



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA“ DIN BUCUREȘTI**



Str. Dionisie Lupu 37, sector 2, București, 020021, România, www.umfed.ro, email: rectorat@umfed.ro

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

”CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

**ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ANCA COLIȚĂ

Student-doctorand:

BELDIMAN (căs. MARCU) ANDRA-DANIELA

2025



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA“ DIN BUCUREȘTI**



Str. Dionisie Lupu 37, sector 2, București, 020021, România, www.umfed.ro, email: rectorat@umfed.ro

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

”CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

**Importanța diagnosticului molecular în
personalizarea tratamentului neoplaziilor**

mieloide pediatrice

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ANCA COLIȚĂ

Student-doctorand:

BELDIMAN (căs. MARCU) ANDRA-DANIELA

2025

Cuprins

Lista lucrărilor științifice publicate

Lista Abrevierilor

Introducere

A. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Considerații generale asupra patologiei mieloidelor pediatrice	1
1.1. Epidemiologie	1
1.2. Clasificarea actuală (WHO, ICC)	4
1.3. Particularități clinice și biologice la copil	9
2. Diagnosticul neoplaziilor mieloidelor pediatrice	12
2.1. Etapele de diagnostic actual	12
2.2. Fundamente moleculare	16
2.2.1. Evoluția clonală și instabilitatea genomică	16
2.2.2. Mecanisme epigenetice – metilarea ADN	17
2.2.3. Anomalii citogenetice și moleculare relevante	19
2.2.4. Sindroame de predispoziție genetică	25
3. Factori prognostici și strategii terapeutice moderne	27
3.1. Profilul molecular în evaluarea prognosticului	27
3.2. Boala minimă reziduală și valoarea sa terapeutică	29
3.3. Transplantul de celule stem hematopoietice	29
3.4. Direcții emergente în tratamentul personalizat	30

B. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

4. Ipoteze de lucru și obiectivele generale	34
5. Metodologia generală a cercetării	35
5.1.1. Design-ul studiului și selecția lotului	35
5.1.2. Analiza statistică a datelor	36
5.1.3. Considerații etice	36
6. Studiul 1 – Identificarea caracteristicilor moleculare în neoplaziile mieloidelor pediatrice	38
6.1. Introducere	38
6.2. Ipoteze de lucru și obiective specifice	39
6.3. Pacienți și metode de lucru	39

6.3.1. Selecția pacienților	39
6.3.2. Obținerea probelor ADN genomic și verificarea calității acestora	40
6.3.3. Secvențierea țintită NGS pentru stabilirea profilului molecular	41
6.4. Rezultate	44
6.4.1. Caracteristici clinice și hematologice ale cohortelor studiate	44
6.4.2. Caracteristici morfologice și imunofenotipice ale cohortelor studiate	50
6.4.3. Caracteristici genetice și moleculare identificate	53
6.4.4. Analiza moleculară	56
6.4.5. Corelații între profilul bolii și date de supraviețuire	67
6.5. Discuții	72
7. Studiul 2 – Impactul leziunilor moleculare asupra evoluției pacienților pediatrici cu neoplazii mieloides	84
7.1. Introducere	84
7.2. Ipoteze de lucru și obiective specifice	84
7.3. Pacienți și metode de lucru	85
7.4. Rezultate	86
7.4.1. Răspunsul la terapia de primă linie	86
7.4.2. Implicațiile clinice ale mutațiilor somatice: <i>TP53</i> și calea RAS	93
7.4.3. Mutațiile germinale ca factori determinanți în evoluția și tratamentul neoplaziilor mieloides pediatrice	96
7.5. Discuții	105
8. Studiul 3 - Analiza comparativă a strategiilor de condiționare utilizate la pacienții pediatrici cu neoplazii mieloides care efectuează TCSH	111
8.1. Introducere	111
8.2. Ipoteze de lucru și obiective specifice	111
8.3. Pacienți și metode de lucru	112
8.4. Rezultate	116
8.5. Discuții	123
9. Concluzii și contribuții personale	129
Bibliografie	135
Anexe	161
• Anexa 1. Panelurile NGS utilizate	
• Anexa 2. Tabele suplimentare	

Introducere

Neoplaziile mieloide ale copilului constituie un grup rar și heterogen de afecțiuni hematologice, profund diferit de formele adulte, marcate de o arhitectură genomică distinctă pentru fiecare subtip. Progresele recente în tehnologiile moleculare au permis depășirea cadrului morfologic clasic și adoptarea unei abordări integrative, centrate pe semnătura genetică, cu implicații fundamentale asupra înțelegerii hematopoezei și a personalizării terapeutice.

Lucrarea de față explorează această complexitate prin trei direcții: caracterizarea mutațională, evaluarea impactului genetic asupra evoluției clinice și abordarea optimă în contextul efectuării procedurii de transplant de celule stem hematopoietice (TCSH). Scopul este orientat spre anticiparea agresivității bolii, identificarea subgrupurilor vulnerabile și alegerea unei terapii personalizate, adaptate specificului molecular al acestor entități rare, dar cu un impact major în hematologia pediatrică modernă.

A. Stadiul actual al cunoașterii

Partea generală a tezei oferă o fundamentare teoretică riguroasă asupra neoplaziilor mieloide pediatrice, printr-o analiză integrativă a particularităților biologice, genetice și clinico-terapeutice ale acestor entități rare. Pentru început se detaliază date de epidemiologie pentru fiecare entitate în parte: leucemia mieloidă acută (LAM), sindroamele mielodisplazice (SMD) și neoplasmele mieloproliferative (NMP) cu accent pe leucemia mielomonocitară cronică juvenilă (LMMCJ). Datele sunt prezentate comparativ cu populația adultă, tocmai pentru a evidenția necesitatea particularizării criteriilor de diagnostic și stadializare în patologia copilului (1, 2).

Clasificarea neoplaziilor mieloide pediatrice a cunoscut o transformare semnificativă în ultimele decenii, migrând de la o abordare bazată exclusiv pe criterii morfologice și clinice către un model integrativ, molecular și adaptativ. Noile ediții WHO-HAEM5 și ICC 2022 reflectă această tranziție, recunoscând particularitățile genetice și clinice distincte ale copiilor față de adulți (3, 4). În mod special, LAM pediatrică a beneficiat de revizuri majore, cu redefinirea entităților pe baza rearanjamentelor genetice (ex. KMT2A, NUP98, MECOM) și introducerea unor noi subtipuri precum “LAM cu alte anomalii genetice definite”, alături de recunoașterea mutațiilor germinale cu impact asupra diagnosticului și conduitei terapeutice (5).

În ceea ce privește SMD, clasificările recente subliniază importanța diferențierii între formele cu număr scăzut și crescut de blaști, integrând mutații recurente și criterii citogenetice complexe pentru stratificarea riscului și indicarea TCSH. Termenul clasic de “citopenie refractară a copilului” a fost înlocuit de entități mai clar definite, precum “SMD cu număr scăzut de blaști” și “SMD cu număr crescut de blaști”, reflectând o înțelegere mai precisă a biologiei bolii. Totodată, accentul cade pe excluderea altor cauze de citopenie și recunoașterea rolului mutațiilor germinale (6, 7).

LMMCJ, anterior inclusă în categoria SMD/SMP, a fost reîncadrată în clasificarea WHO ca neoplasm mieloproliferativ, iar în ICC a fost asociată cu mutații germinale sau forme pediatrie specifice. Această reclasificare se bazează pe recunoașterea mutațiilor canonice ale căii RAS, prezente în majoritatea cazurilor. Astfel, se evidențiază importanța recunoașterii neoplaziilor asociate sindroamelor de predispoziție genetică de linie germinală (3-5).

Următoarele secțiuni ale părții generale sunt dedicate expunerii particularităților clinice și biologice la copil, precum și etapelor de diagnostic actual (7-14). De asemenea, se detaliază caracterizările mutațiilor cu rol patogenetic major, disfuncțiilor epigenetice și rearanjamentelor cromozomiale asociate cu prognostic nefavorabil (15-22). Identificarea și caracterizarea predispozițiilor genetice ale neoplaziilor mieloides reprezintă un element esențial în evaluarea citopeniilor persistente la copil și adultul tânăr. Înțelegerea acestor sindroame genetice, fie ele cu fenotip evident sau cu manifestări exclusiv hematologice, permite personalizarea conduitei terapeutice, optimizarea prognosticului și implementarea eficientă a consilierii familiale (10, 23, 24).

Toate aceste transformări reflectă o reconfigurare profundă a paradigmei diagnostice și terapeutice, orientată către integrarea profilului genomic ca element central al evaluării clinice. În acest context, partea generală a tezei fundamentează conceptual managementului personalizat în hemato-oncologia pediatrie, oferind suportul necesar pentru interpretarea integrativă a datelor clinice și moleculare din studiile originale.

B. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteze de lucru, obiectivele generale și metodologia de cercetare

Această teză explorează complexitatea biologică și clinică a neoplaziilor mieloides pediatrie printr-o abordare multidimensională, orientată spre integrarea datelor genetice în

deciziile terapeutice. Demersul investigativ are la bază analiza profundă a arhitecturii moleculare a bolii, evaluarea modului în care mutațiile influențează cursul evolutiv și a abordării terapeutice optime în cadrul procedurii de TCSH. Ipotezele formulate susțin existența unor conexiuni funcționale între modificările genetice și fenotipul clinic, cu potențial de a ghida strategii terapeutice personalizate și de a genera noi direcții de cercetare aplicabilă.

Metodologia a presupus un studiu observațional, transversal, pe un lot de 61 de pacienți pediatrici diagnosticați și tratați în cadrul Institutului Clinic Fundeni, pe o perioadă de 6 ani. Studiul a inclus trei grupe patologice: LAM (inclusiv MPAL și LAM asociată sindromului Down), SMD și NMP, diagnosticate conform criteriilor internaționale. TCSH a fost indicat în funcție de riscul evolutiv, fiind realizat la pacienții aflați în remisiune completă. Investigația s-a desfășurat în trei etape: (1) analiza moleculară și corelarea profilului genetic cu caracteristicile clinice și supraviețuirea până la TCSH; (2) evaluarea relației dintre profilul mutațional inițial și răspunsul terapeutic precoce; (3) analiza detaliată a pacienților transplantați, cu accent pe impactul regimurilor de condiționare asupra remisiunii, complicațiilor post-TCSH și supraviețuirii în primul an.

Această abordare integrativă subliniază importanța adaptării conduitei terapeutice în funcție de particularitățile clinice și de profilul molecular individual, promovând astfel un model de tratament personalizat în hemato-oncologia pediatrică. Datele au fost procesate prin metode statistice robuste, incluzând analize de supraviețuire și vizualizări tip heatmap, toate desfășurate în conformitate cu standardele etice în vigoare.

Capitolul 6. Studiul 1 – Identificare caracteristicilor moleculare în neoplaziile mieloides pediatrices

Acest studiu explorează caracteristicile moleculare ale neoplaziilor mieloides pediatrices, pornind de la premisa că fiecare entitate patologică (LAM, SMD, NMP) prezintă o semnătură genetică distinctă, cu implicații funcționale și prognostice. Studiul se fundamentează pe ipoteza că analiza integrată a profilului imunofenotipic, citogenetic și molecular permite definirea unor trasee patogenetice specifice și a unor markeri de agresivitate precoce. Obiectivul central a fost identificarea factorilor de risc moleculari cu relevanță clinică, iar printre obiectivele secundare s-au numărat evaluarea mutațiilor semnificative, tendințele prognostice ale anomaliilor

genetice, valoarea predictivă a unor markeri precum CD7 și analiza semnalelor de agresivitate clinică la debut.

Ipotezele de lucru pentru Studiul 1 au fost:

- i. Heterogenitatea moleculară și biologică a neoplaziilor mieloidă pediatrice definește trasee patogenetice diferențiate, ce pot fi captate prin analiza integrată a caracteristicilor clinice, imunofenotipice și moleculare, cu potențial impact asupra prognosticului și strategiilor terapeutice.
- ii. Expresia unor markeri imunofenotipici precum CD7 sau a unor anomalii genetice specifice (ex. *FLT3-ITD*, anomalii ale cromozomului 7, rearanjamente KMT2A) constituie markeri precoce de agresivitate și pot anticipa un prognostic nefavorabil, inclusiv post-transplant.
- iii. Neoplaziile mieloidă pediatrice (LAM, SMD, NMP) prezintă semnături moleculare funcționale distincte, corelate cu comportament biologic specific

Obiectivul principal al studiului 1 a fost:

- i. Să evalueze profilul clinic, imunofenotipic, citogenetic și molecular al neoplaziilor mieloidă pediatrice (LAM, SMD, NMP) pentru identificarea factorilor de risc și a semnăturilor biologice predictive cu impact prognostic

Obiective secundare au constatat în:

- i. Explorarea distribuției mutațiilor și a axelor funcționale per entitate diagnostică
- ii. Explorarea tendințelor prognostice ale anomaliilor genetice identificate la debut
- iii. Evaluarea markerilor imunofenotipici (CD7, CD56, CD123) ca predictorii precoce pentru prognostic nefavorabil
- iv. Identificarea parametrilor clinici și biologici de debut care pot semnaliza agresivitatea bolii

Lotul de 61 de subiecți a fost selectat conform criteriilor de includere, iar pacienții au fost diagnosticați conform standardelor internaționale, folosindu-se o abordare multidimensională pentru caracterizare: date clinice, imunofenotipice, citogenetice și moleculare. Probele biologice pentru analiza prin secvențiere de nouă generație (NGS) au fost prelucrate pentru izolarea ADN-ului genomic prin metode standardizate, iar calitatea și concentrația acestora au fost riguros verificate. Secvențierea țintită a fost realizată pe 23 de pacienți folosind TruSight Myeloid Panel (MiSeq), iar restul de 38 au fost analizați în cadrul unui program național extins de secvențiere

(panel TruSight Oncology 500) acoperind 523 de gene, ce a inclus și un panel de fuziuni genice. Pregătirea probelor pentru analiza NGS a inclus trei etape: (1) pregătirea librăriilor ADN, (2) secvențierea propriu-zisă, și (3) analiza bioinformatică. Au fost raportate doar mutațiile cu frecvență alelică $\geq 2\%$ și valoare potențial patogenică, clasificate conform ghidurilor internaționale.

Studiul a demonstrat complexitatea și heterogenitatea profundă a neoplaziilor mieloide pediatrice, reliefând diferențele semnificative între entitățile analizate nu doar clinic, ci și la nivel genomic, imunofenotipic și funcțional. Deși dimensiunea lotului a limitat obținerea unor semnificații statistice ferme pentru unii parametri, tendințele clinice și moleculare evidențiate susțin valoarea unor markeri precum CD7, fuziunile KMT2A și NUP98, mutațiile FLT3-ITD sau anomaliile cromozomului 7 ca factori asociați cu prognostic negativ. Identificarea unei arhitecturi genetice cooperante și a unor rețele funcționale specifice per entitate oferă un fundament solid pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice integrate și personalizate, cu accent pe stratificarea dinamică a riscului și adaptarea precoce a conduitelor terapeutice în funcție de profilul biologic individual.

Capitolul 7. Studiul 2 – Impactul leziunilor moleculare asupra evoluției pacienților pediatrici cu neoplazii mieloide

Studiul 2 își propune să exploreze impactul leziunilor moleculare asupra evoluției clinice a pacienților pediatrici cu patologie mieloidă malignă sau predispoziție pentru aceasta, pornind de la trei direcții majore. Prima parte analizează corelația dintre răspunsul la terapia *frontline*, evoluția pacienților până la transplant medular și corelația cu profilul genetic identificat la diagnostic. A doua secțiune este centrată pe abordarea mutațiilor somatice dintre care se va pune accent pe *TP53*, recunoscut pentru prognosticul rezervat, și activarea căii RAS/MAPK, cu valențele ei multiple. În final, este evidențiată relevanța predispozițiilor genetice și al mutațiilor de linie germinală precum *GATA2* și *RUNX1*, care oferă o perspectivă asupra riscului ereditar în neoplaziile mieloide și impactul acestora în contextul efectuării procedurii de transplantului de celule stem hematopoietice.

Prin integrarea datelor moleculare cu informațiile clinico-terapeutice, acest studiu își propune să contribuie la consolidarea unei abordări personalizate în tratamentul neoplaziilor mieloide pediatrice, orientată de profilul genomic individual al pacientului.

Ipotezele de lucru pentru Studiul 2 au fost:

- i. Pacienții care ating negativitate MRD după inducție au o supraviețuire semnificativ mai bună și o rată mai mică de recădere post-TCSH
- ii. În LMMCJ cu mutații RAS, răspunsul la AZA se corelează cu obținerea remisiunii moleculare post-TCSH, sugerând valoarea acestuia ca factor predictiv
- iii. Profilul citogenetic clasic nu are valoare predictivă suficientă pentru răspunsul în inducție sau evoluția post-TCSH
- iv. Mutațiile *TP53* conferă un prognostic sever, indiferent de tratamentul utilizat, iar detectarea lor justifică abordări terapeutice precoce și intensificate
- v. Mutațiile germinale (ex. *RUNX1*, *GATA2*) cresc semnificativ riscul de complicații post-transplant și impun o strategie terapeutică individualizată

Obiectivele principale ale studiului 2 au fost:

- i. Caracterizarea răspunsului terapeutic în funcție de regimul de inducție (AIE/MEC), statusul MRD și profilul citogenetic inițial în LAM
- ii. Determinarea valorii predictive a răspunsului la AZA pentru succesul TCSH-ului la pacienții cu SMD/NMPp, în special în LMMCJ
- iii. Evaluarea corelației dintre profilul molecular somatic/germinal, răspunsul terapeutic, complicațiile și supraviețuirea post-transplant

Obiective secundare:

- i. Analiza impactului mutațiilor *TP53* asupra răspunsului la tratament și supraviețuire
- ii. Descrierea comportamentului clinic al mutațiilor în calea RAS, în mod particular *NRAS* întrucât prezintă frecvență crescută în cohorta noastră
- iii. Explorarea semnificației clinice a mutațiilor de linie germinală *RUNX1* și *GATA2*, cu accent pe impactul asupra evoluției în TCSH
- iv. Sistematizarea cazurilor cu sindroame genetice rare pentru a evidenția necesitatea unui screening extins în contextul neoplaziilor mieloidă pediatrie

Acest studiu observațional a inclus pacienți pediatrici diagnosticați cu LAM, SMD, și NMP între anii 2020–2025, care au primit tratament de primă linie conform protocoalelor terapeutice internaționale. Obiectivul principal al analizei a fost evaluarea corelației dintre răspunsul la tratament și profilul genetic identificat la momentul diagnosticului.

Pentru diagnosticul de LAM, pacienții au fost tratați conform protocoalelor internaționale actuale: AIE (citarabină, idarubicină, etoposid) în cadrul protocolului AML-BFM și MEC (mitoxantronă, etoposid, citarabină) conform protocolului NOPHO. În cazul diagnosticelor de SMD și NMP, s-a administrat AZA la doza de 75 mg/m²/zi, intravenos, timp de 7 zile consecutiv, în cicluri de 28 de zile, cu monitorizarea atentă a toxicităților hematologice și ajustarea regimului în funcție de tolerabilitate.

Toți pacienții au beneficiat de analiză citogenetică convențională și testare moleculară extinsă (NGS). În analiza OS s-au inclus subgrupuri definite de prezența unor anomalii genetice specifice: cariotip complex, monosomie 7, rearanjamente KMT2A (KMT2A-r) și/sau mutație *FLT3-ITD*.

Pentru a evidenția impactul clinic specific al anumitor alterări genetice cu risc prognostic crescut, au fost selectate cazuri reprezentative care ilustrează: efectele mutațiilor somatice adverse (*TP53* și mutații ale căii RAS), precum și consecințele clinice ale mutațiilor germinale, documentate în contexte de sindroame de predispoziție ereditară, cu urmărire longitudinală de la diagnosticul molecular până la realizarea transplantului allogeneic.

Rezultatele obținute subliniază importanța unei evaluări terapeutice și moleculare dinamice în gestionarea neoplaziilor mieloide pediatrice (25). Eficiența regimului de inducție, statusul MRD post-inducție și profilul mutațional germinal sau somatic se conturează drept factori esențiali pentru prognosticul pe termen lung. Mutațiile germinale (*GATA2*, *RUNX1*) și cele adverse (*TP53*) definesc subgrupuri cu risc biologic ridicat, ce necesită monitorizare intensivă, terapie adaptată și precauție în managementul atât pre- cât și post-transplant (21). Limitările citogeneticii convenționale impun integrarea biomarkerilor moleculari și funcționali pentru o predicție precisă a răspunsului și supraviețuirii.

Capitolul 8. Studiul 3 – Analiza comparativă a strategiilor de condiționare utilizate la pacienții pediatrici cu neoplazii mieloide care efectuează TCSH

TCSH constituie o opțiune terapeutică esențială în neoplaziile mieloide pediatrice cu risc înalt, recidivante sau refractare, fiind decis în funcție de stratificarea moleculară și statusul MRD. Deși eficacitatea TCSH a crescut, alegerea regimului de condiționare rămâne o provocare majoră, necesitând echilibru între intensitate terapeutică și toxicitate sistemică. Regimurile de condiționare cu toxicitate sau intensitate redusă au fost progresiv implementate în practica

pediatrică, cu scopul de a reduce complicațiile severe și mortalitatea post-transplant, păstrând în același timp beneficiul imunologic al efectului GvL. Aceste strategii reflectă nevoia unei personalizări terapeutice bazate pe profilul individual de risc și tolerabilitate.

Ipotezele de lucru pentru Studiul 3 au fost:

- i. Regimurile de condiționare RTC și RIC conferă o eficiență terapeutică comparabilă cu MAC la 1 an post-TCSH, dar cu o toxicitate semnificativ redusă la pacienții pediatrici cu neoplazii mieloide
- ii. Infecțiile bacteriene și reactivările virale post-TCSH apar mai frecvent și cu severitate crescută la pacienții tratați cu regim MAC comparativ cu RTC sau RIC
- iii. Infecția cu *Clostridioides difficile* se corelează semnificativ cu formele severe de aGvHD gastrointestinal, având rol patogen activ și prognostic negativ
- iv. Vârsta ≥ 10 ani se asociază cu PFS superior și o rată mai scăzută de recădere post-transplant, în special în grupul tratat cu RTC

Obiectivele principale ale studiului 3 au fost:

- i. Compararea eficienței și profilului de toxicitate al regimurilor de condiționare MAC, RTC și RIC la pacienți pediatrici cu neoplazii mieloide supuși procedurii de TCSH
- ii. Evaluarea parametrilor de eficacitate la un an post-TCSH: incidența GvHD acut și cronic, rata de recădere, supraviețuirea fără progresia bolii (PFS), supraviețuirea globală (OS), mortalitatea generală și cauzele acesteia
- iii. Analiza evenimentelor precoce post-transplant: incidența mucozitei orale, dinamica grefării, reactivările virale, incidența infecției *Clostridioides difficile*, durata spitalizării și necesarul transfuzional
- iv. Evaluarea impactului mutațiilor recurente identificate în cohorta de pacienți transplantați asupra supraviețuirii precoce post-TCSH și obținerii remisiunii complete, cu scopul de a defini un posibil profil molecular asociat riscului

Obiective secundare:

- i. Evaluarea diferențelor evolutive între formele de LAM *de novo* versus secundară
- ii. Evaluarea evoluției post-TCSH a pacienților în funcție de grupa de vârstă ($</\geq 10$ ani)
- iii. Determinarea răspunsului la AZA post-TCSH administrată ca monoterapie sau în asociere cu DLI

Acest studiu retrospectiv a analizat 33 de pacienți pediatrici diagnosticați cu LAM, SMD și NMP, care au beneficiat de procedură de TCSH, în perioada 2020–2025, în cadrul Institutului Clinic Fundeni. Toți pacienții au avut profil molecular documentat la diagnostic, permițând integrarea acestor date în evaluarea post-TCSH. Transplantul a fost indicat în funcție de riscul evolutiv și răspunsul la tratamentul de inducție, fiind precedat de evaluarea MRD și a statusului de remisiune.

Pacienții au fost împărțiți în trei grupuri în funcție de regimul de condiționare utilizat: mieloablative (MAC), cu toxicitate redusă (RTC) și cu intensitate redusă (RIC). Regimurile au fost alese în funcție de profilul clinic, compatibilitatea donatorului și obiectivele terapeutice. Profilaxia GvHD a fost personalizată, variind în funcție de tipul de donator (MSD, MUD, haploidentice). Parametrii principali monitorizați au inclus grefarea hematologică, chimerismul complet, complicațiile infecțioase (CMV, EBV, BKV), incidența GvHD acute și cronice, precum și supraviețuirea fără progresie (PFS) și supraviețuirea globală (OS).

Un subgrup de pacienți a primit terapie post-TCSH cu azacitidină (AZA) și infuzie de limfocite de la donator (DLI), atât profilactic, cât și terapeutic, în funcție de statusul MRD sau prezența chimerismului mixt. Aceste intervenții au urmărit consolidarea remisiunii și prevenirea recăderii. Studiul oferă o imagine detaliată asupra eficienței și siguranței diferitelor regimuri de condiționare și strategii adjuvante post-transplant în contextul neoplaziilor mieloidelor pediatrice.

Analiza regimurilor de condiționare în TCSH pentru neoplaziile mieloidelor pediatrice evidențiază nevoia unei strategii terapeutice personalizate, care să balanseze eficiența oncologică și riscurile toxice (26). Regimurile reduse (RTC/RIC) se dovedesc opțiuni viabile pentru pacienții vulnerabili, asigurând tolerabilitate crescută și control al bolii comparabil cu MAC, dar cu un profil de toxicitate și complicații infecțioase semnificativ redus (27). Factorii precum vârsta, statusul pre-transplant, mutațiile moleculare și tipul regimului influențează evoluția post-TCSH și susțin utilizarea unui algoritm decizional integrativ, orientat pe biomarkeri clinici și genetici pentru optimizarea rezultatelor și minimizarea riscurilor (28-31).

Capitolul 9. Concluzii și contribuții personale

Concluzii Studiul 1:

1. Studiul evidențiază heterogenitatea profundă a neoplaziilor mieloidelor pediatrice, atât din punct de vedere biologic, cât și clinic.

2. Lotul de pacienți cu neoplasme mieloide pediatrice a inclus trei entități principale, cu vârsta medie semnificativ mai mică în grupurile SMD și NMP comparativ cu LAM (3,5 și 5,7 ani vs. 9 ani; $p=0.008$).
3. Istoricul de complicații perinatale și infecții recurente a fost semnificativ mai frecvent în SMD (42,9%), sugerând un teren biologic fragil la aceste subgrupuri.
4. Manifestările clinice și paraclinice au evidențiat diferențe nete între entități: NMP se caracterizează prin infiltrare multiorganică (hepatomegalie, splenomegalie, adenopatii); LAM prezintă profil biologic intens proliferativ, susținut de sindromul de liză tumorală (31,8%, $p=0.036$), markerii inflamatori și necesarul transfuzional combinat crescut (>60%, citopenii multifactoriale), sugerând o activare oncogenică majoră; SMD este lent progresiv.
5. Ponderele cazurilor secundare a fost mai mare în SMD (57,1%) și LAM (38,6%), dar toate cazurile secundare din grupurile SMD/NMP și 41.2% din LAM au fost în context de predispoziție genetică, susținând importanța evaluării genetice precoce și screening-ului familial.
6. Displazia multilineală nu a fost predictor semnificativă pentru prognosticul negativ
7. MPAL a fost identificat în 15,9% dintre cazurile LAM, fiind asociate cu prognostic rezervat.
8. Coexpresia markerilor imunofenotipici și heterogenicitatea fenotipică au fost frecvente, reflectând plasticitate și instabilitate imunofenotipică, deși ne semnificative statistic.
9. Expresia markerului CD7 se conturează ca un indicator imunofenotipic precoce cu impact prognostic negativ în LAM pediatrică, reducând OS (14,4 luni vs. mediană neatinsă; $p=0.005$) și menținând această tendință post-TCSH. CD56 și CD123 nu au influențat supraviețuirea semnificativ.
10. Instabilitatea cromozomială și anomaliile de cariotip au fost semnificativ mai frecvente în LAM și SMD decât în NMP ($p=0.038$, respectiv $p=0.034$), susținând diferențele de stabilitate genomică între entități.
11. Fuziunile genice constituie un element central în arhitectura moleculară a LAM pediatrică, cu impact direct asupra prognosticului și strategiilor terapeutice. Frecvența detectată în acest studiu a fost relativ redusă (36.8%), cele mai frecvente fiind RUNX1::RUNX1T1 și KMT2A::AF9, precum și unele cu implicații prognostice

negative (ex: NUP98 și KMT2A cu diverși parteneri de fuziune), demonstrând atât diversitatea cât și relevanța clinică

12. Clasificarea funcțională a mutațiilor identificate în cadrul lotului a evidențiat trasee moleculare dominante per entitate: LAM cu distribuție largă (predominanță *RAS* și *FLT3*), caracterizat de activări proliferative, anti-apoptotice și epigenetice, asociate cu agresivitate crescută; NMP este dominată de mutații RAS/MAPK (ex. *KRAS*, *PTPN11*), definind o biologie hiperproliferativă și rezistentă; SMD cu mutații în factori de transcripție și predispoziții germinale (*SAMD9/SAMD9L*, *GATA2*)
13. Arhitectura genomică distinctă pe entitate indică, de asemenea, mecanisme patogenice diferențiate: LAM prezintă un profil hipermutat și activare mitogenică intensă (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3-ITD*, *KMT2A*), NMP se definește prin activarea căii RAS fără complexitate genomică majoră, iar SMD are un profil mai restrâns ce sugerează predispoziție genetică precoce și progresie lentă
14. Tiparele de asociere ale mutațiilor reflectă rețele funcționale cooperante: corelațiile între mutații epigenetice (ex. *STAG2*, *KDM6A*, *ASXL1*), fuziuni transcripționale (ex. *RUNX1::AFF3*, *NUP98::DENR*) și gene proliferative (ex. *WT1*, *MYC*, *STAT3*). Acestea sugerează o arhitectură genetică cooperantă, cu potențial de a ghida strategii terapeutice combinate și personalizate pentru subgrupuri distincte de boli.
15. NMP și MPAL au prezentat cele mai scurte mediane de supraviețuire (16,5 luni, respectiv 9,2 luni)
16. Analiza OS evidențiază tendințe relevante în funcție de vârstă, cu un prognostic vizibil mai rezervat la copiii sub 1 an, deși nesemnificativ statistic probabil din cauza numărului redus de cazuri ($p = 0.577$)
17. Pacienții cu MPAL au avut OS mai scurtă, indicând un comportament biologic mai agresiv. Prognosticul este influențat favorabil de răspunsul timpuriu la tratament, negativarea MRD și utilizarea schemelor terapeutice de tip LAL.
18. În acest studiu, LAM secundară nu s-a asociat cu OS mai redusă față de formele *de novo*, cu excepția cazurilor cu predispoziție genetică (mediana: 18,5 luni), unde prognosticul este mai rezervat.
19. Anumite semne clinice și paraclinice la diagnostic, precum sepsisul, ascita, leucocitoza extremă, procentul de блаști >70% sau chiar >50%, dependența transfuzională, s-au

asociat cu supraviețuire semnificativ redusă, sugerând un fenotip biologic agresiv. Aceste manifestări pot funcționa ca indicatori precoce de boală evolutivă severă, ghidând clinicianul în stratificarea riscului și ajustarea timpurie a terapiei.

20. Antecedentele personale și familiale, tipul și gradul de displazie identificat la examenul morfologic nu au avut rol predictiv pentru evoluția bolii.
21. Deși parametrii genetici evaluați (*FLT3-ITD*, *KMT2A-r*, anomalii cromozom 7, cariotip complex) nu au evidențiat diferențe statistic semnificative în supraviețuire, tendințele clinice sugerează un impact negativ pentru mutațiile *FLT3-ITD* și deleția 7q. Aceste rezultate indică necesitatea validării în cohorte extinse.

Concluzii studiul 2:

1. Eficiența regimului de inducție influențează direct OS, pacienții tratați cu MEC și cei cu RC post-inducție prezintă rate semnificativ superioare de supraviețuire.
2. Statusul MRD la finalul inducției este un predictor independent major de prognostic, asociat cu o reducere semnificativă a riscului de recădere și o supraviețuire mai îndelungată.
3. Citogenetica convențională nu permite predicția eficientă a răspunsului în inducție sau a mortalității precoce, fiind necesară completarea cu markeri moleculari dinamici.
4. Tratamentul cu AZA în SMD/NMPp oferă o fereastră eficientă de pregătire pentru TCSH, iar răspunsul precoce poate servi ca biomarker predictiv pentru succesul post-transplant.
5. Subgrupurile moleculare cu mutații *TP53* prezintă un profil profund advers, cu supraviețuire redusă și rezistență la terapii combinate.
6. Mutațiile *NRAS* demonstrează comportamente heterogene, de la evoluții indolente la forme agresive de LMMCJ.
7. Mutațiile germinale, în special *GATA2* și *RUNX1*, dar și alte sindroame de predispoziție, definesc subgrupuri distincte de risc, cu implicații majore asupra monitorizării pacienților, screening-ul familial și mai ales al deciziilor terapeutice.
8. Complicațiile post-transplant, în special GvHD și infecțiile severe, sunt exacerbate în contextul predispozițiilor germinale.

Concluzii studiul 3:

1. Analiza comparativă a regimurilor de condiționare utilizate în TCSH-ul pediatric pentru neoplaziile mieloidă subliniază necesitatea unei strategii terapeutice personalizate, adaptate la complexitatea biologică și clinică.
2. Regimurile RTC și RIC se conturează drept alternative terapeutice viabile pentru pacienții vulnerabili, oferind toxicitate redusă și tolerabilitate crescută, fără a compromite eficiența oncologică - OS și PFS la 1 an nu au prezentat diferențe semnificative statistic între regimuri.
3. Infecțiile post-transplant, în special cele bacteriene, și reactivările virale (CMV, BKV), au fost frecvente. Regimul MAC a fost asociat cu risc mai mare de infecții severe.
4. Infecția cu *Clostridioides difficile* s-a corelat cu forme severe și persistente de aGvHD gastrointestinal, evidențiind o interacțiune bidirecțională între colonizarea digestivă și inflamația mediată imun.
5. Regimurile RIC s-au asociat cu o incidență crescută a cGvHD.
6. Azacitidina post-TCSH a demonstrat profil de siguranță favorabil, dar beneficiul asupra supraviețuirii în cohorta actuală nu a fost semnificativ statistic, probabil din cauza selecției pacienților cu risc crescut de recădere.
7. Vârsta pacienților a influențat semnificativ evoluția post-transplant: cei sub 10 ani au avut rate mai mari de recădere, iar cei ≥ 10 ani au prezentat PFS superior și o tendință favorabilă în ceea ce privește OS.
8. Regimul RTC a fost asociat cu o toxicitate sistemică redusă, grefare mai rapidă și profil imunologic mai favorabil la pacienți selectați (peste 10 ani, aflați în prima remisiune completă)
9. Analiza moleculară a evidențiat un risc crescut de deces în primul an post-TCSH la pacienții cu mutații *EGFR*, *MET*, *GATA2*, *RUNX1*, *FLT3*, *CDK4*, *KRAS* și *PTPN11*. Din familia RAS, mutațiile în *NRAS* nu au influențat supraviețuirea, regăsindu-se predominant la pacienții care au depășit 1 an de la procedura de TCSH.
10. Rezultatele susțin implementarea unui algoritm terapeutic integrativ, care să permită alegerea unui regim de condiționare cu toxicitate redusă în condiții de siguranță și care să includă: statusul de remisiune pre-transplant, stratificarea moleculară și imunologică, evaluarea riscului infecțios, profilul de toxicitate.

O serie de limitări trebuie avute în vedere în interpretarea rezultatelor acestui demers științific. Dimensiunea redusă a cohortelor, caracteristică cercetării în domeniul oncologiei pediatrice, limitează puterea statistică și posibilitatea de extrapolare a concluziilor. În plus, heterogenitatea biologică marcată a neoplaziilor mieloides la copil, exprimată printr-o diversitate moleculară crescută și prezența unor entități rare, generează variabilitate în datele obținute și impune prudență în generalizare. Variabilitatea tehnologică inerentă utilizării a două paneluri de secvențiere, diferențele în sensibilitatea metodelor de detecție sau tipurile de probe biologice pot influența interpretarea comparativă a mutațiilor. Aceste limitări subliniază necesitatea validării în cohorte multicentrice extinse și a continuării cercetării în cadrul unor consorții internaționale dedicate patologiilor mieloides pediatrice.

Contribuții personale:

Această lucrare reflectă contribuția mea directă la implementarea și consolidarea analizei moleculare prin secvențiere NGS în practica pediatrică a Institutului Clinic Fundeni, începând din 2019, în cadrul unei colaborări interdisciplinare între Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau” și rețeaua MedLife. Implicarea activă în dezvoltarea și extinderea acestor parteneriate a permis integrarea profilării genetice în evaluarea pacienților pediatrici cu hemopatii maligne. Am contribuit la stabilirea colaborării cu grupul EWOG din Freiburg, Germania, facilitând accesul la rețele internaționale de cercetare, și am participat la inițierea procesului de biobancare a probelor biologice în colaborare cu Centrul de Medicină Translațională (CEMT), consolidând astfel infrastructura necesară pentru medicina de precizie. Toate aceste realizări au fost posibile datorită coordonării științifice și sprijinului constant oferit de doamna Prof. Univ. Dr. Anca Coliță și a echipei multidisciplinare din cadrul Institutului Clinic Fundeni, cărora le sunt profund recunoscătoare.

Bibliografie selectivă

1. Aung MMK, Mills ML, Bittencourt-Silvestre J, Keeshan K. Insights into the molecular profiles of adult and paediatric acute myeloid leukaemia. *Mol Oncol*. 2021;15(9):2253-72.
2. Locatelli F, Strahm B. How I treat myelodysplastic syndromes of childhood. *Blood*. 2018;131(13):1406-14.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140(11):1200-28.
4. Khoury JD, Solary E, Abela O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-19.
5. Xiao W, Nardi V, Stein E, Hasserjian RP. A practical approach on the classifications of myeloid neoplasms and acute leukemia: WHO and ICC. *J Hematol Oncol*. 2024;17(1):56.
6. Arber DA, Orazi A. Classification of Myelodysplastic, Myeloproliferative, and Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms: The Past, Present, and Future. *Am J Hematol*. 2025;100 Suppl 4(Suppl 4):5-15.
7. Arghirescu S BA, Blag C, Cianga AL, Colita A, Colita A, Miron I, Oprisoni AL, Radu LE, Voda DM. Actualitati in hematologia pediatria. Viata Medicala, Medichub Media, Bucuresti. 2024;38-42,54-47.
8. Ghosh S, Jha, S., Choudhary, A., & Yadav, A. Review of Leukemia in Children. *International Journal of Trends in OncoScience*. 2024.
9. Niemeyer CM, Arico M, Basso G, Biondi A, Cantu Rajnoldi A, Creutzig U, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). *Blood*. 1997;89(10):3534-43.
10. Avagyan S, Shimamura A. Lessons From Pediatric MDS: Approaches to Germline Predisposition to Hematologic Malignancies. *Front Oncol*. 2022;12:813149.
11. Kennedy AL, Shimamura A. Genetic predisposition to MDS: clinical features and clonal evolution. *Blood*. 2019;133(10):1071-85.
12. Schwartz JR, Ma J, Lamprecht T, Walsh M, Wang S, Bryant V, et al. The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes. *Nat Commun*. 2017;8(1):1557.
13. Badelita S BD, Branza M, Cirstea M, Crisan A, Dobrea C, Coriu D, et al. Hematologie clinică în practica medicală. Editura Medicala, Bucuresti. 2021:101-8, 15-21.
14. Fish JD LJ, Lankowsky P. eds. Lankowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology. 2022;7th Edition:40, 96, 390-409, 39-57.
15. Attardi E, Corey SJ, Wlodarski MW. Clonal hematopoiesis in children with predisposing conditions. *Semin Hematol*. 2024;61(1):35-42.
16. Strahm B, Malkin D. Hereditary cancer predisposition in children: genetic basis and clinical implications. *Int J Cancer*. 2006;119(9):2001-6.
17. Lamba JK, Cao X, Raimondi S, Downing J, Ribeiro R, Gruber TA, et al. DNA Methylation Clusters and Their Relation to Cytogenetic Features in Pediatric AML. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10).
18. Krizsan S, Peterffy B, Egyed B, Nagy T, Sebestyen E, Hegyi LL, et al. Next-Generation Sequencing-Based Genomic Profiling of Children with Acute Myeloid Leukemia. *J Mol Diagn*. 2023;25(8):555-68.
19. Meena JP, Pathak N, Gupta AK, Bakhshi S, Gupta R, Makkar H, et al. Molecular evaluation of gene mutation profiles and copy number variations in pediatric acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2022;122:106954.

20. Daver NG, Maiti A, Kadia TM, Vyas P, Majeti R, Wei AH, et al. TP53-Mutated Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: Biology, Current Therapy, and Future Directions. *Cancer Discov.* 2022;12(11):2516-29.
21. Marcu AD, Bica AM, Jercan CG, Radu LE, Serbanica AN, Jordan D, et al. Insights into Pediatric GATA2-Related MDS: Unveiling Challenges in Clinical Practice. *Biomedicines.* 2025;13(4).
22. Simon L, Spinella JF, Yao CY, Lavallee VP, Boivin I, Boucher G, et al. High frequency of germline RUNX1 mutations in patients with RUNX1-mutated AML. *Blood.* 2020;135(21):1882-6.
23. Godley LA, DiNardo CD, Bolton K. Germline Predisposition in Hematologic Malignancies: Testing, Management, and Implications. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2024;44(3):e432218.
24. Kanagal-Shamanna R, Schafernak KT, Calvo KR. Diagnostic work-up of hematological malignancies with underlying germline predisposition disorders (GPD). *Semin Diagn Pathol.* 2023;40(6):443-56.
25. Marcu A, Colita A, Radu LE, Jercan CG, Bica AM, Asan M, et al. Single-Center Experience With Epigenetic Treatment for Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Front Oncol.* 2020;10:484.
26. Niculita OO MA, Bica AM, Doncu RE, Colita A, Jercan CG. Oral mucositis – significant complication of pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Ro J Pediatr.* 2021;70(2):148-55.
27. Marcu AD JC, Bica AM, Serbanica AN, Radu LE, Avramescu I, Mocanu A, Niculita OO, Popa DC, Jordan C, Dragomir SM, Colita A, Tanase AD, Colita A. Conditioning Regimens in Pediatric Myeloid Malignancies Undergoing Allogeneic HSCT: A Comparative Single-Center Study. *Frontiers in Oncology.* 2025;Pediatric Oncology.
28. Bitan M, He W, Zhang MJ, Abdel-Azim H, Ayas MF, Bielora B, et al. Transplantation for children with acute myeloid leukemia: a comparison of outcomes with reduced intensity and myeloablative regimens. *Blood.* 2014;123(10):1615-20.
29. Lucchini G, Labopin M, Beohou E, Dalissier A, Dalle JH, Cornish J, et al. Impact of Conditioning Regimen on Outcomes for Children with Acute Myeloid Leukemia Undergoing Transplantation in First Complete Remission. An Analysis on Behalf of the Pediatric Disease Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(3):467-74.
30. Pulsipher MA, Boucher KM, Wall D, Frangoul H, Duval M, Goyal RK, et al. Reduced-intensity allogeneic transplantation in pediatric patients ineligible for myeloablative therapy: results of the Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium Study ONC0313. *Blood.* 2009;114(7):1429-36.
31. Scott BL, Pasquini MC, Logan B, Wu J, Devine S, Porter DL, et al. Results of a Phase III Randomized, Multi-Center Study of Allogeneic Stem Cell Transplantation after High Versus Reduced Intensity Conditioning in Patients with Myelodysplastic Syndrome (MDS) or Acute Myeloid Leukemia (AML): Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN) 0901. *Blood.* 2015;126(23):LBA-8.

Lista lucrărilor științifice publicate

- **Marcu A**, Colita A, Radu LE, Jercan CG, Bica AM, Asan M, Coriu D, Tanase AD, Diaconu CC, Mambet C, Botezatu A, Pasca S, Teodorescu P, Anton G, Gurban P, Colita A. *Single-Center Experience With Epigenetic Treatment for Juvenile Myelomonocytic Leukemia*. Front Oncol. 2020 Apr 9;10:484. doi: 10.3389/fonc.2020.00484. PMID: 32328464; PMCID: PMC7161089. Indexarea revistei: ISI. FI: 3.5, capitol 3, pag 30, capitol 7, pag 90, 95, 106.
- **Marcu, A.D.**; Bica, A.M.; Jercan, C.G.; Radu, L.E.; Serbanica, A.N.; Jordan, D.; Colita, A.; Dima, S.O.; Tomuleasa, C.; Tanase, A.D.; et al. *Insights into Pediatric GATA2-Related MDS: Unveiling Challenges in Clinical Practice*. Biomedicines 2025, 13, 827. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13040827>. Indexarea revistei: ISI. FI: 3.9, capitol 2, pag 22, capitol 7, pag 100,108.
- **Marcu AD**, Jercan CG, Bica AM, Serbanica AN, Radu LE, Avramescu I, Mocanu A, Niculita OO, Popa DC, Jordan C, Dragomir D, Colita A, Tanase AD, Colita A. *Conditioning Regimens in Pediatric Myeloid Malignancies Undergoing Allogeneic HSCT: A Comparative Single-Center Study*. Frontiers in Oncology, 2025. Indexarea revistei: ISI. FI:3.5, capitol 8, pag 120-121, 123, 127.
- Niculita OO, **Marcu AD**, Bica AM, Doncu RE, Colita A, Jercan CG. *Oral mucositis – significant complication of pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation*. Ro J Pediatr. 2021;70(2). doi: 10.37897/RJP.2021.2.10. Indexarea revistei: BDI (autor corespondent), capitol 8, pag 123, 125.
- Tigu AB, Constantinescu CS, Teodorescu P, Kegyes D, Munteanu R, Feder R, Peters M, Pralea I, Iuga C, Cenariu D, **Marcu A**, Tanase A, Colita A, Drula R, Bergthorsson JT, Greiff V, Dima D, Selicean C, Rus I, Zdrenghia M, Gulei D, Ghiaur G, Tomuleasa C. *Design and preclinical testing of an anti-CD41 CAR T cell for the treatment of acute megakaryoblastic leukaemia*. J Cell Mol Med. 2023 Oct;27(19):2864-2875. doi: 10.1111/jcmm.17810. Epub 2023 Sep 4. PMID: 37667538; PMCID: PMC10538266. Indexarea revistei: ISI. FI: 4.3