

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI

**ȘCOALA DOCTORALĂ
MEDICINĂ-HEMATOLOGIE**

**LEUCEMIILE ACUTE LA COPII ȘI ADOLESCENȚI:
ANALIZA MOLECULARĂ ȘI IMPACTUL ASUPRA
MANAGEMENTULUI**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
Prof. Dr. DANIEL CORIU**

**Student-doctorand
SCHMIDT PETRONELA MĂDĂLINA**

2022

Cuprinsul tezei de doctorat	3
Lista cu abrevieri	8
Introducere	10
I. Partea generală	16
Capitolul 1.....	16
1.Leucemia acută mieloidă la copil și adolescent	16
1.1. Clasificarea LAM.....	16
1.2. Particularitățile modificărilor genetice în LAM la copil.....	18
1.2.1. Anomalii structurale ale CBF (core binding factor)	18
1.2.2. Rearanjamente ale KMT2A/11q23	19
1.2.3. Rearanjamente 11p15/NUP98.....	20
1.2.4. Inversia(3)(q21.3q26.2) sau t(3;3)(q21.3;q26.2)/ GATA2, MECOM(EV11)	20
1.2.5. Translocația (6;3)(p22;q34)/DEK-NUP214	21
1.2.6. Translocația (1;22)(p13;q13)/RBM15-MLK1	21
1.2.7. Monosomia 7 și del(7q)	21
1.2.8. Monosomia 5 și del(5q)(-5/5q)	22
1.2.9. Trisomia 8	22
1.2.10. Cariotipul normal	22
1.2.11. Mutații FLT3.....	22
1.2.12. Mutații Ras.....	23
1.2.13. Mutații KIT	23
1.2.14. Mutații WT1.....	23
1.2.15. Mutațiile NPM1	24
1.2.16. Mutații CEBPA	24
1.2.17. Sindroame genetice predispozante pentru LAM.....	25
1.3. Leucemia acută promielocitară	25
1.4. Leucemia acută mieloidă la copiii cu Sindrom Down	26
1.5. Particularități ale modificărilor genetice în recidivele LAM	27
1.6. Clasificarea în funcție de riscul prognostic în LAM pediatrică	28
1.7. Tratamentul standard al LAM.....	30
1.7.1. Tratamentul de Inducție	30
1.7.2. Tratamentul de Consolidare și de întreținere	30
1.7.3. Indicațiile allo-transplantului de celule stem în LAM pediatrică.....	31
1.7.4. Tratamentul formelor speciale de LAM.....	33
1.7.5. Tratament LAM recidivată.....	36
1.8. Terapii țintă recente în LAM pediatrică.....	37
1.8.1. Inhibitori FLT3 (Sorafenib, Midostaurin, Gilteritinib, Quizartinib, Crenolanib)	38
1.8.2. Imunoterapia în LAM pediatrică.....	39

1.8.3. Reglatorii epigenetici	40
1.8.4. Inhibitori BCL-2	41
1.9. Boala minimă reziduală	41
Capitolul 2.....	43
2.Leucemia acută limfoblastică la copil și adolescent.....	43
2.1.Clasificarea LAL.....	43
2.2. Particularitățile modificărilor genetice în LAL la copil și adolescent	44
2.2.1. Anomalii genetice cu prognostic favorabil	44
2.2.2. Anomalii genetice cu prognostic nefavorabil	46
2.2.3 Anomalii genetice cu prognostic genetic intermediar	49
2.2.4. Subtipuri nou identificate de LAL cu celule precursorare B.....	51
2.2.5. Modificări genetice în LAL cu celule T.....	52
2.2.6. Particularități genetice ale LAL la adolescenți	52
2.2.7. Anomalii genetice în LAL recidivată.....	53
2.2.8. Susceptibilitatea genetică.....	54
2.3. Imunofenotipul și corelațiile cu anomaliile moleculare în LAL pediatrică.....	54
2.4. Leucemia acută limfoblastică la pacienții cu sindrom Down	55
2.5. Factori de prognostic în LAL.....	56
2.6. Boala minimă reziduală (BMR).....	58
2.7.Tratamentul standard în LAL.....	59
2.8.Tratamentul LAL-T	61
2.9. Terapii recente, țintite molecular în LAL pediatrică	63
2.9.1. Inhibitori de tirozinkinază	63
2.9.2. Inhibitori BCL-2	63
2.9.3. Inhibitori de proteasom	64
2.10. Imunoterapia	64
2.10.1. CAR-T.....	64
2.10.2 Anticorpi monoclonali	65
2.11. Rolul transplantului de celule stem hematopoietice în LAL	67
II. Contribuții personale.....	69
Introducere	69
3.1. Obiective	69
3.2 Pacienți și metode	70
3.2.1. Proceduri de diagnostic.....	71
3.2.2. Definiții	71
3.2.3. Variabile.....	71
3.2.4. Tratamentul utilizat în lotul de pacienți cu LAM analizat	72
3.2.5. Prelucrarea statistică a datelor.....	74

3.3. Rezultate	75
3.3.1. Caracteristici generale ale lotului de pacienți cu LAM.....	75
3.3.2. Evoluția și răspunsul la tratament al pacienților cu LAM.....	81
3.3.3. Analiza pacienților cu LAM3 PML-RARA pozitiv.....	90
3.3.4. Analiza lotului de pacienți cu LAM fără LAM3.....	96
3.3.5. Analiza lotului de pacienți cu LAM FLT3 versus lotul de pacienți cu LAM fără mutații FLT3	107
3.3.6. Anomalii ale cariotipului	110
3.4. Discuții.....	112
3.4.1. Rezultate supraviețuire și mortalitate precoce	112
3.4.2. LAM și Sindrom Down.....	115
3.4.3. LAM3.....	116
3.4.4. LAM FLT3-ITD.....	118
3.4.5. Limitările studiului.....	119
3.5. Concluzii	119
Capitolul 4.....	122
Studiul 2. Analiza moleculară și impactul acesteia asupra managementului și supraviețuirii în LAL la copil și adolescent.....	122
4.1. Obiective	122
4.2. Pacienți și metode	123
4.2.1. Proceduri de diagnostic	123
4.2.2. Definiții	124
4.2.3. Tratamentul utilizat.....	124
4.2.4. Analiza statistică	125
4.3. Rezultate	127
4.3.1 Caracteristici lot pacienți cu LAL.....	127
4.3.2. Evoluție și răspuns la tratament	133
4.3.3. Corelații între intervalul de vârstă la diagnostic, caracteristicile biologice și moleculare și supraviețuirea pacienților.....	148
4.3.4. Corelații între tipul imunofenotipic al LAL, tabloul biologic, evoluția și supraviețuirea pacienților	150
4.3.5. Analiza supraviețuirii pentru pacienții care au prezentat anomalii moleculare la debut.....	152
4.3.6. Analiza lotului de pacienți cu LAL și rearanjament ETV6-RUNX1	157
4.3.7. Corelații între numărul leucocitelor la debut, infiltrarea SNC la diagnostic și rata de supraviețuire a pacienților	159
4.4. Discuții.....	160
4.4.1. LAL și Sindrom Down.....	160
4.4.2. Susceptibilitate genetică și antecedente eredo-colaterale la pacienții cu LAL pediatrică.....	163
4.4.3. Profilul pacienților cu anomalii moleculare	164
4.4.4. Terapii țintite molecular	167

4.4.5. LAL la adolescenți	170
4.4.6. LAL-T	171
4.4.7. Toxicitatea L-Asparaginazei în tratamentul de primă linie în LAL pediatrică	173
4.4.8. Discuții despre rezultatele analizei supraviețuirii	176
4.4.9. Limitările studiului.....	178
4.5. Concluzii	179
Capitolul 5.....	182
5 Concluzii și contribuții personale	182
5.1. Concluzii	182
5.2. Contribuții personale.....	187
Bibliografie	190
Anexe	227

Lista cu abrevieri

AIEOP -Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica

ATO- Trioxidul de arsenic

ATRA- Acidul all trans retinoic

BFM- Berlin-Frankfurt-Munster

BMR- Boala minimă reziduală

CBF- Core binding factor

CCG -Childhood Cancer Group

CI- Interval de confidență

CID- Coagulare intravasculară diseminată

CLL1- Molecula 1 tip C lectin like

COG- Children's Oncology Group

CTCAE- Criteriile Comune pentru Toxicitate și Efecte Adverse

EFS- Supraviețuire liberă de evenimente

EORTC -European Organization of Research and Treatment of Cancer),

FAB- Franco-American-British

FISH- Hibridizarea fluorescentă în situ

FLT3- FMS like tirozin kinaza 3

Hb-Hemoglobina

HDAC- Histon deacetilaza

i.v.- intravenos

iAMP21- Amplificarea intracromozomială a cromozomului 21

IGH- lanțurile grele ale imunoglobulinelor

ITD- Duplicații tandem interne

LAL- Leucemia acută limfoblastică

LAM - Leucemia acută mieloidă

LAP- Leucemia acută promielocitară

LCR-Lichid cefalo-rahidian

MRC -Medical Research Council

NGS- Secvențierea de nouă generație

OMS- Organizația Mondială a Sănătății

Ph- Philadelphia

RT-PCR- Reacția de polimerizare în lanț

SNC- Sistemul nervos central

TKD- Domeniul tirozin kinazei

Introducere

Leucemiile acute reprezintă cea mai frecventă malignitate la copii și adolescenți și în același timp o cauză importantă a mortalității prin cancer la aceste categorii de vârstă.

Leucemia acută limfoblastică (LAL) este cel mai des întâlnit tip de cancer la vârstă pediatrică, constituind aproximativ 25% dintre neoplaziile diagnosticate la copil și având o incidență anuală de aproximativ 36 de cazuri la un milion (Inaba, 2021; Horibe, 2013).

Probabilitatea de supraviețuire în LAL pediatrică s-a îmbunătățit semnificativ în ultimele 5 decade datorită chimioterapiei intensive, terapiei stratificate și individualizate, adaptate în funcție de încadrarea în categoria de risc a bolii și datorită terapiei suportive adecvate. Supraviețuirea la 5 ani la copiii cu vârsta >1 an cu LAL în S.U.A. și Europa a crescut de la sub 5% la începutul anilor 60 la 85-90% în prezent. Din punct de vedere genetic, LAL este o boală heterogenă. Analiza genomică a evidențiat peste 30 subtipuri moleculare de LAL care sunt asociate fie cu aneuploidii cromozomiale, cu rearanjamente ce implică oncogene sau factori de transcripție sau cu mutații punctiforme (Inaba, 2021). Caracterizarea genetică în LAL este foarte importantă întrucât identifică anomalii moleculare cu risc nefavorabil, influențează deciziile terapeutice prin încadrarea pacienților în categoriile de risc ale protocoalelor terapeutice actuale sau prin justificarea indicației de allo transplant de celule stem hematopietice și de asemenea, contribuie la translarea către terapia țintită molecular care reduce riscul recidivei. Principalele terapii noi în LAL, țintite molecular sau la nivelul markerilor de suprafață prezenți la nivelul blastilor leucemici sunt: imunoterapia (anticorpilor bispecifici precum Blinatumomab, terapia cu celule CAR-T și anticorpilor conjugați precum Inotuzumab) inhibitorii de tirozinkinază, inhibitorii BCL2, inhibitorii de proteasom.

Leucemia acută mieloidă (LAM) este o boală relativ rară la copil, având o incidență de aproximativ 7 cazuri la un milion și reprezintă 15-20% din totalul leucemiilor acute pediatrice. Incidența este mai mare la copiii sub 2 ani și apoi la adolescenții cu vârsta de peste 15 ani (Reinhardt, 2022; De Kouchkovsky, 2016). În ultimii ani s-au înregistrat progrese semnificative în ceea ce privește îmbunătățirea supraviețuirii globale în LAM pediatrică, în special datorită protocoalelor de tratament intensificate în care se realizează stratificarea pacienților în funcție de categoria de risc și a unei terapiei suportive susținute și adecvate. Cu toate acestea, supraviețuirea globală și rata de EFS la 3 ani au valori mult mai mici decât în LAL pediatrică, atingând valori de 65%, respectiv 45% (Aplenc, 2020; Conneely, 2021), iar rata de recidivă se situează între valorile de 25-35% (Zwaan, 2015).

La fel ca și în cazul LAL pediatrice, genetica moleculară a LAM are un rol foarte important atât în înțelegerea mecanismelor leucemogenezei, precum și în determinarea prognosticului și alegerea strategiei terapeutice, iar ultima clasificare OMS a LAM include subtipuri de LAM cu anomalii genetice recurente (Arber, 2016).

În partea generală a acestei lucrări (**Capitolul 1 și Capitolul 2**), am prezentat pe scurt date teoretice despre stadiul actual al cunoașterii în LAM pediatrică, respectiv LAL pediatrică, accentuând particularitățile anomaliilor moleculare și implicațiile acestora în realizarea noilor clasificări și stratificări de risc, în justificarea deciziilor terapeutice și în integrarea unor terapii noi, țintite molecular. În ultimii zece ani, în centrul de tip terțiar de Hemato-Oncologie al Spitalului pentru Copii “Sf. Maria” Iași unde îmi desfășor activitatea, s-au implementat analize de biologie moleculară care au fost incluse în panelul standard de diagnostic și apoi de monitorizare al fiecărui caz nou diagnosticat, atât cu LAL cât și cu LAM, acestea realizându-se prin colaborare cu Institutul Regional de Oncologie Iași, Laboratorul de Biologie Moleculară.

Studiul 1 prezentat în **Capitolul 3** din partea dedicată contribuțiilor personale se numește **Analiza moleculară și impactul acesteia asupra managementului în LAM pediatrică** și include un număr de 54 de pacienți cu LAM diagnosticați în Secția de Hemato-Oncologie a Spitalului pentru Copii “Sf. Maria” Iași în intervalul 2010-2019. **Studiul 2** (prezentat în **Capitolul 4** din partea specială de contribuții personale) este centrat pe analiza moleculară și impactul acesteia asupra managementului și supraviețuirii în LAL pediatrică și este un studiu retrospectiv observațional care include un număr de 165 de pacienți cu LAL diagnosticați în Secția de Hemato-Oncologie a Spitalului pentru Copii “Sf. Maria” Iași în perioada 2010-2019.

Categoria de pacienți cu Sindrom Down și leucemie acută (LAL și LAM) a fost abordată detaliat în subcapitolele de discuții, unde au fost prezentate și rezultatele studiului retrospectiv observațional efectuat pe un lot de 21 de pacienți cu leucemie acută și Sindrom Down din trei centre hemato-oncologice de tip terțiar din țară. Studiul 2 prezintă și analiza diferitelor tipuri de toxicitate ale L-asparaginazei în tratamentul de primă linie al LAL și corelațiile diferitelor tipuri de efecte adverse cu tabloul biologic, molecular și cu supraviețuirea pacienților.

Contribuții personale

Capitolul 3

Studiul 1: Analiza moleculară și impactul acesteia asupra managementului în LAM pediatrică

3.1. Obiective

1. Analiza rezultatelor evaluării moleculare a pacienților cu LAM pediatrică diagnosticați pe o perioadă de 10 ani precum și a rolului pe care îl are analiza moleculară în stabilirea conduitei terapeutice.
2. Identificarea factorilor de prognostic care au avut un impact semnificativ asupra supraviețuirii.
3. Analiza separată a lotului de pacienți cu LAM și mutații ale FLT3 în comparație cu lotul de pacienți cu LAM fără mutații ale FLT3
4. Analiza lotului de pacienți diagnosticați cu LAP și analiza în detaliu a pacienților cu Sindrom Down și LAM.

3.2. Pacienți și metode

Criterii de eligibilitate:

1. LAM nou diagnosticată conform criteriilor OMS și FAB în cadrul Spitalului pentru Copii "Sf. Maria" Iași în perioada 2010-2019.
2. Vârsta pacientului între 0-18 ani.
3. Consimțământ semnat de unul dintre părinții pacientului privind acceptul investigațiilor medicale și utilizării datelor din fișa de observație în cercetarea științifică.

Criterii de excludere:

1. Lipsa datelor privind analiza moleculară sau imunofenotipică la debut.
2. Lipsa datelor necesare monitorizării evoluției pacientului.

3. Nesemnarea de către părinți a consimțământului privind acceptul investigațiilor medicale și utilizării datelor din fișa de observație în cercetarea științifică.

Au fost evaluați pentru eligibilitate un număr de 56 de pacienți cu diagnosticul de LAM și au fost înrolați în acest studiu retrospectiv observațional 54 de pacienți diagnosticați cu LAM în perioada ianuarie 2010- decembrie 2019 în cadrul Secției de Hemato-Oncologie a Spitalului pentru Copii "Sf. Maria" Iași. Au fost excluși doi pacienți pentru care nu erau disponibile date privind analiza moleculară la debut. Pacienții au fost urmăriți până la deces sau până la data de referință 1 iunie 2021. Studiul retrospectiv al foilor de observație ale pacienților a fost aprobat de Comitetul Etic al Spitalului pentru Copii "Sf. Maria" Iasi (6877/26.02.2020).

Diagnosticul s-a efectuat conform criteriilor OMS și FAB, toți pacienții au efectuat la diagnostic aspirat medular cu flow-citometrie și analiză moleculară (NPM1, FLT3- ITD, FLT3 D835, PML-RAR α , CBF β -MYH11, AML1-ETO). Analiza moleculară s-a realizat la Institutul Regional de Oncologie Iași, Laboratorul de Biologie Moleculară.

Remisiunea completă a fost definită conform criteriilor International Working Group (Cheson, 2003) ca <5% blaști în măduva osoasă, inexistența blaștilor în sângele periferic, numărul de trombocite > 50.000/mm³ fără a primi suport trombocitar, neutrofile >1000/ mm³ după faza de Inducție. Remisiunea parțială a fost definită ca existența unui procent de blaști în măduva osoasă între 5-25% după prima cură de inducție. Decesul precoce a fost definit ca decesul apărut în primele 28 de zile după diagnostic. Infiltrarea leucemică la nivelul sistemului nervos central (SNC) reprezintă prezența în lichidul cefalo-rahidian a peste 5 blaști/mm³. Recidiva a fost definită ca recurența leucemiei indiferent de localizare. Toxicitatea postterapie a fost definită conform criteriilor versiunii 5.0 a Criteriilor Comune pentru Toxicitate și Efecte Adverse (CTCAE).

Pacienții cu LAM 3 au efectuat protocolul **GIMEMA-AIDA 2000** și au fost încadrați în grupa de risc înalt dacă au avut numărul leucocitelor la diagnostic > 10.000/mm³. Pacienții cu LAM care nu au avut LAM3 au fost tratați conform protocolului de tratament **AIEOP-LAM 2002**. Pacienții cu LAM și Sindrom Down au efectuat protocolul AIOEP-LAM 2002, brațul adaptat pentru pacienții cu Sindrom Down.

Variable

Variabilele obținute din foile de observație și analizate au fost:

- parametri demografici (vârstă, sex)
- asocierea cu un sindrom genetic preexistent (Sindrom Down)
- parametri clinici (modalitatea de debut, manifestări hemoragice în momentul diagnosticului, hepatomegalie, splenomegalie, hipertrofie gingivală la diagnostic)
- valorile hematologice la debut: număr leucocite, valoarea Hb, valoarea trombocitelor, procentul blaștilor în sânge periferic și în măduva osoasă
- profilul probelor de coagulare, prezența sindromului de CID la diagnostic
- tipul morfologic FAB al LAM
- imunofenotiparea din proba de aspirat medular la debut și la evaluările succesive
- biologia moleculară (NPM1, FLT3- ITD, FLT3 D835, PML-RAR α , CBF β -MYH11, AML1-ETO) la debut și la evaluările succesive
- examenul citogenetic
- tipul de terapie efectuat, încadrarea în grupa de risc,
- toxicitatea terapiei, tipurile de complicații și frecvența acestora în funcție de faza de tratament
- mortalitatea precoce în Inducție
- cauzele de deces
- rata de remisiune completă, rata de supraviețuire globală, rata de supraviețuire fără evenimente (EFS)
- rata de recidivă

Prelucrarea statistică a datelor

Analiza statistică a fost efectuată utilizând programul de analiză statistică IBM SPSS, versiunea 25.0 (Armonk, NY). Analiza descriptivă a fost efectuată utilizând analiza frecvențelor și procentelor pentru variabilele de tip categorial și mediana cu valorile minime și maxime pentru variabilele de tip cantitativ. Supraviețuirea globală a fost calculată ca timpul de la data diagnosticului până la data decesului sau data ultimei evaluări. Supraviețuirea liberă de evenimente (EFS) a fost calculată ca timpul de la data diagnosticului la data primului eveniment precum decesul, recidiva, rezistența la tratament, a doua malignitate sau data ultimei evaluări dacă nu a apărut nici un eveniment din cele enunțate mai sus. Supraviețuirea globală și supraviețuirea liberă de evenimente (EFS) au fost estimate cu ajutorul curbei Kaplan-

Meier. Subgrupurile au fost comparate utilizând testul log-rank (Mantel-Cox). Valoarea p a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic la valori <0.05 . Modelul regresiei Cox a fost utilizat pentru analiza multivariată a supraviețuirii globale și a supraviețuirii libere de evenimente (EFS). Analiza bivariată a fost folosită pentru analiza corelațiilor între variabilele observate. Am utilizat regresia logistică multiplă pentru analiza corelației între două sau mai multe variabile independente și o singură variabilă dependentă. Data de referință a analizei statistice este 1 iunie 2021.

3.3. Rezultate

3.3.1. Caracteristici generale ale lotului de pacienți cu LAM

În acest studiu au fost incluși 54 de pacienți diagnosticați cu LAM în perioada ianuarie 2010-decembrie 2019 în Secția Hemato-Oncologie a Spitalului pentru Copii „Sf. Maria” Iași. Caracteristicile clinice, hematologice și moleculare ale lotului de pacienți cu LAM sunt sintetizate în tabelul 3.1.

Din punct de vedere al biologiei moleculare, la doi (3,7%) dintre pacienți s-a identificat rearanjamentul CBF beta MYH11, iar la zece pacienți (18,5%) s-a pus în evidență gena de fuziune PML-RARA. Șase pacienți (11,1%) au prezentat mutații FLT3 și trei pacienți au avut mutații ale genei NPM1 (5,6%). Doi dintre pacienți au prezentat asocierea mutațiilor FLT3 ITD cu mutații NPM1, iar doi pacienți au prezentat asocierea PML RARA cu mutații FLT3 ITD. 70,7% dintre pacienți nu au prezentat anomalii moleculare identificate la diagnostic (Figura 3.1.). Examenul citogenetic a fost disponibil pentru 14 pacienți, patru dintre pacienți au prezentat trisomie 21, un pacient trisomie 8, un pacient a prezentat translocția $t(3:5)(q21:q31)$, iar 8 pacienți au avut cariotip normal.

După prima cură de Inducție, în ziua +28 de la inițierea Inducției, 39(72,2%) de pacienți au prezentat remisiunea bolii, dintre care 29(53,7%) au prezentat remisiune completă și 10 pacienți (18,5%) remisiune parțială. 13 pacienți (24,1%) au decedat în primele 28 de zile după diagnostic. Cauzele de deces precoce au fost: hemoragii severe (6), infecții severe (4), progresia bolii (3). De asemenea, este de remarcat faptul că toți cei patru pacienți care au prezentat numărul de leucocite la diagnostic $> 200.000/ mm^3$, au decedat în prima săptămână de la debut. Trei dintre ei au prezentat hemoragii severe pe fondul leucostazei și tulburărilor de coagulare, iar unul dintre ei a decedat în urma unei infecții sistemice severe.

Tabel 3.1. Caracteristicile clinice, hematologice și moleculare ale întregului lot de pacienți cu LAM

	Număr =54	Procent %
Sex		
Feminin	29	53,7%
Masculin	25	46,3%
Sindrom Down	4	7,4%
Mediana vârstei la diagnostic (range)	10,9 ani (0,1-17,9)	
Vârsta		
<3 ani	10	18,5%
3-10 ani	16	29,6%
>10 ani	28	51,9%
Mediana Leucocite la diagnostic	19.580/mm³ (900-593.260)	
Număr leucocite		
< 10.000/mm³	19	35,2%
10.000-99.000/mm³	22	40,7%
≥100.000//mm³	13	24,1%
Mediana Trombocite la diagnostic	26.500/mm³(2000-261.000)	
Număr trombocite		
<10.000/mm³	11	20,3%
10.000-30.000/mm³	19	35,2%
>30.000/mm³	24	44,4%
Afectare SNC la debut	4	7,4%
Anomalii moleculare		
AML-ETO	0	0%
CBF beta-MYH11	2	3,7%
PML-RARA	10	18,5%
NPM1	3	5,6%
FLT3	6	11,1%
Subtip FAB		
M0	0	0%
M1	3	5,6%
M2	13	24,1%
M3	10	18,5%
M4	6	11,1%
M5	16	29,6%
M6	0	0%
M7	6	11,1%
CID la debut	21	38,9%

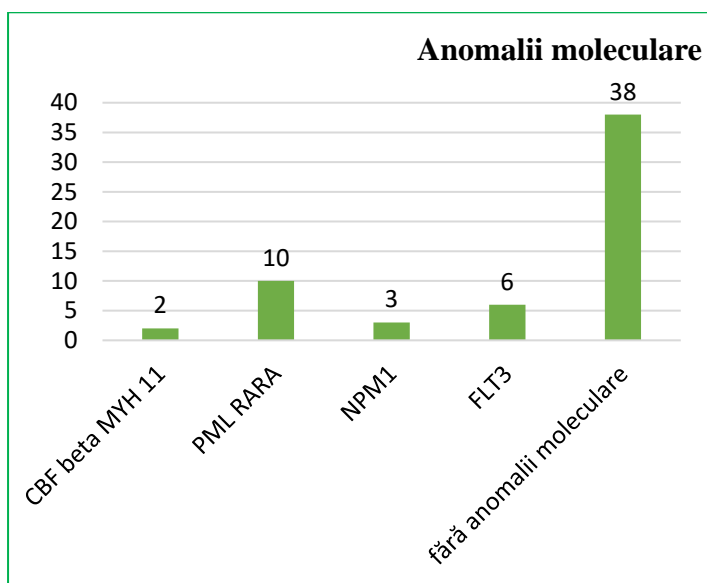


Figura 3.1. Distribuția anomaliilor moleculare identificate în lotul de pacienți diagnosticați cu LAM

Tabel 3.2. Evoluția și răspunsul la tratament pentru întreg lotul de pacienți cu LAM

	Număr pacienți (%)
Remisiune completă	29 (53,7%)
Remisiune parțială	10 (18,5%)
Deces precoce în Inducție	13 (24,1%)
Mortalitate asociată terapiei	10 (18,5%)
Recidivă	8(14,8%)
Supraviețuire globală	46,3%
EFS	44,4%
Transplant	8(14,8%)

Supraviețuirea globală a întregului lot de pacienți cu LAM, estimată prin curba Kaplan Meier a fost de 46,3% (fiind ilustrată în figura 3.2.), cu estimarea mediei supraviețuirii de 5,28 ani \pm 0,72 ani, 95% CI: 3,86-6,70 ani. Probabilitatea de supraviețuire fără evenimente legate

de recidiva bolii, deces sau a doua malignitate, a fost de $44,4\% \pm 6,8\%$, iar estimarea mediei duratei de supraviețuire fără evenimente este de $5 \text{ ani} \pm 0,72 \text{ ani}$ cu $95\% \text{ CI: } 3,66\text{-}6,49 \text{ ani}$.

S-a constatat că supraviețuirea globală a variat în funcție de tipul FAB al LAM, supraviețuirea globală fiind de $66,7\%$ în cazul pacienților cu LAM7, $53,8\%$ pentru pacienții cu LAM2, 50% pentru pacienții cu LAM3, $43,8\%$ pentru pacienții cu LAM5, $33,8\%$ pentru pacienții cu LAM1 și doar $16,7\%$ pentru pacienții cu LAM4.

12 pacienți au plecat în timpul protocolului de chimioterapie sau după încheierea acestuia în centre din țară sau din afara țării unde 8 dintre ei au efectuat transplant de celule stem hematopoietice (4 haplotransplant, 3 allotransplant de la donator înrudit și un pacient allotransplant de la donator neînrudit). Șase pacienți au efectuat transplantul în prima remisiune completă și doi l-au efectuat în momentul primei recidive. Dintre pacienții care au efectuat transplant, 4 au decedat (fie prin complicații posttransplant sau prin progresia bolii după recidivă posttransplant) și 4 supraviețuiesc. Supraviețuirea globală a pacienților care au efectuat transplant a fost de 50% față de $45,7\%$ a celor care nu au efectuat transplant ($p = 0,463$), neexistând o diferență semnificativ statistică între cele două grupuri de pacienți, dar datele trebuie interpretate cu precauție datorită numărului mic de pacienți care au trecut prin procedura de allo transplant.

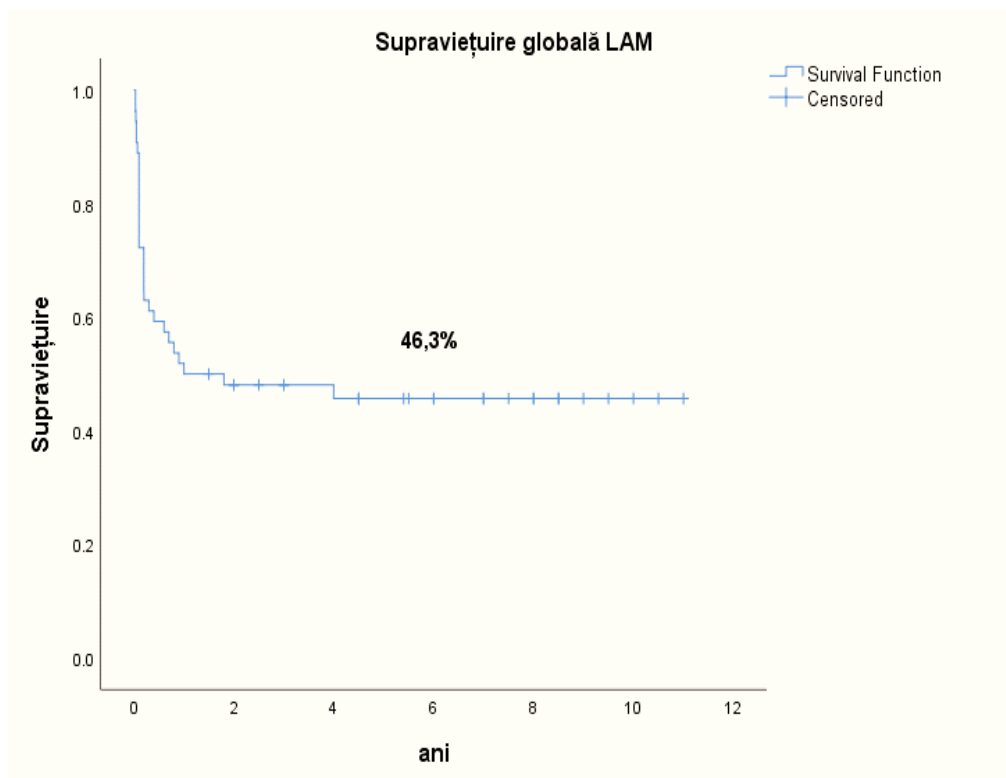


Figura 3.2. Curba Kaplan-Meier a supraviețuirii globale pentru întreg lotul de pacienți cu LAM

29 (53,7%) dintre pacienții diagnosticați cu LAM au decedat, principalele cauze de deces fiind hemoragiile fulminante (8), infecțiile (10), progresia bolii (8), complicațiile posttransplant (3), insuficiența hepatică (1).

Analiza multivariată prin modelul regresiei Cox, a relevat faptul că sexul masculin ($p = 0.004$, HR: 3.589, 95%CI:1.516-8.499), prezența hepato-splenomegaliei importante în momentul diagnosticului ($p=0.008$, HR:3.887, 95%CI:1.415-10.679) și vârsta la diagnostic > 10 ani ($p=0.03$, HR: 2.921, 95% CI: 1.106-7.710) sunt predictorii independenți semnificativi din punct de vedere statistic pentru o durată de supraviețuire mai mică (Tabel 3.3.).

De asemenea, așa cum se observă în tabelul 3.3., pentru întreg lotul de pacienți cu LAM, numărul de leucocite la diagnostic $>100.000/mm^3$ ($p=0.650$, HR:1.284), identificarea mutațiilor FLT3-ITD ($p=0.392$, HR:1.815), precum și prezența sindromului CID în momentul diagnosticului ($p=0.591$, HR:1.372), influențează negativ supraviețuirea globală, dar nu într-un mod semnificativ statistic. Mutațiile NPM1, prezența PML-RAR alfa și CBF beta-MYH11 cresc durata supraviețuirii, dar nu semnificativ din punct de vedere statistic.

Tabel 3.3. Analiza multivariată prin regresie Cox pentru factorii independenți de prognostic ai supraviețuirii globale în lotul de pacienți cu LAM

	p	HR	95% CI pentru HR	
Sex	.004	3.589	1.516	8.499
Vârsta >10 ani	.030	2.921	1.106	7.710
Număr leucocite >100.000/mm³ la debut	.650	1.284	.437	3.774
Hepato-splenomegalie	.008	3.887	1.415	10.679
Hipertofie gingivală la debut	.592	.746	.256	2.174
Blaști în sângele periferic > 50% la debut	.819	.892	.335	2.378
CID la debut	.591	1.372	.433	4.346
Mutații NPM1	.249	.242	.022	2.703
Mutații FLT3-ITD	.392	1.815	.464	7.091
PML-RAR alfa	.744	.781	.177	3.448
CBF beta-MYH11	.735	.663	.061	7.159

Analiza multivariată prin modelul regresiei Cox, a relevat faptul că sexul masculin ($p=0.005$, HR:3.352, 95% CI:1.444-7.779), hepato-splenomegalia importantă în momentul diagnosticului ($p=0.006$, HR: 3.931, 95% CI: 1.484-10.412) și vârsta la diagnostic peste 10 ani ($p=0.029$, HR:2.846, 95% CI:1.111-7.291) sunt factori predictorii independenți semnificativi din punct de vedere statistic pentru o rată a EFS mai mică.

De asemenea, se poate observa că, pentru întreg lotul de pacienți cu LAM, numărul de leucocite la diagnostic $>100.000/\text{mm}^3$ ($p=0.454$, HR:1.476), identificarea mutațiilor FLT3- ITD ($p=0.383$, HR: 1.818) la diagnostic și prezența CID în momentul diagnosticului ($p=0.795$, HR: 1.160), sunt factori care influențează negativ rata EFS, dar nu într-un mod semnificativ din punct de vedere statistic. În lotul de pacienți analizat, mutațiile NPM1 ($p=0.254$, HR: 0.244), prezența PML-RAR alfa ($p=0.893$, HR: 0.904), și prezența CBF beta-MYH11 ($p=0.540$, HR: 0.481) cresc rata de EFS, dar nu semnificativ din punct de vedere statistic.

3.3.2. Analiza pacienților cu LAM3 PML-RARA pozitiv versus lot pacienți cu LAM excluzând LAM3

În perioada 2010-2019 au fost confirmate 10 cazuri de **LAM3** din totalul de 54 de LAM diagnosticate, ceea ce înseamnă un procent de 18,5% din totalul cazurilor de LAM. Doi pacienți au avut asociate mutații ale FLT3-ITD și unul dintre pacienți a avut mutația NPM1 asociată transcriptului PML-RARA. La toți cei zece pacienți cu LAM3, s-a detectat gena de fuziune PML-RARA, doi pacienți au avut descrisă și izoforma, la unul dintre pacienți fiind detectată izoforma bcr1 și la celălalt pacient, izoforma bcr2.

Conform clasificării Sanz (Sanz et al, 2019) care ține cont de numărul de leucocite și de numărul de trombocite în momentul diagnosticului, 4 cazuri au fost încadrate în grupul high-risk, 4 cazuri în grupul de risc intermediar și două cazuri în grupul low risk.

Se remarcă numărul de trei decese precoce ale copiilor cu LAM3, în primele zile după momentul diagnosticului, toate cele trei decese fiind prin hemoragii severe în contextul în sindromului de CID cu fibrinoliză de la debut. Mediana numărului de zile de la diagnostic la deces a fost de 5 zile. Două dintre cazurile de hemoragie cerebrală ce au avut loc în primele zile ale inducției au fost în rândul pacienților încadrați în grupa high risk, având un număr de leucocite la diagnostic $> 10.000/\text{mm}^3$ ($143.000/\text{mm}^3$, respectiv $13.590/\text{mm}^3$).

Un singur pacient a prezentat recidiva bolii, iar decesul acestui pacient s-a produs prin manifestare hemoragică secundară progresiei bolii. O pacientă a decedat prin progresia bolii, ca urmare a refuzului de a efectua protocolul de tratament. Cinci pacienți trăiesc, se află în remisiune completă și toți au încheiat protocolul de chimioterapie.

Nici un pacient cu LAM 3 nu a efectuat transplant de celule stem. Supraviețuirea globală a pacienților cu LAM3 a fost de 50%, media estimată a supraviețuirii fiind de 5 ± 1 ani (1,9 ani- 8 ani), iar probabilitatea de supraviețuire fără evenimente (rata de EFS) a fost de 50%. S-a observat că supraviețuirea globală a fost mai mare pentru pacienții de sex feminin (75%) comparativ cu sexul masculin (33,3%), dar fără a se înregistra o diferență semnificativ statistic ($p = 0.234$).

Supraviețuirea globală pentru **lotul de pacienți cu LAM excluzând pacienții diagnosticați cu LAM3** a fost de 45,5%, cu o durata medie estimată a supraviețuirii de $5,2 \pm 0,7$ ani (3,6 - 7,6 ani). Probabilitatea supraviețuirii fără evenimente (EFS) a fost de 43,2%, cu media estimată a duratei de supraviețuire fără evenimente de $4,9 \pm 0,7$ ani (3,3 ani - 6,5 ani). Supraviețuirea pacienților care au reușit să obțină remisiunea completă la bilanțul din ziua 28, după prima cură de Inducție a fost de 73,9%, semnificativ mai mare decât supraviețuirea globală a pacienților care au obținut doar remisiune parțială după prima cură de Inducție care a fost de 20% ($p = 0.003$, HR: 3.729; CI 95%: 1.894-7.341).

Supraviețuirea globală a pacienților care au prezentat recidiva bolii a fost mică (14,3%), comparativ cu supraviețuirea globală de 51,4 % pentru pacienții la care nu s-a înregistrat recidiva bolii ($p = 0.292$). Media estimată a duratei de supraviețuire pentru pacienții cu recidivă a bolii a fost de $1,6 \pm 0,63$ ani (0,4 ani – 2,8 ani), iar pentru pacienții fără recidivă a bolii, media estimată a duratei de supraviețuire a fost de $5,7 \pm 0,88$ ani (4 ani – 7, 4 ani).

În ceea ce privește supraviețuirea globală a pacienților care au efectuat transplant de celule stem hematopoietice, aceasta a fost de 50% față de 44,4% supraviețuirea globală pentru pacienții care nu au efectuat transplant, fără a se constata o diferență semnificativă statistic între cele două grupuri de pacienți, ($p = 0.418$).

Luând în considerare variabilele care ar putea influența probabilitatea apariției decesului precoce în inducție, analiza multivariată prin modelul regresiei a evidențiat că adolescenții cu vârsta peste 14 ani ($p = 0.031$, Odds Ratio: 20.219, 95% CI: 1.326-308.349) și pacienții cu o valoare a LDH > 1.000 U/l la debutul bolii ($p = 0.037$, Odds Ratio: 13.116, 95% CI: 1.164-147.797) au un risc semnificativ statistic mai mare de deces în primele 28 de zile.

Tabel 3.4 Analiza comparativă a lotului de pacienți cu LAM excluzând LAM3 versus lotul de pacienți cu LAM3

	LAM n=44	LAM3 PML-RARA pozitiv n=10	p
Sex			0.345
Masculin	19 (43,2%)	6 (60%)	
Feminin	25 (56,8%)	4 (40%)	
Sindrom Down	4 (9,1%)	0 (0%)	0.331
Mediana vârstei la diagnostic	11,3 ani (0,1-17,9)	9,6 ani (1,4-15,5)	0.404
Mediana leucocite la diagnostic	25.190/mm ³ (14.805-93.260)	7.125/mm ³ (900-143.000)	0.049
Mediana Trombocite la diagnostic	27.500/mm ³ (2.000-261.000)	15.000/mm ³ (4.000-231.000)	0.084
Mediana LDH la debut	1.221 U/l (316-11.550)	665 U/l (313-3.164)	0.031
Subtip FAB			
M1	3(6,81%)		
M2	13 (29,54%)		
M4	6 (13,63%)		
M5	16 (36,36%)		
M7	6 (13,63%)		
CID la debut	11 (25%)	10	< 0.0001
Anomalii moleculare			
AML-ETO	0 (0%)		
CBF beta-MYH11	2 (4,5%)		
NPM1	2 (4,5%)	1(10%)	0.506
FLT3	4 (9,1%)	2 (20%)	0.331
PML-RARA		10 (100%)	
Remisiune completă după prima cură Inducție	23(52,3%)	6(60%)	0.124
Deces precoce	10 (22,7%)	3 (30%)	0.635
Recidivă	7 (15,9%)	1(10%)	0.643
Mortalitate legată de tratament	10 (22,7%)	0 (0%)	0.098
Supraviețuire globală			
EFS	20 (45,5%)	5(50%)	0.799
Transplant	19 (43,2%)	5 (50%)	0.702
	8 (18,2%)	0 (0%)	

3.3.3. Analiza lotului de pacienți cu LAM FLT3 versus lotul de pacienți cu LAM fără mutații FLT3

Tabel 3.5. Analiza comparativă a lotului de pacienți cu LAM FLT3-ITD versus lotul de pacienți fără mutații FLT3-ITD (aspecte biologice și moleculare)

	LAM FLT3-ITD pozitiv	LAM fără mutații FLT3-ITD	p
Număr	6	48	
Vârsta mediană la diagnostic	13,65 (8-16,9)	8,6 (0,1-17,9)	0.104
Vârsta peste 10 ani	5 (83,3%)	23 (47,9%)	0.105
Sex			0.850
M	3 (50%)	22 (45,8%)	
F	3 (50%)	26 (54,2%)	
Mediana număr Leucocite la diagnostic	32.655/mm ³ (3.380-593.260/mm ³)	18.790/mm ³ (900-487.000)	0.315
Mediana Hb	6,5g/dl (5-10,8)	7,2 (2,3-15)	0.794
Mediana număr trombocite la diagnostic	19.500/mm ³	27.000/mm ³	0.378
Blaști în sângele priferic >50%	4 (66,7%)	16 (33%)	0.149
Hepato-splenomegalie la debut	2 (33,3%)	22 (45,8%)	0.570
CID la debut	5 (83,3%)	16 (33,3%)	0.017
Infiltrare SNC	0 (0%)	4 (8,3%)	0.472
Subtip FAB			
M1	0 (0%)	3 (6,3%)	
M2	3 (50%)	10 (20,8%)	
M3	2 (33,3%)	8 (16,7%)	0.331
M4	1 (16,7%)	5 (10,4%)	
M5	0 (0%)	16 (33,3%)	0.095
M7	0 (0%)	6 (12,5%)	
Anomalii moleculare			
PML-RARA	2	8	0.326
CBF beta-MYH11	0	2 (4,2%)	0.618
NPM1	2 (33,3%)	1 (2,1%)	0.001

Se observă din tabelul 3.5, mediana vârstei la diagnostic mai mare pentru pacienții care prezintă mutații FLT3 ITD (mediana vârstei la diagnostic de 13,6 ani comparativ cu vârsta mediană la diagnostic de 8,6 ani a pacienților cu LAM care nu prezintă mutații FLT3-ITD, $p = 0.104$). De asemenea, pacienții cu mutații FLT3 ITD prezintă mediana numărului de leucocite la diagnostic mai mare decât pacienții care nu prezintă mutații FLT3 ($32.655/\text{mm}^3$ comparativ cu $18.790/\text{mm}^3$), fără a exista totuși o diferență semnificativă din punct de vedere statistic ($p = 0.315$).

Este de remarcat faptul că 83,3% dintre pacienții cu mutații FLT3 au avut sindrom CID la momentul diagnosticului, în comparație cu doar 33,3% dintre pacienții fără mutații FLT3, remarcându-se o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între cele două grupuri de pacienți ($p = 0.017$).

Tabel 3.6. Evoluția și răspunsul la tratament pentru lotul de pacienți cu mutații FLT3-ITD versus lotul de pacienți fără mutații FLT3-ITD

	LAM FLT3 pozitiv n = 6	LAM FLT3 negativ n = 48	p
Remisiune completă	3 (50%)	26 (54,2%)	0.780
Remisiune parțială	1 (16,7%)	9 (18,8%)	
Moarte precoce	1(16,7%)	12 (25%)	0.660
Recidivă	1(16,7%)	7 (14,6%)	0.859
Supraviețuire	2 (33,3%)	23 (47,9%)	0.509
EFS	2 (33,3%)	22 (45,8%)	0.588
Transplant	1(16,7%)	7 (14,6%)	0.859

Supraviețuirea globală pentru lotul de pacienți LAM cu mutații FLT3 ITD a fost de $33,3\% \pm 10,2\%$ comparativ cu $47,9\% \pm 7,2\%$ supraviețuirea globală în lotul de pacienți cu LAM fără mutații FLT3 ITD ($p = 0.509$). Durata medie estimată a supraviețuirii pentru pacienții cu mutații FLT3 a fost de $2,8 \pm 1,2$ ani (0,4 – 5,2), în timp ce durata medie estimată a supraviețuirii pentru pacienții fără mutații FLT3 a fost de $5,4 \pm 0,7$ ani (3,9 – 6,9).

Probabilitatea supraviețuirii fără evenimente (EFS) a fost de 33,3% pentru lotul de pacienți cu LAM și mutații FLT3 față de 45,8% pentru pacienții fără mutații FLT3 ($p = 0.588$) (Figura 3.3.), neobservându-se o diferență semnificativă din punct de vedere statistic. Durata

medie de supraviețuire fără evenimente a fost de $2,6 \pm 1,2$ ani (0,14 ani – 5,13 ani) pentru pacienții cu mutații FLT3 și $5,2 \pm 0,76$ ani (3,7 ani-6,7ani) pentru pacienții fără mutații FLT3.

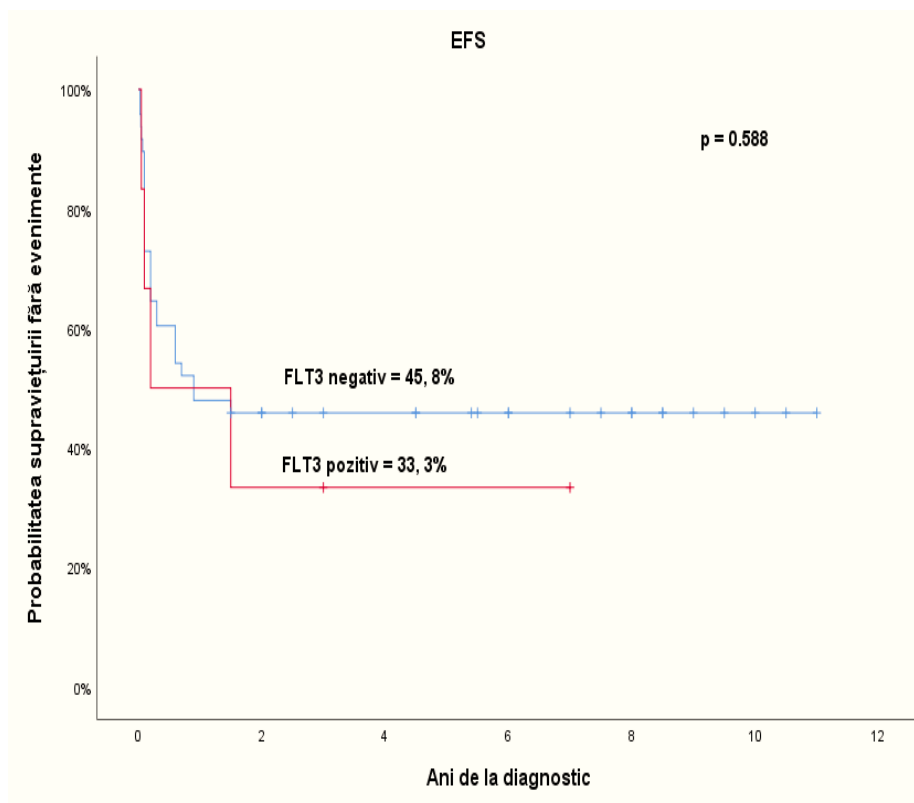


Figura 3.3. Curbele Kaplan-Meier pentru supraviețuirea liberă de evenimente (EFS) pentru lotul de pacienți fără mutații FLT3 (linia albastră) versus lotul de pacienți cu mutații FLT3 (linia roșie)

3.3.4. LAM și Trisomia 21 (Sindrom Down)

În lotul de pacienți incluși în acest studiu, doar patru copii au prezentat asocierea Sindrom Down și LAM, reprezentând un procent de 7,4% din totalul de pacienți diagnosticați cu LAM. Întrucât numărul de pacienți cu Sindrom Down și leucemie acută este mic, am încercat realizarea unui lot mai mare de copii cu Sindrom Down și LAM prin adăugarea la cei patru pacienți a unor pacienți diagnosticați în alte două centre din țară, unul pediatric (Institutul Clinic Fundeni, Clinica de Pediatrie) și altul de adulți (Institutul Clinic Fundeni, Clinica de Hematologie). Astfel, în studiul observațional retrospectiv publicat în 2021, s-a analizat un lot de 21 de pacienți cu Sindrom Down și leucemie acută, diagnosticați în cele trei centre de hemato-oncologie, dintre care șapte pacienți au fost cu LAM și Sindrom Down.

Grupul acestora a fost analizat comparativ cu lotul pacienților cu LAM fără Sindrom Down. (**Schmidt** et al, 2021 a).

Studiul a relevat faptul că vârsta în momentul diagnosticului a fost mai mică pentru pacienții cu Sindrom Down și LAM (2,5 ani) decât pentru cei care au avut doar LAM (11,2 ani) ($p = 0.151$). Mediana numărului de leucocite la diagnostic a fost mai mare pentru copiii cu Sindrom Down decât pentru cei doar cu LAM ($93.040/\text{mm}^3$, versus $21.500/\text{mm}^3$, dar fără o diferență semnificativă din punct de vedere statistic, $p = 0.834$). A existat însă o corelație semnificativă ($p = 0.002$) între subtipul morfologic LAM 7 conform clasificării FAB și asocierea Sindrom Down și LAM. Unul dintre pacienți a prezentat la examenul citogenetic asociat trisomiei 21, trisomia 11, inversia cromozomului 11 și duplicația brațului lung al cromozomului 1.

Complicațiile postchimioterapie ale copiilor cu LAM și Sindrom Down au fost mai puțin severe decât ale copiilor cu LAL și Sindrom Down și au constat mai ales în mucozite severe (42,8% dintre pacienți), sepsis (14,2%), infecții cutanate (28,5%), manifestări hemoragice (28,5%). Mortalitatea asociată cu toxicitatea terapiei a fost de 14,2%, asemănătoare cu cea întâlnită în LAM fără Sindrom Down (16%).

Supraviețuirea globală a fost mai bună pentru pacienții cu Sindrom Down și LAM decât pentru cei doar cu LAM (57,1% comparativ cu 45,1%, $p = 0.479$), dar fără o diferență semnificativă din punct de vedere statistic. Datele în legătură cu supraviețuirea globală au corespuns cu cele din alte studii din literatură care au demonstrat o supraviețuire mai bună pentru copiii cu Sindrom Down și LAM (Qiao, 2018).

Este de remarcat particularitatea recidivei extramedulare, la nivelul pleoapei inferioare drepte în cazul unei paciente cu LAM7 și Sindrom Down. Ciclurile de tratament cu doze mari de Cytarabin au fost foarte eficiente și au confirmat rezultatele anterioare publicate în literatură în studii ex-vivo în ceea ce privește sensibilitatea crescută a mieloblaștilor din LAM asociată cu Sindromul Down (Taub, 1999). De asemenea, trialul AAML 0431 a demonstrat că utilizarea precoce în protocolul de primă linie a curelor cu doze mari de Cytarabin îmbunătățește rata de supraviețuire și de răspuns a copiilor cu Sindrom Down și LAM (Taub, 2017).

Capitolul 4

Studiul 2. Analiza moleculară și impactul acesteia asupra managementului și supraviețuirii în LAL la copil și adolescent

4.1. Obiective

1. Analiza rezultatelor evaluării moleculare a pacienților cu LAL pediatrică și identificarea corelațiilor dintre prezența anomaliilor moleculare, tabloul biologic, răspunsul, complicațiile la tratament, rata de supraviețuire și de EFS.
2. Analiza rolului pe care l-a avut biologia moleculară în stabilirea conduitei terapeutice.
3. Identificarea diferențelor în ceea ce privește supraviețuirea globală a pacienților și a factorilor care au avut impact semnificativ asupra supraviețuirii.
4. Analiza lotului de pacienți cu rearanjament ETV6-RUNX1 în comparație cu lotul de pacienți care nu au prezentat rearanjament ETV6-RUNX1.
5. Analiza în detaliu a pacienților cu Sindrom Down și LAL.

4.2. Pacienți și metode

Criterii de eligibilitate:

1. Pacient cu LAL nou diagnosticată conform criteriilor OMS și FAB în cadrul Spitalului pentru Copii "Sf. Maria" Iași în perioada ianuarie 2010 - decembrie 2019.
2. Vârsta pacientului între 0-18 ani.
3. Consimțământ semnat de unul dintre părinții pacientului privind acceptul investigațiilor medicale și utilizării datelor din fișa de observație în cercetare științifică.

Criterii de excludere:

1. Lipsa datelor privind analiza moleculară sau imunofenotipică la debut.
2. Lipsa datelor necesare monitorizării evoluției pacientului.
3. Neseemnarea de către părinți a consimțământului privind acceptul investigațiilor medicale și utilizării datelor din fișa de observație în cercetarea științifică.

Au fost evaluați pentru eligibilitate un număr de 173 de pacienți cu diagnosticul de LAL și au fost înrolați în acest studiu retrospectiv observațional 165 de pacienți diagnosticați cu LAL în perioada ianuarie 2010- decembrie 2019 în cadrul Secției de Hemato-Oncologie a Spitalului pentru Copii "Sf. Maria" Iași. Au fost excluși opt pacienți pentru care nu au fost disponibile datele necesare privind monitorizarea evoluției. Pacienții au fost urmăriți până la deces sau până la data de referință 1 iulie 2021. Mediana duratei de urmărire a fost de 5 ani (1 lună –11,5 ani). Studiul retrospectiv al foilor de observație ale pacienților a fost aprobat de Comitetul Etic al Spitalului pentru Copii "Sf. Maria" Iasi (6877/26.02.2020).

Proceduri de diagnostic

Diagnosticul pacienților s-a efectuat conform criteriilor OMS (Arber, 2016), toți pacienții au avut la diagnostic aspirat medular cu flow-citometrie în acord cu criteriile grupului european de caracterizare imunologică a leucemiilor (Bene, 1995) și analiză moleculară pentru genele de fuziune ETV6-RUNX1(TEL-AML1), TCF3-PBX1(E2A-PBX1), BCR-ABL1 p190, MLL-AF4, SIL-TAL efectuată prin RT-PCR. Din 2017, răspunsul la tratament s-a evaluat și prin boala minima reziduală realizată prin flow-citometrie multiparametrică (Theunissen, 2017).

Remisiunea completă a fost definită conform criteriilor International Working Group (Cheson, 2003). Remisiunea parțială a fost definită ca existența unui procent de blaști în măduva osoasă între 5-25% în ziua 33 a tratamentului. Răspunsul nefavorabil la prednison a fost definit ca un număr de blaști $> 1.000/\text{mm}^3$ în sângele periferic în ziua 8 a tratamentului. Boala minima reziduală se consideră pozitivă la valori $>0.01\%$. Recidiva a fost definită ca recurența leucemiei indiferent de localizare, toxicitatea postterapie a fost definită conform criteriilor versiunii 5.0. a Criteriilor Comune pentru Toxicitate și Efecte Adverse (CTCAE). Decesul precoce a fost definit ca decesul apărut în primele 33 de zile după diagnostic. Infiltrarea în sistemul nervos central (SNC) reprezintă prezența în lichidul cefalo-rahidian a peste 5 blaști/ mm^3 .

Pacienții cu vârsta între 1-18 ani au fost tratați cu protocolul de chimioterapie ALL IC BFM 2002 (Stary, 2014). Pacienții cu răspuns nefavorabil la prednison în ziua 8 sau lipsa remisiunii complete în ziua 33 sau prezența de anomalii moleculare cu prognostic nefavorabil la debutul bolii, au fost încadrați în brațul de tratament de risc înalt al protocolului și au efectuat brațul HR-2B(BFM) al protocolului, iar restul pacienților au efectuat brațul de risc standard SR-2. Toți pacienții au efectuat în inducție Dexametazonă ca tip de corticoterapie.

Pacienții cu LAL BCR-ABL1 pozitiv au asociat Imatinib la protocolul de chimioterapie ALL IC BFM 2002. Pacienții cu vârsta < 1 an au efectuat protocolul INTERFANT 1999 (Pieters, 2007).

Analiza statistică

Analiza statistică a fost efectuată utilizând programul de analiză statistică IBM SPSS, versiunea 25.0 (Armonk, NY). Analiza descriptivă a fost realizată utilizând analiza frecvențelor și procentelor pentru variabilele de tip categorial și mediana cu valorile minime și maxime pentru variabilele de tip cantitativ. Supraviețuirea globală a fost calculată ca timpul de la data diagnosticului până la data decesului sau data ultimei evaluări. Supraviețuirea liberă de evenimente (EFS) a fost calculată ca timpul de la data diagnosticului la data primului eveniment precum decesul, recidiva, rezistența la tratament, a doua malignitate sau data ultimei evaluări dacă nu a apărut nici un eveniment dintre cele menționate mai sus. Supraviețuirea globală și supraviețuirea liberă de evenimente (EFS) au fost evaluate cu ajutorul curbei Kaplan-Meier. Subgrupurile au fost comparate utilizând testul log-rank (Mantel-Cox). Valoarea p a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic la valori <0.05. Modelul regresiei Cox a fost utilizat pentru analiza multivariată a supraviețuirii globale și a supraviețuirii libere de evenimente (EFS). Analiza bivariată a fost folosită pentru analiza corelațiilor între variabilele observate. Am utilizat regresia logistică multiplă pentru analiza corelației între două sau mai multe variabile independente și o singură variabilă dependentă.

Variabilele obținute din foile de observație care au fost analizate au fost:

- parametri demografici (sex, vârstă, pentru vârstă s-a utilizat atât variabila de tip cantitativ cât și variabile de tip categorial, vârstă <1 an, vârstă 1-10 ani, vârstă 10-14 ani, vârstă >14 ani)
- intervalul anului de diagnostic (intervalele 2010-2014 și 2015-2019)
- asocierea cu sindromul Down
- parametri clinici la debut (modalitate de debut, manifestări hemoragice, în momentul diagnosticului, hepatomegalie, splenomegalie, masă mediastinală, adenopatii)
- valorile hematologice la debut: număr leucocite, valoare Hb, valoare trombocite, procent blaști în sânge periferic și în aspiratul medular (variabile de tip cantitativ), pentru numărul de leucocite la debut, s-au utilizat și variabilele de tip categorial, leucocite >50.000/mm³ și leucocite > 100.000/mm³

- biologia moleculară la debut, ETV6-RUNX1(TEL-AML1), TCF3-PBX1(E2A-PBX1), BCR-ABL1 p190, MLL-AF4, SIL-TAL
- imunofenotipul
- examenul citogenetic
- tipul de celule precursoare determinat prin imunofenotipare
- infiltrarea SNC la debut
- răspunsul la Prednison evaluat în ziua 8 a terapiei
- remisiunea în ziua 33
- boala minimă reziduală în ziua 33, boala minimă reziduală la evaluările succesive
- încadrarea în grupa de risc înalt
- toxicitatea terapiei, tipurile de complicații în funcție de faza de tratament
- toxicitatea la L-asparaginază, alergia la L-asparaginază, hepatotoxicitatea la L-asparaginază, tromboze post L-asparaginază, hiperglicemie, hipertrigliceridemie, osteonecroză post L-asparaginază, pancreatita post L-asparaginază, hipoproteinemia post L-asparaginază
- mortalitatea până în ziua 33 a inducției, mortalitatea în remisiunea completă
- cauzele de deces
- recidiva, tipul de recidivă
- supraviețuirea
- supraviețuirea liberă de evenimente (EFS)

4.3. Rezultate

4.3.1 Caracteristici lot pacienți cu LAL

Tabelul 4.1. sintetizează caracteristicile biologice și moleculare ale lotului analizat de pacienți cu LAL.

Din punct de vedere al biologiei moleculare, 37 dintre pacienți (22,4%) au avut modificări detectate prin RT-PCR, la trei (1,8%) dintre pacienți s-a identificat rearanjament BCR-ABL1, la 7(4,2%) pacienți s-a pus în evidență gena de fuziune TCF3-PBX1 (E2A-PBX1), 25 pacienți (15,2%) au prezentat gena de fuziune ETV6-RUNX1(TEL-AML1), 3 pacienți (1,8%) au avut la diagnostic prezent rearanjamentul MLL-AF4 și 3 pacienți (1,8%) au avut rearanjamentul BCR-ABL P190. (Figura 4.1.). Examenul cariotipului a fost disponibil pentru 20 pacienți,

dintre care trei pacienți au avut trisomie 21, unul dintre ei asociată cu translocția robertsoniană t(14q;21q), trei pacienți au prezentat cromozom Philadelphia, un pacient a prezentat asocierea t(21;21) cu der(1)p22, del1p13, der(1:6), un pacient a prezentat del cr2, del cr5, del cr6, addcr1, addcr11, addcrX, iar restul de 12 pacienți au avut cariotipul normal.

Tabel 4.1. Caracteristici biologice și moleculare ale lotului de pacienți cu LAL

Număr cazuri LAL	n=165
Mediana vârstei la diagnostic	5,4 ani (0,1-17,1 ani)
Adolescenți ≥14 ani	25 (15,2%)
Vârsta 10-13,9 ani	24 (14,5%)
Vârsta 1-10 ani	112 (67,9%)
Vârsta < 1 an	4 (2,4%)
Sex	
Masculin	108 (65,5%)
Feminin	57 (34,5%)
Sindrom Down	3 (1,8%)
Număr leucocite la diagnostic (mediana,range)	12.250/mm ³ (420-1.000.000)
Hb la diagnostic (mediana, range)	6,8g/dl (2-13,5)
Număr trombocite la diagnostic (mediana, range)	37.000/mm ³ (2.000-573.000/mm ³)
Procentul de blaști în sânge periferic (mediana, range)	46% (0-90%)
Mediana valorii LDH la diagnostic	951 U/l (151-18.297)
LAL-T/LAL-celulă precursoră B	26/139 (15,8%/84,2%)
Infiltrare sistem nervos central (SNC)	12 (7,3%)
Anomalii moleculare	37(22,4%)
TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)	7(4,2%)
ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)	25(15,2%)
MLL-AF4	3(1,8%)
SIL-TAL	0(0%)
BCR-ABL P190	3(1,8%)

Pentru întreg lotul de 165 pacienți cu LAL și o durată mediană de follow-up de 5 ani (1 lună-11,5 ani), supraviețuirea globală la 5 ani a fost de 74,5% ± 3,6%. Durata medie estimată a supraviețuirii globale a fost de 8,71 ± 0,3 ani (7,9-9,4) ani. Rata de EFS la 5 ani a fost de 71,3%

$\pm 3,6\%$, iar durata medie estimată a supraviețuirii libere de evenimente a fost de $8,35 \pm 0,3$ ani (7,6-9,1) ani. Supraviețuirea globală a fost mai mare pentru pacienții diagnosticați în intervalul 2015-2019 față de cei diagnosticați în intervalul 2010-2014, 82,2% versus 68,5%, dar fără a se constata o diferență semnificativă statistic ($p = 0.082$). Rata de recidivă a fost de 14,5%, 24 dintre pacienți prezentând recidiva bolii, 15(9%) au avut recidivă medulară, 6(3,63%) pacienți au avut recidivă SNC, iar trei(1,8%) pacienți au avut recidivă combinată (SNC + medulară). 19(11,51%) recidive au fost precoce, iar 5(3%) pacienți au avut recidive tardive. Trei pacienți au avut a doua recidivă a bolii.

Trei pacienți au efectuat transplant de celule stem hematopoietice, doi dintre ei allotransplant de la un donator neînrudit și unul haplotransplant având ca donator mama. La doi dintre pacienți, allotransplantul a fost după prima recidivă (recidivă precoce SNC într-un caz și recidivă combinată tardivă în alt caz), iar la al treilea, a fost un haplotransplant în prima remisiune completă. Un pacient a avut a doua recidivă a bolii după aproximativ un an de la allotransplant. Dintre cei trei pacienți care au efectuat transplant, doi supraviețuiesc și al treilea a decedat ca urmare a complicațiilor post haplotransplant.

42 dintre pacienți au decedat, cauzele de deces fiind progresia bolii (19), infecții (15), toxicitate postchimioterapie (5), manifestări hemoragice (2), complicații post haplotransplant (1).(Figura 4.2.)

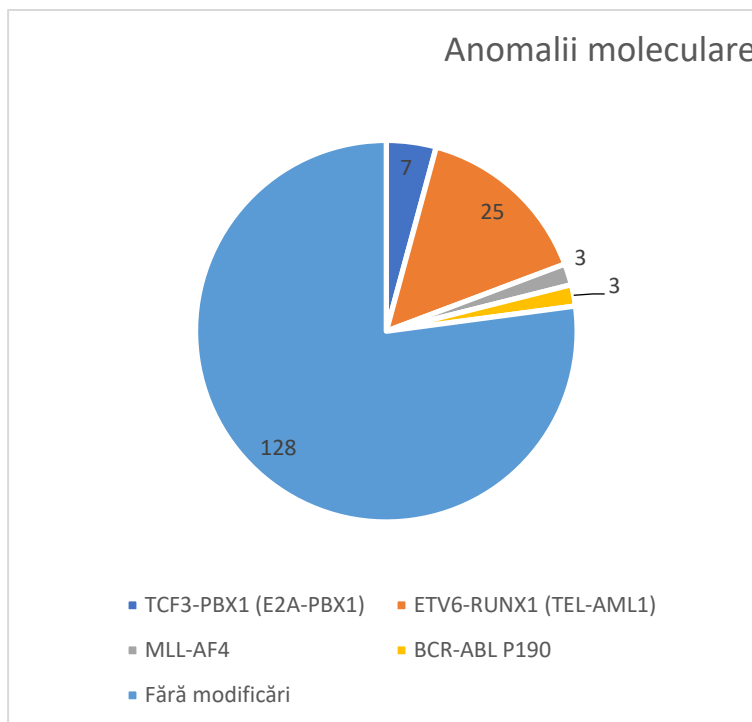


Figura 4.1. Analiza anomaliilor moleculare

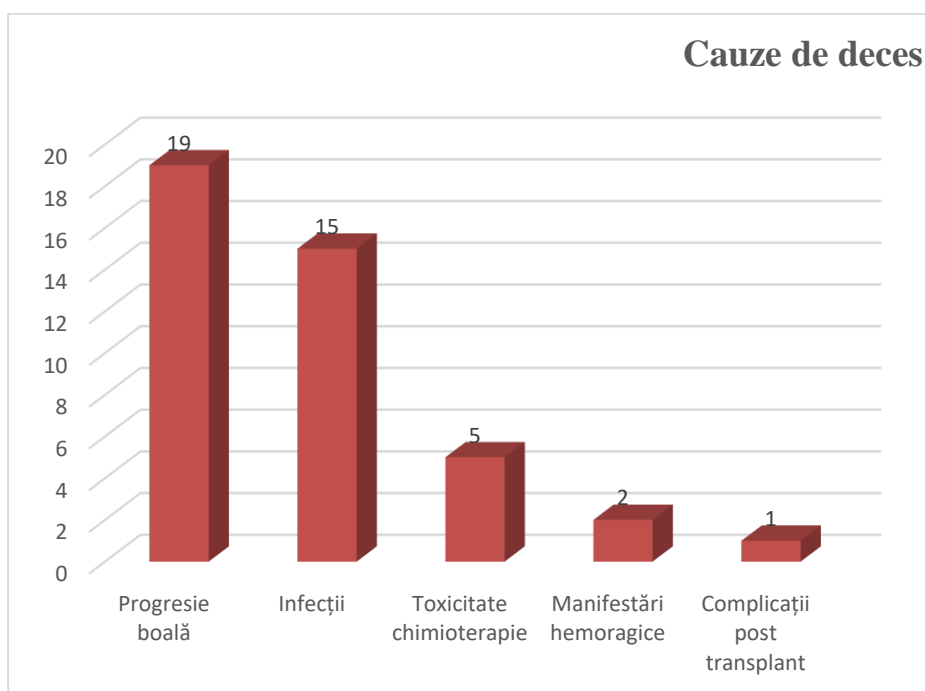


Figura 4.2. Cauze deces pacienți cu LAL

Tabel 4.2. Evoluție și răspuns la tratament lot pacienți cu LAL

	Număr (procent)
Răspuns zi 8 tratament	
Corticorezistență zi 8	23(13,9%)
Corticosensibilitate zi 8	141(85,5%)
Remisiune completă zi 33	155(93,9%)
Boala minimă reziduală	n=34
Negativă	26(76,47%)
Pozitivă	8(23,5%)
Decese în inducție	9(5,4%)
Decese în remisiune completă după ziua 33	6(3,63%)
Încadrare grupa de risc înalt	33(20%)
Recidivă	24(14,5%)
Medulară	15(9%)
SNC	6(3,63%)
Combinat	3(1,8%)
Precoce	19(11,51%)
Tardive	5(3%)
Transplant	3(1,8%)
Supraviețuire globală	123(74,5%)
Supraviețuire liberă de evenimente (EFS)	117(70,9%)
Mediana duratei de follow-up	5 ani (1 lună- 11,5 ani)

Boala minimă reziduală (BMR) realizată prin flow-citometrie multiparametrică pentru evaluarea din ziua 33 a fost disponibilă pentru 34 de pacienți. La toți pacienții care au avut gene de fuziune evidențiate prin RT-PCR la diagnostic, boala minimă reziduală s-a efectuat și prin examinare RT-PCR. 8 dintre pacienți au avut BMR pozitivă ($> 0,01\%$) și 26 pacienți au avut BMR negativă. S-a constatat că supraviețuirea globală a pacienților cu BMR negativă a fost semnificativ statistic mai mare comparativ cu supraviețuirea pacienților cu boală minimă reziduală pozitivă (92,3% față de 50%, $p = 0.002$) (Figura 4.3.).

Supraviețuirea globală a fost semnificativ statistic mai mare în lotul de pacienți care au prezentat răspuns favorabil la Prednison în ziua 8 comparativ cu lotul de pacienți la care s-a constatat corticorezistență în ziua 8 (80,1% comparativ cu 39,1%, $p < 0.0001$). Rata de recidivă fost mai mare în rândul pacienților cu răspuns nefavorabil în ziua 8 a tratamentului comparativ cu cea a pacienților cu răspuns favorabil în ziua 8 (26,1% versus 12,8%, $p = 0.098$).

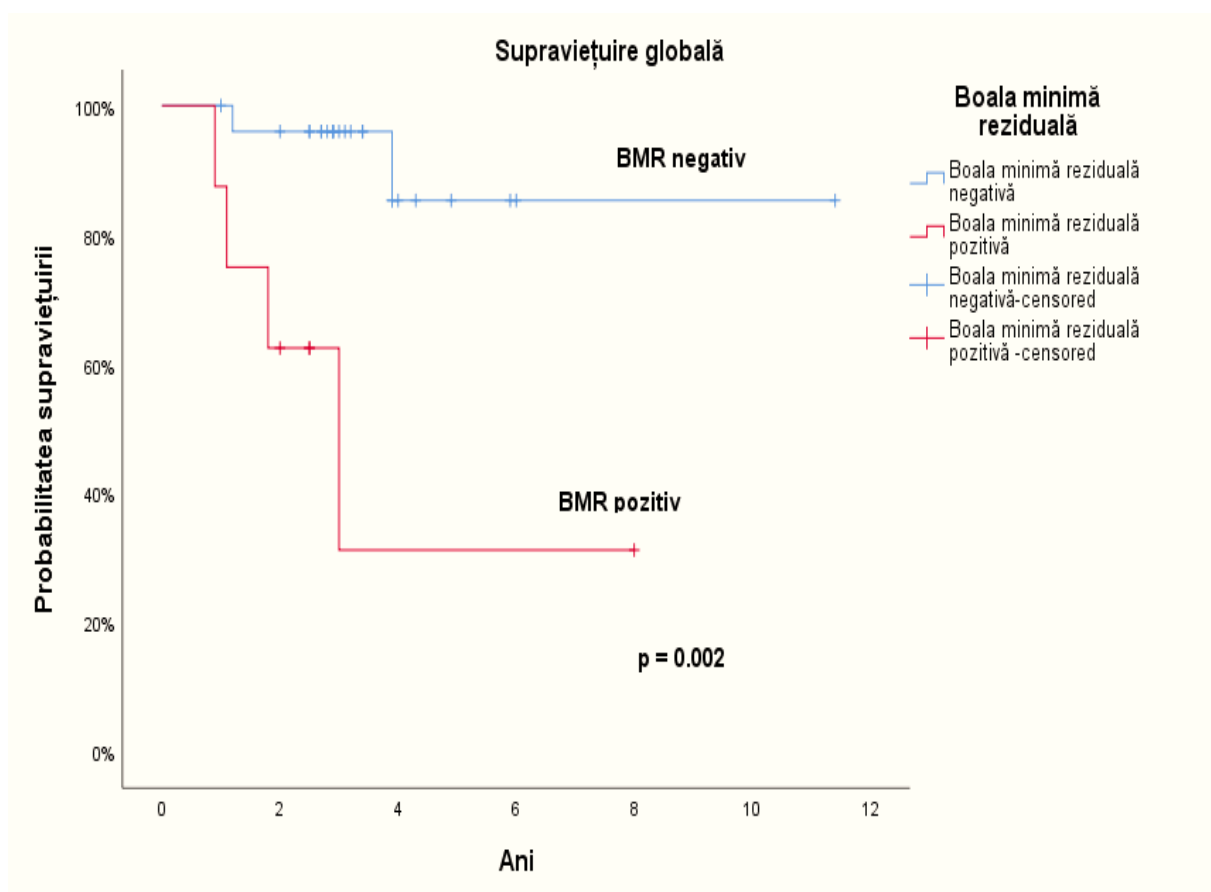


Figura 4.3. Curba Kaplan-Meier a supraviețuirii globale pentru pacienții cu BMR negativ (linia albastră), comparativ cu cea a supraviețuirii globale pentru pacienții cu BMR pozitiv în ziua 33 (linia roșie).

4.3.2. Analiza factorilor de prognostic ai supraviețuirii în LAL pediatrică

Analiza univariată a factorilor de prognostic ce influențează supraviețuirea globală a pacienților cu LAL a identificat vârsta < 1 an (p =0.021, HR: 9.389; 95% CI:0.949-92.381), valoarea leucocitelor la debut > 50.000/mm³ (p =0.021,HR: 2.412; 95% CI:1.126-5.169), infiltrarea SNC la debut (p =0.007, HR:4.720; 95% CI:1.410-15.798), prezența transcriptului BCR-ABL1(p =0.03, HR:1.077; 95% CI:0.990-1.171), răspunsul nefavorabil la Prednison în ziua 8 (p <0.0001, HR: 6.278; 95% CI:2.467-15.975), boala minimă reziduală pozitivă în ziua 33 ca factori de prognostic negativ (p =0.006, HR:12.00; 95% CI:1.623-88.702). De asemenea, sexul masculin (p =0.015, HR:0.414; 95% CI:0.202-0.849) și vârsta la diagnostic în intervalul 1-10 ani (p =0.027, HR:0.444; 95% CI:0.215-0.918) au fost identificați ca factori de prognostic favorabil (Tabel 4.3.).

Tabel 4.3. Analiza univariată a factorilor care influențează supraviețuirea

Variabilă	p	HR	95% CI
Sex M/F	0.015	0.414	0.202-0.849
Vârsta < 1 an	0.021	9.385	0.949-92.831
Vârsta 1- 10 ani	0.027	0.444	0.215-0.918
Adolescenți >14 ani	0.070	2.250	0.922-5.491
L > 50.000/mm ³	0.021	2.412	1.126-5.169
Infiltrare SNC la debut	0.007	4.720	1.410-15.798
LAL-T	0.243	1.701	0.693-4.172
TEL-AML1	0.239	0.511	0.165-1.586
E2A-PBX1	0.488	0.476	0.056-4.070
MLL-AF4	0.098	6.100	0.539-69.073
BCR-ABL1	0.03	1.077	0.990-1.171
Răspuns zi 8	< 0.0001	6.278	2.467-15.975
Boala minimă reziduală zi 33	0.006	12.00	1.623-88.702
Braț risc înalt	0.108	1.943	0.858-4.401

Pentru a aprofunda analiza factorilor de prognostic în LAL și a identifica existența factorilor de predicție independenți ai supraviețuirii, s-a utilizat metoda de analiză multivariată prin modelul regresiei Cox introducând în analiză variabilele care au avut un impact semnificativ în analiza univariată și variabila TEL-AML1, cea mai frecventă anomalie moleculară în LAL pediatrică (Tabel 4.4.).

Analiza multivariată pentru supraviețuirea globală a identificat în lotul de pacienți cu LAL că boala minimă reziduală în ziua 33 a inducției reprezintă singurul factor predictiv independent al supraviețuirii (p=0.042; HR:24.432; 95% CI:1.123-531.486). De asemenea, boala minimă reziduală în ziua 33 a reprezentat și singurul factor predictiv independent al supraviețuirii libere de evenimente precum recidiva, decesul sau a doua malignitate (p=0.007; HR:40.312; 95% CI:2.798-580.691).

Tabel 4.4. Analiza multivariată a supraviețuirii prin metoda regresiei Cox

Analiza supraviețuirii	B	SE	p	Hazard Ratio	95.0% CI pentru HR	
Răspuns zi 8 tratament	2.226	2.397	.353	9.264	.084	1017.364
Boala minimă reziduală	3.196	1.571	.042	24.432	1.123	531.486
Sex	-.414	1.531	.787	.661	.033	13.284
Vârsta 1-10 ani	-1.987	1.276	.119	.137	.011	1.671
Infiltrare SNC la debut	2.417	2.643	.360	11.214	.063	1991.986
Leucocite > 50.000 la debut	1.211	2.284	.596	3.357	.038	295.280
TEL-AML1	.131	1.743	.940	1.140	.037	34.724
					95.0% CI pentru HR	
EFS	B	SE	p	HR		
Răspuns zi 8 tratament	1.583	2.534	.532	4.870	.034	699.247
Boala minimă reziduală	3.697	1.361	.007	40.312	2.798	580.691
Sex	.607	1.163	.602	1.835	.188	17.947
Vârsta 1-10 ani	-1.907	1.059	.072	.148	.019	1.183
Infiltrare SNC la debut	2.894	2.692	.282	18.061	.092	3531.847
Leucocite >50.000 la debut	.226	2.444	.926	1.254	.010	150.960
TEL-AML1	-.073	1.359	.957	.929	.065	13.337

4.3.3. LAL și Sindrom Down

O categorie specială de pacienți, cu particularități distincte biologice și de evoluție, este reprezentată de pacienții care au sindrom Down și LAL. Trialurile clinice existente tind să excludă pacienții cu LAL și sindrom Down, astfel încât, există un număr mic de studii clinice care să analizeze diferențele de evoluție, răspuns și de complicații la tratament ale acestui subgrup de pacienți în comparație cu pacienții cu LAL fără sindrom Down, diagnosticați și tratați în aceeași perioadă de timp și în condiții similare în ceea ce privește resursele economice.

Întrucât proporția copiilor cu sindrom Down din totalul de copii diagnosticați cu LAL a fost mică (1,8%), în studiul publicat în 2021 (**Schmidt, 2021a**) am adăugat pacienți de la alte două centre de hemato-oncologie din țară (Institutul Clinic Fundeni, Clinica de Pediatrie și Institutul Clinic Fundeni-Clinica de Hematologie) și am realizat un lot de 14 pacienți cu LAL și sindrom Down. Scopul studiului a fost de a analiza diferențele de supraviețuire și evoluție între pacienții cu LAL și sindrom Down și cei care au avut doar LAL.

Rezultatele au evidențiat faptul că evoluția pacienților cu sindrom Down și LAL a fost nefavorabilă. Supraviețuirea globală a fost de doar 35,7%, semnificativ statistic mai mică decât cea a pacienților fără sindrom Down care a fost de 75% ($p = 0.001$, odds ratio: 2.12; 95% CI: 1.047–4.316). Principalele cauze de deces ale pacienților cu sindrom Down au fost infecțiile severe și toxicitatea la chimioterapie. S-a observat o diferență semnificativ statistică mai mare a mortalității legate de terapie în cazul pacienților cu sindrom Down ($p < 0.0001$, odds ratio: 1.7; 95% CI, 1.005–2.88), comparativ cu pacienții fără sindrom Down, această constatare fiind în acord cu cea a grupului de lucru de la Ponte di Legno (Buitenkamp, 2014).

4.3.4. Analiza supraviețuirii pentru pacienții care au prezentat anomalii moleculare la debut

Supraviețuirea globală pentru lotul de pacienți cu **LAL și rearanjament ETV6-RUNX1(TEL-AML1)**, cea mai frecventă anomalie moleculară identificată, a fost de 84% față de 72,9% pentru lotul de pacienți fără rearanjament ETV6-RUNX1(TEL-AML1) ($p = 0.260$), cu o durată medie estimată a supraviețuirii de $9,6 \pm 0,8$ ani (8-11,2 ani) pentru pacienții cu rearanjament ETV6-RUNX1(TEL-AML1) comparativ cu $8,5 \pm 0,4$ ani (7,7-9,3 ani) pentru pacienții fără rearanjament ETV6-RUNX1(TEL-AML1). Rata de EFS pentru pacienții cu LAL ETV6-RUNX1(TEL-AML1) a fost de 80% comparativ cu 69,3% în lotul celor fără acest rearanjament

($p = 0.294$), cu o durată medie estimată a supraviețuirii fără evenimente de $9,2 \pm 0,8$ ani (7,5-10,9 ani) pentru pacienții cu rearanjament ETV6-RUNX1(TEL-AML1) comparativ cu $8,1 \pm 0,4$ ani (7,3-9 ani).

Durata medie estimată a supraviețuirii pentru pacienții cu **LAL E2A-PBX1** a fost de $7,3 \text{ ani} \pm 0,9$ ani (5,3-9,3 ani) versus $8,6 \pm 0,3$ ani (7,9-9,4 ani) pentru pacienții cu LAL fără rearanjament E2A-PBX1. De remarcat este faptul că pacienții cu LAL E2A-PBX1 au prezentat mediana valorii leucocitelor la debut foarte mare ($139.000/\text{mm}^3$ versus $11.760/\text{mm}^3$, $p = 0.015$) și de asemenea un procent mare dintre pacienții cu acest tip de rearanjament au avut răspuns nefavorabil în ziua 8, semnificativ statistic mai mare în comparație cu pacienții fără E2A-PBX1 care au prezentat corticorezistență în ziua 8 (42,9% versus 12,7%, $p = 0.025$) (Tabel 4.5.).

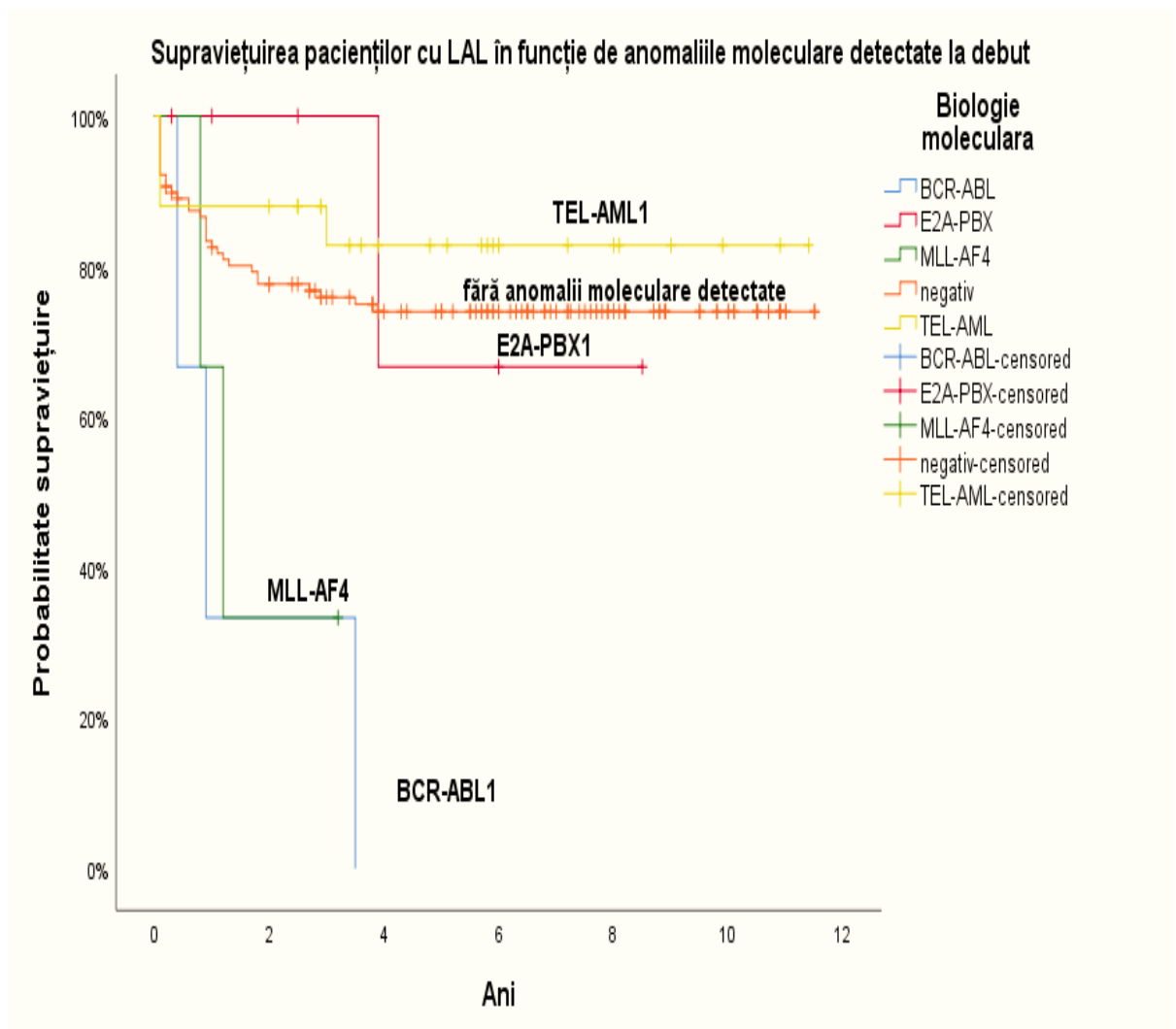


Figura 4.4. Analiza Kaplan-Meier a supraviețuirii pacienților diagnosticați cu LAL în funcție de anomaliile moleculare detectate la debut: TEL-AML1(linia galbenă), fără anomaliile moleculare detectate (linia portocalie), E2A-PBX1(linia roșie), BCR-ABL1(linia albastră), MLL-AF4 (linia verde)

Din figura 4.4. se poate observa faptul că supraviețuirea estimată la 5 ani este cea mai mare pentru pacienții cu rearanjament TEL-AML1(82,8%±7,9%), urmată de cea a pacienților fără anomalii moleculare detectate prin RT-PCR la debut (74%±4%) și supraviețuirea pacienților cu rearanjament E2A-PBX (66,7%± 7%).

Pacienții cu rearanjament MLL-AF4 și cei cu rearanjament BCR-ABL1 au supraviețuiri foarte mici (33,3%, respectiv 0%), dar numărul pacienților cu aceste anomalii moleculare este foarte mic (câte trei pacienți în fiecare dintre cele două categorii), prin urmare datele trebuie interpretate cu prudență.

Tabel 4.5. Analiză comparativă a pacienților cu anomalii moleculare la debut

	LAL TEL-AML1 (ETV6- RUNX1)	LAL E2A-PBX1	LAL BCR-ABL P190	LAL MLL- AF4
Număr pacienți	25 (15,15%)	7(4,2%)	3(1,8%)	3(1,8%)
Mediana vârstă la diagnostic	3,9 ani (2,1-13,9)	4,8 ani (2,9-16)	9,2 ani (5,9-15,9)	2 luni (21 zile-14,5ani)
Sex F/ Sex M	8/17 (32%/68%)	4/3 (57,1%/42,9%)	1/2 (33%/66%)	1/2 (33%/66%)
Mediana valorii Leucocitelor la diagnostic	16.620/mm ³ (2.800-303.000)	139.000/mm ³ (4.800-248.000)	20.570/mm ³ (4.870-45.740)	79.230/mm ³ (24.600-169.000)
Pacienți cu Leucocite >100.000 la diagnostic	6(24%)	4(57,1%)	0(0%)	1(33,3%)
Infiltrare SNC la diagnostic	0(0%)	1(14,3%)	0(0%)	0(0%)
Corticorezistență în ziua 8	1(4%)	3(42,9%)	0(0%)	1(33%)
Recidive	2(8%)	1(14,3%)	2(66%)	2(66%)
Supraviețuire globală	84%	85,7%	0%	33,33%

Rearanjamentul TEL-AML1(ETV6-RUNX1) a fost cea mai frecventă modificare moleculară întâlnită, fiind identificat la 25(15,15%) din totalul de pacienți. Analiza comparativă între lotul

de pacienți cu TEL-AML1(ETV6-RUNX1) și lotul de pacienți fără acest rearanjament a evidențiat faptul că pacienții cu TEL-AML1(ETV6-RUNX1) au mediana vârstei la diagnostic semnificativ mai mică (3,9 ani versus 6,3 ani, $p = 0.034$) (Tabel 4.6.) Valorile hematologice (mediana numărului de leucocite, mediana Hb, mediana numărului de trombocite, blaști în sângele periferic) la debutul bolii nu au prezentat diferențe semnificative între cele două grupuri de pacienți.

Tabel 4.6. Analiza lotului de pacienți cu rearanjament ETV6-RUNX1 versus lotul de pacienți fără ETV6-RUNX1

	LAL cu ETV6-RUNX1 n=25	LAL fără ETV6-RUNX1 n=140	p
Mediana vârstei la diagnostic	3,9 ani (2,1-13,9)	6,3 ani (0,1-17,1)	0.034
Sex			0.807
Masculin	17 (68%)	91(65%)	
Feminin	8 (32%)	49(35%)	
Sindrom Down	0(0%)	3(2,1%)	0.463
Leucocite la diagnostic (mediana)	16.620/mm ³ (2.800-303.000)	12.020/mm ³ (420-1.000.000)	0.448
Hb la diagnostic (mediana)	6,1g/dl (2,9-12,4)	6,9 g/dl (2-13,5)	0.522
Trombocite la diagnostic (mediana)	25.000/mm ³ (7.000-224.000)	38.000/mm ³ (2.000-573.000)	0.943
Blaști în sânge periferic (procent, mediana)	60% (0-90%)	40% (0-90%)	0.614
Infiltrare sistem nervos central (SNC)	0(0%)	12(8,6%)	0.130
Deces în inducție	3(12%)	6(4,3%)	0.451
Corticorezistență zi 8	1(4%)	22(15,7%)	0.118
Remisiune completă zi 33	23(92%)	125(89,3%)	0.339
Boala minimă reziduală zi 33 pozitivă	2/8=25%	6/26=23%	0.151
Recidivă	2(8%)	22 (15,7%)	0.311
Supraviețuire globală	21 (84%)	102(72,9%)	0.290
EFS	20(80%)	97 (69,3%)	0.294

5 Concluzii și contribuții personale

Cele două studii prezentate în partea dedicată contribuțiilor personale au analizat un număr mare (219) de pacienți cu leucemie acută la vârstă pediatrică. Pacienții au fost diagnosticați într-un centru terțiar de hemato-oncologie pediatrică și au beneficiat de teste de biologie moleculară prin RT-PCR atât la momentul debutului, cât și ca monitorizare a bolii minime reziduale moleculare.

Rezultatele și concluziile ambelor studii prezentate converg către importanța existenței unor centre regionale, supraspecializate în patologia hemato-oncologică pediatrică, dotate cu platforme de diagnostic molecular modern, cu personal dedicat, posibilități de tratament suportiv avansat, acces rapid atât la terapii moderne, țintite molecular, cât și la transplant medular și care să se dezvolte în colaborare cu centrele de hematologie pentru adulți.

Concluzii studiul 1

1. Spre deosebire de LAL pediatrică, LAM la copil și adolescent are o evoluție nefavorabilă, supraviețuirea globală pentru întreg lotul de pacienți cu LAM analizat în studiul 1 (capitol 3) fiind de 46,3%, iar rata de EFS de 44,4%. Rata de supraviețuire este mai mică decât cea descrisă în studiile internaționale recente din țările foarte dezvoltate care ajunge până la 70%. Explicațiile diferenței de supraviețuire sunt legate de mortalitatea precoce mai mare (22,4% față de 3-13%) și de procentul mic de pacienți din centrul nostru care au efectuat allotransplant de celule stem (18,2% față de 63,8% pacienți care au efectuat allotransplant în trialul AIEOP BFM 2002).
2. Mortalitatea precoce, în primele 28 de zile după diagnostic, a fost mare (22,4%) în lotul nostru de pacienți. Cauza principală de deces în primele 14 zile a fost reprezentată de hemoragia cerebrală, în timp ce decesele în intervalul 15-28 de zile după diagnostic au fost determinate în principal de infecțiile severe. Analiza multivariată prin modelul regresiei a evidențiat că adolescenții cu vârsta peste 14 ani ($p=0.031$, Odds Ratio: 20.219, 95% CI: 1.326-308.349) și pacienții cu o valoare a LDH > 1.000 U/l la debutul bolii ($p=0.037$, Odds Ratio: 13.116, 95% CI: 1.164 - 147.797) au un risc semnificativ statistic mai mare de deces în primele 28 de zile de la diagnostic.

3. Un procent de 29,3% dintre pacienții cu LAM au prezentat anomalii moleculare la momentul diagnosticului, 18,5%(10 pacienți) au avut gena de fuziune PML-RARA, 3,7%(2 pacienți) au avut rearanjamentul CBF beta MYH11, 11,1%(6 pacienți) au avut mutații FLT3-ITD și 5,6%(3 pacienți) au avut mutații ale genei NPM1.
4. Incidența LAM cu PML-RARA (LAM3) a fost mai mare (18,5% raportat la totalul numărului de LAM) decât cea descrisă (6-10%) în majoritatea studiilor europene (Creutzig, 2012; Testi, 2018). Rata de supraviețuire globală în LAM PML-RARA a fost de 50%, fiind influențată negativ de mortalitatea precoce prin hemoragie cerebrală.
5. Supraviețuirea globală a pacienților cu mutații FLT3-ITD la debut a fost mai mică decât cea a pacienților fără mutații FLT3-ITD la debut, dar fără a se constata o diferență relevantă din punct de vedere statistic (33% versus 47,9%, $p = 0.588$). Pentru pacienții cu LAM excluzând LAM3, s-a identificat o corelație semnificativ statistică între prezența mutațiilor FLT3-ITD și sindromul CID la debut ($p=0.017$)
6. Supraviețuirea globală a fost mai bună pentru pacienții cu Sindrom Down și LAM decât pentru cei doar cu LAM (57,1% comparativ cu 45,1%). S-a observat că există o corelație semnificativă statistic între subtipul M7 și asocierea LAM și Sindrom Down.
7. Analiza multivariată prin modelul regresiei Cox, a relevat faptul că sexul masculin ($p = 0.004$, HR: 3.589, 95% CI:1.516-8.499), prezența hepato-splenomegaliei importante în momentul diagnosticului ($p=0.008$, HR:3.887, 95% CI:1.415-10.679) și vârsta la diagnostic > 10 ani ($p=0.03$, HR: 2.921, 95% CI: 1.106-7.710) sunt predictori independenți semnificativi din punct de vedere statistic pentru o durată de supraviețuire mai mică. De asemenea, pentru întreg lotul de pacienți cu LAM, numărul de leucocite la diagnostic $> 100.000/mm^3$ ($p=0.650$, HR:1.284), identificarea mutațiilor FLT3-ITD ($p=0.392$, HR:1.815) și prezența sindromului CID în momentul diagnosticului ($p=0.591$, HR:1.372), influențează negativ supraviețuirea globală, dar nu într-un mod semnificativ statistic. Mutațiile NPM1, prezența PML-RAR alfa și CBF beta-MYH11 cresc durata supraviețuirii, dar nu semnificativ din punct de vedere statistic.
8. Numărul de pacienți cu LAM excluzând LAM3 care au efectuat allo transplant de celule stem hematopoietice a fost mic (8 pacienți, 18,2%), 75% dintre ei au efectuat allo transplantul în timpul primei remisiuni complete. Un pacient cu LAM FLT3-ITD a efectuat terapie cu inhibitori FLT3 ca terapie punte către allotransplantul cu

celule stem. Supraviețuirea globală pentru pacienții care au efectuat transplant a fost de 50%.

9. Întrucât intensificarea protocoalelor de chimioterapie care deja determină o rată de toxicitate mare, nu este fezabilă, este necesară în viitor translarea la cât mai mulți pacienți de la identificarea cât mai completă a particularităților moleculare la momentul debutului bolii sau cel al recidivei la terapia țintită molecular.

Concluzii studiul 2

1. Evoluția pacienților cu LAL pediatrică și vârsta >1 an a fost favorabilă, supraviețuirea la 5 ani pentru lotul de pacienți analizat în studiul 2 fiind de $75,8\% \pm 3,6\%$, iar rata de supraviețuire liberă de evenimente (EFS) a fost de $72,6\% \pm 3,8\%$. Cu toate acestea, ratele de supraviețuire din centrul nostru rămân mai mici decât cele descrise în ultimele studii internaționale din țările foarte dezvoltate din Europa sau cele din S.U.A. (85-90%). Supraviețuirea mai mică înregistrată în centrul nostru comparativ cu supraviețuirea raportată în trialurile din Europa se datorează ratei de deces în inducție mai mari (5% în centrul nostru față de 2,5% în trialul AIEOP-BFM ALL 2000), dar și numărului mic de pacienți cu recidivă a bolii care au reușit să efectueze allotransplant de celule stem (8,3%), ceea ce a condus la o rată mică de supraviețuire a pacienților cu recidivă (22%).
2. Supraviețuirea globală a fost mai bună pentru pacienții diagnosticați în intervalul anilor 2015-2019 comparativ cu cea a pacienților cu LAL diagnosticați în intervalul 2010-2014 (82,2% versus 68,5%).
3. Mortalitatea precoce, în primele 33 de zile ale Inducției pentru pacienții cu LAL a fost de 5%. Principalele cauze de deces în acest interval de timp au fost toxicitatea postchimioterapie (în special post L-asparaginază) și infecțiile severe. Mortalitatea în remisiune completă după ziua 33 a fost de 3,6%, principala cauză de deces fiind reprezentată de infecțiile severe, iar mortalitatea prin progresia bolii a fost de 11,5%.
4. Un procent de 22,4% dintre pacienții cu LAL la vârstă pediatrică au avut anomalii moleculare detectate prin RT-PCR în momentul diagnosticului. Cea mai frecventă anomalie moleculară identificată a fost ETV6-RUNX1(TEL-AML1)(15,2%), urmată de TCF3-PBX1(E2A-PBX1)(4,2%), BCR-ABL1 P190(1,8%) și MLL-AF4(1,8%).
5. S-a constatat o corelație semnificativă din punct de vedere statistic între identificarea rearanjamentului ETV6-RUNX1(TEL-AML1) și intervalul de vârstă la diagnostic între

- 1-10 ani ($p = 0.021$). Evoluția pacienților cu LAL ETV6-RUNX1(TEL-AML1) a fost favorabilă, rata de supraviețuire globală fiind de 84%, iar rata de EFS de 80%.
6. Supraviețuirea la 5 ani a pacienților cu LAL E2A-PBX1 a fost de $66,7 \pm 7\%$, iar rata de EFS la 5 ani de $64,1 \pm 8\%$, cu o durată medie estimată a supraviețuirii pentru pacienții cu LAL E2A-PBX1 mai mică decât durata medie estimată a supraviețuirii pentru pacienții cu LAL fără E2A-PBX1 ($7,3 \pm 0,9$ ani versus $8,6 \pm 0,3$ ani). Pacienții cu LAL E2A-PBX1 au prezentat comparativ cu pacienții cu LAL fără E2A-PBX1, mediana valorii leucocitelor la debut mai mare ($139.000/\text{mm}^3$ versus $11.760/\text{mm}^3$, $p = 0.015$) și un procent mai mare de corticorezistență în ziua 8 a protocolului ($42,9\%$ comparativ cu $12,7\%$, $p = 0.025$).
 7. Pacienții cu LAL BCR-ABL1 precum și pacienții cu vârsta < 1 an cu rearanjament MLL-AF4 au avut o evoluție particular nefavorabilă, nici unul dintre aceștia nu mai este în viață la momentul efectuării prelucrării statistice pentru lotul de pacienți cu LAL.
 8. Analiza Kaplan-Meier a supraviețuirii la 5 ani în funcție de rezultatele evaluării moleculare efectuate la debutul bolii, a evidențiat faptul că supraviețuirea estimată la 5 ani a fost cea mai mare pentru pacienții cu rearanjament TEL-AML1 ($82,8\% \pm 7,9\%$), urmată de cea a pacienților fără anomalii moleculare detectate prin RT-PCR la debut ($74\% \pm 4\%$) și apoi supraviețuirea pacienților cu rearanjament E2A-PBX ($66,7\% \pm 7\%$). Pacienții cu MLL-AF4 și cei cu BCR-ABL1 au avut supraviețuiri foarte mici ($33,3\%$, respectiv 0%).
 9. În timp ce rata de supraviețuire globală pentru pacienții cu LAL fără Sindrom Down s-a îmbunătățit în ultimii ani, evoluția rămâne nefavorabilă pentru pacienții cu LAL și Sindrom Down, în special din cauza mortalității asociată tratamentului care este semnificativ mai mare pentru pacienții cu Sindrom Down ($p < 0.0001$). Supraviețuirea globală a pacienților cu LAL și Sindrom Down a fost de $35,7\%$ comparativ cu 75% pentru pacienții cu LAL fără Sindrom Down ($p = 0.001$).
 10. Pentru categoria de vârstă a adolescenților >14 ani, supraviețuirea globală a fost de 60% , iar rata EFS de 56% . În cazul adolescenților, mortalitatea precoce, în primele 33 de zile ale Inducției, a fost de 4% , iar mortalitatea în remisiunea completă după ziua 33 a fost de 12% , toate decesele în remisiunea completă după ziua 33 având drept cauză infecțiile severe. Nici un adolescent nu a prezentat rearanjamentul ETV6-RUNX1(TEL-AML1).
 11. Supraviețuirea globală, estimată cu ajutorul curbei de supraviețuire Kaplan-Meier, a fost pentru pacienții cu LAL cu celule precursorare B mai mare ($76,3 \pm 3,6\%$) comparativ

cu supraviețuirea globală a pacienților cu LAL-T ($65,4 \pm 9,6\%$), dar fără a se înregistra o diferență semnificativă din punct de vedere statistic ($p = 0.237$). Pacienții cu LAL-T și răspuns nefavorabil în ziua 8 a tratamentului au avut o rată de supraviețuire de doar 12,5%.

12. Analiza univariată a demonstrat că vârsta < 1 an ($p=0.021$, HR:9.385), valoarea leucocitelor la debut $>50.000/\text{mm}^3$ ($p=0.021$, HR:2.412), prezența transcriptului BCR-ABL1 ($p=0.03$, HR:1.077), răspunsul nefavorabil în ziua 8 a tratamentului ($p < 0.0001$, HR: 6.278) și boala minimă reziduală pozitivă în ziua 33 ($p= 0.006$, HR:12) reprezintă factori cu impact negativ asupra supraviețuirii, în timp ce sexul masculin ($p=0.015$, HR:0.414) și vârsta la diagnostic în intervalul 1-10 ani ($p=0.027$, HR:0.444) au fost identificați ca factori cu impact favorabil asupra supraviețuirii.
13. Analiza multivariată prin modelul regresiei Cox a identificat boala minimă reziduală în ziua 33 ca unicul factor predictiv independent al supraviețuirii globale ($p= 0.042$, HR:24.432) și al ratei EFS ($p=0.007$, HR:440,31).
14. Pacienții cu LAL și rearanjamente MLL-AF4 sau BCR-ABL1 la debut au fost încadrați în grupul de risc înalt al protocolului de chimioterapie, alături de cei cu răspuns nefavorabil în ziua 8 sau cei care nu au obținut remisiunea completă în ziua 33.
15. Asparaginaza are un rol cheie în protocoalele de chimioterapie în LAL și de asemenea în îmbunătățirea supraviețuirii pe termen lung în LAL pediatrică. Aproximativ 50% dintre pacienți au prezentat cel puțin un efect advers secundar administrării de L-asparaginază, cele mai importante efecte adverse ale L-asparaginazei fiind reacțiile de hipersensibilitate (24,1%), hepatotoxicitatea (19,4%), trombozele (2,4%), hipoproteinemia (9,1%), hiperglicemia (4,2%), hipertrigliceridemia (6,7%), pancreatita (3%). Adolescenții au avut un risc semnificativ statistic mai mare de a dezvolta ca efecte adverse după administrarea de L-asparaginază, hipertrigliceridemie ($p = 0.043$) și osteonecroză ($p = 0.015$) și în același timp, un risc mai mic de a dezvolta alergie la L-asparaginază ($p = 0.04$).
16. S-a constatat o corelație semnificativă din punct de vedere statistic ($p=0.001$) între apariția trombozelor după administrarea L-asparaginazei și prezența transcriptului ETV6-RUNX1(TEL-AML1).
17. Numărul pacienților cu LAL pediatrică care au efectuat allotransplant de celule stem hematopoietice a fost mic (1,8%). Doar 8,33% dintre pacienții care au prezentat recidiva bolii au reușit să efectueze allotransplant de celule stem, în special datorită faptului că nu s-a reușit reobținerea remisiunii complete.

18. Patru pacienți din lotul cu LAL au efectuat terapii țintite molecular (inhibitori de tirozinkinază) sau imunoterapie (anticorp monoclonal anti CD38, anticorp monoclonal anti CD22), atât în prima linie de tratament (doi pacienți), cât și după recidiva bolii (doi pacienți).
19. Aprofundarea testelor de biologie moleculară și extinderea panelului de teste moleculare standard efectuate la diagnostic sunt absolut necesare pentru că vor avea ca rezultat o mai bună încadrare a pacientului în grupa de risc genetic, orientarea rapidă către o terapie țintită molecular individualizată și posibilitatea utilizării celor mai recente protocoale terapeutice care includ atât imunoterapia cât și criterii moleculare de stratificare a riscului.

Articole publicate în reviste **ISI:**

Schmidt MP, Ivanov AV, Coriu D, Miron IC (2021). L-Asparaginase Toxicity in the Treatment of Children and Adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Med.* Sep 26;10(19):4419. doi: 10.3390/jcm10194419. PMID: 34640436; PMCID: PMC8509606.

Factor de impact: 4.242

<https://doi.org/10.3390/jcm10194419>

Schmidt MP, Colita A, Ivanov AV, Coriu D, Miron IC (2021). Outcomes of patients with Down syndrome and acute leukemia: A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore).* Oct 8;100(40): e27459. doi:10.1097/MD.0000000000027459. PMID: 34622870; PMCID: PMC8500660.

Factor de impact:1,889

<https://journals.lww.com/md->

[journal/Fulltext/2021/10080/Outcomes_of_patients_with_Down_syndrome_and_acute.44.](https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2021/10080/Outcomes_of_patients_with_Down_syndrome_and_acute.44.aspx)

[aspx](https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2021/10080/Outcomes_of_patients_with_Down_syndrome_and_acute.44.aspx)

Bibliografie selectivă

Aplenc R, Soheil Meshinchi, Lillian Sung et al. (2020). Bortezomib with standard chemotherapy for children with acute myeloid leukemia does not improve treatment outcomes: a report from the Children's Oncology Group. *Haematologica*. 105(7): pp.1879-1886.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J et al. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19;127(20): pp.2391-405.

Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M, et al. (2014). Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno Study Group. *Blood*. 123:70–7.

Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Bloomfield CD et al. (2003). Leukemia. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. Dec 15;21(24):4642-9.

Conneely SE, Stevens AM. (2021). Acute Myeloid Leukemia in Children: Emerging Paradigms in Genetics and New Approaches to Therapy. *Curr Oncol Rep*. 23:16.

Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B et al. (2012). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 18;120(16):3187-205.

De Kouchkovsky I and Abdul-Hay M (2016). AML: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer Journal*. 6, e441.

Horibe K, Saito AM, Takimoto T et al (2013). Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Int J Hematol*. Jul;98(1):74-88.

Inaba H, Pui CH. (2021). Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Med*. Apr 29;10(9):1926.

Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P. (2007). A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet*. Jul 21;370(9583):240-250.

Qiao B, Austin AA, Schymura MJ, Browne ML. (2018). Characteristics and survival of children with acute leukemia with Down syndrome or other birth defects in New York State. *Cancer Epidemiol. Dec*; 57:68-73.

Reinhardt D, Antoniou E, Waack K (2022). Pediatric Acute Myeloid Leukemia-Past, Present, and Future. *J Clin Med*. Jan 19;11(3):504.

Rubnitz JE, Lacayo NJ, Inaba H et al. (2019). Clofarabine Can Replace Anthracyclines and Etoposide in Remission Induction Therapy for Childhood Acute Myeloid Leukemia: The AML08 Multicenter, Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. Aug 10;37(23):2072-2081.

Rubnitz, J. E., Inaba, H., Dahl, G et al. (2010). Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *The Lancet. Oncology*, 11(6), 543–552.

Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS et al. (2019). Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*. 11;133(15):1630-1643.

Schmidt MP, Colita, A, Ivanov, AV, Coriu, D, Miron, IC (2021). Outcomes of patients with Down syndrome and acute leukemia: A retrospective observational study. *Medicine*. 100(40), e27459.

Schmidt MP, Ivanov AV, Coriu D, Miron IC (2021). L-Asparaginase Toxicity in the Treatment of Children and Adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Med*. Sep 26;10(19):4419. doi: 10.3390/jcm10194419. PMID: 34640436; PMCID: PMC8509606.

Stary J, Zimmermann M, Campbell M et al. (2014). Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *J Clin Oncol*. Jan 20;32(3):174-84.

Taub JW, Huang X, Matherly LH et al. (1999). Expression of chromosome 21-localized genes in acute myeloid leukemia: differences between Down syndrome and non-Down syndrome

blast cells and relationship to in vitro sensitivity to cytosine arabinoside and daunorubicin. *Blood*. Aug 15;94(4):1393-400.

Taub, J. W., Berman, J. N., Hitzler, J. K. et al. (2017). Improved outcomes for myeloid leukemia of Down syndrome: a report from the Children's Oncology Group AAML0431 trial. *Blood*, 129(25), 3304–3313.

Testi AM, Pession A, Diverio D et al. (2018). Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia: results from the International Consortium for Childhood APL. *Blood*. Jul 26;132(4):405-412.

Theunissen, P, Mejstrikova, E, Sedek, L. et al. (2017). Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* .129, 347–357.

Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D et al. (2015). Collaborative Efforts Driving Progress in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 33(27):2949-2962.