulare provoaca chimioterapia standard insistand pe descoperirea, analiza si testarea unor noi terapii. [96, 97]

Desi analiza cohortei demonstrează o rată crescuta de mortalitate prin infectii, studiile citeaza IRM intre 2.4% si 43.2%, [92, 93], cu TRM=10.2% similar cu valoarea citata de Nordic Society

of Paediatric Haematology and Oncology ALL-92 and ALL-2000 trials, [96] TRM=10.8%, mortalitatea globala a cohorței este scăzută chiar și în grupul celor cu leucemie cu risc crescut (LAL-HRG). Se impune reducerea la maxim a ratelor de mortalitate prin infecții și/ sau reacții adverse postchimioterapie în vederea creșterii supraviețuirii globale.

Analizând supraviețuirea globală (OS=Overall Survival) a cohorței s-a observat un rezultat relevant **87.75% (n=128) la 52.56 luni**, valoare similară cu cea relevată și de metanaliza efectuată de Eric W.Tai, Atlanta 2017, pe copii cu LAL din SUA, ce a inclus date culese din registrele de cancer a peste 37 de state ce acoperă peste 80% din populația continentului. Supraviețuirea citată fiind de 86% la 5 ani pentru cei diagnosticați 2001-2003 și respectiv 88% pentru cei din 2004-2009. Societatea Americană de cancer, citează pe propriul site în februarie 2019 o supraviețuire pentru copii cu LAL de aproximativ 90%, iar „Cancer.Net Editorial Board” citează în ianuarie 2020 o rată de OS de 89%. [98-101]

Figura nr20: OS la 5 ani



Concluzii finale:

- 1. La finalul studiului în clinica IC Fundeni toți pacienții pediatrici au conform protocolului ALL-BFM 2009 un diagnostic complet și complex de LAL: citomorfologic, imunofenotipic și genetic și o monitorizare standard în z15,33,78 prin IFT și/ sau RT-PCR.**
- 2. S-a atins scopul propus și s-a standardizat monitorizarea tuturor pacienților pediatrici cu LAL diagnosticați și tratați în clinica de Pediatrie, IC Fundeni conform protocolului ALL-BMF2009**
- 3. S-a efectuat acest studiu observațional, analitic, prospectiv pe o perioadă de 5 ani într-un centru de referință de hematologie pediatrică IC Fundeni, București, România cu scopul culegerii datelor esențiale cu privire la rezultatele aplicării unui tratament chimioterapic adaptat și a unei monitorizări stricte ghidată pe etape conform protoacoalelor în vigoare.**
- 4. Cohorta de studiu a inclus 147 de subiecți, pacienți pediatrici cu LAL, număr reprezentativ pentru incidența din țara noastră și nu numai.**
- 5. Caracterele morfologice, imunofenotipice și genetice ale limfoblastilor au fost în concordanță cu datele din literatura de specialitate.**
- 6. Screeningul hematologic impune o atenție marită pediatriilor prin cazurile diagnosticate cu LAL dar cu HLG cu valori în limite normale în ziua 0 și fără blaști existenți pe frotiul de sânge periferic. Verificarea statusului central medular rămâne temelia unui diagnostic cert.**
- 7. Monitorizarea atentă a pacienților pediatrici cu LAL reprezintă cheia succesului în ceea ce privește evaluarea răspunsului la tratament cu încadrarea corectă pe grupe de risc și adaptarea chimioterapiei cu scopul obținerii unei rate cât mai crescute de remisiune și supraviețuire și, nu în ultimul rând, identificării precoce a recăderilor pentru a câștiga timp în vederea intervenției terapeutice rapide.**

8. Evaluarea din ziua 8 este un marker de prognostic important, răspunsul la prednison fiind direct proporțional cu rata de recădere mai ales a celor cu LAL-T.
9. BMR rămâne cel mai fidel marker de evaluare a copiilor cu LAL:
 - a. nivelul BMR-IFTz15 este direct proporțional cu răspunsul la chimioterapie, cu riscul de recădere și cu supraviețuirea
 - b. nivelul BMR-IFTz33 $> 0.01\%$ rămâne punctul culminant ce decide escaladarea intensității chimioterapiei în vederea scăderii ratei de recădere la pacienții cu LAL-HRG
 - c. BMR-IFTz78 pozitiv este markerul celor candidați la transplantul de celule stem hematopoietice
10. Încadrarea pe grupe de risc dictată de nivelul BMR este mai sensibilă în adaptarea chimioterapiei, în vederea scăderii morbidității și mortalității asociate de TRM-ul direct proporțional cu intensitatea chimioterapiei, a ratei de recădere și pentru obținerea celui mai înalt nivel de supraviețuire posibil.
11. Rezultate releva o monitorizare standard cu impact pozitiv:
 - a. Rata obținerii remisiunii complete la finalul studiului 99.31%;
 - b. Rata de recăderi raportată la o mie de subiecți cu leucemie = 9.5%;
 - c. Mortalitatea generală a cohortei 12.24%;
 - d. Supraviețuirea medie generală a cohortei, la 52.56 luni, de 87.75%.

Bibliografie selectivă:

- 1) Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D., et al., "Detection of minimal residual disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia", *Cytometry Part B*. 2013;84B:359-369
- 2) Malec M, van der Velden VHJ, Björklund E, et al., "Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TCR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping", *Leukemia* 2004, 18:1630-1636
- 3) Juliana Maria Camargos Rocha, Sandra Guerra Xavier, Marcelo Eduardo de Lima Souza, et al., "Current Strategies for the Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, *Mediterranean Journal of Hematology&Infection Diseases*", 2016, 8(1): e2016024
- 4) Ricardo Sánchez, Rosa Ayala, Joaquín Martínez-López, et al., "Minimal Residual Disease Monitoring with Next-Generation Sequencing Methodologies in Hematological Malignancies", *International Journal of Molecular Science*, iunie 2019; 20(11): 2832
- 5) J Flores-Montero, L Sanoja-Flores, A Orfao et al., "Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma", *Leukemia* ian 2017 volume 31, 2094-2103
- 6) Dogliotti I., Drandi D., Genuardi E., et al., "New Molecular Technologies for Minimal Residual Disease Evaluation in B-Cell Lymphoid Malignancies". *J. Clin. Med.* 2018;7:288
- 7) Daniela Cilloni, Jessica Petiti, Valentina Rosso, et al., "Digital PCR in Myeloid Malignancies: Ready to Replace Quantitative PCR?", *International Journal of Molecular Sciences*, mai 2019, 20(9): 2249
- 8) Irene Della Starza, Vittorio Nunes, Federica Lovisa, et al., "Digital-Droplet PCR, an Accurate Method for IG/TR PCR-MRD Stratification in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia", *Blood Journal* 2018; 132 (Supplement 1): 1544
- 9) Sam Behjati, Patrick S Tarpey, et al., "What is next generation sequencing?", *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013 Dec; 98(6): 236-238.

- 10) [Giuseppe Gaipa](#) ,[Giuseppe Basso](#), Andrea Biondi, “Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia”., The official Journal of the international clinical cytometry, iunie 2013, Vol. 84-6, pag. 359-369
Imagine preluata-sursa: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.b.21101>
- 11) <https://www.omixon.com/ngs-minimal-residual-disease/>
- 12) Hélène Cavé, “Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia”, Atlas Genetics and Cytogenetics Oncology and Haematology, 1999, Vol 3(3), pag168-172
Imagine preluata-sursa:<http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/MinResidDisID20007.html>
- 13) J.J.M. van Dongen, L. Lhermitte, S. Böttche, et al., “EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes”, EuroFlow™ antibody panels Handout at 14th EHA Congress, Berlin, Germania, iunie 2009
Imagine preluata-sursa: <https://www.cytognos.com/products/alot-acute-leukemia-orientation-tube/>
- 14) Bing Chen, Lu Jiang, Meng-Ling Zhong, et al.,” Identification of fusion genes and characterization of transcriptome features in T-cell acute lymphoblastic leukemia”, PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences, ianuarie 2018, 115 (2), pag. 373-378
Imagine preluata-sursa: <https://www.pnas.org/content/115/2/373>
- 15) Inaba H, Greaves M, Mullingham CG., „Acute lymphoblastic leukemia, Lancet 2013;381(9881):1943-1955;
- 16) Basso G, Buldini B, De Zen L, et al.& Orfao A.,” New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias.”, Haematologica 2001; 86(7):675-692
- 17) Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, et al.,” Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European Leukemia Net Work Package 10”., Leukemia 2011;25:567-574.

- 18) Peters JM, Ansari MQ., et al.,” Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia”., Arch Pathol Lab Med. 2011;135:44-54.
- 19) Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, et al.,”International BFM Study Group (I-BFM-SG). Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia”., Leukemia. 2008;22(4):771-782.
- 20) Xu XJ, Tang YM, Song H, et al.,” Monitoring of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia and its prognostic significance”., Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2010 Martie; 48(3):180-4
- 21) Jacques J. M. van Dongen,Vincent H. J. van der Velden, Monika Brüggemann, et al., “Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies.”, *Blood* 2015, Vol.125(26): 3996-4009.
- 22) Irene Della Starza,Sabina Chiaretti, Maria S. De Propriis, et al., Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances, *Front Oncol.* Aug 2019; 9: 726
- 23) Vora A, Goulden N, Mitchell C, et al.,” Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial.”, *Lancet Oncol.* 2014 Jul;15(8):809-18.
- 24) Brüggemann, M., Raff, T., Flohr, T., et al., “Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia.” *Blood*, 2006,107, 1116-1123
- 25) Mortuza, F. Y., Papaioannou, M., Moreira, I. M., et al.,”Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia”. *Journal of Clinical Oncology*, 2002, 20, 1094-1104

- 26) Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al., "Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow.", J Clin Oncol. 2009;27:5168-5174
- 27) Raff, T., Gokbuget, N., Luschen, S., et al., "Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: Data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials.", Blood, 2007, 109, 910-915.
- 28) Imagine preluata-Sursa imaginii: https://www.medscape.org/viewarticle/849751_2: The Role of MRD in Hematologic Malignancies
- 29) Hefazi M, Litzow MR, "Recent advances in the biology and treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia", Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy, septembrie 2018 Vol. 8 pg: 47—61 Imagine preluata-Sursa imaginii: <https://www.dovepress.com/recent-advances-in-the-biology-and-treatment-of-b-cell-acute-lymphobla-peer-reviewed-fulltext-article-BLCTT#>
- 30) van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al., "European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data". Leukemia. 2007;21(4):604-611.
- 31) FDA briefing document: Oncologic Drugs Advisory Committee Meeting: BLA 125557 S-013 Blincyto (blinatumomab) Applicant: Amgen, Inc. FDA website. www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM599298.pdf. Accessed iunie 2020.
- 32) van der Velden VH, van Dongen JJ., et al., "MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR"., Methods Mol Biol. 2009;538:115-150.
- 33) Imagine preluata-sursa imaginii: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600313/#B4-ijms-20-02832>
Ricardo Sánchez, Rosa Ayala, Joaquín Martínez-López, et al., "Minimal Residual Disease Monitoring with Next-Generation Sequencing Methodologies in Hematological Malignancies, International Journal of Molecular Science, iunie 2019; 20(11): 2832;

- 34) Myriam Campbell, Luis Castillo, Eduardo A. Dibar et al, “ALL IC-BFM 2002 A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia Final Version of Therapy Protocol” from May 3, 2002 Start 01.11.2002 End 31.10.2006;
- 35) Myriam Campbell, Luis Castillo, Cecilia Riccheri, et al., “ALL IC-BFM 2009: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia Final Version of Therapy Protocol, Final Version of Therapy Protocol” from August-14-2009 Start 01.04.2010 End 31.03.2015;
- 36) Borowitz M.J, Chan J.KC, Downing J.R, et al, B-Lymphoblastic Leukaemia/Lymphoma, NOS. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2017 Revised Ed., pag 200-210
- 37) Sabina Chiaretti, Gina Zini, Renato Bassan, et al., “Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia.”, *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014; 6(1): e2014073
- 38) Pulte D., Gonds A., Brenner H., et al., „Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia for the 1980s to the early 21st century”., *Blood*, 113:1408-11, 2009.
- 39) Ward E, DeSantis C, Robbins A, et al., „Childhood and adolescent cancer statistics.”, *Cancer Clinical Journal* 2014; 64:83.
- 40) Moricke A., Zimmermann M., Reiter A., et al., „Prognostic impact of age in children and adolescent with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM86,90 and 95”., *Klin Padiatr.* 2005; 217(6): 310-20
- 41) Robin Foà, “Acute lymphoblastic leukemia: age and biology.”, *Pediatr Rep.* 2011 Jun 22; 3(Suppl 2): e2.
- 42) <https://www.childrenwithcancer.org.uk/childhood-cancer-info/cancer-types/acute-lymphoblasticleukaemia/>
- 43) José Carlos Jaime-Pérez, Gisela García-Arellano, José Luis Herrera-Garza, et al., “Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center.”, *Hematol Transfus Cell Ther* Jan-Mar 2019; 41(1):57-61
- 44) O. González Llano, „The complete blood count in the early diagnosis of acute leukemia in children”, *EXPERT'S CORNER: A PERSONAL APPROACH, Medicina Universitaria.* 2017; 18(73):216-218, <https://www.elsevier.es/en-revista-medicina-universitaria-304-pdf-S1665579617300030>
- 45) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. (August 1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group". *British. Journal of Haematology*, 33 (4): 451-458
- 46) Bellan C, Stefano L, Giulia de F, et al., “Burkitt lymphoma versus diffuse large B-cell lymphoma: a practical approach”., *Hematol Oncol* 2010; 28:53-56

- 47) Jelena Roganovic, "Acute Lymphoblastic Leukemia in Children.", *Leukemia* May 15th 2013
- 48) Pan L., Liu G., et al., "Machine learning applications for prediction of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia". *Scientific Reports*, 2017; 7(1),7402
- 49) van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al., "EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes", *Leukemia*. sept 2012, 26 (9): 1908-75.
- 50) Foa R., Vitale A., "Acute lymphoblastic leukemia", *Hematology in progress*, 2013 & Lanzkowsky P., et al., *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, Elsevier, 2011
- 51) Attarbaschi A, Mann G, König M, et al.: Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia* 2004,18 (10): 1611-6
- 52) Pui C. H., Robinson L. L, Look T, "Acute lymphoblastic leukaemia". *Lancet*, 2008; 371(9617):1030-43
- 53) Stefanos Papadimitriou, Georgios S. Paterakis, Agapi Parcharidou, et al., "TEL/AML1⁺ acute lymphoblastic leukemia in the greek pediatric population.", *Pediatrics* January 2008, 121 (Supplement 2) S111-S11
- 54) Tsang KS, Li CK, Chik KW, et al., "TEL/AML1 rearrangement and the prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia in Hong Kong". *American Journal of Hematology*, 01 Oct 2001, 68(2):91-98
- 55) Roberts KG, Pei D, Campana D, Payne-Turner D, Li Y, Cheng C, et al., "Outcomes of children with BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease". *J Clin Oncol* (2014) 32(27):3012-20
- 56) Moorman AV, Schwab C, Ensor HM, et al., "IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia". *J Clin Oncol* 2012; 30:3100.
- 57) Kumar, D., Panigrahi, M.K., et al., "Molecular analysis of childhood B-acute lymphoblastic leukemia: Identification and prognosis of rare breakpoints". *Molecular Biology*, 2015; 49(6):843-7
- 58) Elena Maino, Rosaria Sancetta, Piera Viero, et al., "Current and future management of Ph/BCR-ABL positive ALL". *Expert Review of Anticancer Therapy* 2014, Vol 14-6, pag 723-740
- 59) Mullighan C.G., "The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia". *Hematology*. 2012, 389-396
- 60) J.Gao, W., J Liu, "Prognostic value of the response to prednisone for children with ALL a meta-analysis.", *European Medical Review for Medical and Pharmacological Science* 2018,22:7858-7866

- 61) Girish Kamat, Kanann Subramanian, Shashikant Apte et al., „Correlation of Day 8 Steroid Response with Bone Marrow Status Measured on Days 14 and 35, in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia Being Treated with BFM Protocol.”, Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion, april 2019, 35(7)
- 62) Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, et al., ”Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232.”, Blood. 2015 Aug 20; 126(8):964-71
- 63) H. Athale, Paul J. Gibson, Nicole M. Bradley, et al., ”Minimal Residual Disease and Childhood Leukemia: Standard of Care Recommendations From the Pediatric Oncology Group of Ontario MRD Working Group”., Pediatric Blood & Cancer iunie 2016, Vol 63 (6), 973-982
- 64) de Graaf G, Buckley F, Skotko BG: ” Estimation of the number of people with Down syndrome in the United States”., Genet Med 19 (4): 439-447, 2017
- 65) Maloney KW, Carroll WL, Carroll AJ, et al.: ” Down syndrome childhood acute lymphoblastic leukemia has a unique spectrum of sentinel cytogenetic lesions that influences treatment outcome: a report from the Children's Oncology Group” . Blood 116 (7): 1045-50, 2010
- 66) Pui CH, Pei D, Coustan-Smith E, et al., „Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study”., Lancet Oncol. 2015;16(4):465-474.
- 67) Pui CH, Pei D, Raimondi SC, et al., ” Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy” . Leukemia. 2017;31(2):333-339.
- 68) Forestier E, Heyman M, Andersen MK, et al., ” Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival”., Br J Haematol. 2008;140(6):665-672
- 69) Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, et al., ” Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study”., J Clin Oncol. 2008;26(13):2186-2191.
- 70) Hector Sarmiento Palao, Fabián Tarín, Fernanda Martirena, et al., ”A reproducible strategy for analysis of minimal residual disease measured by Standardized multiparametric flow cytometry in b acute lymphoblastic leukemia”., Clinical Cytometry-part B, 2019, Vol 94-4.
- 71) Pieters R., de Groot-Kruseman H., Van der Velden V., et al., » Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group”., J. Clin. Oncol. 2016; 34:2591-2601

- 72) Seibel NL, Steinherz PG, Sather HN, et al., "Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group"., *Journal of Clinical Oncology* 2008;111:2548-2555
- 73) Hala M. Abaza, Mervat A.A. Alfeky, et al., "Neuropilin-1/CD304 Expression by Flow Cytometry in Pediatric Precursor B-Acute Lymphoblastic Leukemia: A Minimal Residual Disease and Potential Prognostic Marker"., *J Pediatr Hematol Oncol* 2018;40:200-207
- 74) Aaron Kruse, Nour Abdel-Azim, Hye Na Kim, et al., "Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia", *Int J Mol Sci.* 2020 Feb; 21(3): 1054
- 75) Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, et al., "Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia"., *N Engl J Med* 2014; 371: 1005-1015.
- 76) Ladetto M., Bruggemann M., Monitillo L., et al., "Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders"., *Leukemia.* 2014; 28:1299-1307.
- 77) Anthony V. Moorman, Amir Enshaei, et al., "A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia"., *Blood* 2014, 124: 1434-1444.
- 78) Locatelli F, Schrappe M, Bernardo ME, et al., "How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia"., *Blood.* 2012;120(14):2807-2816.
- 79) Freyer DR, Devidas M, La M, et al., » Postrelapse survival in childhood acute lymphoblastic leukemia is independent of initial treatment intensity: a report from the Children's Oncology Group"., *Blood.* 2011;117(11):3010-3015.
- 80) Pulsipher MA, Langholz B, Wall DA, et al., "Risk factors and timing of relapse after allogeneic transplantation in pediatric ALL: for whom and when should interventions be tested?"., *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50(9):1173-1179.
- 81) Bhatla T, Jones CL, Meyer JA, et al., "The biology of relapsed acute lymphoblastic leukemia: opportunities for therapeutic interventions"., *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014;36(6):413-418
- 82) G Henze, A v Stackelberg, C Eckert, et al., "ALL-REZ BFM--the consecutive trials for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia", *Klin Padiatr.* 2013 May;225 Suppl 1:S73-8.

- 83) Rosenberg A.S., Brunson A., Paulus J.K., et al., "Secondary acute lymphoblastic leukemia is a distinct clinical entity with prognostic significance". *Blood Cancer J.* 2017; 7: e605
- 84) Gaynon P.S., "Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse". *Br J Haematol*, 2005, vol.131(5), pag. 579-587
- 85) Bhojwani D, Pui CH. "Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia". *Lancet Oncol.* 2013; 14: 205-217
- 86) Tallen G.,Ratei R.,Mann G., et al., "Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90". *J Clin Oncol*, 2010, vol. 28(14)(pg. 2339-2347
- 87) Bruggemann M, Raff T, Flohr T, et al. "Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia". *Blood* 2006; 107: 1116-1123
- 88) Franco Locatelli,Martin Schrappe,Maria Ester Bernardo, et al., "How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia", *Blood* 2012,120 (14),pag: 2807-2816.
- 89) Borowitz M.J., Wood B.L., Devidas M., et al."Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: A report from Children's Oncology Group study AALL0232". *Blood J. Am. Soc. Hematol.* 2015; 126:964-971
- 90) Short N.J., Jabbour E., "Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: How to Recognize and Treat It. *Curr. Oncol. Rep*". 2017]
- 91) Weili Sun, Jemily Malvar, et al., "Outcome of children with multiply relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma study,*Leukemia* 2018", vol. 32, pag 2316-2325
- 92) Serbanica A, Radu L,Colita A, et al, "Studiu retrospectiv 2014-2017, privind analiza cauzelor de deces, altele decât progresia bolii, la copiii diagnosticați cu Leucemie acută limfoblastica; experiența clinicii de Pediatrie IC Fundeni, *Revista romana de pediatrie*, mai 2019".
- 93) Ceppi F, Stephens D, den Hollander BS, et al."Clinical presentation and risk factors of serious infections in children with Down syndrome treated for acute lymphoblastic leukemia". *Pediatr Blood Cancer* 2016; 63:1949.

- 94) David O'Connor, Jessica Bate, Rachel Wade, et al., "Infection-related mortality in children with acute lymphoblastic leukemia: an analysis of infectious deaths on UKALL2003", Blood journal Aug 2014..
- 95) Tran Kiem Hao, Pham Nhu Hiep, Nguyen Thi Kim Hoa, et al., "Causes of Death in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia at Hue Central Hospital for 10 Years (2008-2018)", Glob Pediatr Health. 2020; 7: 2333794X20901930.
- 96) T Terwilliger, M Abdul-Hay, et al., "Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update", Blood Cancer J. 2017 Jun; 7(6): e577
- 97) Joanna Pierro, Laura E. Hogan, Teena Bhatla, et al. " New Targeted Therapies for Relapsed Pediatric Lymphoblastic Leukemia, Expert Rev Anticancer Ther", 2017 Aug; 17(8): 725-736.
- 98) <https://www.cancer.org/cancer/leukemia-in-children/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>
- 99) Leukemia - Acute Lymphoblastic - ALL - Childhood: Statistics Approved by the Cancer.Net Editorial Board, 01/2020 <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-acute-lymphoblastic-all-childhood/statistics>
- 100) Mertens AC, Yong J, Dietz AC, et al., "Conditional survival in pediatric malignancies: analysis of data from the Childhood Cancer Survivor Study and the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program", Cancer 2015; 121:1108.
- 101) Cooper SL, Brown PA, "Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia.", Pediatric Clinics of North America, 18 Oct 2014, 62(1):61-73