

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

Factori genetici și de biologie moleculară care pot influența evoluția și prognosticul în leucemia acută

Doctorand: **Alexandra-Elena Neaga**

Conducător de doctorat: Prof.dr. **Mihnea Zdrengea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

*“If we knew what it was we were doing, it
would not be called research, would it?”*

Albert Einstein

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Neaga A, Bagacean C, Tempescul A, Jimbu L, Mesaros O, Blag C, Tomuleasa C, Bocsan C, Gaman M, and Zdrenghea M (2021) MicroRNAs Associated With a Good Prognosis of Acute Myeloid Leukemia and Their Effect on Macrophage Polarization. *Front. Immunol.* 11:582915. doi: 10.3389/fimmu.2020.582915 (ISI, impact factor: 7.56, Q1, indexat PubMed). Studiu cuprins în capitolul 2.
2. Neaga A, Jimbu L, Mesaros O, Bota M, Lazar D, Cainap S, Blag C, Zdrenghea M. Why do children with acute lymphoblastic leukemia fare better than adults?. *Cancers.* 2021 Aug 2;13(15):3886. (ISI, impact factor 6.75, Q1, indexat PubMed). Studiu cuprins în capitolul 1.
3. Neaga A, Jimbu L, Mesaros O, Blag C, Zdrenghea M. Children With Acute Lymphoblastic Leukemia in Romania: Results From a Decade-Long Single-Center Study. *Cureus.* 2024 Sep 25;16(9). (ISI, impact factor 1,1, Q3, indexat Web of Science). Studiu cuprins în capitolele 3 și 4.

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Leucemia acută limfoblastică la copii	19
1.1. Istoric	19
1.2. Aspecte generale	19
1.3. Stabilirea diagnosticului	20
1.3.1. Manifestări clinice și examen obiectiv	20
1.3.2. Investigații paraclinice	21
1.3.2.1. Bilanțul inițial	22
1.3.2.2. Aspiratul și biopsia osteomedulară	22
1.3.2.3. Imunofenotipare	23
1.3.2.4. Gene de fuziune în LAL	23
1.3.2.5. Cariotipul	27
1.3.3. Încadrarea în grupe de risc	27
1.4. Tratament	28
1.4.1. Chimioterapie citostatică	29
1.4.2. Imunoterapie	29
1.5. Evaluarea răspunsului la tratament	31
2. Rolul microARN în leucemia acută limfoblastică	33
2.1. Introducere	33
2.2. Rolul miR în prognosticul LAL la copii	34
2.3. Rolul miR în timpul tratamentului, răspunsul la tratament și toxicitatea în LAL la copii	35
2.3.1. miR și rezistența multidrug	36
2.3.2. miR asociate cu recidiva în LAL la copii	38
2.3.3. miR ca instrument pentru imunoterapie	42
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
1. Ipoteza de lucru/obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1 - Leucemia acută limfoblastică la copii: caracteristici clinice, biologice, epidemiologice și răspunsul la tratament	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	50
3.3. Material și metodă	50
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	58
3.6. Concluzii	61

4. Studiul 2 - Supraviețuirea pacienților pediatrici diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică	63
4.1. Introducere	63
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	64
4.3. Material și metodă	64
4.4. Rezultate	64
4.5. Discuții	75
4.6. Concluzii	77
5. Studiul 3 – Rolul miR în prognosticul pacienților pediatrici diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică	79
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	80
5.3. Material și metodă	80
5.4. Rezultate	82
5.5. Discuții	90
5.6. Concluzii	92
6. Discuții generale	93
7. Concluzii generale	97
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101
ANEXE	107

ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT

ADN	Acid deoxiribonucleic
ALL-IC BFM 2002	Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental Berlin-Frankfurt-Münster Study Group 2002
ALL-IC BFM 2009	Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental Berlin-Frankfurt-Münster Study Group 2009
ARN	Acid ribonucleic
AYA	Adolescenți și adulți tineri
CD	Cluster of differentiation
cDNA	ADN complementar
EFS	Event-free survival
FCM-MRD	Boală reziduală minimă determinată prin flow-citometrie
FISH	Hibridizare in situ cu fluorescență
HRG	Grupă de risc înalt
LAL	Leucemie acută limfoblastică
LAL-B	LAL cu celule B
LAL-T	LAL cu celule T
miR	MicroARN
MO	Măduvă osoasă
MRD	Boală reziduală minimă
MRG	Grupă de risc mediu
NGS	Next generation sequencing
OMS	Organizația mondială a sănătății
OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
PGR	Răspuns bun la prednison
Ph+LAL	LAL cu cromozom Philadelphia
PPR	Răspuns nesatisfăcător la prednison
RNOHP	Registrul Național de Onco-Hematologie Pediatrică
RQ	Cuantificare relativă
RT qPCR	Real time quantification PCR
SRG	Grupă de risc standard

INTRODUCERE

Leuceмиile acute la copii cuprind mai multe entități, însă cele mai frecvent întâlnite sunt leucemia acută limfoblastică și cea mieloblastică. În această lucrare am abordat pacienții diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică cu celule B și cu celule T. Este bine știut faptul că LAL la copii este o boală cu grad înalt de obținere a remisiei complete, în special în țările dezvoltate, unde ratele ating procente de 85-90%, în unele țări vest-europene chiar depășind aceste procente. Totodată în jur de 20% dintre copii fie recidivează, fie nu răspund la tratament. O multitudine de factori prognostici pot anticipa care dintre pacienți va avea o evoluție nefavorabilă, însă există pacienți aparent fără factori de prognostic negativ, care cad pradă bolii. Din această cauză, LAL la copii este încă o boală intens studiată. În ultimii ani, progrese importante au fost înregistrate, în special introducerea testării bolii minime reziduale, care contribuie la stratificarea mai corectă a pacienților în grupe de risc, drept urmare identificând mai corect pacienții care au nevoie de scheme de chimioterapie mai intense, transplant allogen de celule stem în prima remisie completă, sau, din contră, pacienții la care se poate reduce intensitatea chimioterapiei. De asemenea, pe lângă genele de fuziune deja cunoscute ca fiind markeri prognostici, au fost identificate multe altele care intervin în evoluția și prognosticul acestei patologii (de exemplu, identificarea deleției genei *Ikaros*, identificarea genei *Ikaros^{plus}*, sau a semnăturii Philadelphia-like).

În plus, există modificări epigenetice, iar în ultimii ani s-a descoperit faptul că ARN-urile non-codificante joacă roluri importante, în special microARN-urile. Acestea conlucrează în grupuri care reglează procese la nivel celular în diferite stadii ale limfopoiezei, cum ar fi supresia tumorală sau promoția tumorală. Drept urmare, în timpul proliferării blastilor apar expresii anormale ale unor anumite microARN-uri, care ar putea fi considerate ca o „semnătură” în leucemia acută limfoblastică. Modificarea expresiei are roluri importante în apariția LAL, rezistența la terapie și a altor procese, însă reversia expresiilor ar putea avea rol terapeutic.

În această teză am urmărit caracteristicile personale, biologice și epidemiologice, supraviețuirea pacienților diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică și unele dintre microARN-urile care ar avea rol în LAL, din cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca, Departamentul de Oncologie și Hematologie Pediatrică.

Primul studiu este unul retrospectiv, care cuprinde pacienții diagnosticați cu LAL timp de 10 ani între 01.01.2011 și 02.04.2021, pe o cohortă de 158 de pacienți, în care am descris caracteristicile personale (vârstă, sex), cele biologice (numărul de leucocite la diagnostic, evaluarea morfologică, imunofenotipică, citogenetică, răspunsul la

prednison, răspunsul morfologic și rezultatele MRD, pe lângă altele) și ratele de incidență, reprezentate de rate brute și rate standardizate. Toate aceste variabile au fost evaluate statistic. Rezultatele principale au evidențiat că niciunul dintre pacienții cu recidivă foarte proceoce nu a intrat în a doua remisie completă, în timp ce toți pacienții cu recidive tardive au intrat în remisie completă. De asemenea, odată cu introducerea testării MRD am observat o schimbare a distribuirii a grupelor de risc: înainte de această testare, majoritatea pacienților făceau parte din grupele de risc standard și mediu, iar după testare distribuția s-a schimbat, în sensul că majoritatea pacienților au fost stratificați în grupele de risc mediu și înalt.

Al doilea studiu este unul de supraviețuire, pentru care am împărțit pacienții în două cohorte: cohorta 2011-2015 și cohorta 2016-2020. Am urmărit supraviețuirea (OS și EFS) la 5 și la 10 ani în funcție de mai mulți parametri: genul pacienților, grupele de vârstă, grupele de risc, răspunsul la prednison, răspunsul morfologic la tratament, boala reziduală minimă, imunofenotip, numărul de leucocite la diagnostic. Cele mai importante rezultate obținute sunt: creșterea cu 2% a supraviețuirii cohortei 2016-2020 comparativ cu precedenta, pacienții cu mai puțin de 25% blaști în aspiratul osteomedular în ziua 15 au avut OS și EFS mai mari la cinci ani decât cei care au avut MRD<10%, dar adevărata îmbunătățire a ratelor de supraviețuire a fost înregistrată în rândul copiilor cu MRD>10% comparativ cu pacienții cu >25% blaști în aspiratul osteomedular (70% versus 40%). Pacienții cu imunofenotip T sau cu număr mare de leucocite au suferit toate evenimentele (recidivă, deces, progresie) în primul an de la diagnostic, însă în ultimii ani a crescut supraviețuirea acestora.

Cel de-al treilea studiu din cadrul tezei este despre expresia microARN în LAL. Pe o perioadă de 4 ani, am colectat probe biologice de la 50 de pacienți nou diagnosticați (ser, celule mononucleate din aspiratul osteomedular), din care am ales 20 de pacienți reprezentativi, dintre care 10 au răspuns favorabil la tratament, iar 10 fie au recidivat, au progresat sau au decedat, fiind urmăriți pe o perioadă de 3 ani. Analiza a fost efectuată din serul copiilor, determinarea nivelurilor de expresie ale microARN-urilor putând fi considerate adevărate biopsii lichide. Am determinat prin metode de laborator specifice, descrise în detaliu în subcapitolul Materiale și Metode din cel de-al treilea studiu, trei dintre microARN-urile implicate în LAL pediatrică: miR-21, miR-25 și miR-155. Am vrut să aflăm dacă există diferențe între expresia acestor miR și răspunsul la tratament, supraviețuire și recidivă. Din cunoștințele mele, este primul studiu pe acest subiect cercetat în România cu privire la copiii diagnosticați cu LAL. Principalele rezultate obținute sunt: există diferențe între nivelurile de expresie relativă a miR-25 și miR-155, fiind mai mici în cazul copiilor care au răspuns favorabil la tratament, fiind cunoscut faptul că hiperexpresia lor se asociază cu prognostic infaust, iar 65% din cohortă a suferit evenimente ca recidiva sau decesul. De asemenea există corelații între supraviețuire, miR-21 și 25, iar hiperexpresia miR-155 se corelează negativ cu supraviețuirea.

**STADIUL
ACTUAL
AL
CUNOAȘTERII**

1. Leucemia acută limfoblastică la copii

1.1. Istoric

Introducerea terapiei chimioterapeutice în anii 1960 a permis utilizarea multi-modală, de exemplu, în combinație cu radioterapia și tratamentul chirurgical pentru tratamentul cancerului. Drept urmare, supraviețuirea copiilor diagnosticați cu cancer a crescut dramatic de la 20-30% în anii '60 la 62% în anii '70 (1). Cel mai important eveniment, care a deschis drumul spre îmbunătățirea supraviețuirii a fost în anul 1947, când s-a observat că administrarea antagoniștilor de acid folic sunt capabili să inducă remisia pacienților cu LAL. Recunoașterea importanței inducerii remisiei complete cu administrarea chimioterapiei, utilizarea acesteia în combinații, împreună cu terapia suportivă, administrarea profilactică a tratamentului la nivelul sistemului nervos central, precum și recunoașterea nevoii de a dezvolta combinații de agenți chimioterapeutici pentru tratament în timpul remisiei complete, sunt printre factorii care au condus la creșterea progresivă a supraviețuirii (2). În ultimii 70 de ani leucemia acută limfoblastică la copii s-a transformat dintr-o boală fatală, în care supraviețuirea atingea doar 4 luni, într-o boală curabilă, cu o supraviețuire ce depășește 85% (3).

În anul 1995 a fost format grupul Ponte di Legno, denumit după prima localitate unde a avut loc prima întâlnire majoră. De atunci, s-au alăturat 15 grupuri mari de studiu sau instituții și au fost organizate 14 întâlniri ale acestor grupuri. Participanții au fost de acord să utilizeze aceleași criterii sau criterii similare pentru a prezenta rezultatele răspunsului la tratament pentru a putea fi comparate în diverse trial-uri clinice pentru a identifica strategii eficiente ale tratamentului pentru LAL. Sub conducerea lui Haig Riehm și Giuseppe Masera, grupurile BFM și AIEOP (Associazione Italiana di Ematologia Pediatrica) au dat un exemplu prolific de colaborare internațională (4).

1.2. Aspecte generale

Leucemia este cel mai frecvent cancer care apare la copii și adolescenți. LAL este cel mai comun tip, iar peste 80% dintre cazuri sunt clasificate ca și LAL de linie B. Este caracterizată de proliferarea rapidă a progenitorilor slab diferențiați de la nivelul măduvei osoase. Deși etiologia LAL la copii și adolescenți este în mare parte necunoscută, dovezile sugerează că expunerea la radiații ionizante, deși rară, precum și expunerea prenatală sau postnatală la pesticide ar putea fi corelate cu creșterea riscului de a dezvolta LAL (5).

Global, în jur de 240000 de cazuri noi de leucemie sunt diagnosticate în fiecare an. LAL, cea mai comună formă de leucemie în rândul pacienților pediatrici au o incidență de 75% de cazuri în țările în curs de dezvoltare. Reprezintă 76% dintre leucemiile care apar la copiii cu vârste sub 15 ani. Ratele de supraviețuire în țările industrializate au crescut la aproximativ 90% în ultimii ani, cu o supraviețuire globală (OS) de 93% în Statele Unite. Cu toate acestea, în țările cu venit mic și mediu OS variază între 50% și 75%. Această diferență poate fi explicată, în parte, de întârzieri în stabilirea diagnosticului și, drept urmare, în inițierea terapiei (6).

În ciuda succesului tratamentului în LAL există încă aproximativ 20% dintre copii care recidivează și capitulează în fața bolii. Este clar chiar din timpul primelor zile de tratament că unii pacienți au nevoie de un tratament mai puțin intens și că un grup de copii rămâne foarte rezistent la terapie, chiar și cu creșterea intensității. Încadrarea în grupe de risc a fost introdusă pentru a ghida asupra intensității tratamentului, dar aceste criterii sunt insuficiente pentru a discrimina corect predicția riscului de recidivă (3). Aproape 50% dintre copiii care recidivează nu au niciun factor de prognostic negativ și nu au alte caracteristici distinctive comparativ cu pacienții la care se obține remisia completă (7). Prognosticul acestei categorii este sumbru, cu o rată de supraviețuire la 5 ani de mai puțin de 10% (8, 9).

1. 3. Stabilirea diagnosticului

Caracterizarea limfoblaștilor din punct de vedere morfologic, biochimic și imunofenotipic au confirmat că LAL este o afecțiune heterogenă. Această heterogenitate reflectă că diferite tipuri de leucemie iau naștere din progenitorii limfoizi în diferite stadii de diferențiere și că, de obicei, markerii sunt asociați cu mai mult de un stadiu de dezvoltare. Majoritatea cazurilor de LAL la copii (80-90%) exprimă markeri care indică ca origine progenitori B tineri. Aceste cazuri au fost denumite LAL cu celule B precursorare, dar după criteriile OMS din 2017 au fost denumite toate LAL-B (10). LAL-T are originea dintr-un progenitor tânăr de linie T și reprezintă 15% din cazurile de LAL (11).

1.3.1. Manifestări clinice și examen obiectiv

Semnele și simptomele la prezentare ale unui copil cu LAL reflectă gradul de infiltrare medulară cu celule leucemice, răspândirea extramedulară a bolii și eșecul măduvei osoase de a produce o hematopoieză normală. Paloarea, fatigabilitatea, durerile osoase, peteșiile, purpura, sângerarea și febra sunt frecvent prezente la diagnostic, iar limfadenopatiile nedureroase, hepatomegalia și splenomegalia sunt semne ale răspândirii extramedulare a LAL. Implicarea extramedulară a sistemului nervos central și a testiculelor pot fi prezente la diagnostic și trebuie evaluate la prima internare, ca parte a investigațiilor diagnostice. Dovedirea implicării acestor organe pot influența managementul și stratificarea în grupe de risc. Mai rar, copiii cu LAL pot avea la prezentare semne și simptome ale extensiei extramedulare neobișnuite (de exemplu,

oculare, ale vezicii urinare, ale sânilor, pancreasului) sau manifestări endocrinologice mai puțin comune (12, 13). Afectarea extramedulară se regăsește mai degrabă în cazurile cu recidivă sau refractare, dar pot apărea și la diagnostic. Simptome ale hipercalcemiei (letargie, anorexie, slăbiciune musculară, greață, vărsături și constipație) sunt rare și sunt datorate eliberării de la nivelul plăștilor de proteina asociată PTH (14).

Leucemia cu celule T are caracteristici clinice distincte, care includ frecvența mai mare în rândul băieților cu vârste mai mari, un număr inițial de leucocite mare și frecvent prezența de mase mediastinale. Aproximativ jumătate dintre copiii cu LAL-T au mase mediastinale, iar o treime până la jumătate au un număr de leucocite mai mare de $100000/\text{mm}^3$. Pacienții cu LAL-T au, de asemenea, o incidență mai mare a afectării sistemului nervos central (15).

Durata simptomelor până la stabilirea diagnosticului poate dura de la câteva zile la câteva luni. Anorexia este frecventă, dar nu conduce de obicei la pierdere în greutate. Durerea osoasă, care afectează în special oasele lungi este frecventă și reflectă afectarea periostului și osului. Copiii mici se pot prezenta cu dificultăți de mers sau chiar refuzul mersului. Aceste simptome împreună cu artralgiile generalizate sunt datorate, cel mai probabil, infiltrării leucemice a spațiului articular și ar putea complica diagnosticul LAL cu stabilirea altor diagnostice infecțioase sau reumatologice (16).

Durerea osoasă la diagnostic poate fi foarte severă, asociată cu o hemoleucogramă aproape normală, ceea ce contribuie la întârzierea diagnosticului pacienților care se prezintă la medic doar cu această manifestare (între 18% și 23%) (17). Durerea osoasă sau articulară fără prezența de plăști în sângele periferic are potențial să inducă în eroare medicul, drept urmare să introducă corticosteroizi în tratament, de obicei datorită suspiciunii unei artrite idiopatice juvenile. Introducerea tratamentului corticosteroid înainte de evaluarea pacientului pentru LAL poate complica stabilirea diagnosticului de leucemie sau poate induce remisia completă temporară. Durerea osoasă dispare odată cu inițierea tratamentului citostatic. La prima prezentare pot fi prezente organomegalii (ficat, splină, rinichi), disfuncție hepatică, de obicei ușoară. Liza plăștilor, hematopoieza inefficientă și afectarea hepatică conduc la creșterea lactat dehidrogenazei (LDH) (18).

1.3.2. Investigații paraclinice

1.3.2.1. Bilanțul inițial

Aproximativ 20% dintre pacienții care se prezintă cu LAL au un număr de leucocite $>50000/\text{mm}^3$. Gradul de creștere a leucocitelor la diagnostic rămâne unul dintre cei mai importanți predictorii ai prognosticului în LAL. Neutropenia (<500 granulocite/ mm^3) este un fenomen comun, fiind asociat cu un risc ridicat de infecții severe (6). Anemia (hemoglobina <10 g/dL) apare în aproximativ 80% din cazuri. Chiar dacă anemia este severă, eritrocitele sunt de obicei normocrome, normocitare, iar

numărul de reticulocite este scăzut. Trombocitopenia apare la marea majoritate a pacienților, aproximativ 75% având sub 100000 trombocite/mm³. Severitatea și gradul de sângerare se corelează cu gradul trombocitopeniei (19). Hemoragia severă este rară chiar și cu un număr de trombocite mai mic de 20000/mm³, decât dacă febra și infecția (amândouă pot afecta supraviețuirea și funcția trombocitelor) sunt prezente (19). Este important de subliniat faptul că prezentarea doar cu trombocitopenie izolată este foarte rară, existând riscul de a rata diagnosticul de LAL din cauza suspiciunii de purpură trombocitopenică idiopatică, estimată ca fiind mai rară de 1% (20). LAL se mai poate prezenta cu pancitopenie în absența blastilor circulanți și trebuie diferențiată de anemia aplastică prin aspirat osteomedular și biopsie medulară (21). În toate cazurile în care există această prezentare, pancitopenia este probabil datorată inhibiției creșterii și diferențierii precursorilor hematopoietici normali dată de infiltrația leucemică (22).

1.3.2.2. Aspiratul și biopsia osteomedulară

Aspiratul osteomedular, cu sau fără biopsie stabilește diagnosticul de leucemie fără echivoc. Deși blastii se pot regăsi și în sângele periferic la diagnostic, doar evaluarea morfologică este insuficientă pentru stabilirea diagnosticului. În cazurile în care severitatea bolii interzice evaluarea măduvei osoase, dar leucocitoza semnificativă este prezentă, dacă sunt cel puțin 1000 de blasti/mm³ circulanți, acest diagnostic este foarte probabil (23).

1.3.2.3. Imunofenotiparea

Imunofenotiparea este metoda standard acceptată pentru diagnosticul LAL, fiind posibilă datorită progreselor în dezvoltarea anticorpilor monoclonali, îmbunătățirii în marcarea anticorpilor enzimatic și fluorescent și dezvoltării tehnologiei multiparametru pentru sortarea cu celule fluorescente activate (FACS) (24). Transformarea leucemică și expansiunea clonală poate apărea în diferite stadii de diferențiere limfoidă și citometria în flux multicoloră poate fi utilizată pentru a colora o probă cu paneluri de anticorpi pentru a afla ce populații clonale există, bazată pe coexpresia markerilor. Deoarece antigenele utilizate pentru imunofenotiparea de rutină sunt mai degrabă asociate liniilor celulare și nu sunt specifice, un panel de anticorpi multipli trebuie folosit. De obicei un panel include anticorpi pentru linia T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD8 sau CD7), pentru linia B (CD10, CD19, CD20, CD22, kappa și lambda) și pentru linia mieloidă (25). Expresia aberantă a antigenelor mioeloide CD13 și CD33 este comună în LAL-B. Mai multe anomalii genetice recurente sunt asociate cu modelele imunofenotipice specifice: rearanjamentul *KMT2A* este asociat de obicei cu CD10-/CD15+, Ph+ALL este adesea CD25+ și exprimă markeri mioeloi (CD13, CD33). *ETV-RUNX1* este de obicei CD19+/CD10+/CD34+/CD9- cu expresia CD13. *TCF-PBX1* are de regulă CD34-/CD9+/lanț mu+. LAL la sugari ia naștere dintr-un precursor hematopoietic multipotent foarte tânăr, căruia îi lipsesc CD10 și antigenele mature de linie B, exprimând frecvent HLA-DR și markeri mioeloi precum CD15 (26).

1.3.2.4. Gene de fuziune în LAL

t(12;21)(p13;q22)-ETV6-RUNX1 este cea mai frecventă translocăție în LAL pediatrică, fiind asociată cu un prognostic favorabil (27). Aproximativ 20% dintre pacienții cu LAL-B din Statele Unite au această anomalie, deși prevalența variază larg între grupuri etnice (28). În majoritatea cazurilor translocăția e criptică, nu poate fi determinată de cariotipare, dar poate fi determinată de FISH. Această translocăție ia naștere, aparent, *in utero* și este considerată necesară, dar insuficientă pentru a cauza leucemia. Evenimentele următoare care cauzează progresia spre LAL nu sunt lămurite (29). Această translocăție apare cel mai adesea la copiii cu vârste de la 1 an la 10 ani și în cazurile CD10+. În general, este văzută ca un factor de prognostic favorabil, deși unele studii au sugerat că prezența acestei translocății ar putea avea legătură cu un risc crescut de recidivă tardivă (30). Prezența translocăției t(12;21) nu este o garanție a succesului tratamentului, însă 10% dintre recidive provin din acest grup. Părerile sunt împărțite dacă *ETV6-RUNX1* este un factor de prognostic independent sau tinde să se asocieze cu alte caracteristici favorabile (de exemplu, vârsta și răspunsul la terapie). recidivele în aceste cazuri tind să fie tardive, cu o sensibilitate la chimioterapie foarte bună și remisii complete (31).

t(1;19)(q23;p13)-TCF3-PBX1 apare în 3% din cazuri și a fost asociată cu un prognostic nefavorabil în anii 1990, dar nu mai are semnificație prognostică în protocoalele curente, exceptând un potențial risc a recidivei SNC (32). Translocăția t(17;19) apare în 1% dintre cazurile de LAL și are un prognostic infaust (33). Acești pacienți au o prezentare clinică neobișnuită, caracterizată de hipercalemie, risc crescut de coagulare intravasculară diseminată și CD10 slab pozitiv (34).

t(8;14)(q24;q32)-IGH-MYC este identificată în toate cazurile de LAL cu celule B mature sau LAL Burkitt. Similaritatea dintre mecanismele moleculare asociate cu această translocăție în LAL cu celule B mature și cele care apar în limfomul Burkitt sprijină supoziția că LAL cu celule B mature este o formă diseminată a limfomului Burkitt (34, 35).

11q23/Rearanjamente KMT2A apar în 5% dintre cazurile de LAL pediatrică și în 70% dintre cazurile de LAL la sugari (atât în LAL, cât și în leucemia acută mieloblastică), precum și în majoritatea leucemiilor apărute în urma chimioterapiei, în special cu inhibitori de topoizomerază II (36). Cea mai comună translocăție în LAL este t(4;11)(q21;q23) fuzionând *KMT2A* cu *AFF1*. Pacienții cu aceste rearanjamente au răspunsuri la tratament semnificativ mai slabe comparativ cu copiii care nu au aceste rearanjamente (37).

t(9;22)(q34;q11)-BCR-ABL1 este una dintre primele translocății descrise, din care rezultă un cromozom marker mic, cunoscut ca și cromozomul Philadelphia (38).

Este cea mai des întâlnită translocăție la adulții cu LAL, dar este mult mai puțin frecventă la copiii diagnosticați cu LAL, unde apare în 3% din cazuri. Până recent, era asociată cu un prognostic infaust. Chiar și cu administrarea chimioterapiei intensive, acești pacienți aveau un risc crescut de eșec al tratamentului de inducție, afectare SNC și recidivă precoce. Tratamentul leucemiei mieloide cronice și al LAL Ph+ a fost revoluționat odată cu apariția inhibitorilor de tirozin-kinază, activ împotriva fuziunii *BCR-ABL1*, care în combinație cu chimioterapia a îmbunătățit supraviețuirea de la 30-40% la 80%. Datorită acestor rate de remisie completă, transplantul de celule stem hematopietice nu mai este indicat în prima remisie completă (39, 40). Majoritatea cazurilor de Ph+LAL sunt CD10+ cu celule B, deși rare cazuri de LAL-T au fost descrise. Coexpresia de markeri mieloizi este frecventă. Acești pacienți tind să fie mai în vârstă, au număr de leucocite mai mare și blaști în periferie, afectarea SNC și aveau rate de remisie în inducție mai mici, remisii complete de scurtă durată și rate de supraviețuire mici.

Prezența aberațiilor secundare sunt asociate cu rezultate nefavorabile, în special în cazul delețiilor *IKZF1* (41). A fost sugerat faptul că proteina p190 apare de novo, în timp ce proteina p210 poate reprezenta criza blastică dintr-o leucemie mieloidă cronică nediagnosticată. Alte aspecte care ar putea distinge cazurile care au originea dintr-o leucemie mieloidă cronică includ bazofilia, splenomegalie marcată, precum și persistența fuziunii *BCR-ABL1* la nivelul celulelor precuroare hematopoietice după obținerea remisiei (42).

Rearanjamente *IGH* – mai multe translocății recurente din LAL implică locusul IgH (cunoscut și ca *IGH@*). Se juxtapune regiunea enhancer unui factor de transcripție sau unui genei unui receptor de citokine, rezultând o expresie alterată a unei gene țintă. Aceste translocății apar la 4% din LAL pediatric și implică gene partenere, care includ familia *CEBP*, *ID4* și *CRLF2*. Acest grup de pacienți tinde să afecțeze copii mai mari și au un prognostic mai prost. Cele mai frecvente translocății *IGH@* implică *CRLF2* și sunt corelate cu un prognostic nefavorabil. Altă translocăție rară *IGH@* care merită menționată pentru prezentarea clinică distinctivă este t(5;14)(q31;q32), fiind asociată cu hipereozinofilia. Eozinofilele sunt reactive, datorită producției crescute de citokine și nu sunt maligne. Cazurile se prezintă cu eozinofilie marcată, dar cu un procent relativ scăzut de blaști în MO, drept urmare, identificarea acestei translocății este suficientă pentru stabilirea diagnosticului de LAL, chiar dacă numărul de blaști este scăzut (43, 44).

Rearanjamente *DUX4*, *MEF2D* și *ZNF284* – trei noi rearanjamente criptice în LAL-B, recent indentificate prin NGS, implică *DUX4*, *MEF2D* și *ZNF284*. Rearanjamentele *DUX4* rezultă în hiperexpresia *DUX4* și pierderea funcției *ERG* printr-un mecanism unic, care constă fie în deleția *ERG* sau inducerea expresiei unei isoforme negativ dominantă, fiind asociate cu un prognostic favorabil. Rearanjamentele *MEF2D* conduc la o activitate transcripțională crescută, activarea expresiei *HDAC9*, un imunofenotip distinct (CD10 slab exprimat sau absent și expresia crescută a CD38). Sunt asociate cu o vârstă mai

mare la diagnostic și prognostic nefavorabil. Rearanjamentele *ZNF384* sunt conectate cu un profil de expresie genică îmbogățită pentru caracteristicile celulelor stem hematopoietice, au un imunofenotip distinct (CD10 subexprimat și expresie aberantă a CD13 sau CD33) și un prognostic care depinde de gena parteneră fuzionată (45-47).

Deleții 9p21-22 – sunt comune în LAL pediatrică, apărând în aproximativ 20% din cazurile de LAL-B și 50% din cazurile de LAL-T. aceste deleții variază în dimensiuni, dar regiunea critică implică două gene supresoare tumorale: inhibitorii de ciclină D kinază p16 și p15. Părerile din literatură sunt mixte în privința deleției acestui locus, dacă ar avea semnificație independentă prognostică nefavorabilă în regimurile de tratament actuale (48).

Amplificarea intracromozomială a cromozomului 21 a fost identificată în aproximativ 2% din LAL pediatrică și este asociată cu un prognostic nefavorabil. Pacienții tind să aibă vârste mai mari, cu numere inițiale de leucocite și trombocite mici. Rezultatele obținute sunt precare, cu rate de recidivă între 38% și 61%, dependente de regimul de tratament utilizat. *iAMP21* este încorporată în mai multe dintre protocoalele de tratament ca și factor de risc, pacienții fiind stratificați în grupe de risc astfel încât să primească chimioterapie mai intensivă (49)

Alterații ale genelor care intervin în dezvoltarea celulelor B – aproximativ 20% dintre copiii cu LAL-B cuprind alterații ale genelor care reglează dezvoltarea și diferențierea limfocitelor B. acestea au fost descoperite într-un studiu condus de Mullighan et al., în care s-a descoperit că alterațiile *PAX5* au fost cele mai frecvente, afectând 31.7% din cazuri. Deleții au fost identificate și în căi a mediatorilor celulelor B, incluzând *TCF3*, *EBF1*, *LEF1*, *IKZF1* și *IKZF3*. Majoritatea nu au fost raportate ca având semnificație prognostică, cu excepția *IKZF1*, care codifică factorul hematopoietic de transcripție IKAROS. Deleții recurente și mutații inactivatoare a *IKZF1* apar în 15 % dintre cazurile de LAL și sunt asociate cu un prognostic infaust în cazul tuturor subtipurilor de LAL, cu excepția cazurilor în care *ERG* și *DUX4* sunt dereglate, care oferă un prognostic favorabil, indiferent de alterațiile *IKZF1*. Alterările *IKZF1* apar mai frecvent la pacienții cu risc înalt și *Ph*+LAL, dar și la pacienții *Ph-like* LAL (50, 51).

LAL Philadelphia-like- profilarea expresiei genice a identificat un subgrup al LAL, reprezentând aproximativ 12% cu o semnătură a expresiei genice asemănătoare celei *Ph*+LAL. O varietate de leziuni genetice sunt asociate cu semnătura *Ph-like*, cu frecvențe relative care depind de semnături ale expresiei genice specifice și care sunt folosite pentru definirea entității *Ph-like*. Ele diferă la copii față de adulți și în diferite etnii. Cea mai comună alterație *Ph-like* este rearanjamentul *CRLF2* și rearanjamente care implică kinaze, fiecare cu o varietate de parteneri de fuziune: *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB*, *JAK2* și *EPOR*. Deleții sau mutații ale *SH2B3* și *IL7R* sunt de asemenea asociate cu LAL *Ph-like*.

Mai multe alterări ale *CRLF2* au fost observate în LAL, toate conducând spre hiperexpresia acesteia. Aceste alterări au fost observate în 5%-8% dintre cazurile la copii. Au o mai mare incidență în LAL cu risc înalt, la pacienții cu etnie hispanică sau latină și la pacienții cu sindrom Down, unde incidența este de 50%. Mutațiile *JAK* au fost identificate inițial la 20% dintre pacienții cu sindromul Down, dar mutațiile *JAK* (cel mai frecvent *JAK2*, dar nu exclusiv) au fost identificate în la 10% dintre pacienții cu risc înalt care nu au sindrom Down. Mutațiile *FLT3*, altă kinază implicată în semnalizare sunt prevalente în leucemia acută mieloblastică, dar apar și în LAL pediatrică. În LAM apar duplicații interne în tandem, spre deosebire de LAL, unde se regăsește mai frecvent o hiperexpresie a *FLT3* wild-type. Alterările *FLT3* din LAL sunt asociate cel mai adesea cu hiperdiploidia sau rearanjamente *KMT2A* (50, 52-54).

Alteratii moleculare în LAL-T- LAL-T este caracterizată de numeroase rearanjamente cromozomiale și mutații punctiforme, majoritatea fiind distincte de cele întâlnite în LAL-B. Cu puține excepții, alterațiile genetice întâlnite nu au valoare prognostică, drept urmare nu sunt folosite pentru a ghida stratificarea în grupe de risc sau tratament. Analizele genomice a LAL-T au identificat 10 căi recurente alterate. Acestea sunt împărțite în reglatori ai transcripției, supresoare ale ciclului celular, celulelor sau tumorale, reglarea epigenetică, funcția ribozomală, ubiquitare, procesoare ale ARN. Mutații ale călor specifice funcționale sunt îmbogățite în diferite subtipuri de LAL-T în curs de diferențiere, sugerând importanța unei anumite căi de semnalizare în diferite stadii de maturare ale limfocitelor T. Cele mai frecvente alterații în LAL-T sunt mutațiile activatoare ale *NOTCH1* în aproape 60% din cazuri, deleții ale locusului *CKDN2A* în peste 70% din cazuri. Translocațiile sunt, de asemenea, frecvente, implicând factori de transcripție ale genelor, care sunt sub controlul regiunilor enhancer ale TCR. Spre deosebire de fuziunile oncogene de novo din LAL-B, majoritatea translocațiilor din LAL-T implică relocarea secvențelor de codificare pentru factorii de transcripție ai proteinelor în situsuri în aval de TCR, conducând către hiperexpresia acestora. LAL cu precursori T tineri (ETP) este un subgrup cu importanță clinică, afectând aproximativ 10-15% dintre copiii diagnosticați cu LAL cu celule T. Aceasta este asociată cu un prognostic nefavorabil, deși acest lucru ar putea fi contracarat de regimul de tratament. LAL-ETP a fost inițial identificată pe baza unui profil de expresie genică și imunofenotipică, cu caracteristici de progenitor-T foarte tânăr, cu absența markerilor pentru celule T CD1a și CD8 și CD5 (care poate fi și slab exprimat), combinate cu CD3 citoplasmatic și cu markeri ai celulelor mieloidale sau markeri ai celulelor stem. Este caracterizată și de mutații de gene similare cu cele găsite în leucemia mieloidă. Recent au fost făcute progrese în caracterizarea heterogenității moleculare ale LAL-T, dar abordările terapeutice curente nu utilizează încă aceste perspective pentru a rafina deciziile prognostice și terapeutice (55-57).

1.3.2.5. Cariotipul

Celulele normale diploide sau pseudodiploide (anormale citogenetic, dar au un conținut normal de ADN) au un index ADN de 1.0. Hiperdiploidia reprezintă un număr de cromozomi mai mare de 46 și un index ADN mai mare de 1, iar hiploidia este reprezentată de un număr de cromozomi mai mic de 46, cu un index ADN mai mic decât 1.

Hiperdiploidia este clasificată ca „joasă” (47-50 de cromozomi) sau „înaltă” (peste 50 de cromozomi). Cazuri cu mai mult de 67 de cromozomi sunt în general considerate a fi aproape tetraploide, o categorie distinctă a modelului de dublare a cromozomilor. Cazurile aproape tetraploide sunt asociate cu LAL-T sau translocția ETV6-RUNX1 din LAL-B. Studiile mai vechi sugerează un prognostic relativ rezervat, dar cercetările mai recente sugerează un prognostic favorabil pentru cazurile aproape tetraploide. Cazurile din categoria pseudodiploidă (acelea care au index ADN de 1.0 sau număr de cromozomi normal, dar alte anomalii) au un prognostic mai grav. Copiii cu diploidie sau hiperdiploidie „joasă” (între 48 și 50 de cromozomi) au un prognostic puțin mai rezervat comparativ cu cazurile cu hiperdiploidie „înaltă”. În LAL pediatrică aproximativ 20% din cazuri sunt hiperdiploide, iar 2% sunt hipodiploide. În LAL-T majoritatea cazurilor sunt pseudodiploide sau diploide.

Hiperdiploidia „înaltă” este asociată cu un prognostic favorabil. Cromozomul 21 este cel mai des câștigat, urmat de X, 6, 14, 4, 18, 17 și 10. Baza moleculară pentru LAL hiperdiploidă rămâne încă neclară, dar majoritatea dovezilor sugerează că cel mai frecvent mecanism este prin câștigarea simultană a tuturor cromozomilor extra într-o singură diviziune celulară anormală. Hiperdiploidia este recunoscută de mult ca fiind un factor de prognostic favorabil în LAL-B. Definiția hiperdiploidiei are diferite definiții în funcție de studiu. Indiferent de o definiție specifică, hiperdiploidia este un factor independent de prognostic favorabil în numeroase trial-uri a grupurilor de lucru, cu semnificație independentă păstrată din anii 1990 până în prezent. Pacienții cu hiperdiploidie au de obicei și alți factori de prognostic favorabil (vârstă favorabilă, număr mai mic de leucocite la diagnostic, fenotip LAL-B, de obicei cu CD10+ sau CALLA pozitiv).

Cel mai infaust prognostic îl au cei cu hipodiploidie (număr de cromozomi mai mic de 45 și index ADN mai mic decât 1.0). cazurile sunt stratificate în funcție de numărul de cromozomi: aproape haploid (între 24 și 31), hipodiploidie „joasă” (între 32 și 39 de cromozomi) și hipodiploidie „înaltă” (între 40 și 43 de cromozomi), iar prognosticul este direct proporțional cu numărul de cromozomi. Mutațiile TP53 au fost identificate în 91% dintre cazurile cu hiploidie „joasă”, cu aproape jumătate dintre aceste mutații apărând și la nivelul celulelor de linie germinală (58-61).

1.3.3. Încadrarea în grupe de risc

Încadrarea în grupe de risc se face pe parcursul inducției remisiei. Se iau în calcul anumiți factori: vârsta la diagnostic, numărul inițial de leucocite, imunofenotiparea, testele de biologie moleculară și cariotipul, dar și răspunsul la tratament pe perioada de inducție a remisiei. Astfel, răspunsul la prednison în ziua 8, răspunsul morfologic de la nivelul măduvei osoase în ziua 15 de tratament (evaluat prin aspirat osteomedular), boala reziduală minimă evaluată în ziua 15, răspunsul morfologic în ziua 33 și boala reziduală minimă tot din ziua 33. Toți acești factori au rolul de a stratifica pacienții în grupe de risc: grupa de risc standard, grupa de risc mediu sau intermediară și grupa de risc înalt.

SRG: vârstă cuprinsă între 1 și 6 ani, leucocite la diagnostic $<20000/\text{mm}^3$, <1000 blasti/ mm^3 în sangele periferic în ziua 8 în sangele periferic, FCM-MRD $< 0.1\%$ sau măduvă M1/M2 în ziua 15, fără măduvă M2/M3 în ziua 33.

Încadrarea în HRG presupune: grupă de risc intermediară și FCM-MRD $> 10\%$ sau măduvă M3 în ziua 15, SRG și FCM-MRD $> 10\%$, peste 1000 leucocite/ mm^3 în sangele periferic în ziua 8, măduvă M2/M3 în ziua 33, translocatii t(9;22)/BCR-ABL1 sau t(4;11)/KMT2-AFF1 sau hipodiploidie <44 cromozomi.

Pacienții care nu se încadrează cu aceste criterii în grupele de risc standard sau înalt vor fi stratificați în grupa de risc mediu (62, 63).

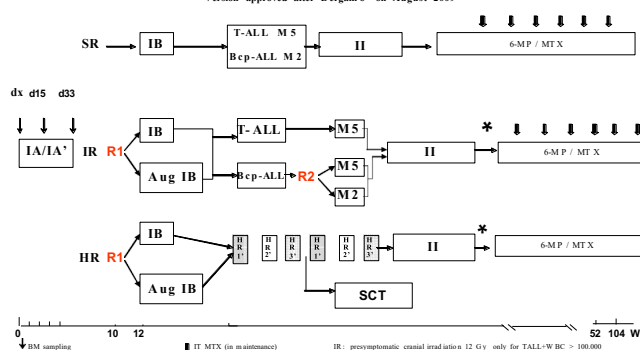
1.4. Tratament

Recunoșterea LAL ca fiind o boală heterogenă, tratabilă în funcție de încadrarea în grupe de risc a influențat profund terapia. Evaluarea inițială necesită teste sofisticate de laborator pentru determinarea corectă a informațiilor derivate din informațiile oferite de citogenetică, imunologice și moleculare. Protocoalele moderne necesită monitorizare în timp real (de exemplu, stabilirea MRD în diferite etape ale tratamentului), utilizarea riguroasă a terapiei suportive și raportarea promptă a evenimentelor adverse. Deci, este o nevoie clară de a evalua și trata acești copii în centrele pediatrice care pot aplica ultimele protocoale internaționale. Pentru adolescenți și adulți tineri (AYA) regimurile de tratament pediatrice oferă rezultate mai bune, însă sunt asociate cu toxicități mai mari, necesitând o mai mare vigilență pentru administrarea terapiei suportive. Chiar dacă există abordări specifice în funcție de încadrarea în grupe de risc și terminologia utilizată în protocoale poate varia între grupele cooperative de studiu, majoritatea protocoalelor moderne împarte terapia în 4 faze: inducția remisiei, terapia preventivă asupra SNC/consolidare, întreținere interimă, reinducție și terapia de întreținere sau de continuare.

Cea mai intensivă chimioterapie este administrată în primele 6 până la 12 luni, terapia administrându-se pe o perioadă între 2 și 3 ani în total. Intensitatea chimioterapiei este modelată de riscul de recidivă, pacienții cu risc înalt fiind tratați cu mai mulți agenți, doze mai mari, pe perioade mai lungi de tratament intensiv față de

1.4.1. Chimioterapie citostatică

Version approved after Bergamo on August 2009



1.4.2. Immunoterapie

Terapia LAL se dezvoltă rapid, cu apariția noilor agenți imunoterapeutici care țintesc antigene specifice ale LAL, utilizând anticorpi neconjugați, anticorpi conjugați cu medicamente sau toxine, anticorpi care cuplează celulele leucemice de celulele efectoare sau celule CAR proiectate. Antigenele țintă ideale au expresie limitată la nivelul celulelor normale, care scad toxicitatea în afara țintei terapeutice. În LAL-B, aplazia celulelor B care survine în urma țintirii acestora pentru că au ca markeri de suprafață antigene ca și CD19 sau CD20 conduc la hipogamaglobulinemie, un efect advers care poate fi contracarat prin administrarea preparatelor de imunoglobuline. În LAL-T, țintirea celulelor T normale cauzează o imunodeficiență și mai accentuată, deci dezvoltarea de imunoterapii viabile a rămas în urmă comparativ cu cele pentru LAL-B, unde mulți agenți au demonstrat activitate semnificativă în conjunctura recidivă/boală refractară, fiind evaluate ca și terapie de linie 1.

Anticorpul neconjugați se leagă de markeri de suprafață și identifică celula țintă pentru eliminare sub efectul citolitic al celulelor efectoare prin procesul de citotoxicitate mediata celular dependentă de antigene. Anticorpul neconjugați în uz sau sub investigație includ Rituximab, Epratuzumab și Daratumumab (Figura 2) (67, 68).

Blinatumomab este un anticorp bispecific, care leagă CD3 și CD19, aducând celulele T în proximitatea celulelor maligne, dar și sănătoase care exprimă CD19, rezultând distrugerea acestor celule prin citotoxicitate mediata de perforine. Este aprobat FDA la copii cu LAL-B, cu recidivă sau boală refractară. Blinatumomab este foarte eficient în obținerea remisie prin negativarea MRD. Toxicitățile primare sunt sindromul de eliberare de citokine și toxicitatea neurologică. Incidența și severitatea sindromului de eliberare de citokine depinde de încărcătura tumorală, dar cu rate mai mici în cazurile MRD pozitive. Trialurile clinice în curs de desfășurare vor determina integrarea optimă în regimurile de tratament pentru recidive, dar și pentru LAL-B proaspăt diagnosticată (69-71).

CAR-T (chimeric antigen receptor T) țintesc celulele CD19+, fiind foarte eficiente la 80-90% dintre copii intens pretratați, cu leucemii foarte rezistente la tratament, obținându-se remisii MRD negative. În unele cazuri, remisia este susținută chiar fără terapie subsecventă, deși, pentru mulți pacienți CAR-T CD19 este considerat a fi o punte către transplantul medular, ca și terapie definitivă. Tisagenlecleucel (Kymriah) a fost aprobat de FDA în anul 2018 pentru tratamentul LAL-B pentru copii care sunt în a doua remisie completă, sau chiar cu multiple remisii complete, care sunt refractari la tratament. Ca și toxicități sunt incluse sindromul de eliberare de citokine la 77% din pacienți și evenimente neurologice la 40% din copii. Aplazia prelungită a celulelor B periferice, un marker pentru persistența CAR-T, este asociată cu răspuns pe termen lung, deci majoritatea pacienților pediatrici necesită substituie cronică cu imunoglobuline. CAR-T nu se limitează doar la CD19, ci alte strategii terapeutice care sunt sub investigație includ CD22, CRLF2 și targetare duală a CD19 și CD22, pentru reducerea riscului de a „scăpa” antigene (72-74).

Conjugatele de anticorpi cu medicamente țintesc proteine celulare de suprafață, iar mai multe astfel de molecule sunt în curs de dezvoltare, cel mai promițător fiind Inotuzumab Ozogamicin, care constă într-un anticorp monoclonal uman anti-CD22 conjugat cu analogul de calicheamicină, ozogamicin. Într-un studiu retrospectiv efectuat pe pacienții pediatrici îndelung tratați, cu multiple recidive sau care au fost refractari, 67% au obținut remisia completă, cu MRD mai mic de 0.01% în 71% din cazuri. toxicitatea hepatică, care include sindromul de obstrucție sinusoidală este cea mai importantă toxicitate, în special la pacienții care au făcut în prealabil sau urmează să facă transplant de celule stem hematopoietice. Integrarea Inotuzumab Ozogamicin în schemele de chimioterapie, în cazul recidivelor, dar și în cazul pacienților nou diagnosticați este încă sub investigație (75, 76).

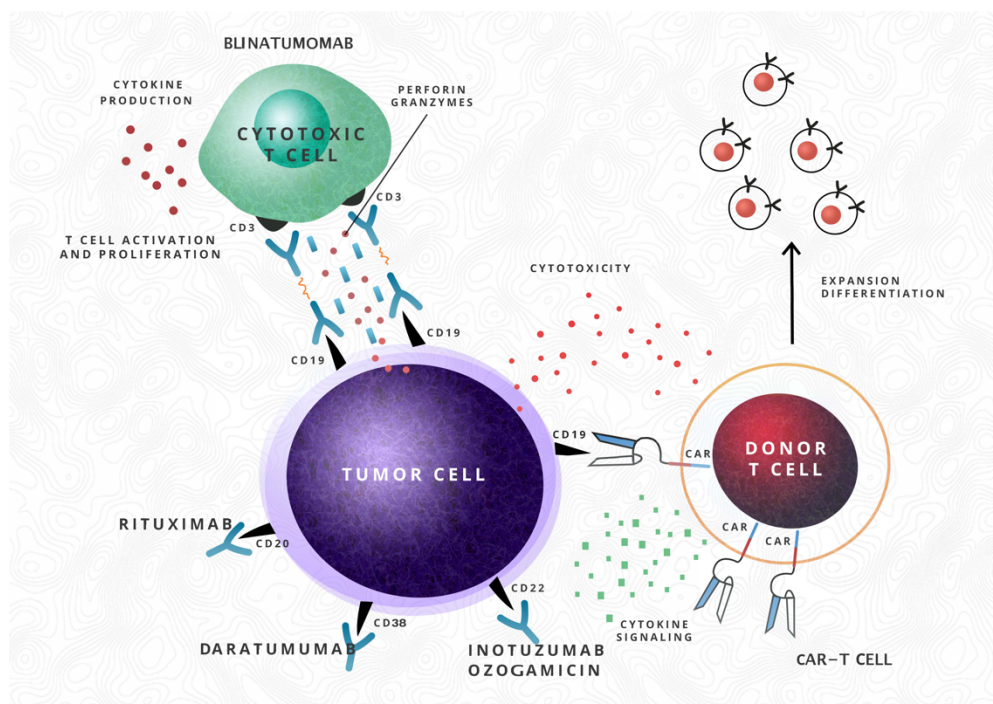


Fig.2. Reprezentarea schematică a imunoterapiei din leucemia acută limfoblastică la copii(77)

1.5. Evaluarea răspunsului la tratament

Răspunsul rapid la tratament este un foarte important indicator al prognosticului. Lipsa obținerii remisiei complete în primele 4-6 săptămâni de inducție a remisiei, cunoscut ca și eșecul inducției este recunoscut ca fiind asociat cu o rată mare a recidivei și supraviețuire redusă. Multiple grupuri au demonstrat importanța prognostică a eliminării rapide a blastilor din sângele periferic și măduva osoasă în timpul terapiei de inducție, măsurată după doar 1 sau 2 săptămâni de terapie (78, 79).

În ultimii ani, măsurarea MRD folosind citometria în flux sau amplificarea PCR a genelor receptorilor antigenici a înlocuit evaluarea morfologică timpurie a MO, având o importanță critică în schemele de stratificare a riscului. În general, cu cât un pacient devine mai rapid MRD negativ, cu atât mai bun este prognosticul. Nivelurile MRD care sunt nedetectabile sau cel puțin mai mici de 10^{-4} la sfârșitul unei inducții standard (sau ideal mai devreme) sunt asociate cu cel mai bun prognostic. În cazurile de LAL-T, obținerea târzie a negativității MRD (adică la sfârșitul consolidării) nu afectează semnificativ prognosticul. Persistența sau creșterea MRD la momente ulterioare după inducție este asociată cu un rezultat slab, atât pentru pacienții nou diagnosticați cu LAL-

B, cât și pentru cei recidivanți, tratați cu chimioterapie salvatoare sau transplant medular (80, 81).

Cele două tehnici principale folosite în prezent pentru detectarea MRD sunt identificarea imunofenotipurilor aberante prin citometrie în flux și amplificarea PCR a genelor imunoglobulinei sau TCR, sau a genelor de fuziune specifice leucemiei, atunci când este aplicabil. RT-PCR poate detecta chiar și o singură celulă leucemică dintre 10^5 și 10^6 celule normale din măduva osoasă, iar citometria în flux aproximativ 10^4 până la 10^5 . Citometria în flux are avantajul suplimentar al detectării celulelor intacte, spre deosebire de PCR, în care materialul contaminant din acidul nucleic al celulelor moarte poate complica interpretarea. Ambele sunt limitate într-o anumită măsură pentru că imunofenotipul dominant sau rearanjamentul Ig/TCR pot evolua în timp și astfel scapă recunoașterii. HTS pentru detectarea MRD este o tehnologie emergentă, care este mai sensibilă decât citometria de flux, iar studiile recente au arătat că este predictivă pentru rezultate nefavorabile, atât în cazurile de LAL nou diagnosticate cât și recidivate cu niveluri scăzute de MRD care nu sunt detectabile prin citometrie în flux. Utilizarea HTS-MRD în practica clinică standard se dezvoltă, inclusiv punctele în timp și pragurile de detecție care ar trebui să declanșeze schimbări în tratament (82-85).

2. Rolul microARN în leucemia acută limfoblastică

2. 1. Introducere

Este recunoscut faptul că mutațiile genetice stau la baza manifestării inițiale a LAL. Cu toate acestea, doar aceste modificări genetice se dovedesc inadecvate pentru manifestarea completă a bolii, fiind necesare și modificări epigenetice suplimentare. Recent, în LAL au fost identificate roluri de reglare jucate de ARN-urile necodificatoare, în special de microARN-uri (miR-uri) (86, 87). Au fost observate variații notabile în modelele de expresie ale miR-urilor, care conduc la modificări ale profilurilor transcripționale ale genelor țintă corespunzătoare. Aceste modificări epigenetice joacă un rol esențial în timpul procesului de transformare malignă, determinând dereglarea oncogenelor și a genelor supresoare tumorale, perturbând astfel funcțiile celulare esențiale și declanșând potențial dezvoltarea LAL. Prin urmare, modificările miR, ca tip major de modificare epigenetică, exercită o influență profundă atât asupra apariției, cât și asupra progresiei LAL (88).

miR-urile prezintă, de asemenea, modele de expresie distincte în timpul diferitelor etape ale limfopoiezei. Acestea se leagă de ARN mesager specific, îi reglează expresia post-transcripțională și exercită un impact asupra procesului de maturare a precursorilor limfoizi. În timpul limfopoiezei oncogene, miR-urile sunt exprimate aberant, iar aceste anomalii pot servi drept semnături pentru diferite subtipuri de LAL. Modificările în profilurile de expresie ale miR-urilor prezintă o semnificație funcțională în leucemogeneză sau în rezistența la terapie, iar inversarea acestor expresii miR ar putea contracara progresia bolii și ar putea îmbunătăți răspunsurile clinice (89-91). În plus, profilurile de expresie ale miR-urilor în leucemia acută prezintă interacțiuni pe parcursul dezvoltării bolii, fiind potențiali biomarkeri valoroși pentru diagnosticare, prognostic și tratament în LAL. De exemplu, miR-100, miR-196a și miR-146a joacă roluri cruciale în leucemogeneza pediatrică, putând servi ca indicatori biologici moleculari valoroși pentru diagnostic. S-a constatat că nivelurile de expresie ale miR-155a și miR-181a sunt semnificativ crescute în grupul de pacienți cu LAL pediatrică, ambele miR-uri fiind asociate cu niveluri ridicate de MRD și cu un prognostic nefavorabil. Combinația dintre miR-125b și limfom cu celule B-2 (Bcl-2) servește drept indicator prognostic puternic în LAL pediatrică, ceea ce le transformă în ținte terapeutice potențiale pentru tratamentul LAL. În plus, miR-155 se evidențiază ca un miRNA pivotal și este considerat

o țintă terapeutică potențială în tratamentul pacienților pediatrici cu leucemie infectați cu virusul hepatitic C (92-95), (Tabel 1).

Tabel 1. Reprezentarea schematică a expresiei diferențiate a miR-urilor în LAL pediatrică (după (96))

miR cu subexprimare în LAL pediatrică	miR cu supraexprimare în LAL pediatrică
Cele mai frecvente:	Cele mai frecvente:
miR-125b, miR-142, miR-196, miR-223	miR-128a, miR-155, miR-181b, miR-708
Alte miR:	Alte miR:
Let-7e, let-7f, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-182, miR-199b, miR-335, miR-3173, miR-5100	miR-128b, miR-130b, miR-181c, miR-210, miR-222, miR-363, miR-506, miR-922
Alte miR importante:	Alte miR importante:
miR-100, miR-143, miR-148a, miR-582	miR-21, miR-145, miR-146, miR-181a

În ultimii ani, miR-urile, o clasă semnificativă de ARN-uri necodificatoare, au atras atenția în cercetarea tumorilor datorită rolurilor lor esențiale în proliferarea, diferențierea și apoptoza celulară. Prin urmare, o explorare aprofundată a miR-urilor în LAL la copii este esențială pentru elucidarea patogenezei acestei patologii, descoperirea țintelor terapeutice și îmbunătățirea prognosticului. Studiul profilurilor de expresie miR în LAL pediatrică poate identifica miR-urile implicate în boală și mecanismele lor specifice în semnalizarea celulară și expresia genelor. Acest lucru nu numai că ne îmbunătățește înțelegerea patogenezei LAL, dar pune și bazele strategiilor terapeutice care vizează miR. Compararea profilurilor de expresie miR între diferite subtipuri și stadii de LAL poate dezvălui în continuare asocieri clinice, prognostice și diagnostice, oferind noi orizonturi (97).

2.2. Rolul miR în prognosticul LAL la copii

LAL este în prezent stratificată în funcție de diferiți parametri biologici și clinici, pacienții primind ulterior un tratament adaptat în funcție de risc. Deși strategiile actuale produc o rată de vindecare foarte ridicată, există un număr de pacienți cu LAL care vor recidiva în cele din urmă. Utilizarea clasică atât a profilului de expresie genică, cât și a semnelor de ARN mesager în mediul clinic prezintă dezavantaje, fiind raportate doar succese intermediare. Deoarece profilarea miR este de obicei limitată la un număr mic de gene, aceasta poate oferi potențial mai puține semnale, dar mai robuste, care au o capacitate prognostică la fel de puternică (98).

Nivelurile de expresie ale **miR-16**, o genă pierdută în multe cazuri de leucemie limfatică cronică, au fost evaluate la 93 de copii cu LAL, iar rezultatele au fost asociate cu principalele variabile biologice și clinice care definesc prognosticul: numărul de leucocite, vârsta la diagnostic, profilul cito- și molecular-genetic și grupele de risc. În timp ce valorile cele mai mari ale expresiei miR-16 au fost asociate cu un prognostic slab, nivelurile scăzute au fost asociate cu un rezultat bun. Supraviețuirea fără boală (DFS) și supraviețuirea globală (OS) au fost evaluate în funcție de profilurile de expresie miR-16 în grupul LAL ca întreg și în subgrupurile LAL cu celule B și cu celule T. Analiza de grup a arătat că DFS a fost cea mai lungă pentru pacienții cu expresie miR-16 mai mică decât quartila 25 și cea mai scurtă pentru pacienții cu expresie miR-16 peste quartila 75. Recidiva a fost rar observată la pacienții cu niveluri scăzute de miR-16, în timp ce cea mai scurtă DFS a fost în quartila peste 75. În mod similar, în grupul LAL-T, pacienții din quartila peste 75 au prezentat cea mai scurtă supraviețuire, în timp ce supraviețuirea cea mai lungă a fost observată în quartila sub 25. S-au obținut, de asemenea, relații semnificative din punct de vedere statistic între nivelurile scăzute de miR-16 și nivelul scăzut de leucocite și markerii cito- și molecular-genetici favorabili (99).

În plus, o analiză multivariată a expresiei **miR-24**, incluzând vârsta la diagnostic, sexul și numărul de leucocite, a definit miR-24 ca un marker prognostic independent. Hiperexpresia miR-24 a fost asociată cu o OS semnificativ mai scurtă, comparativ cu pacienții care au expresie scăzută (100). Aceste rezultate sugerează cu tărie că nivelurile ridicate ale expresiei miR-24 ar putea fi utilizate ca un biomarker fiabil și eficient al prognosticului nefavorabil în LAL.

Modificările expresiei miR în LAL recidivată sunt în centrul atenției mai multor grupuri de cercetare și sugerează că nivelurile **miR-223** și **miR-128b** ar putea fi posibili predictorii ai recidivei LAL. Nemes et al. au colectat probe de sânge periferic și aspirat osteomedular de la 24 de pacienți cu LAL în toate fazele de tratament (101). Ei au determinat că, în timp ce expresia miR-223 era aproape nedetectabilă la diagnostic, nivelurile de expresie au revenit la normal în timpul tratamentului și în remisiune, dar apoi a scăzut din nou la recidivă. În schimb, s-a observat o supraexpresie a miR-128b la diagnostic, care a scăzut semnificativ pe măsură ce pacienții au intrat în remisie, când s-au detectat niveluri normale de expresie miR-128b pentru celulele mononucleare. Nivelurile mai ridicate ale expresiei miR-128b la diagnostic s-au corelat, de asemenea, cu un prognostic mai bun, sugerând că monitorizarea nivelurilor expresiei miR-128b în sângele periferic ar putea ajuta la detectarea precoce a recidivei bolii (101).

2.3. Rolul miR în timpul tratamentului, răspunsul la tratament și toxicitatea în LAL la copii

Majoritatea copiilor diagnosticați cu LAL urmează un protocol de tratament standard ca parte a unei strategii adaptate riscului, care este de obicei împărțit în 3 faze principale: inducție, consolidare și întreținere, precum și o a patra fază de terapie orientată către SNC. Deși principalii agenți citotoxici utilizați în faza de inducție a tratamentului nu s-au schimbat, aceștia includ de obicei combinații de medicamente, inclusiv prednison, vincristină, L-asparaginază și daunorubicină. Regimurile multidrog sunt utilizate în încercarea de a preveni rezistența la medicamente, dar toți agenții au efecte tardive nedorite. Terapia de întreținere, tratamentul final și cel mai prelungit în LAL la copii, implică un regim mult mai puțin intens decât chimioterapia anterioară. Cu o durată de până la doi ani, s-a demonstrat că faza de întreținere reduce riscul de recidivă, dar poate fi în sine o cauză a apariției de noi mutații (rezistente la medicamente) (62, 102).

2.3.1 miR și rezistența multidrug

Evaluarea nivelurilor de expresie ale **miR-326** la pacienții cu LAL pediatrică rezistenți la chimioterapie a evidențiat o scădere semnificativă a expresiei miR-326 la pacienții MRD+ comparativ cu grupul MRD-, susținând ideea că reducerea expresiei miR-326 are un impact negativ asupra răspunsului la tratamentul chimioterapic (103). Reducerea expresiei miR-326 la copiii cu LAL recidivată, comparativ cu nivelurile de expresie observate la diagnostic, indică faptul că miR-326 poate fi considerat un alt marker de prognostic pentru recidivă în LAL pediatrică.

Pentru a identifica noi predictori prognostici și terapeutici în LAL, a fost efectuat un studiu al expresiei miR genomice pe 63 de copii cu LAL nou diagnosticați (104). Profilurile miR ale cazurilor de recidivă/deces au fost comparate cu cele în remisie completă identificând faptul că **miR-335** are cele mai scăzute niveluri. Reducerea expresiei epigenetice a genelor acestui miR este asociată cu rezultatul clinic în LAL la sugari (105, 106). EFS la 5 ani a fost semnificativ mai slabă la pacienții cu niveluri scăzute de expresie a miR-335, iar o analiză multivariată a confirmat că nivelurile miR-335 la diagnostic sunt un marker prognostic eficient și independent în predicția răspunsului la tratament (104).

Se postulează faptul că **miR-155** joacă un rol în inhibarea diferențierii liniilor (107), menținând celulele stem și progenitoare hematopoietice la stadiul de celule stem foarte tinere. El-Khazragy et al. (94) au determinat că nivelurile de expresie ale miR-155 sunt corelate cu caracteristicile clinico-patologice ale bolii; efectul terapiei asupra nivelurilor de expresie ale miR-155 a fost, de asemenea, evaluat prin RT-qPCR. Probele de aspirat medular de la 45 de copii cu LAL au fost recoltate la diagnostic pentru a determina nivelurile de expresie miR-155, iar procentul de blaști postinducție a fost evaluat în ziua 15 prin MRD. În plus, nivelurile de expresie au fost determinate după tratament în probele prelevate în ziua 28 și rezultatele au fost comparate cu un grup de

control sănătos. Un nivel semnificativ ridicat al expresiei miR-155 a fost detectat la diagnostic în grupul LAL și s-a observat o corelație semnificativă între nivelurile ridicate de miR-155 și numărul mare de blaști (>25%), anomalii citogenetice nefavorabile, numărul total de leucocite, rata mai mare de recidivă și o MRD mai mare după 15 zile. Prin urmare, supraexprimarea miR-155 se corelează cu un prognostic nefavorabil în LAL pediatrică, din cauza scăderii răspunsului la tratament și a creșterii ratei de recidivă. De asemenea, nivelurile de expresie ale miR-155 au scăzut semnificativ de 10 ori după terapie, sugerând din nou o utilizare potențială ca biomarker al răspunsului terapeutic (94).

Pentru a determina în continuare profilurile de expresie miR și modelele miR asociate cu recidiva LAL din copilărie, a fost efectuată o analiză genomică miR microarray pe serii de diagnostic-recidivă și diagnostic-remisie completă. A fost identificat un model diferit al miR între pacienții cu recidivă și cei cu remisie completă, care a inclus **miR-223** și **miR-27a**: ambele miR-uri au fost foarte exprimate la pacienți în timpul remisiei complete. Pe de altă parte, nivelurile de expresie ale miR-223 și miR-27a au fost scăzute în probele de la diagnostic ale pacienților care au recidivat ulterior în timpul studiului. Expresia miR-223 la diagnostic este un alt predictor independent și fiabil pentru OS la pacienții cu LAL pediatrică (108).

Piatopoulou et al. au examinat profilurile miR la diagnostic și după inducție, comparând aceste niveluri cu caracteristicile prognostice cunoscute ale LAL. Nivelurile mai scăzute ale expresiei **miR-125b** la diagnostic și nivelurile mai ridicate la sfârșitul protocolului de inducție au fost asociate cu caracteristici adverse ale bolii. Riscul mai mare de recidivă pe termen scurt și OS mai mică au fost demonstrate în mod clar prin analiza supraviețuirii pacienților care prezentau miR-125b subexprimat la diagnostic și supraexprimat după inducție (109).

Deși miR-125b a prezentat o variabilitate largă a expresiei la momentul diagnosticului, nivelurile mai scăzute de expresie au fost corelate cu caracteristici prognostice nefavorabile, inclusiv vârsta mai mare, numărul mare de blaști în momentul diagnosticului și în ziua 15, precum și pacienții cu o concentrație scăzută de hemoglobină. Expresia scăzută a miR-125b este, de asemenea, asociată în mod semnificativ cu un risc mai mare de recidivă și cu o OS slabă, furnizând dovezi convingătoare că miR-125b ar putea fi, de asemenea, utilizat ca un potențial biomarker de prognostic în LAL pediatrică (95).

Glucocorticoizii sunt utilizați pe scară largă în tratamentul LAL pediatrică; totuși, diferențele interindividuale în răspunsul la terapie cu corticosteroizi compromit aplicarea lor clinică. În plus, rezistența este unul dintre principalii factori care contribuie la rezultatele slabe în LAL. Studii recente au arătat că miR-urile joacă un rol crucial în sensibilitatea la glucocorticoizi și pot oferi strategii potențiale pentru a depăși rezistența la aceștia (110). Într-o analiză genomică miR a pacienților cu LAL, o expresie redusă a

miR-335 a fost identificată ca fiind cea mai semnificativă anomalie a miR asociată cu un rezultat slab. Expresia excesivă a miR-335 a sensibilizat semnificativ celulele leucemice la prednison, într-o gamă de concentrații, indicând faptul că expresia ectopică a miR-335 poate conferi o sensibilitate sporită. Deoarece nu s-a observat nicio intensificare a morții celulare în liniile celulare supraexprimând miR-335 atunci când au fost tratate cu alte medicamente de chimioterapie, s-a propus că scăderea miR-335 ar putea reduce sensibilitatea celulelor din LAL la tratamentul cu prednison (104).

2.3.2. miR asociate cu recidiva în LAL

miR-urile intervin în recidiva LAL prin controlul a numeroase gene, iar acestea participă la diverse căi de semnalizare suplimentare față de pierderea sau mutația genelor. Câteva dintre cele mai studiate miR-uri sunt asociate cu recidiva LAL, iar mecanismele lor moleculare sunt descrise mai jos (111).

miR-24: Pacienții cu LAL pediatrică cu supraexprimare miR-24 au rate de remisie și supraviețuire mai scăzute decât cei cu miR-24 subexprimat (100). Supraexprimarea miR-24 protejează celulele leucemice de apoptoză, care este un proces necesar pentru menținerea homeostaziei țesuturilor. În plus, eșecul chimioterapiei și radioterapiei este cauzat de rezistența la apoptoză, iar supraexprimarea genelor antiapoptotice crește riscul de carcinogeneză (112). S-a constatat că supraexprimarea miR-24 protejează celulele canceroase de apoptoză în ficat, stomac, prostată și țesuturile cervicale.

miR-27a: este un alt miR legat de recidiva LAL, iar scăderea reglării miR-27a a fost asociată cu recidiva la pacienții pediatrici cu pre-B-ALL. În schimb, pacienții din grupul miR-27 cu supraexpresie au avut o rată mai mare de remisie completă și un interval mai mare fără recidivă comparativ cu cei care au avut subexprimarea acestui miR (108). Scheibner et al. au raportat că miR-27a este subexprimat în liniile celulare de LAL și a tumorilor primare, spre deosebire de celulele progenitoare hematopoietice stem (113). De asemenea, supraexprimarea miR-27a (FOXM1) și proteina de rezistență multidrog 1 (MRP1), sunt reglate de miR-27a (114, 115). În plus, a îmbunătățit sensibilitatea la doxorubicină în linia celulară de leucemie K562 (114). Conform acestor rezultate, miR-27 este un supresor tumoral în leucemia acută și o țintă terapeutică prospectivă (113).

miR-99 și miR-100 s-au dovedit a fi downregulate la pacienții cu LAL-T care prezintă, de asemenea, rearanjarea MLL și expresia genei de fuziune BCR-ABL. Un prognostic nefavorabil a fost asociat cu nivelurile de expresie ale acestor miR. În plus, apoptoza indusă de dexametazonă a fost crescută, iar proliferarea celulară a fost inhibată în liniile celulare CCFR-CEM, CEM/C1 și Jurkat atunci când miR-100 și miR-99a au fost exprimate ectopic. Au fost efectuate studii funcționale pentru a determina funcția acestor miR in vivo. Cu toate acestea, conform altor cercetări, supraexprimarea miR-100 și miR-99 este legată de un prognostic slab și de rezistența la vincristină și daunorubicină (116), iar coexprimarea miR-125b cu miR-99a sau miR-100 determină un grad semnificativ de rezistență la vincristină (reprezentat de rata de viabilitate

celulară) în celulele Reh ETV6-RUNX1-pozitive care exprimă miR-125b (117). Deși aceste constatări se contrazic reciproc în ceea ce privește natura supresoare tumorală sau oncogenă a funcției miR-99/100, ele au arătat că miR-100 și miR-99a sunt legate de leucemogeneza și prognosticul LAL. Cu toate acestea, constatările nu sunt pe deplin concludente.

miR-124: Supraexprimarea miR-124 este legată de un prognostic nefavorabil și de o probabilitate ridicată de recidivă la copiii cu LAL-T și LAL-B (108). De asemenea, comparativ cu pacienții cu miR-124 downregulat, care au reacționat la glucocorticoizi, pacienții cu LAL-B și LAL-T cu miR-124 supraexprimat au prezentat rezistență la glucocorticoizi și un răspuns insuficient la tratament. În plus, liniile celulare CEM/C1 și Jurkat rezistente la prednison au prezentat o expresie substanțial mai mare a miR-124 decât linia celulară CCRF-CEM sensibilă la prednison. Cercetările *in vitro* au arătat că receptorul glucocorticoid NR3C1 este o țintă moleculară a miR-124, ceea ce duce la rezistența la tratament. Supraexprimarea miR-124 a indus proliferarea și a prevenit apoptoza mediată de dexametazonă în linia celulară CCRF-CEM sensibilă la prednison. Aceste constatări susțin ideea că miR-124 este necesar pentru răspunsul la glucocorticoizi (118). În cele din urmă, o analiză recentă a arătat că miR-124 este legat de gene asociate cu transportul medicamentelor, rezistența multidrog și reglarea proceselor de biosinteză celulară (108)

miR-125b: Unul dintre miR-urile cel mai frecvent legate de recidiva LAL este miR-125b. Expresia miR-125b este downreglată la pacienții cu LAL pre-B și LAL T. Cu toate acestea, nivelul miR-125b a crescut considerabil după aplicarea protocolului Berlin-Frankfurt-Munster, iar un raport miR-125b în ziua 33/diagnostic ridicat a fost asociat cu un prognostic slab (109). Conform unui studiu diferit, pacienții cu LAL pre-B cu supraexprimare miR-125b au avut un prognostic slab și au fost rezistenți la tratamentul cu vincristină și daunorubicină (116). În plus, coexpresia miR-125 cu miR-100 și miR-99 a crescut rezistența la vincristină în linia celulară Reh pozitivă pentru translocația ETV6-RUNX1 (117). Zhou și colab. au raportat că miR-125b a scăzut expresia proteinelor GRK2 și PUMA, care au prevenit moartea celulară în liniile celulare K562, THP-1, Jurkat și REH, contribuind la rezistența la daunorubicină (119). Alți cercetători au descoperit că miR-125b poate promova leucemia prin țintirea factorului de reglare a interferonului 4 (IRF4), supresor tumoral, care este necesar pentru celulele B și T mature (120). Aceștia au arătat că miR-125b promovează proliferarea celulară și induce expresia factorilor legați de pluripotență în celulele B progenitoare prin țintirea proteinei A + T-rich interaction domain 3A (ARID3a) (121). În plus, miR-125b poate afecta T-ALL prin țintirea TNFAIP3, o proteină care s-a dovedit a servi ca supresor tumoral în mai multe limfoame cu celule B umane. Această moleculă poate spori proliferarea celulelor B, diferențierea și reprogramarea metabolismului glucozei (122). BMF, TP53, TP53INP1 și MAPK14 (p38a) sunt ținte suplimentare miR-125b conectate

la calea apoptozei. Aceste informații au sugerat că miR-125b este un oncogen. Pacienții cu niveluri crescute de miR-125b după chimioterapie au avut un prognostic mai prost, deoarece supraexprimarea miR-125b poate inhiba efectele medicamentelor chimioterapeutice care provoacă apoptoză (109).

miR-128b: Conform mai multor studii, copiii cu LAL-T și LAL-B care au recidivat au prezentat niveluri mai ridicate de expresie a miR-128b decât cei care erau în remisie (101, 108, 123). Acest miR controlează transformarea celulelor stem progenitoare și a celulelor progenitoare pluripotente în celule mai mature, fiind esențiale pentru etapele timpurii ale hematopoiezei (123, 124).

Alte studii au demonstrat că gena supresoare tumorală PTEN, a cărei dereglare activează calea de semnalizare fosfatidilinositol 3-kinază (PI3K)/serină/treonină kinază (AKT), promovând supraviețuirea celulară și oncogeneza, este reglată de miR-128 (125, 126). O altă țintă moleculară a miR-128 este proto-oncogenul polycomb ring finger (BMI-1), care este un factor de transcripție necesar pentru autoreînnoirea celulelor stem leucemice și a celulelor stem hematopoietice (HSC) (108, 127). Dereglarea BMI-1 afectează calea de semnalizare PI3K-AKT-mTOR, care controlează diviziunea celulară, apoptoza și senescenta. Ca urmare, miR-128 este crucial pentru dezvoltarea tumorală în LAL (125). Deși miR-128 a fost demonstrat a fi downregulat în unele afecțiuni maligne, cum ar fi cancerul de sân, expresia sa ectopică în prezența doxorubicinei crește deteriorarea ADN-ului și moartea. Aceste constatări au sugerat că miR-128 joacă un rol oncogenic în LAL, dar este un supresor tumoral în cancerul de sân (124).

miR-142-3p: Supraexprimarea miR-142-3p a fost asociată cu recidiva și cu o durată de supraviețuire considerabil mai scurtă la pacienții cu LAL-T decât la cei cu expresie scăzută a miR-142-3p. Mai mult, miR-142-3p a fost descoperit ca fiind un marker util pentru evaluarea prognosticului pacienților cu LAL-T (128). În plus, miR-142-3p a fost puternic exprimat în liniile celulare leucemice T acute umane Jurkat, MOLT-3, MOLT-4 și CCRF/CEM, precum și în liniile celulare pre-B-LAL REH, RS4;11 și SEM (128, 129). Expresia miR-142 a fost raportată ca fiind semnificativ mai mare în aceste linii celulare decât în celulele stem hematopoietice ale subiecților sănătoși sau în celulele T normale.

ARN mesager al adenilil ciclazei 9 (AC9), o enzimă care catalizează conversia ATP în AMPc, este o altă țintă a **miR-142-3p** (130). Proliferarea celulelor T este redusă prin intermediul căii de semnalizare cAMP/proteina kinază A (PKA), care reglează pozitiv p27kip1 în timp ce reglează negativ ciclina D3. Ca urmare, supraexprimarea miR-142-3p suprimă calea cAMP/PKA și încurajează proliferarea celulelor T leucemice (128). În plus, miR-142-3p vizează ARN mesager al receptorului glucocorticoid (GR), un receptor care leagă în mod eficient glucocorticoizii și are un domeniu de legare a ADN-ului și o secvență care vizează nucleul, ducând la moartea limfocitelor în principal prin calea apoptozei intrinsece (131). Inhibarea căii GC produce celule T care sunt rezistente la apoptoza intrinsecă. Prin direcționarea căilor de semnalizare GRa și cAMP/PKA, miR-

142-3p promovează leucemogeneza în LAL-T prin promovarea proliferării celulare, rezistența la tratamentul cu glucocorticoizi și evitarea apoptozei (128).

miR-142-3p este un miR specific pentru celulele hematopoietice (129). Acest miR participă la creșterea și diferențierea celulelor stem hematopoietice și este esențial pentru maturarea limfocitelor T prin semnalizarea mediată de factorul de reglare a interferonului 7 (IRF7), dar dereglarea sa a fost asociată cu leucemia.

miR-155: Potrivit cercetărilor efectuate de Liang și colab. și Sun și colab. (132, 133), supraexpresia miR-155 a fost legată de un prognostic nefavorabil la pacienții pediatrici cu LAL. Prin țintirea proteinei zinc finger protein 238 (ZNF238), o moleculă cu o potențială funcție supresoare tumorală în LAL, necesară proprietăților antiproliferative ale celulelor normale, Liang și colab. au descoperit că supraexprimarea miR-155 a crescut proliferarea celulară în liniile celulare leucemice. Cu toate acestea, metodele prin care ZNF238 reglează activitatea transcripțională sunt încă necunoscute (132). În plus, miR-155-5p a promovat creșterea celulelor LAL. Prin țintirea explicită a limfomului de linie B Casitas, care degradează în mod obișnuit proteina factorului de reglementare a interferonului 4 (IRF4) prin ubiquitinare, miR-155 suprimă producția de kinază dependentă de ciclina 6 (CDK6), prevenind apoptoza (133). Aceste constatări sugerează că miR-155 poate funcționa ca o oncogenă în LAL (132) și că miR-155 poate fi vizat în viitor pentru a trata LAL prin reglarea axei IRF4/CDK6 mediată de CBL.

miR-335: Un nivel scăzut de expresie a miR-335 este legat de un prognostic nefast, de o rată mai scăzută a EFS la 5 ani și de rezistența la glucocorticoizi la pacienții cu LAL pediatrică, conform unei investigații genomice microarray miR (104). Spre deosebire de cei din grupul de control, s-a constatat că pacienții cu recidivă aveau niveluri mai scăzute de miR-335-3p într-un studiu ulterior. De asemenea, pacienții rezistenți la medicamente aveau niveluri mai scăzute de miR-335-3p decât pacienții sensibili la medicamente. miR-335 influențează expresia genei ABCA3, un membru al familiei transportatorilor ABC, care poate întrerupe căile de rezistență multidrog (134) și vizează proteina kinază 1 activată de mitogen (MAPK1) pentru a influența căile implicate în rezistența la prednison și apoptoza crescută (104). Aceste investigații au demonstrat rolul de supresor tumoral al miR-335 în LAL.

Conform altor cercetări, regiunea promotoare a genei miR-335 poate suferi o metilare excesivă și poate deveni silențioasă din punct de vedere epigenetic, explicând dereglarea miR-335-3p în cancer (135). S-a constatat că ARN-urile necodificatoare lungi (lncRNA), transcriptia 1 a ansamblului paraspeckle nuclear (NEAT1) și transcriptia 1 a adenocarcinomului pulmonar asociat metastazelor (MALAT1), care pot regla posttranscripțional producția de miR, au impact asupra miR-335-3p. NEAT1 și MALAT1 sunt corelate cu prognosticul slab și joacă roluri în dezvoltarea diferitelor tipuri de cancer (136-138). NEAT1 și MALAT1 sunt supraexprimate în LAL pediatrică, în special la pacienții cu rezistență multidrog, iar nivelurile scăzute de miR-335-3p sunt asociate

cu niveluri ridicate de expresie ale acestor lncRNA-uri (134). LncRNA-ul inhibitor al kinazei dependente de ciclin 2B antisens RNA 1 (CDKN2B-AS1), care promovează carcinogeneza și rezistența la adriamicină (ADR) în LAL pediatrică cu celule T, reglează, de asemenea, miR-335-3p. Dimpotrivă, knockdown-ul CDKN2B-AS1 a inhibat creșterea tumorală. Aceasta a crescut sensibilitatea la adriamicină (ADR) in vivo, cel puțin parțial prin inhibarea miR-335-3p, iluminând o țintă terapeutică cu mare potențial pentru tratarea pacienților tineri cu LAL-T (139). Conform acestor constatări, lncRNA-urile NEAT1, MALAT1 și CDKN2B-AS1 reglează expresia miR-335-3p și joacă un rol în mecanismele care stau la baza recidivei LAL (111).

2.4. miR ca instrument pentru imunoterapie

În principal, studiile privind biologia miR s-au axat pe rolul lor fie ca oncogene, fie ca supresoare tumorale; cu toate acestea, progresele recente în înțelegerea sistemului imunitar sugerează că miR joacă, de asemenea, un rol important în reglarea imunității și, prin urmare, pot acționa atât ca agenți, cât și ca ținte ale imunoterapiei.

Terapiile cu CAR-T au început recent să demonstreze un succes spectaculos în studiile clinice care tratează pacienții cu BCP-ALL (140). Analiza profilurilor transcriptomice la pacienții cu B-ALL înainte și după terapia CAR-T, în combinație cu miR-seq, a arătat că multe miR (inclusiv membrii familiei let-7) sunt implicate în procesul imunitar și ar putea să regleze interacțiunea dintre factorii de transcripție și proteinele histone implicate în răspunsul la terapia CAR-T. De exemplu, în cadrul unei rețele reglatoare, autorii studiului au arătat că FOS, JUN și CEBP reglează expresia genică a histonelor HIST1H4A și HIST2H4A, care au fost targetate de miR-148a-3p. La pacienții aflați în remisie au fost identificate 15 miR-uri supraexprimate și 7 miR-uri subexprimate care pot deveni acum biomarkeri suplimentari de prognostic (141).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective

Leuceemiile acute la copii cuprind mai multe entități, însă cele mai frecvent apărute sunt leucemia acută limfoblastică și cea mieloblastică. În această lucrare am abordat pacienții diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică cu celule B și cea cu celule T. Este știut faptul că LAL la copii este o boală cu grad înalt de obținere a remisiei complete, în special în țările dezvoltate, unde ratele ating procente de 85-90%, în unele țări europene chiar depășind aceste procente. Totodată în jur de 20% dintre copii fie recidivează, fie nu răspund la tratament. Cu ajutorul unei multitudini de factori prognostici se poate anticipa care dintre pacienți va avea o evoluție nefavorabilă, însă există pacienți aparent fără factori de prognostic negativi, care cad pradă bolii. Din această cauză, LAL la copii este încă o boală intens studiată. În ultimii ani, progrese importante au fost înregistrate, în special introducerea testării bolii minime reziduale, care contribuie la stratificarea mai corectă a pacienților în grupe de risc, drept urmare identificând mai corect pacienții care au nevoie de scheme de chimioterapie mai intense, transplant autolog de celule stem în prima remisie completă, sau, din contră, pacienții la care se poate reduce intensitatea chimioterapiei. Pe lângă genele de fuziune deja cunoscute ca fiind markeri prognostici, au fost identificate multe altele care intervin în evoluția și prognosticul acestei patologii.

În plus, există modificări epigenetice, iar în ultimii ani s-a descoperit faptul că ARN-urile non-codificante joacă roluri importante, în special microARN-urile. Acestea conlucrează în grupuri care reglează procese la nivel celular în diferite stadii ale limfopoiezei, cum ar fi supresia tumorală sau promoția tumorală. În timpul proliferării blastilor apar expresii anormale ale unor anumite miR-uri, care ar putea fi considerate ca o „semnătură” în leucemia acută limfoblastică. Modificarea expresiei are roluri importante în apariția LAL, rezistența la terapie și a altor procese, însă reversia expresiilor ar putea avea rol terapeutic.

Această lucrare pleacă de la premiza că în leucemia acută limfoblastică la copii intervin numeroși factori care pot anticipa evoluția, răspunsul la tratament și supraviețuirea. Acești factori pot fi legați de caracteristicile clinice, paraclinice, citomoleculare și genetice, precum și epigenetice. Dintre aceștia, factorii epigenetici sunt cel mai puțin studiați în această patologie la copii.

Obiectivul principal al acestei teze este studiul modificărilor epigenetice în leucemia acută limfoblastică la copii, adică modificările anumitor microARN implicate în patogeniza acestei boli și corelarea expresiei acestora cu răspunsul la tratament, supraviețuirea și recidiva.

Obiectivele secundare sunt:

- Determinarea caracteristicile clinice, biologice și epidemiologice ale pacienților cu LAL și compararea acestora cu literatura de specialitate prin efectuarea unui studiu retrospectiv a pacienților internați și tratați în cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca, Departamentul de Oncologie și Hematologie Pediatrică pe o perioadă de 10 ani, între anii 2011-2021.
- Impactul bolii reziduale minime asupra stratificării în grupe de risc, intensitatea chimioterapiei și relația cu obținerea remisiei complete, a recidivelor și a deceselor.
- Determinarea ratelor de supraviețuire obiectivate prin supraviețuirea globală și supraviețuirea fără evenimente, în funcție de diferite variabile personale și biologice și compararea a două loturi de pacienți de câte 5 ani prin efectuarea unui studiu retrospectiv de supraviețuire al pacienților diagnosticați cu LAL în perioada 2011-2020.
- Determinarea relației dintre supraviețuire și boala minimă reziduală
- Alegerea unui eșantion reprezentativ de 20 de pacienți dintre cei cărora li s-au recoltat probe biologice (celule mononucleate și ser) la diagnostic. Dintre aceștia 10 au avut un răspuns bun la terapie, cu obținerea remisiei complete și supraviețuire până în prezent, iar ceilalți 10 cu răspuns nefavorabil prin rezistența la tratament, apariția recidivelor și deceselor
- Identificarea unor miR care intervin în patologia LAL pediatrică

2. Metodologie generală

Primele 2 studii retrospective le-am realizat după obținerea consimțământului informat semnat de aparținători la internare, iar studiul 3 a fost realizat cu acordul Comisiei de Etică a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca, precum și a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”.

Primele două studii sunt retrospective, realizate pe cohorte diagnosticate între anii 2010-2021, respectiv 2010-2020, iar cel de-al treilea studiu a fost realizat prin selectarea a 20 de pacienți reprezentativi din cei 50 de pacienți pentru care am recoltat probe la diagnostic și pe parcursul chimioterapiei, în momentele cheie de evaluare. Pentru aceste studii, datele pacienților au fost extrase din foile de observație, iar datele care lipsesc au fost preluate din Registrul Național de Onco-Hematologie Pediatrică. Toate aceste informații au fost centralizate într-o baza de date cu ajutorul Microsoft Excel. Analiza statistică a fost făcută cu ajutorul programului Prism GraphPad versiunea 10.2.3.

Criteriile de includere în studii sunt:

- Copii <18 ani nou diagnosticați cu LAL
- Copii care au fost tratați în Departamentul de Oncologie și Hematologie Pediatrică din cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca
- Pacienți nou diagnosticați, înainte de începerea chimioterapiei citostatice

Criteriile de excludere din studiu sunt:

- Pacienți/aparținători care nu au semnat consimțământul informat
- Pacienți >18 ani
- pacienți care au fost diagnosticați în serviciul nostru, dar au optat pentru un alt centru de tratament (din țară sau străinătate)
- Pacienți care au început chimioterapia citostatică înainte de recoltarea probelor pentru studiu

Pentru cel de-al treilea studiu au fost necesare anumite etape de obținere a diferenței de expresie a miR-urilor studiate (miR-21, miR-25 și miR-155):

- Recoltarea de sânge periferic și separarea serului
- Izolarea miR din ser
- Sinteza cDNA din miR

- Amplificarea PCR cantitativă
- Normalizarea datelor obținute

3. Studiu 1. Leucemia acută limfoblastică la copii: caracteristicile clinice, biologice, epidemiologice și răspunsul la tratament

3.1. Introducere

Leucemia acută limfoblastică la copii este cea mai frecventă malignitate din cadrul cancerelor pediatrice. 80% dintre toate cancerele la copii sunt diagnosticate ca și LAL (1). Există rezultate impresionante în obținerea remisiei complete în ultimii ani, unele studii având rezultate de supraviețuire de peste 90%, dar încă aproape 20% dintre copii recidivează și 15% cad pradă bolii (3, 142). În țările cu venit mic sau mediu din toată lumea, ratele de supraviețuire variază între 50% și 75%, datorate în parte întârzierilor în stabilirea diagnosticului sau a inițierii tratamentului (143).

Leucemia acută limfoblastică este de obicei diagnosticată la copii cu vârste între 3-6 ani și mai frecvent la sexul masculin (raportul între fete și băieți este de 1.4:1). Tratamentul este efectuat în funcție de încadrarea în grupe de risc, care ia în considerare factorii de risc tradiționali din protocoalele internaționale, incluzând vârsta la diagnostic, numărul de leucocite inițial, imunofenotipul (celule de linie B sau T), analize de citogenetică, răspunsul la tratament, de preferat prin evaluarea MRD (care poate fi efectuat prin FC-MRD, prin PCR sau prin NGS), fiind un instrument valoros la îndemână pentru a măsura răspunsul la terapie. Inițial, MRD a fost determinată doar de câteva grupuri de lucru, dar în zilele noastre majoritatea protocoalelor care au ca scop tratarea pacienților cu LAL includ evaluarea MRD (144-146).

LAL este o boală heterogenă care cuprinde o constelație de căi alterate care controlează proliferarea celulară, diferențierea și supraviețuirea, fiind pioni importanți implicați în răspunsul la tratament (147). Cel mai frecvent LAL ia naștere din precursori de linie B, comparativ cu cei de linie T. LAL este corelată cu hipodiploidie, hiperdiploidie și rearanjamente cromozomiale recurente, din care iau naștere gene de fuziune chimerice, care au legătură restrânsă cu prognosticul, răspunsul la tratament și recidiva (148). Metode de detecție complexe au determinat faptul că o clonă preleucemică poate fi dormantă timp de ani, putând la un moment dat să se activeze. Defectele genetice primare sunt factori prognostici mult mai adecvați pentru prognostic comparat cu defectele genetice secundare (acestea sunt alterări ale numărului de copii, microdeleții și mutații punctiforme). Translocația t(12;21)/ETV6/RUNX1 este cel mai cunoscut

biomarker din LAL și, împreună cu hiperdiploidia conferă un prognostic bun (144). Translocațiile KMT2A (MLL), t(9;22)/ BCR/ABL1, t(17;19)/TCF3-HLF, cariotipul aproape hiploid și cel cu joasă hiploidie, t(1;19)/TCF3-PBX1, amplificarea intracromozomială a cromozomului 21 (iAMP), translocații IGH, deleții ale genei Ikaros, care este un simbol al LAL cu risc înalt, IKZF1^{plus} (deleție, dar fără deleția ERG, asociată cu alte deleții genice, cum ar fi CDKN2A/2B, PAX5 și PAR1) sunt toate caracteristice riscului înalt (144, 149, 150).

3.2. Ipoteza de lucru

Leucemia acută limfoblastică la copii este o maladie cu grad înalt de vindecare, în special în țările dezvoltate, unde obținerea remisiei complete poate ajunge, chiar depășii 90% (151), puține se știu însă despre caracteristicile pacienților și supraviețuirea în România, în afară de câteva studii realizate în diferite centre mari de Oncologie și Hematologie Pediatrică.

Această parte a lucrării va determina caracteristicile clinice, biologice și epidemiologice ale pacienților diagnosticați cu LAL pediatrică și compararea acestora cu datele din literatura de specialitate, precum și impactul bolii reziduale minime asupra stratificării în grupe de risc, intensitatea chimioterapiei și relația cu obținerea remisiei complete, a recidivelor și a deceselor.

Pacienții studiați într-un interval de timp de 10 ani au fost internați, diagnosticați și tratați în Compartimentul de Oncologie și Hematologie Pediatrică din cadrul Spitalului Clinic de Urgență Cluj-Napoca.

3.3. Material și metodă

Acest studiu retrospectiv a inclus pacienți nou diagnosticați cu LAL în perioada ianuarie 1 ianuarie 2011 și 2 aprilie 2021. Toți părinții/apartinătorii legali au semnat consimțământul informat la internare, iar studiul a fost condus conform Declarației de la Helsinki. Un număr total de 158 de pacienți a fost analizat, cu vârste cuprinse între 0 și 17 ani. Nu au fost excluși pacienți din studiu.

Tratamentul a fost administrat conform protocolului Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental Berlin-Frankfurt-Münster Study Group 2002 (BFM ALL-IC 2002) până în mai 2017, atunci când boala reziduală minimă a devenit disponibilă și în România, ulterior tratamentul administrându-se conform protocolului BFM ALL-IC 2009.

La diagnostic, precum și în momentele cheie ale tratamentului au fost recoltate probe din sângele periferic, sânge medular prin aspirat osteo-medular și lichid cefalorahidian. Diagnosticul a fost stabilit predominant prin examinarea citologică a sângelui periferic, prin examinarea morfologică a frotiului medular ($\geq 25\%$ blaști) și imunofenotipare. Lichidul cefalorahidian a fost evaluat în vederea determinării afectării sistemului nervos central.

Au fost determinate cele mai frecvente gene de fuziune din LAL la copii, dar nu toate au fost disponibile din 2011. ETV6-RUNX1 a devenit disponibilă din aprilie 2012, translocția BCR-ABL1 p210 și p190 a fost disponibilă de la începutul studiului, KMT2A-AFF1 a devenit disponibilă din octombrie 2014, TCF-PBX1 din iulie 2015 și translocția SIL-TAL1 a fost disponibilă pentru determinare din 2017. Cariotipul a fost evaluat la diagnostic din aspiratul osteo-medular și a fost disponibil din 2011.

Variabilele studiului cuprind genul, vârsta la diagnostic, numărul initial de leucocite, stratificarea în grupe de risc, răspunsul la prednison în ziua 8, testele de biologie moleculară, cariotipul, răspunsul morfologic în zilele 15 și 33 de tratament și boala minimă reziduală în zilele 15 și 33 (ambele din sânge medular).

Încadrarea în grupe de risc a fost realizată conform protocolului ALL-IC BFM 2002 din anul 2011 până în anul 2017, apoi conform protocolului ALL-IC BFM 2009. Conform protocolului din 2002 încadrarea în cele 3 grupe de risc sunt definite astfel: SRG: vârste cuprinse între 1 și 6 ani, leucocite la diagnostic $<20000/\text{mm}^3$, în ziua 8 de tratament <1000 blaști/ mm^3 în sangele periferic, frotiu medular M1 sau M2 în ziua 15 și M1 în ziua 33. MRG este definită astfel: <1000 blaști/ mm^3 în sangele periferic în ziua 8, vârste <1 an sau ≥ 6 ani și/sau leucocite $\geq 20000/\text{mm}^3$ și măduvă M1 sau M2 în ziua 15 plus măduvă M1 în ziua 33, sau criterii de includere în grupa de risc standard, dar cu măduvă M3 în ziua 15 și măduvă M1 în ziua 33. HRG este definită astfel: MRG și măduvă M3 în ziua 15, leucocite în ziua 8 $>1000/\text{mm}^3$, măduvă M2 sau M3 în ziua 33 de tratament sau translocții t(9;22)/BCR-ABL1 sau t(4;11)/KMT2-AFF1 (62).

Conform protocolului din 2009, împărțirea în grupe de risc include MRD și se face astfel: SRG: vârstă cuprinsă între 1 și 6 ani, leucocite la diagnostic $<20000/\text{mm}^3$, <1000 blaști/ mm^3 în sangele periferic în ziua 8 în sângele periferic, FCM-MRD $< 0.1\%$ sau măduvă M1/M2 în ziua 15, fără măduvă M2/M3 în ziua 33. Încadrarea în grupa de risc înalt presupune: grupă de risc intermediară și FCM-MRD $> 10\%$ sau măduvă M3 în ziua 15, SRG și FCM-MRD $> 10\%$, peste 1000 leucocite/ mm^3 în sângele periferic în ziua 8, măduvă M2/M3 în ziua 33, translocții t(9;22)/BCR-ABL1 sau t(4;11)/KMT2-AFF1 sau hipodiploidie <44 cromozomi. Pacienții care nu se încadrează cu aceste criterii în grupele de risc standard sau înalt vor fi stratificați în grupa de risc mediu (63).

Măduva M1 este definită ca având $<5\%$ blaști pe frotiu la examinarea morfologică, M2 este definită ca având între 5 și 25% blaști, iar măduva M3 $\geq 25\%$ blaști. Răspunsul bun la Prednison pe frotiul sangvin periferic în ziua 8 este definit astfel: prednisone good responders (PGR) <1000 blaști/ mm^3 , iar răspunsul slab la prednison este definitiv ca prednisone poor responders (PPR) ≥ 1000 blaști/ mm^3 . Toți pacienții au primit 7 zile de prednison înainte de evaluarea răspunsului la cortizon și o administrare intratecală de metotrexat, conform protocolului (63). Remisia completă înainte de disponibilitatea MRD a fost evaluate cu ajutorul morfologiei aspiratului osteo-medular în ziua 33: măduvă M1 în ziua 33, fără semne de afectare extramedulara. Boala reziduală minimă a

început să fie evaluată din aprilie 2017 și a fost măsurată cu ajutorul unui analizator de flow-citometrie în 10 culori (Navios, Beckman Coulter). S-au folosit 8 markeri caracteristici imunofenotipurilor anormale din leucemie, atingând o sensibilitate de 10^{-4} . În ziua 15 grupele de răspuns la tratament conform MRD au fost definite ca $<0.1\%$, $0.1\%-1\%$, $1\%-10\%$, $>10\%$. În ziua 33 grupele MRD au fost împărțite în $<0.05\%$ și $>0.05\%$ (63). Efectuarea MRD în ziua 33 a fost disponibilă din septembrie 2019.

Am împărțit cauzele de deces în 2 grupuri: deces în inducție (înainte de ziua 33) și deces după inducție (după ziua 33). În cazul deceselor în inducție am luat în considerare decesele datorate toxicității cauzate de chimioterapie, decese datorate bolii progressive sau decese datorate altor comorbidități. Decesele după inducție au fost datorate toxicității tratamentului, recidive foarte precoce, precoce sau tardive și decese datorate altor comorbidități.

Rata brută (incidența brută) definește un număr total dintr-o populație a unui anumit eveniment datorat unei boli, fără a folosi aspect specific cum ar fi vârsta, sexul sau alte variabile legate de demografie. Rata standardizată este folosită pentru a compara incidența unei boli în populații diferite, luând în considerare diferențele dintre distribuția pe grupe de vârstă. Ca referință a fost folosită populația medie europeană din 2016 (152).

Analiza datelor obținute au fost făcute cu ajutorul Prism GraphPad, versiunea 10.2.3. și Microsoft Excel. Analiza epidemiologică a fost realizată cu ajutorul celor două concepte prezentate mai sus. Rata brută a fost calculată cu ajutorul formulei: numărul cazurilor/populație*100000, iar rata standardizată a fost calculată folosind populația standard europeană conform Eurostat (Anexa 1) (153). Formula de calcul folosită pentru rata standardizată este numărul de cazuri/populația standard*100000. Populația standard este derivată din populația actuală împărțită la ponderea populației. Populația actuală a fost obținută de la Institutul Național de Statistică, în funcție de vârstă și ani. Statistica descriptivă, împreună cu figurile și tabelele au fost realizate cu ajutorul Microsoft Excel. O valoare $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic.

3.4. Rezultate

Un număr total de 158 de pacienți a fost analizat, iar caracteristicile lor sunt prezentate în Tabelul 1. Această cohortă reprezintă 15.3% dintre toate cazurile diagnosticate în România din perioada de desfășurare al studiului (datele sunt extrase din Registrul Național de Onco-Hematologie Pediatrică). Din cei 158 de pacienți, 78 (47.4%) sunt fete, iar 86 (52.5%) sunt băieți. Raportul dintre sexe este de 1.1/1. 11 pacienți au fost pierduți din studiu în timpul diagnosticului, terapiei sau urmăririi, dar au fost incluși în acesta datorită faptului că datele despre supraviețuire și deces au putut fi obținute de la Direcția Generală pentru Evidența Persoanelor.

Vârsta medie la diagnostic a fost de 5 ani și 6 luni (95%CI 4.97-6.26), cu un interval cuprins între 0 și 17 ani. 62% (98) dintre pacienți au fost cuprinși în intervalul de vârsta de 1-6 ani, 34.9% (55 pacienți) au avut vârsta peste 6 ani, iar 3.1% (5) pacienți au avut vârsta sub un an.

Urmărirea medie a cohortei a fost de 44 luni/1319 zile, cu extreme de 4.2 luni/127 zile și 124.3 luni/3730 de zile. 95 de pacienți (60.1%) au avut <20000 leucocite/mm³ la diagnostic, iar 19 pacienți (12%) au avut >100000 leucocite/mm³.

Cea mai mare proporție a copiilor au avut imunofenotip B (134 pacienți/84.8%) și doar 15.1% (24) au avut imunofenotip T.

75.9% (120) dintre pacienți au avut cariotip normal, 5% (8) au avut cariotip hiperdiploid, 1.9% (3) pacienți hipodiploid, iar 12% (19) pacienți au avut alte anomalii, cum ar fi 47XX, +21, 45XX, +6, -2, 47XY, +8, 45XX, -9, inv9, del17, 45XY, -22, del8, del10, 45XX, -13, -11.

28.5% (45) dintre copii au prezentat translocția ETV6-RUNX1 și o pacientă a prezentat concomitant translocția BCR-ABL1 majoră. La 53.8% (45) dintre pacienți nu a fost detectată nicio translocție, iar doar 5.7% (9) au avut afectare SNC la diagnostic.

80.3% (127) copii au răspuns bine la prednison în ziua 8, spre deosebire de 15.2% (24) dintre copii, care au avut răspuns prost la prednison.

În ziua 15 răspunsul morfologic medular a fost astfel: 40.9% (63) dintre pacienți au prezentat măduvă M1, 20.1% (31) au avut măduvă M2 și 13.6% (21) măduvă M3. 23.3% (36) dintre cei evaluați au avut aplazie medulară, iar răspunsul nu a putut fi evaluat în acel moment. În ziua 33 răspunsul morfologic medular a fost înregistrat astfel: 78.5% (113) pacienți au prezentat măduvă M1, 5.5% (8) au avut măduvă M2, iar 0.7% (un pacient) a avut măduvă M3. 15.2% (22) copii au fost în aplazie medulară în acest moment al evaluării, iar remisia completă nu a putut fi confirmată.

Boala reziduală minimă în ziua 15 a evidențiat că 29.4% (20) dintre pacienți au intrat în remisie completă (MRD<0.1%), 25% (17) au avut MRD între 0.1-1%, 25% (17 pacienți) între 1% și 10%, iar 20.6% (14 pacienți) >10%. În ziua 33 FC-MRD a fost negativă pentru 63.6% (14) copii și pozitivă pentru 36.3% (8).

Tabel 2. Caracteristicile cohortei (2011-2021)

VARIABILE	REZULTATE	NUMĂR ȘI PROCENT PACIENȚI
Sex	Feminin	75 (47.4%)
	Masculin	83 (52.5%)
Vârsta la diagnostic (ani)	Vârsta medie	5.6 years
	<1 an	5 (3.1%)
	1-6 ani	98 (62%)
	>6 ani	55 (34.9%)

Numărul de leucocite la diagnostic	<20000/mm ³	95 (60.1%)
	20000-100000/mm ³	44 (27.85)
	>100000/mm ³	19 (12%)
Imunofenotip	B	134 (84.8%)
	T	24 (15.1%)
Cariotip	Normal	120 (75.9%)
	Hipodiploid	3 (1.9%)
	Hiperdiploid	8 (5%)
	Alte anomalii	19 (12%)
Biologie moleculară	TEL-AML1/ETV6-RUNX1	45 (28.5%)
	E2A-PBX1/TCF3-PBX1	8 (5.1%)
	SIL-TAL1	10 (6.3%)
	BCR-ABL minor (p190)	7 (4.4%)
	MLL-AF4/KMT2A-AFF1	2 (1.3%)
	BCR-ABL major (p210)	1 (0.6%)
	Fără fuziuni	85 (53.8%)
	>5 elemente	9 (5.7%)
Afectare SNC		
Răspuns la prednison în ziua 8	Răspuns bun	127 (80.3%)
	Răspuns slab	24 (15.2%)
Încadrare în grupe de risc	SRG	36 (22.8%)
	MRG	76 (48.1)
	HRG	38 (24%)
Răspuns morfologic medular în ziua 15	M1	113 (78.5%)
	M2	31 (20.1%)
	M3	21 (13.6%)
	Aplazie	36 (23.3%)
Răspuns morfologic medular în ziua 33	M1	113 (78.5%)
	M2	8 (5.5%)
	M3	1 (0.7%)
	Aplazie	22 (15.2%)
FCM MRD în ziua 15 (din 2017)	<0.1%	20 (29.4%)
	0.1-1%	17 (25%)
	0.1-1%	17 (25%)
	>10%	14 (20.6%)

FCM MRD în ziua 33 (din 2019)	<0.05%	14 (63.6%)
	>0.05%	8 (36.3%)

Au fost 11 pacienți (6.9%) care au decedat în timpul terapiei de inducție a remisiei și 16 (10.1%) care au decedat după inducție. De asemenea, au fost 18 pacienți (11.4%) cu recidive, dintre care 6 (3.8%) au fost foarte precoce, 7 (4.4%) precoce, iar 5 (3.2%) tardive.

După recidivă 61% dintre pacienți au decedat, dar în 39% din cazuri s-a obținut a doua remisie completă. Nici unul dintre pacienții cu recidive foarte precoce nu a intrat în a doua remisie completă, dar toți pacienții cu recidive tardive au intrat în remisie completă. În cazul a doi dintre pacienții cu recidivă precoce s-a obținut remisia completă. Folosind testul Chi-square am găsit o corelație semnificativă din punct de vedere statistic, legată de momentul recidivei și obținerea remisiei complete ($p=0.0296$).

Dintre copiii care au decedat, 11 (6.9%) au suferit decese toxice în inducție, iar 16 (10.1%) au decedat după inducție (toxicitate sau recidivă). Numărul total este de 27 (17%). În 68% dintre cazuri a fost obținută remisia completă, 13% dintre pacienți au decedat, 11% au suferit recidive, 7% au fost pierduți din evidență, iar 1% (2 pacienți) au dezvoltat a doua malignitate (Figura 3).

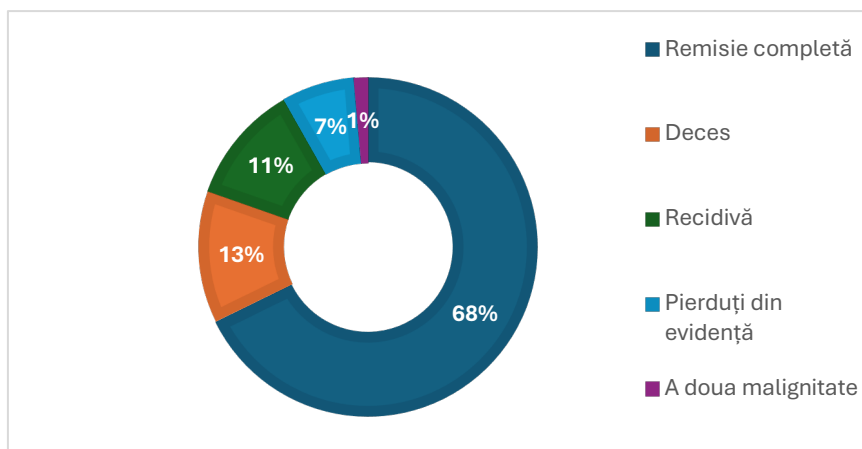


Fig.3. Evoluția pacienților după prima linie de chimioterapie

Înainte de folosirea testării MRD în 2017 (Figura 4), 39% (61) dintre pacienți au fost stratificați în grupa de risc standard, 46% (37) în grupa de risc mediu, iar doar 15% (24) dintre pacienți în grupa de risc înalt. După anul 2017, cu testarea MRD, doar 7% (11) au fost încadrați în grupa de risc standard, marea majoritate a pacienților fiind

stratificați în grupele de risc mediu (57%, 90 pacienți) și înalt (36%, 57 pacienți). Luând în considerare momentul tratamentului și testarea MRD, am observat că același număr de pacienți au intrat în remisie completă (33.7%, 53 pacienți), dar mai mulți au recidivat (7%, 11 pacienți) sau au decedat (10.7%, 17 pacienți) înainte de 2017, spre deosebire de perioada următoare, unde am înregistrat 4.4% (7) recidive și 5.4% (6) decese, dar nu am găsit nicio corelație semnificativ statistică între aceste două perioade ($p=0.29$).

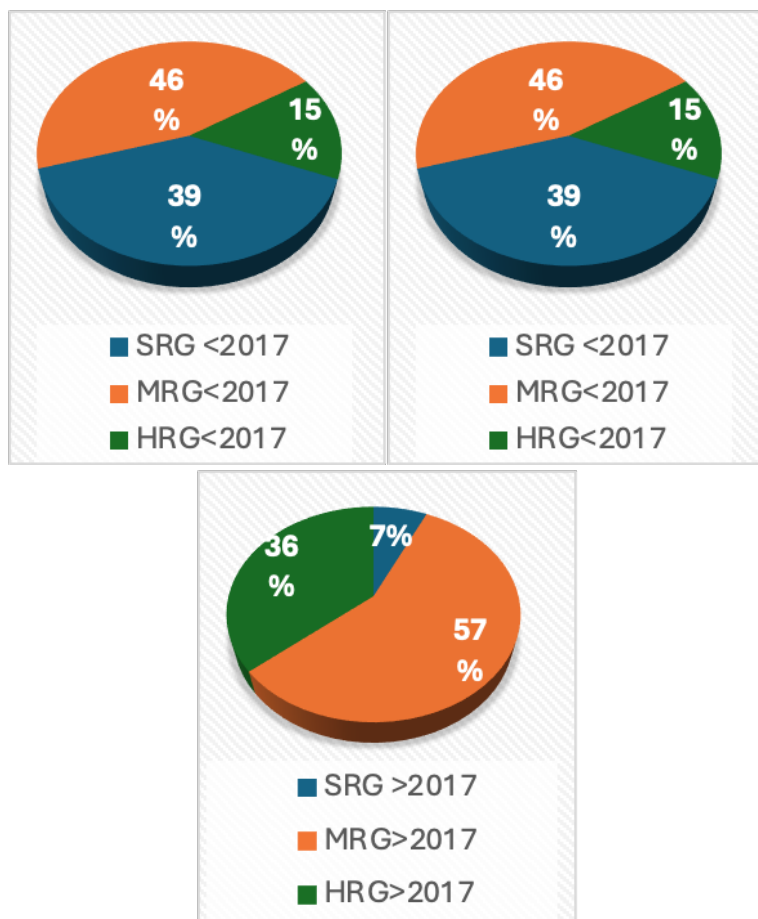


Fig.4. Împărțirea în grupe de risc înainte și după introducerea testării MRD

Numărul nou de cazuri pe an a fost relativ constant, cu excepția anului 2016, unde se observă o scădere a numărului nou de cazuri. Cea mai mare incidență a fost în anul 2018 (Figura 5).

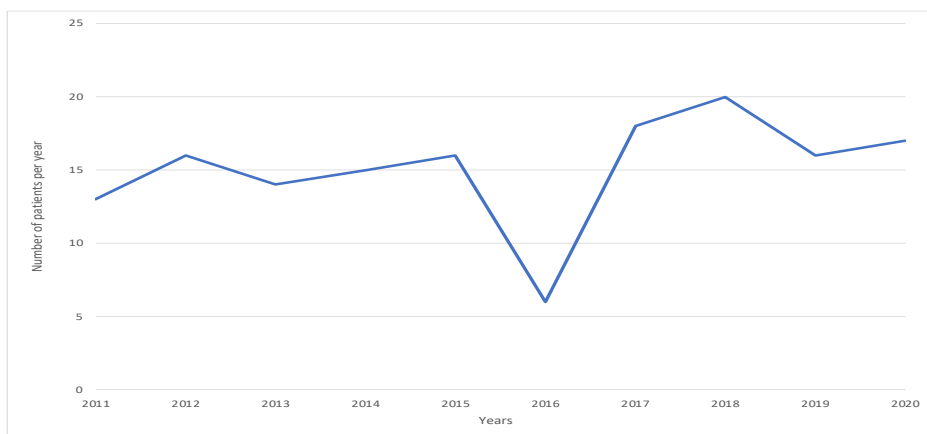


Fig.5. Numărul de cazuri noi pe an din perioada 2011-2021

Am analizat incidențele brute pe ani a întregii cohorte, dar pentru a exclude factori care pot altera ratele brute am calculat și ratele standardizate în funcție de vârste, pentru a exclude distribuțiile inegale. Analizând incidențele tuturor anilor, am observat că ratele brute și cele standardizate la populația europeană de referință prezintă valori aproape identice și apropiate de la an la an. Cea mai mică incidență este înregistrată în anul 2016, iar cea mai ridicată în 2018 (Tabel 3).

Tabel 3. Incidențe pe ani

An de incidență	Rata Brută* (Incidence)	Rata standardizată (ASR)**
2011	0.31	0.31
2012	0.38	0.39
2013	0.34	0.35
2014	0.36	0.36
2015	0.40	0.40
2016	0.15	0.15
2017	0.44	0.44
2018	0.50	0.50
2019	0.39	0.40
2020	0.41	0.43

*Incidența raportată la o populație de 100000

**Populația europeană medie (2016) (153)

Din motive epidemiologice am împărțit pacienții în 4 grupe de vârstă. Cele mai mari incidențe au fost la grupa de vârstă 0-4 ani, urmată de 5-9 ani, cea mai mică incidență fiind înregistrată la adolescenții de 15-17 ani (Tabelul 4).

Tabel 4. Incidențe în funcție de ani și grupe de vârstă

Grupe de vârstă	0- 4 ani		5- 9 ani		10-14 ani		15-17 ani	
Ani/Incidențe	Rată brută*	Rată standardizată**	Rată brută*	Rată standardizată**	Rată brută*	Rată standardizată**	Rată brută*	Rată standardizată**
2011	0.57	0.6	0.38	0.36	0.18	0.18	0.09	0.09
2012	0.97	1.0	0.38	0.36	0.18	0.18	0.00	0.00
2013	1.00	1.02	0.28	0.28	0.09	0.09	0.00	0.00
2014	0.52	0.51	0.75	0.75	0.19	0.19	0.00	0.00
2015	0.94	0.93	0.28	0.28	0.28	0.28	0.09	0.09
2016	0.32	0.31	0.28	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00
2017	0.51	0.52	0.67	0.66	0.48	0.47	0.09	0.09
2018	1.10	1.15	0.6	0.57	0.19	0.19	0.09	0.09
2019	0.88	0.95	0.31	0.29	0.19	0.19	0.19	0.19
2020	1.06	1.16	0.21	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19

*Incidența raportată la o populație de 100000

**Populația europeană medie (2016) (153)

3.5. Discuții

Este important de subliniat faptul că LAL este o boală curabilă, în special în țările cu venituri mari, unde ratele înalte de remisie completă ating procente de 80-90% (151). Pe de altă parte, statusul socio-economic are un rol important în supraviețuirea pe termen lung (154). Începând din anul 2017, România este clasificată ca făcând parte din țările cu venit mare, bazat pe IBRD (Banca Internațională pentru Reconstrucție și Dezvoltare) (155), deși există multe discrepanțe în populație, cum ar fi lipsa de educație a părinților, venituri scăzute, șomaj, condiții de viață precare (aglomerație), copii care locuiesc în zone rurale izolate și altele.

Cohorta de pacienți studiată a fost diagnosticată în Cluj-Napoca, în cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii, Departamentul de Oncologie și Hematologie Pediatrică, unde se tratează 7% din cancerele diagnosticate în țară. Este de menționat faptul că acest departament tratează și tumori solide, boli hematologice non-maligne și deservește partea de Nord-Vest a țării, unde sunt cele mai mari incidențe ale cancerului pediatric (11.25/100000 locuitori). Pe o perioadă de 10 ani, în acest departament au

fost tratați 15.3% de copii cu LAL, fiind al treilea centru din România care a tratat această patologie (156).

Durata medie de urmărire a pacienților a fost de 44 luni (3.6 ani), cu extreme între 4.2 luni și 124.3 luni (10 ani). Motivele pentru această durată medie de urmărire relativ scurtă ar putea fi: adolescenții sunt redirecționați către centrele de adulți la împlinirea vârstei de 18 ani, alți pacienți au ales spitalele locale pentru urmărire (după încheierea chimioterapiei de întreținere), o parte din pacienți nu s-au mai prezentat pentru controalele regulate, iar alții fie au recidivat și/sau au fost transplantați în alte centre (în România sau transfrontalier) sau au decedat.

Vârsta medie la diagnostic a fost de 5.6 ani, fiind aliniată cu literatura internațională (151, 157). Diferența dintre numărul de băieți și fete nu este revelatoare, deoarece este foarte mică, dar mai multe fete au fost diagnosticate cu LAL. Raportul dintre cele 2 sexe este de 1.1/1, fiind mai mic decât cel raportat de RNOHP sau alte articole (156). Majoritatea pacienților aparțin grupei de vârstă 1-6 ani, așa cum era de așteptat, 40% (60 de pacienți) au peste 6 ani și doar 3.1% (5 pacienți) au vârste sub 1 an. Această stratificare este importantă din punct de vedere al stabilirii grupei de risc, fiind știut faptul că cei între 1-6 ani au cel mai bun prognostic (63). Cei mai mulți copii au prezentat imunofenotip B. Imunofenotipul T a fost detectat la 15% dintre pacienți, fiind consistent cu literatura (158). Cei mai mulți dintre copii au cariotip normal, doar 11 dintre ei au prezentat hiper- sau hipodiploidie, iar o parte din pacienți au avut alte anomalii izolate, majoritatea fiind lipsite de semnificație. Cea mai frecventă translocăție este ETV6-RUNX1, dar mai mult de jumătate dintre pacienți nu au avut prezentă nicio translocăție. Aceste gene de fuziune nu au fost analizate în detaliu în acest studiu, deoarece nu toate au fost disponibile de la începutul studiului. Detectia în detaliu a translocățiilor cu semnificație prognostică, cum ar fi amplificarea intracromozomială a cromozomului 21 (iAMP21), translocății IGH, deleții ale genei Ikaros și Ikaros+ a devenit disponibilă din anul 2023, dar numai într-un singur centru din România.

Din punct de vedere al numărului de leucocite la diagnostic, cei mai mulți pacienți au avut sub 20000 leucocite/mm³ (60.1%), acesta fiind un marker de prognostic favorabil. Cei cu leucocite ≥ 20000/mm³ pot avea prognostic nefavorabil, mai ales dacă se asociază și alți factori de risc. Marea majoritate a pacienților a avut un răspuns bun la prednison în ziua a 8-a, fiind un moment cheie din stratificarea în grupe de risc. Trebuie să menționez aici faptul că încadrarea în grupe de risc se poate realiza doar după ce toate criteriile de stadializare au fost îndeplinite, adică în ziua 33, când se marchează sfârșitul terapiei de inducție a remisiei.

Intrarea în remisie completă înainte de anul 2017 a fost stabilită morfologic, iar din 2017 prin MRD, care este un instrument de maximă importanță pentru stabilirea remisiei complete. În ziua 15 doar jumătate dintre pacienți au intrat în remisie completă morfologică, dar un procent semnificativ de copii era în aplazie medulară, drept urmare,

nu s-a putut stabili intrarea în remisie. Din 2017, MRD a evidențiat un procent de 29.4% (20 pacienți) care au intrat în remisie completă în ziua 15 și un sfert dintre copii au prezentat MRD între 0.1-1%. În ziua 33, morfologic, la 78.5% dintre copii s-a obținut remisia completă, însă 15% au avut măduvă aplazică, fiind imposibil de a stabili intrarea în remisie. Deci, în acest moment cheie atât de important nu s-a putut evalua intrarea în remisie completă, înainte de administrarea a și mai multor doze de chimioterapie. Din anul 2019 am început să evaluăm aspiratul medular prin MRD, majoritatea pacienților intrând în remisie completă (64%, 16 pacienți).

Am descoperit cu ajutorul MRD o schimbare importantă a distribuției grupelor de risc. Înainte de anul 2017, majoritatea copiilor erau alocați MRG (46%), SRG (39%) și HRG (15%). După anul 2017, doar 7% au fost încadrați în SRG, restul în MRG (57%) și HRG (36%), deci mai mulți pacienți au primit chimioterapie mai intensă. Înainte de adoptarea testării MRD am observat că mai mulți pacienți au recidivat și/sau au decedat, spre deosebire de următoarea perioadă, începând din anul 2017, când mai puțini copii au recidivat/au decedat. Acest fapt reiterează importanța MRD.

După prima linie de chimioterapie sau în timpul tratamentului majoritatea pacienților au intrat în remisie completă, însă 13% au decedat, iar 11% au recidivat. Dintre recidive, majoritatea au fost precoce, urmate de cele foarte precoce și de cele tardive. Cel mai important aspect pe care l-am remarcat este faptul că nici unul dintre copii cu recidive foarte precoce nu au intrat în a doua remisie completă și au decedat, dar toți pacienții cu recidive tardive au supraviețuit datorită obținerii unei a doua remisii complete, acest lucru fiind confirmat de corelația statistică pe care am găsit-o ($p=0.0296$). În legătură cu pacienții care au decedat (17%), cei mai mulți au decedat după terapia de inducție, datorită toxicității sau recidivelor, dar 7% au avut acest eveniment în timpul inducției datorită toxicității.

La analizarea incidenței cazurilor noi/an, scăderea bruscă din anul 2016 este confirmată și de incidențele calculate pe ani. Comparând aceste rezultate cu cele ale studiului de supraviețuire din 2024 a RNOHP am sesizat aceeași scădere a incidenței și că aceasta a avut loc în toate centrele din România, nu numai în cohorta aleasă de mine. Această scădere ar trebui studiată în profunzime pentru a decela motivele (scăderea ar putea fi datorată faptului că mai mulți apaținători au ales ca pacienții să înceapă tratamentul în alte țări și că aceștia nu au fost investigați niciodată într-un departament public de hematologie și oncologie pediatrică). Cele mai mari incidente au fost înregistrate în anii 2015, 2017, 2018 și 2020. Cea mai mare incidență a fost înregistrată la grupa de vârstă 0-4 ani (comparabilă cu distribuția internațională pe grupe de vârstă), urmată de grupa 5-9 ani, cea mai mică incidență fiind la adolescenți. Aceste rate (incidența bruta și incidența standardizată) sunt foarte apropiate între ele, astfel am putut verifica că incidențele din România sunt relativ identice cu ale populației europene standard și că nu există discrepanțe între date.

Trebuie subliniat faptul că numărul constant de cazuri noi/an și a incidențelor/an este un indicator al calității bune de culegere a datelor.

Acest studiu are câteva limitări, cum ar fi numărul relativ mic de pacienți, care a făcut dificilă evaluarea mai multor variabile sau numărul mic de studii la nivelul celorlalte centre de Onco-Hematologie Pediatrică, cu care datele obținute să poată fi comparate.

Avantajul studiului este că am evaluat în detaliu cohorta, atât descriptiv, cât și din punct de vedere epidemiologic, pe o perioadă lungă de timp.

3.6. Concluzii

Introducerea testării MRD a fost un moment cheie în acest studiu, deoarece a condus la schimbări importante în stratificarea pe grupe de risc. Drept urmare, mai mulți pacienți au fost stratificați în grupele de risc mediu și înalt, ceea ce a condus la administrarea chimioterapiei mai intense și, în unele cazuri, la transplant hematopoietic de celule stem în prima remisie completă, ceea ce înseamnă că mai mulți copii au intrat în remisie completă. Faptul că niciun pacient cu recidivă foarte precoce nu a intrat în a doua remisie completă, decedând, iar că toți pacienții cu recidive tardive au intrat în remisie completă sunt aspecte importante și merită explorate în profunzime.

4. Studiu 2. Supraviețuirea pacienților pediatrici diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică

4.1. Introducere

O descoperire importantă în gestionarea LAL a fost făcută în anul 1947, atunci când s-a descoperit că antagoniștii de acid folic sunt eficienți în inducerea remisiei. Importanța obținerii remisiei complete, utilizarea agenților chemoterapeutici în combinații, administrarea profilactică intratecală a citostaticelor, terapia de menținere a remisiei complete și îmbunătățirea terapiei de susținere sunt factori importanți care au contribuit la creșterea treptată a supraviețuirii (2).

În istoria managementului bolilor hematologice maligne există puține rezultate la fel de spectaculoase ca scăderea masivă a mortalității datorate leucemiei la copii. Între anii 1960 și 2000, progresul a condus la o creștere a supraviețuirii copiilor diagnosticați cu LAL de la unul din nouă la aproximativ nouă din zece. Acest progres nu este atribuit atât de mult descoperirii de noi agenți citostatici, ci mai degrabă reevaluării instrumentelor la îndemână deja cunoscute (159).

În ultimele decade, pacienții cu LAL au beneficiat de rate de supraviețuire îmbunătățite. Acest progres însă a fost înregistrat în principal la copii și adolescenți, cu EFS actual la 5 ani variind între 76% și 86% (9, 160), chiar ajungând la 90% în unele rapoarte (161). În populația pediatrică copiii mai mari au prognostic mai prost, însă în populația adultă, adulții tineri au cel mai bun prognostic (162). Supraviețuirea la 5 ani a copiilor între 0-15 ani este de 87% spre deosebire de adolescenții mai mari, care au OS la 5 ani de 63% (163).

4.2. Ipoteza de lucru

Leucemia acută limfoblastică la copii este o maladie cu grad înalt de vindecare, în special în țările dezvoltate, unde obținerea remisiei complete poate ajunge, chiar depăși 90% (151), puține se știu însă despre caracteristicile pacienților și despre supraviețuire în România, în afara a câtorva studii realizate în diferite centre mari de Oncologie și Hematologie Pediatrică. Această parte a lucrării va determina ratele de supraviețuire obiectivate prin supraviețuirea globală și supraviețuirea fără evenimente, în funcție de diferite variabile personale și biologice și compararea a două loturi de pacienți de câte 5 ani prin efectuarea unui studiu retrospectiv de supraviețuire al pacienților

diagnosticați cu LAL în perioada 2011-2020. În plus, mi-am propus să aflu care este relația dintre supraviețuire și boala minimă reziduală în rândul copiilor diagnosticați cu LAL. Datele provin din rândul pacienților internați în Compartimentul de Oncologie și Hematologie Pediatrică din cadrul Spitalului Clinic de Urgență Cluj-Napoca și se întinde pe o perioadă de 10 ani.

4.3. Material și metodă

Acest studiu este unul retrospectiv, care include pacienți diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică în cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca, Departamentul de Oncologie și Hematologie Pediatrică și cuprinde 151 de copii diagnosticați între 1 ianuarie 2011 și 31 decembrie 2020. Cohorta are vârste cuprinse între 0 și 17 ani. Toți aparținătorii legali au semnat consimțăminte la internare, iar studiul a respectat cerințele Declarației de la Helsinki. Încadrarea în grupe de risc și tratamentul au fost efectuate conform protocolului ALL-IC BFM 2002 până în anul 2017, când datorită introducerii testării FCM-MRD a fost folosit protocolul ALL-IC BFM 2009.

Variabilele studiului cuprind sexul pacienților, vârsta la diagnostic, numărul de leucocite înainte de inițierea tratamentului, imunofenotip, răspunsul la prednison în ziua a 8-a, împărțirea în grupe de risc, perioada de urmărire, perioada de supraviețuire, timpul scurs de la diagnostic până la recidivă sau deces, acestea fiind măsurate în număr de luni.

Cele două concepte cheie cu care am lucrat sunt supraviețuirea globală (Overall survival-OS), care reprezintă timpul de la stabilirea diagnosticului până la ultimul contact sau deces. Supraviețuirea fără evenimente (Event-free survival-EFS) reprezintă timpul scurs de la diagnostic până la ultimul contact. Ultimul contact poate indica fie remisia completă, fie alte evenimente precum recidiva, rezistența la tratament, decesul sau apariția celei de-a doua malignități (164).

Analiza de supraviețuire a fost realizată cu ajutorul Prism GraphPad versiunea 10.2.3. și cuprinde curbe Kaplan-Meier, test Logrank (Mantel-Cox), test Logrank pentru trend, test Gehan-Breslow-Wilcoxon, proporții ale supraviețuirii. O valoare $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă statistic.

4.4. Rezultate

Pentru a analiza supraviețuirea, am împărțit cohorta în două grupe: cohorta 2011-2015 și cohorta 2016-2020.

4.4.1. Cohorta 2011-2015

Această cohortă include 74 de pacienți diagnosticați între 01.01.2011 și 31.12.2015. OS la 1 an este de 80.82% (60 pacienți), la 3 ani 78.08% (58 pacienți), iar la 5 ani 75.34% (56 pacienți). EFS la 1 an este 80.82%, la 3 ani 76.71% (57 pacienți) și la 5 ani 75.34% (56 pacienți) (Figurile 7 și 8).

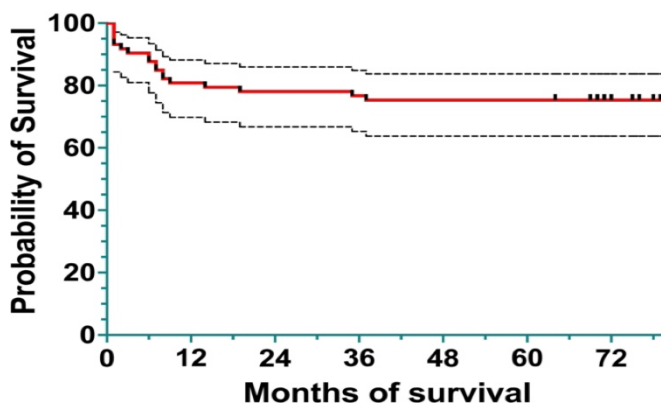


Fig.7. Supraviețuirea globală la 1, 3 și 5 ani a cohorte 2011-2015

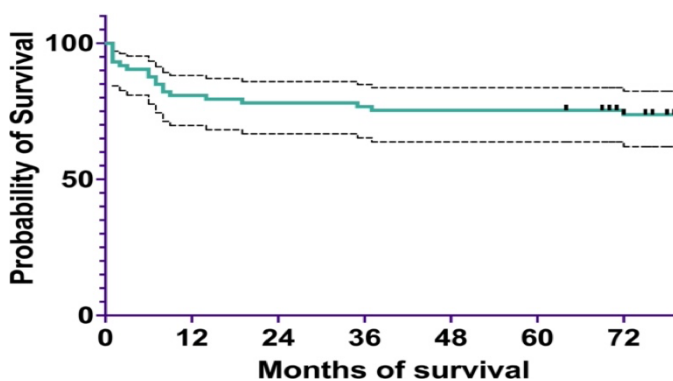


Fig.8. Supraviețuirea fără evenimente la 1, 3 și 5 ani a cohortei 2011-2015

OS la 1 an pentru sugarii de <1 an este de 50% (2 pacienți), 85.41% (41) pentru copiii cu vârste între 1-6 ani și 77.77% pentru copiii >6 ani (Tabele 5, 6, 7). La 3 ani, supraviețuirea este de 50% pentru sugari, 80.95% (39) pentru pacienții între 1-6 ani și 74.04% (16) pentru cei peste 6 ani. La 5 ani supraviețuirea sugarii <1 an rămâne aceeași, 80.95% (39) pentru cei între 1 și 6 ani și 74.07% (16) pentru grupa de vârstă >6 ani. EFS la un an pentru cei <1 an este de 60 %, 84.61% (41) pentru copiii între 1-6 ani și 79.48% (38) pentru cei mai mari de 6 ani. La 3 ani, sugarii sub 1 an au aceeași valoare ca la 1 an, EFS pentru pacienții între 1-6 ani este 79.48% (38), iar grupa de vârstă peste 6 ani a înregistrat o supraviețuire fără evenimente de 75.86% (17). La 5 ani, EFS pentru sugari are aceeași valoare ca la 1 și 3 ani, 76.93% (37) pentru copiii între 1-6 ani și pentru grupa de vârstă peste 6 ani se înregistrează aceeași supraviețuire ca la 3 ani.

OS la un an în funcție de imunofenotip este de 85.71% (55) pentru fenotipul B și 44.44% (4) pentru fenotipul T (Tabele 5, 6, 7). La 3 ani supraviețuirea pentru cei cu

celule B este de 80.95% (52), iar pentru cei cu celule T este același procent ca și în primul an. Supraviețuirea la 5 ani pentru pacienții cu imunofenotip B este de 79.36% (51), iar cei cu imunofenotip T aceeași ca în primul an și în al treilea an. Aceste date sunt semnificative din punct de vedere statistic ($p=0.002$). EFS la 1 an pentru pacienții cu celule B este 85.93% (55 pacienți) și 44.44% (4) pentru LAL cu celule T. la 3 ani 81.25% (52) dintre copiii cu imunofenotip B nu au prezentat niciun eveniment, iar copiii cu imunofenotip T au avut același procent ca la 1 an. La 5 ani, EFS este de 79.68% (51) pentru LAL cu celule B, iar pentru LAL cu celule T a fost înregistrat același procent ca la 1 și 3 ani. Aceste date au semnificație statistică ($p=0.044$).

Luând în considerare sexul pacienților, supraviețuirea globală la 1 an este 80% (29) pentru sexul feminin și 81.57% (31) pentru sexul masculin (Tabelul 4). La 3 ani a fost înregistrat același procent pentru fete, iar pentru băieți 73.68% (28). La 5 ani este 77.14% (28) pentru fete și 73.68% (28) pentru băieți. EFS la 1 an este de 80% (29) pentru sexul feminin și 81.57% (31) pentru sexul masculin. La 3 ani, supraviețuirea fără evenimente a fost aceeași pentru fete și 73.68% (29) pentru băieți, aceștia având același procent și la 5 ani. La 5 ani EFS pentru sexul feminin este de 7.14% (28).

Referitor la numărul de leucocite la diagnostic, OS la 1 an este 86.95% (40) pentru pacienții care au avut mai puțin de 20000 leucocite/mm³, 82.35% (14) pentru pacienții care au avut între 20000-100000 leucocite/mm³ și 50% (5) pentru leucocite peste 100000/mm³ (Tabele 5, 6, 7). Supraviețuirea la 3 ani evidențiază același procent ca în primul an pentru pacienții cu <20000 leucocite/mm³, cei cu leucocite între 20000-100000/mm³ au avut 64.70% (11), la fel ca la 5 ani și pacienții cu >100000 leucocite/mm³ au aceeași supraviețuire ca la 1 an și la 5 ani. La 5 ani, OS pentru copiii cu <20000 leucocite/mm³ este de 84.78% (39). EFS la 1 an pentru pacienții cu leucocite sub 20000/mm³ este de 88.63% (41), același procent fiind înregistrat și la 3 ani. Pentru cei cu leucocite între 20000-100000/mm³ supraviețuirea fără evenimente este 83.33% (14), iar pentru cei cu peste 100000 leucocite/mm³ este de 45.45% (5) pentru toată perioada studiată. La 3 și 5 ani copiii cu leucocite între 20000-100000/mm³ au EFS de 66.66% (11). La 5 ani supraviețuirea copiilor cu mai puțin de 20000 leucocite/mm³ este de 86.36%. Ambele tipuri de supraviețuire prezintă rezultate semnificative din punct de vedere statistic ($p=0.008$ și $p=0.003$).

Supraviețuirea globală în funcție de răspunsul la prednison la 1 an pentru PGR este 85.24% (52) și 58.33% (6) pentru PPR (Tabele 5, 6, 7). La 3 ani OS pentru copiii care au răspuns bine la prednison este de 81.96% (50), iar pentru cei care au răspuns slab este de 50% (6), la fel ca la 5 ani. La 5 ani supraviețuirea pentru PGR este de 80.32% (49), aceste rezultate fiind semnificative statistic ($p=0.02$). EFS la 5 ani evidențiază o supraviețuire de 85.24% (52) pentru PGR și 58.33% (6), aceleași rezultate fiind înregistrate la 3 și la 5 ani. La 3 ani EFS pentru cei care au avut răspuns bun la prednison este de 81.96% (50), iar la 5 ani 80.32% (49).

Din punct de vedere al împărțirii pe grupe de risc, OS la 1 an pentru SRG este de 96.42% (27), pentru MRG 87.09% (27), iar pentru HRG 36.36% (4) (Tabele 5, 6, 7). La 3

ani pentru SRG a fost înregistrat același procent ca la 1 an, MRG are o supraviețuire de 80.65% (25), iar HRG de 27.27% (3). La 5 ani supraviețuirea este de 92.85% (26) pentru SRG, 80.64% (25) pentru MRG, iar la pacienții din HRG a fost aceeași ca la 1 an și la 3 ani. EFS pentru copiii încadrați în SRG este de 96.49% (27), la fel ca la 3 ani, pentru cei încadrați în MRG este 87.09% (27), iar pentru cei din HRG 36.36% (3). La 5 ani am înregistrat EFS la cei din SRG de 92.85% (26), la cei din MRG 80.64% (25), iar HRG a avut aceeași supraviețuire ca la 3 ani. Am obținut date statistice semnificative și în acest caz ($p=0.002$ și $p=0.001$).

Tabel 5. Supraviețuirea cohorței 2011-2015 la 1 an în funcție de variabile.

Supraviețuire	OS la 1 an (% și n)	95% CI	EFS la 1 an (% și n)	95%CI
Cohorta 2011-2015	80.82% (60)	69.78-88.1	80.82% (60)	69.78-88.16
Grupe de vârstă				
<1 an	50% (2)	5.79-84.48	60% (2)	12.58-88.17
1-6 ani	85.71% (41)	70.94-93.31	84.61% (41)	68.96-92.77
>6 ani	77.77% (17)	50.78-89.33	79.31% (17)	59.64-90.12
Imunofenotip				
Celule B	85.71% (55)	74.35-92.29	85.93% (55)	74.72-91.41
Celule T	44.44% (4)	13.59-71.92	44.44% (4)	13.59-71.92
Grupe de risc				
SRG	96.42% (27)	77.24-99.48	96.49% (27)	77.24-99.48
MRG	87.09 % (27)	69.18-94.89	87.09% (27)	69.18-94.94
HRG	36.36% (4)	11.18-62.67	36.36% (4)	11.18-62.67
Sex				
Feminin	80% (29)	62.58-89.92	80% (29)	62.58-89.92
Masculin	81.57% (31)	65.2-90.75	81.57% (31)	65.2-90.75
Răspuns la prednison				
PGR	85.24% (52)	73.56-92.02	85.24% (52)	73.56-92.02
PPR	58.33% (6)	27.02-80.09	58.33% (6)	27.02-80.09
Număr leucocite				
<20000/mm ³	86.95% (40)	73.25-93.91	88.63% (41)	74.83-95.09
20000-100000/mm ³	82.35% (14)	54.72-93.93	83.33% (14)	56.77-94.29
>100000/mm ³	50%	18.37-75.31	45.45%	16.66-70.68

Tabel 6. Supraviețuirea cohorței 2011-2015 la 3 ani în funcție de variabile.

Supraviețuire	OS la 3 ani (% și n)	95% CI	EFS la 3 ani (% și n)	95%CI
Cohorta 2011-2015	78.08% (58)	66.74-85.95	76.71% (56)	69.78-88.16
Grupe de vârstă				
<1 an	50% (2)	5.79-84.48	60% (2)	12.58-88.17
1-6 ani	80.95% (39)	65.5-89.98	79.31% (38)	59.64-90.12
>6 ani	74.04% (16)	53.16-86.67	75.86% (17)	55.95-87.68
Imunofenotip				
Celule B	80.95% (55)	68.9-88.7	81.25% (52)	69.36-88.88
Celule T	44.44% (4)	13.59-71.92	44.4% (4)	13.59-71.92
Grupe de risc				
SRG	96.42% (27)	77.24-99.48	96.49% (27)	77.24-99.48
MRG	80.65% (25)	61.92-90.79	80.64% (25)	61.91-90.97
HRG	27.27% (3)	6.52-53.88	27.27% (3)	6.52-53.88
Sex				
Feminin	80% (29)	62.58-89.92	80% (29)	62.58-89.92
Masculin	73.68% (28)	56.61-84.87	73.68% (28)	56.61-84.87

Răspuns la prednison				
PGR	81.96% (50)	69.81-89.57	81.96% (50)	69.81-89.57
PPR	50% (5)	20.85-73.60	58.33% (6)	27.02-80.09
Număr leucocite				
<20000/mm ³	86.95% (40)	73.25-93.91	88.63% (41)	74.83-95.09
20000-100000/mm ³	64.70% (11)	37.71-82.33	66.66% (11)	40.34-83.42
>1000000/mm ³	50% (5)	18.37-75.31	45.45% (5)	16.66-70.68

Tabel 7. Supraviețuirea cohorței 2011-2015 la 5 ani în funcție de variabile.

Supraviețuire	OS la 5 ani (% și n)	95% CI	p	EFS la 5 ani (% și n)	95%CI	p
Cohorta 2011-2015	75.34% (56)	63.76-83.68		75.34% (56)	63.76-83.68	
Grupe de vârstă			p=0.38			p=0.32
<1 an	50% (2)	5.79-84.48		79.48% (2)	12.58-88.17	
1-6 ani	80.95% (38)	65.5-89.98		76.93% (37)	60.35-87.26	
>6 ani	74.07% (16)	53.19-86.67		75.86% (17)	55.95-87.68	
Imunofenotip			p=0.002			p=0.044
Celule B	79.36% (51)	67.13-87.45		79.68% (51)	67.6-87.65	
Celule T	44.44% (4)	13.59-71.92		44.44% (4)	13.59-71.92	
Grupe de risc			p=0.002			p=0.001
SRG	92.85% (26)	74.35-98.15		92.85% (26)	74.35-98.15	
MRG	80.64% (25)	61.91-90.8		80.64% (25)	61.91-90.8	
HRG	27.27% (3)	6.52-53.88		27.27% (30)	6.52-53.88	
Sex			p=0.77			p=0.78
Feminin	77.14% (28)	59.46-87.84		77.14% (28)	59.46-87.84	
Masculin	73.68% (28)	56.61-84.87		73.68% (28)	56.61-84.87	
Răspuns la prednison			p=0.02			p=0.06
PGR	80.32% (49)	67.96-88.30		80.32% (49)	67.96-88.30	
PPR	50% (5)	20.85-73.60		58.33% (6)	27.02-80.09	
Număr leucocite			p=0.008			p=0.003
<20000/mm ³	84.78% (39)	70.71-92.43		86.36 % (40)	72.14-93.62	
20000-100000/mm ³	64.70% (11)	37.71-82.33		66.66% (11)	40.34-83.42	
>1000000/mm ³	50% (5)	18.37-75.31		45.45% (5)	16.66-70.68	

4.4.2. Cohorta 2016-2020

Această cohortă cuprinde 77 de pacienți diagnosticați între 01.01.2016 și 31.12.2020.

Supraviețuirea globală este de 86.33% (66 pacienți) la un an, 80.56% la 3 ani și 76.73% (59) la 4 ani (Figura 9). Supraviețuirea fără evenimente la 1 an este de 86.14% (66), la 3 ani 75.44% (58), iar la 4 ani 64.66% (50) (Figura 10).

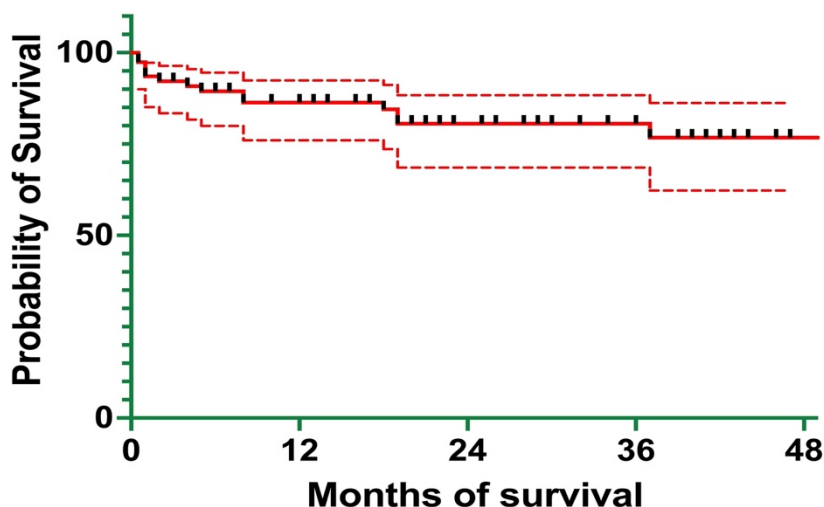


Fig.9. Supraviețuirea globală la 1, 3 și 5 ani a cohorței 2016-2020

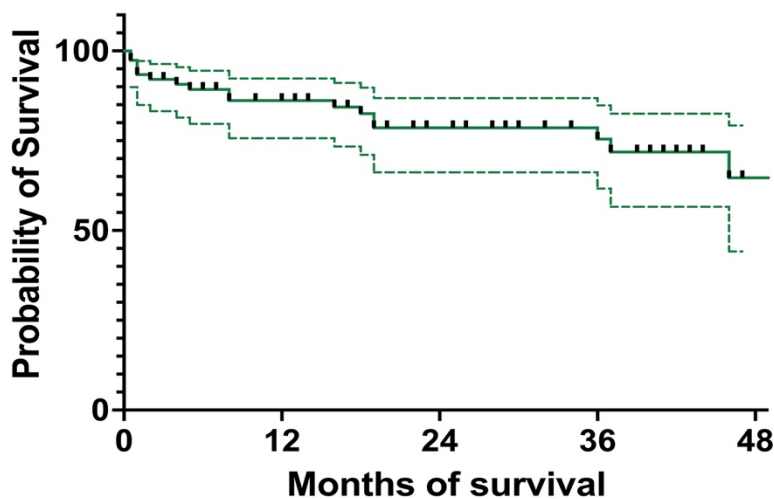


Fig.10. Supraviețuirea fără evenimente la 1, 3 și 5 ani a cohorței 2016-2020

OS la un an pentru pacienții <1 an (un singur sugar) este 0, pentru cei între 1-6 ani este 85.17% (37), iar pentru cei >6 ani 87.13% (28), aceeași ca la 3 ani (Tabele 8, 9, 10). La 3 ani, supraviețuirea pentru copiii între 1 și 6 ani este aceeași ca la 1 și la 5 ani. La 5 ani, OS pentru pacienții >6 ani este de 69.61% (22). EFS la 1 an este 0 pentru sugarii <1 an, 85.17% (37) pentru pacienții cu vârste între 1 și 6 ani, aceeași supraviețuire ca cea de la 3 ani, iar pentru cei >6 ani 83.91% (27). La 3 ani, copiii mai mari de 6 ani au avut EFS de 64.95% (21). La 5 ani, supraviețuirea fără evenimente pentru pacienții între 1-6 ani este de 70.97% (31), iar pentru cei >6 ani 42.63% (14). Am găsit rezultate semnificative statistic ($p=0.01$ și $p=0.008$).

Supraviețuirea globală pentru pacienții cu imunofenotip B la un an este de 85.57% (55), iar pentru cei cu imunofenotip T 62.30% (8), același procent ca la 3 și 5 ani (Tabele 8, 9, 10). La 3 ani am înregistrat o supraviețuire de 79.25% (54) pentru cei cu celule B și la 5 ani 52.96% (34). EFS pentru copiii cu imunofenotip B la un an este 83.93% (54), iar pentru cei cu imunofenotip T este de 62.3% (8), aceleași procente ca la 3 și 5 ani. La 3 ani, EFS pentru cei cu LAL cu celule B este de 75.96% (49), iar la 5 ani 52.96% (34). Nu am găsit nicio legătură statistică între aceste date.

La un an OS pentru băieți este de 84.47% (35), iar pentru fete 82.35% (30) (Tabele 8, 9, 10). La 3 ani este 84.47% (35) pentru sexul masculin și 70.17% (25) pentru sexul feminin, același procent regăsit la 5 ani. La 5 ani OS pentru băieți este de 77.97% (32). EFS la 1 an pentru băieți este de 81.91% (34), iar pentru fete 82.35% (30). La 3 ani este de 76.45% (31) pentru sexul masculin și 67.12% (24) pentru sexul feminin. La 5 ani supraviețuirea fără evenimente este de 70.57% (29) pentru băieți, iar pentru fete 40.27% (14).

În funcție de numărul de leucocite la diagnostic, OS la 1 an este de 86.05% (39) pentru pacienții care au sub 20000 leucocite/mm³ (Tabele 8, 9, 10). Pentru cei cu leucocite între 20000-100000/mm³ este de 86.66% (21), iar pentru cei cu leucocite ≥ 100000 /mm³ este de 58.33% (5), același procent fiind înregistrat la 3 și la 5 ani. La 3 ani copiii cu <20000 leucocite/mm³ au avut OS de 79.89% (36), cei cu leucocite 20000-100000/mm³ au prezentat o supraviețuire de 80.47% (19), aceeași ca la 5 ani. La 5 ani, OS pentru cei cu leucocite sub 20000/mm³ este de 72.67% (33). EFS pentru pacienții cu leucocite sub 20000/mm³ este de 86.05% (39), pentru cei cu leucocite între 20000-100000/mm³ este 82.33% (20), iar pentru cei cu leucocite ≥ 100000 /mm³ este 58.33% (5) la 1 an, 3 ani și 5 ani. La 3 ani EFS pentru copiii cu <20000 leucocite/mm³ este de 79.89% (36), iar cei din grupul cu 20000-100000/mm³ leucocite au avut o supraviețuire fără evenimente de 64.50% (15). La 5 ani, EFS pentru cei cu <20000 leucocite/mm³ este 51.87% (23), iar pentru cei cu leucocite între 20000-100000/mm³ este de 53.75% (13).

OS la 1 an pentru pacienții care au răspuns bine la prednison este de 86.54% (53), iar pentru cei cu răspuns nefavorabil 66.12% (9) (Tabele 8, 9, 10). La 3 ani OS pentru PGR este de 82.20% (50), iar pentru PPR 52.89% (7), la fel ca la 5 ani. La 5 ani, supraviețuirea pentru pacienții cu răspuns bun la prednison este de 78.29% (48). EFS la 1 an pentru PGR este 84.87% (52) și 66.12% (6) pentru PPR. La 3 ani, supraviețuirea

fără evenimente este de 75.60% (46). La 5 ani EFS este 56.41% (34) pentru PGR. Am găsit o corelație statistic semnificativă pentru OS ($p=0.03$).

În funcție de împărțirea în grupe de risc OS la 1 an, 3 ani și 5 ani este de 77.77% (6) (Tabele 8, 9, 10) pentru SRG, pentru MRG este de 89.57% (36), iar pentru HRG este de 77.94% (20). La 3 ani, OS pentru MRG este 86.37% (35), iar pentru HRG 65.95% (17). La 5 ani, OS este de 79.72% (32), iar pentru HRG este aceeași ca cea de la 3 ani. EFS la 1 an pentru SRG este 77.77% (6), la fel ca la 3 și 5 ani și identică cu OS. EFS la 1 an pentru MRG este 89.57% (36), iar pentru HRG 73.07% (19). La 3 ani pentru MRG este de 80.20% (32), iar pentru HRG 57.41% (15). La 5 ani EFS este de 51.82% (21) pentru MRG și 45.93% (12) pentru HRG.

Tabel 8. Supraviețuirea cohorței 2016-2020 la 1 an în funcție de variabile.

Supraviețuire	OS la 1 an (% și n)	95% CI	EFS la 1 an (% și n)	95%CI
Cohorta 2016-2020	86.33% (66)	76.02-92.42	86.14% (66)	75.71-92.31
Grupe de vârstă				
<1 an	0		0	
1-6 ani	85.17% (37)	69.74-93.09	85.17% (37)	69.74-93.09
>6 ani	87.13% (28)	69.20-94.97	83.91% (27)	65.53-92.97
Imunofenotip				
Celule B	85.57% (55)	74.06-92.23	83.93% (54)	72.15-91.02
Celule T	62.30% (8)	27.35-84.13	62.30% (8)	27.35-84.13
Grupe de risc				
SRG	77.77% (6)	36.47-93.92	77.77% (6)	36.47-93.92
MRG	89.57% (36)	74.42-95.95	89.57% (36)	74.42-95.95
HRG	77.94% (20)	54.3-90.32	73.07% (19)	49.13-87.06
Sex				
Feminin	82.35% (30)	64.75-91.68	82.35% (30)	64.75-91.68
Masculin	84.47% (35)	68.56-92.73	81.91% (35)	65.69-90.95
Răspuns la prednison				
PGR	86.54% (53)	74.84-93.04	84.87% (52)	72.91-91.83
PPR	66.12% (9)	31.56-86.20	66.12% (9)	31.56-86.20
Număr leucocite				
<20000/mm ³	86.05% (39)	71.48-93.49	86.05% (39)	71.48-93.49
20000-100000/mm ³	86.66% (21)	63.99-95.51	82.33% (20)	59.44-92.99
>1000000/mm ³	58.33% (5)	18.02-84.40	58.33% (5)	18.02-84.40

Tabel 9. Supraviețuirea cohorței 2016-2020 la 3 ani în funcție de variabile.

Supraviețuire	OS la 3 ani (% și n)	95% CI	EFS la 3 ani (% și n)	95%CI
Cohorta 2016-2020	80.56% (62)	68.56-88.35	75.44% (58)	61.65-84.85
Grupe de vârstă				
<1 an	0		0	
1-6 ani	85.17% (37)	69.74-93.09	85.17% (37)	69.74-93.09
>6 ani	87.13% (28)	69.20-94.97	64.95% (21)	44.17-79.61
Imunofenotip				
Celule B	79.25% (51)	66.10-87.75	75.96% (49)	62.59-85.10
Celule T	62.30% (8)	27.35-84.13	62.30% (8)	27.35-84.13
Grupe de risc				
SRG	77.77% (6)	36.47-93.92	77.77% (6)	36.47-93.92
MRG	86.37% (35)	70.14-94.12	80.20% (32)	58.68-91.27

HRG	65.95% (17)	40.58-82.52	57.41% (15)	33.59-74.40
Sex				
Feminin	70.17% (25)	49.82-83.51	67.12% (24)	46.97-81.03
Masculin	84.47% (35)	91.69-100	76.45% (31)	56.69-88.06
Răspuns la prednison				
PGR	82.20% (50)	69.24-90.07	75.60% (46)	61.07-85.33
PPR	52.89% (7)	19.02-78.31	52.89% (7)	19.02-78.31
Număr leucocite				
<20000/mm ³	79.89% (36)	63.41-89.52	79.89% (36)	63.41-89.52
20000-100000/mm ³	80.47% (19)	55.26-92.34	64.50% (15)	38.49-81.75
>1000000/mm ³	58.33% (5)	18.02-84.40	58.33% (5)	18.02-84.40

Tabel 10. Supraviețuirea cohorței 2016-2020 la 5 ani în funcție de variabile.

Supraviețuire	OS la 5 ani (% și n)	95% CI	p	EFS la 5 ani (% și n)	95%CI	p
Cohorta 2016-2020	76.73% (59)	62.29-86.22		64.66 % (50)	44.17-79.24	
Grupe de vârstă			p=0.01			p=0.008
<1 an	0			0		
1-6 ani	85.17% (37)	69.74-93.09		70.97% (31)	35.32-89.31	
>6 ani	75.41% (22)	54.47-87.55		42.63% (14)	18.28-65.20	
Imunofenotip			p=0.2			p=0.2
Celule B	75.29% (48)	59.91-85.45		52.96% (34)	32.22-69.72	
Celule T	62.30% (8)	27.35-84.13		62.30% (8)	27.35-84.13	
Grupe de risc			p=0.33			p=0.36
SRG	77.77% (6)	36.47-93.92		77.77% (6)	36.47-93.92	
MRG	79.72% (32)	57.33-91.23		51.82% (21)	20.99-75.81	
HRG	65.95% (17)	40.58-82.52		45.93% (12)	19.53-69.02	
Sex			p=0.37			p=0.15
Feminin	70.17% (25)	49.82-83.51		40.27% (14)	15.72-63.94	
Masculin	77.97% (32)	56.38-89.75		70.57% (29)	48.47-84.55	
Răspuns la prednison			p=0.03			p=0.06
PGR	78.29% (48)	62.95-87.86		56.41% (34)	35.60-72.80	
PPR	52.89% (7)	19.02-78.31		52.89% (7)	19.02-78.31	
Număr leucocite			p=0.3			p=0.3
<20000/mm ³	72.67% (33)	50.27-86.18		51.87% (23)	23.01-74.58	
20000-100000/mm ³	80.47% (19)	55.26-92.34		53.75% (13)	25.24-75.58	
>1000000/mm ³	58.33% (5)	18.02-84.4		58.33% (5)	18.02-84.4	

Supraviețuirea globală a întregii cohorțe la 10 ani este de 75.5% (119 pacienți) (95%CI: 67.27-81.92). Supraviețuirea fără evenimente este de 48.3% (76 pacienți) (95%CI: 31.89-62.9) (Figurile 10 și 11).

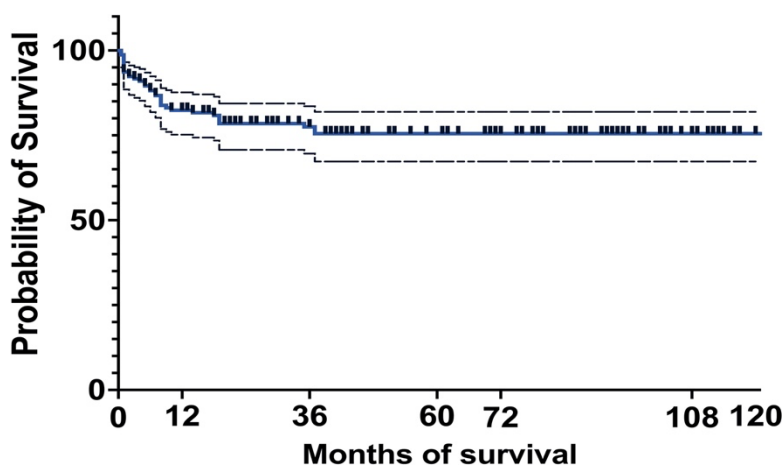


Fig.10. Supraviețuirea globală la 10 ani a întregii cohorte

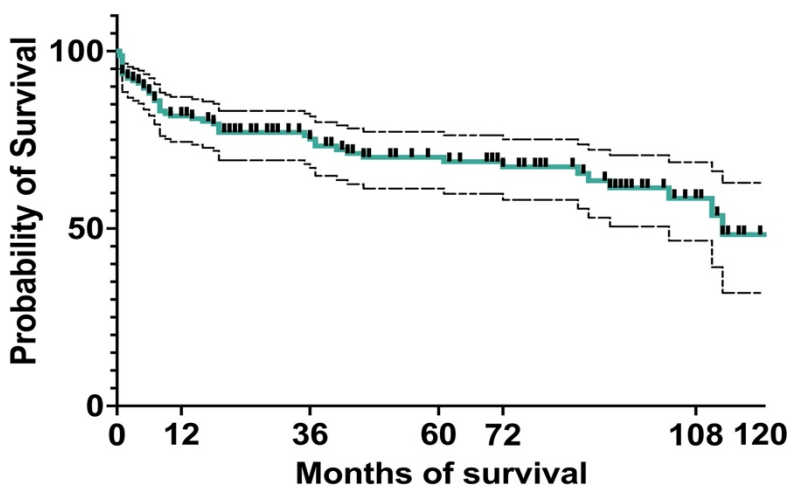


Fig.11. Supraviețuirea fără evenimente la 10 ani a întregii cohorte

La cinci ani, OS pentru grupul cu <5% blaști în MO și pacienții cu MRD <0,1% OS a fost aceeași cu cea de la unul și trei ani. Pentru pacienții cu blaști între 5%-25% și cei cu MRD între 0,1%-10%, OS a fost aceeași ca la un an și trei ani. Pentru pacienții cu >25% blaști în MO și cei cu MRD >10%, OS a fost aceeași cu procente înregistrate la trei ani (Figura 12).

În ceea ce privește EFS la cinci ani, supraviețuirea a fost identică ca la unul și trei ani atât pentru pacienții cu $<5\%$ Blaști în MO, cât și pentru cei cu $MRD < 0,1\%$. Pentru grupul cu $5\%-25\%$ blaști în MO și grupul cu MRD cuprins între $0,1\%-10\%$, EFS a fost aceeași ca cea de la un an și trei ani. Pentru pacienții care au avut $>25\%$ blaști în MO, EFS a fost identică cu cea de la un an și trei ani. Pentru pacienții cu $MRD > 10\%$, EFS a fost identică cu cea înregistrată la trei ani (Figura 13).

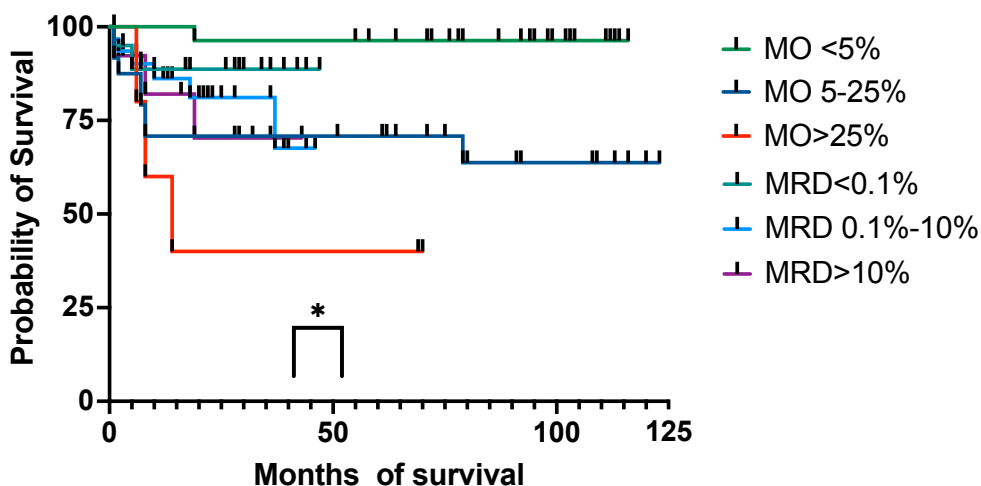


Fig.12. Supraviețuirea globală în funcție de aspiratul osteomedular și MRD în ziua 15

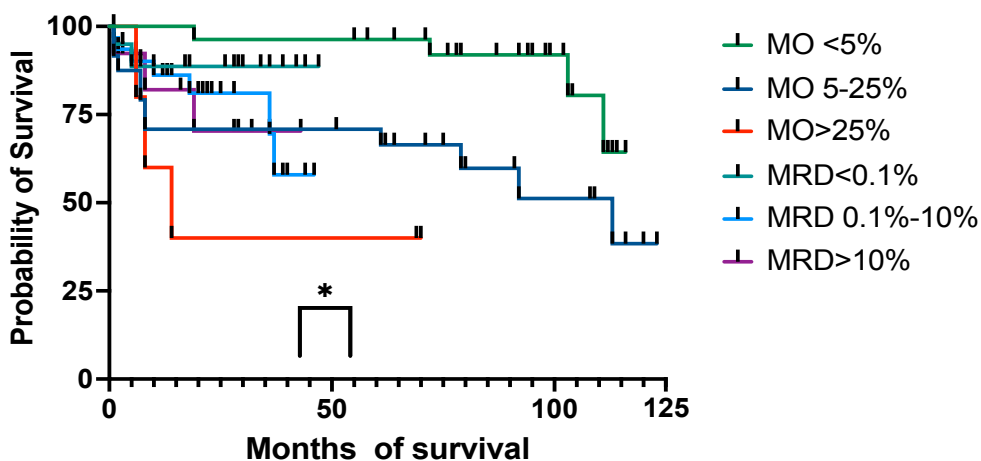


Fig.13. Supraviețuirea fără evenimente în funcție de aspiratul osteomedular și MRD în ziua 15

4.5. Discuții

În Europa sunt diagnosticați anual în jur de 4300 de copii cu LAL, cea mai mare parte cu precursori B, fără cromozom Philadelphia, iar în majoritatea cazurilor se obține remisia completă (165). Importante progrese au fost făcute în tratamentul copiilor cu LAL, aceștia atingând rate de remisie completă de 95% și o supraviețuire fără evenimente la 5 ani de 80%-85% (166).

Curbele de supraviețuire ale cohortei 2011-2015 evidențiază la 5 ani OS și EFS identice, probabil din cauza faptului că toți pacienții cu recidivă au decedat. În cohorta 2016-2020 OS la 5 ani de 77% (59 pacienți) și EFS de 65% (50 pacienți), supraviețuirea globală fiind mai mare în această cohortă.

Analizarea supraviețuirii în funcție de sex evidențiază pentru cohorta 2011-2015 o supraviețuire ușor superioară la 5 ani pentru fete, dar EFS mai mare pentru băieți. Cohorta 2016-2020 indică OS mai mare pentru băieți față de fete, iar EFS mult mai mică pentru fete, însemnând că fetele au suferit mai multe evenimente (recidive, decese) decât băieții. Intervalul de confidență este destul de larg, datorită numărului mic de cazuri, dar supraviețuirea este mult mai mare, majoritatea fetelor obținând remisia completă.

Referitor la grupele de vârstă am observat că pentru cohorta 2011-2015 OS la 5 ani a fost cea mai importantă la grupa de vârstă 1-6 ani, ceea ce am putut anticipa, urmată de grupa de vârstă de peste 6 ani și grupa de vârstă de sub un an. EFS la 5 ani a fost puțin mai mică pentru cei <1 an și a rămas constantă în timp, la 50%. A doua cohortă a cuprins doar un sugar, care a decedat la 5 luni. OS la 5 ani pentru pacienții între 1-6 ani a fost mai mare decât precedentă, dar mai mică pentru pacienții >6 ani. EFS la 5 ani a fost inferioară pentru copiii 1-6 ani, dar mult mai mică pentru cei >6 ani, însemnând că aceștia au avut cele mai multe evenimente, fapt demonstrat statistic pentru cohorta 2016-2020: OS $p=0.01$ și EFS $p=0.008$.

Am analizat supraviețuirea în funcție de imunofenotipuri între cele două cohorte și am decelat că OS la 5 ani pentru prima a fost de aproape 80% pentru fenotipul B și doar 44.44% pentru cei cu fenotip T. Aceste rezultate sunt asociate cu corelație statistică puternică ($p=0.002$), ceea ce înseamnă că pacienții cu imunofenotip B au o probabilitate mai mare de supraviețuire. EFS este relativ mai mare pentru cei cu fenotip B, dar pentru fenotipul T, OS și EFS rămân constante, aceleasi pe parcursul anilor de urmărire ca și la un an, indicând faptul că acești pacienți nu au avut alte evenimente în afară de deces, iar acesta a survenit devreme, în primul an de diagnostic ($p=0.04$). Cohorta 2016-2020 a avut OS pentru LAL cu celule B mai mică decât a cohortei precedente, dar a fost identificată o creștere semnificativă a supraviețuirii pentru copiii cu LAL T (62.3%). EFS pentru copiii cu LAL cu celule B este de 53%, iar pentru cei cu celule T 62.3%, aceeași ca OS și aceeași ca în primul an de urmărire, subliniind ideea că acești pacienți au

evenimente doar în primul an de la diagnostic și că niciun alt eveniment nu a survenit după această perioadă.

Am împărțit valorile leucocitelor la diagnostic în 3 grupuri și am calculat rata de supraviețuirea între cele două cohorte. Pentru prima cohortă, supraviețuirea globală la 5 ani este 85% pentru grupul de $<20000/\text{mm}^3$, pentru grupul cu leucocite între $20000/\text{mm}^3$ și $100000/\text{mm}^3$ este de 65%, iar pentru pacienții cu $\geq 100000/\text{mm}^3$ doar 50%, iar decesele au survenit în primul an, majoritatea având imunofenotip T. EFS pentru copiii cu <20000 leucocite/ mm^3 este 86.4%, pentru cei cu leucocite între $20000/\text{mm}^3$ și $100000/\text{mm}^3$ este de 66.7%, identică cu cea a pacienților cu $\geq 100000/\text{mm}^3$. Aceste rezultate au impact semnificativ ($p=0.08$ și $p=0.003$). Cohorta 2016-2020 a avut o supraviețuire globală mai mică față de prima pentru <20000 leucocite/ mm^3 , dar pentru următoarele două grupuri de leucocite supraviețuirea a crescut. Pacienții cu ≥ 100000 leucocite/ mm^3 au avut evenimente (recidive, decese) doar în primul an de la diagnostic. EFS a fost mai mică pentru restul pacienților.

Prima cohortă are OS la 5 ani de 80.3% pentru copiii care au răspuns bine la prednison și 50% pentru cei cu răspuns nefavorabil. EFS la 5 ani a avut aceeași valoare ca și OS pentru PGR, ceea ce înseamnă că nici un pacient cu răspuns bun la cortizon nu a avut alte evenimente în acest interval de timp. La 5 ani, doar jumătate din pacienții cu PPR au supraviețuit, iar acest procent se menține la 3 ani, indicând faptul că decesul a survenit în primii 3 ani. Cohorta 2016-2020 are o supraviețuire globală de 78.3% pentru PGR și 53% pentru PPR, același procent fiind înregistrat la 3 ani, și este puțin mai mare decât al primei cohorte, fiind confirmat statistic ($p=0.03$). EFS este de 56.4% pentru PGR și 53% pentru PPR, având aceeași semnificație, aceea că pacienții care au răspuns nefavorabil la prednison au avut evenimente în primii 3 ani de urmărire.

La analiza supraviețuirii în funcție de grupele de risc, OS a cohortei 2011-2015 la 5 ani este mare pentru grupa de risc standard (93%) și scăzută pentru HRG (27.3%). EFS la 5 ani a fost aceeași pentru pacienții încadrați în SRG, 80.64% pentru MRG (aceeași ca și OS si EFS la 3 ani), iar pentru pacienții care fac parte din HRG 27.3% (aceeași ca la 3 ani și la fel ca și OS). Pentru acestea am găsit o semnificație statistică importantă (OS: $p=0.002$, EFS: $p=0.001$). Cele două grupe MRG si HRG au avut aceleași procente de supraviețuire la 3 ani, indicând că toate evenimentele au avut loc în primii 3 ani de la diagnostic. Pentru cohorta 2016-2020, OS a fost constantă pentru SRG pe parcursul anilor de urmărire, de 78%, dar mai mică comparativ cu prima cohortă. La 5 ani 80% dintre pacienții încadrați în MRG au supraviețuit, iar 66% din cei stratificați în HRG au supraviețuit, procente mai mari decât a primei cohorte, mai ales în cazul HRG. EFS la 5 ani pentru SRG a fost aceeași ca și OS (însă mai mică decât a primei cohorte), jumătate dintre pacienții încadrați ca MRG nu au avut evenimente, iar un procent mai ridicat al copiilor stratificați în HRG nu a avut niciun eveniment.

Supraviețuirea globală pentru cohorta 2011-2015 este de 75% (56 pacienți), dar pentru cohorta 2016-2020 am înregistrat o creștere de 2% (59 pacienți). OS la 10 ani,

pentru cele două cohorte este de 76% (115 pacienți), iar EFS este de 48.3% (73 pacienți).

Am analizat apoi OS și EFS ale pacienților care au avut doar aspirate osteomedulare în ziua 15 și le-am comparat cu copiii care au avut rezultate MRD în ziua 15. Copiii cu aplazie au fost excluși din această analiză. OS pentru pacienții cu mai puțin de 5% (96%, 27 de pacienți) blaști și cei cu 5%-25% (71%, 19 pacienți) a fost mai mare la cinci ani comparativ cu cei cu MRD <0,1% (89%, 15 pacienți) și MRD 0,1%-10% (68%, șase pacienți). Atunci când m-am uitat la cei cu >25% blaști și MRD >10%, am observat o probabilitate mai mare de supraviețuire pentru al doilea grup (40%, 3 pacienți) și, respectiv, 70% (7 pacienți)). Am constatat o corelație statistică între OS și procentul de blaști în MO și MRD ($p = 0,033$). Grupul cu blaști <25% a avut rate de supraviețuire mai bune decât cei cu MRD <10%, deși MRD a făcut o diferență atunci când a fost >10%, cu o supraviețuire mult mai mare decât a pacienților cu >25% blaști în MO. În ceea ce privește EFS, rezultatele au fost similare cu OS la 5 ani. Singurul grup care a suferit evenimente (recidive) a fost MRD între 0,1%-10% cu EFS de 58% (6 pacienți). Compararea curbelor este semnificativă din punct de vedere statistic ($p = 0,036$) și poate fi interpretată în același mod ca și OS.

Acest studiu are limitări, cum ar fi numărul relativ mic de pacienți, ceea ce a făcut dificilă evaluarea supraviețuirii comparativ cu alte variabile. Altă limitare este faptul că sunt puține studii în România pentru a putea compara rezultatele cu cele ale altor centre.

Un avantaj este că am realizat un studiu exhaustiv al supraviețuirii în funcție de variabilele alese, dar în viitor plănuiesc să evaluez supraviețuirea pe perioade mai lungi de timp, în funcție de mai multe variabile, care să includă genele de fuziune și statusul socio-economic al pacienților, deoarece este un lucru știut că în România există diferențe mari, chiar și în orașele mari.

4.6. Concluzii

Conform rezultatelor obținute, ratele de supraviețuire ale pacienților cuprinși în acest studiu indică o îmbunătățire constantă în timp, apropiindu-se încet, dar sigur de cele ale unor țări europene dezvoltate.

Supraviețuirea globală pentru cohorta 2011-2015 este de 75%, dar pentru cohorta 2016-2020 am decelat o creștere de 2%. OS la 10 ani, pentru cele două cohorte este de 76%, iar EFS este de 48.3%.

Datorită introducerii testării bolii reziduale minime, mult mai puțini copii au fost încadrați în grupa de risc standard, marea majoritate făcând parte din grupele de risc mediu și înalt. Acest lucru a condus la administrarea unei chimioterapii mai intense, ceea ce a rezultat în îmbunătățirea supraviețuirii globale. Pacienții cu mai puțin de 25% blaști în aspiratul osteomedular în ziua 15 au avut OS și EFS mai mare la cinci ani decât cei care au avut MRD <10%, dar adevărata îmbunătățire a ratelor de supraviețuire a fost în

rândul copiilor cu MRD >10% comparativ cu pacienții cu >25% blaști în aspiratul osteomedular (70% versus 40%).

Pacienții cu imunofenotip T sau cu număr mare de leucocite la diagnostic au suferit mai multe evenimente (recidivă, deces), însă toate evenimentele au survenit în primul an de la diagnostic. De asemenea, în ultimii ani am observat o creștere a supraviețuirii a pacienților cu imunofenotip T. Fetele au avut mai multe evenimente comparativ cu băieții, însă au avut o rată de supraviețuire mai mare, datorită intrării în a doua remisie completă.

5. Studiu 3. Rolul miR în prognosticul pacienților pediatrici diagnosticați cu leucemie acută limfoblastică

5.1. Introducere

Leucemia acută limfoblastică la copii reprezintă cel mai frecvent cancer din cadrul populației pediatrice, adică aproximativ 70% din toate leucemiile (167). Importante progrese au fost făcute datorită noilor markeri moleculari, stratificarea în grupe de risc mai precisă, însă un anumit număr relativ mare de pacienți recidivează (168).

Căile moleculare și genetice care influențează apariția LAL sunt cruciale pentru cercetarea modernă, elucidarea lor conducând spre îmbunătățirea terapiei (169). În acest scenariu, mutațiile moleculare izolate nu explică singure toate aspectele legate de boală, fiind esențial a se determina mai departe și modificările epigenetice. În studiile mai recente s-a descoperit că ARN-urile non-codificante joacă roluri importante, în special miR (97).

miR sunt ARN-uri non-codificante cu un singur lanț, care conțin în jur de 18-22 de nucleotide. Sunt capabile de inhibiția translației sau degradarea ARN-ului țintă (170). Ele sunt actori principali în mai multe procese: proliferare, diferențiere, apoptoză, migrare, supraviețuire și multe alte procese. Structurile transformate ale expresiei lor sunt descoperite progresiv a se asocia cu progresia în LAL (171, 172). miR-urile conlucrează în grupuri care reglează procese similare la nivel celular, cum ar fi supresia tumorală sau ca și oncogene tumorale, conducând la efecte fenotipice. Acestea au rol în procese ca transcripția, translația, reglarea epigenetică, configurația anticipată, iar moleculele asupra cărora acționează pot fi determinate de diferite dispozitive bioinformatic (173). Ele prezintă un anumit model de expresie în stadiile limfopoiezei, atașându-se de un ARN mesager specific și astfel controlează expresia posttranscripție, influențând maturarea precursorilor limfoizi.

În timpul leucemogenezei apare o expresie anormală a mai multor miR, care poate fi considerată o „semnătură” pentru subtipurile de LAL. Modificarea expresiei lor are o semnificație majoră în apariția leucemiei, rezistența la tratament sau a altor procese, dar reversia expresiilor ar putea avea roluri în progresia bolii și îmbunătățirea rezultatelor clinice (97). Biosinteza miR-urilor este descrisă extensiv în alte studii (174, 175).

5.2. Ipoteza de lucru

Există puține studii care au evaluat rolul miR în leucemia acută limfoblastică la copii, în special la cei care recidivează. Este necesară adoptarea un consens pentru a stabili o semnătură caracteristică a miR-urilor relevante clinic din această patologie la copii (176). În acest studiu am testat 3 miR circulante în momentul diagnosticului copiilor: miR21, miR25 și miR 155. Mi-am propus să aflu dacă există corelații între expresia acestora și răspunsul la tratament, supraviețuirea și recidiva.

5.3. Material și metodă

5.3.1. Pacienți

Au fost colectate probe de sânge de la 50 de pacienți nou diagnosticați LAL în perioada 2018-2021 în cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca, Departamentul de Oncologie și Hematologie Pediatrică. Au fost înregistrate toate datele relevante despre pacienți din foile de observație, cum ar fi: data diagnosticului, vârstă, numărul de leucocite la diagnostic, imunofenotip, biologie moleculară, cariotip, răspunsul la prednison în ziua 8 de tratament, răspunsul morfologic în zilele 15 și 33, MRD în zilele 15 și 33, statusul vital, data progresiei, data recidivei, data decesului, supraviețuirea în luni. Toți pacienții au fost tratați conform protocolului ALL-IC BFM 2009 (63).

Din cei 50 de pacienți recoltați am ales 20 de pacienți, dintre care 10 au răspuns bine la tratament, iar ceilalți 10 au avut răspuns nesatisfăcător, au recidivat sau au decedat. Perioada de urmărire de 3 ani după stabilirea diagnosticului și inițierea terapiei specifice a fost suficientă pentru a stabili evoluția fiecărui caz.

Recoltarea probelor de la copii este conform reglementărilor Comisiei de Etică a Universității „Iuliu Hațieganu” de Medicină și Farmacie și a Comisiei de Etică a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca, pentru care am primit aviz favorabil (110/05.03.2018) și a fost respectată Declarația de la Helsinki. Toți părinții și copiii peste 7 ani au semnat un consimțământ informat înainte de recoltare (redactat în așa fel încât pacienții să înțeleagă scopul recoltării și al studiului), consimțăminte care au fost în concordanță cu cerințele celor 2 comitete de etică. Recoltările pentru acest studiu (MO din apiratul osteomedular și sânge periferic) s-au realizat concomitent cu recoltările impuse de protocolul terapeutic utilizat.

5.3.2. Recoltarea de sânge periferic și separarea serului

Sângele periferic a fost recoltat la diagnostic, înainte de inițierea tratamentului. Au fost recoltați 2.5 ml în vacutainere BD CAT. Probele au fost centrifugate la 20°C, 6400 g pentru 20 minute și am colectat supernatantul în alicote, câte 500 µL per tub Eppendorf de 1.5 ml, urmând protocelele recomandate (177). Am obținut aproximativ 3 alicote pentru fiecare pacient, iar probele au fost stocate la -80°C, pentru a fi analizat mai departe.

5.3.3. Izolarea miR din ser

Serul pacienților a fost dezghețat pe gheață și procesat pentru separarea miR, conform manualului producătorului din kitul Small RNA and DNA from Plasma NucleoSpin® miRNA Plasma kit de la Macherey-Nigel. Am folosit 300 μ L de la fiecare pacient.

5.3.4. Sinteza cDNA din miR

cDNA a fost obținut din ARN revers transcris, incluzând și miR, utilizând un master mix: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de la Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific). Revers transcriptia pentru un singur lanț scurt de ARN a fost realizată conform protocolului producătorului. 10 μ L din proba ARN au fost adăugați la 10 μ L 2x RT Master Mix, probele au fost centrifugate și puse în thermal cycler de la BioRad®. Condițiile de revers transcriptie au fost setate pentru 20 μ L, urmate de 4 pași de incubare: 30 minute la 16°C, 30 minute la 42°C, 5 minute la 85°C și păstrare la 4°C. cDNA obținut a fost stocat în microtuburi la -20°C pentru a fi analizat mai departe.

5.3.5. Amplificarea PCR cantitativă

Mixul pentru reacția PCR a fost preparat conform instrucțiunilor producătorului: TaqMan™ Small RNA Assays (Applied Biosystems from ThermoFisher Scientific). Mixul pentru reacția PCR a fost adăugat în fiecare godeu al plăcuței optice pentru reacții (au fost folosite plăcuțe cu 96 de godeuri), împreună cu cDNA obținut anterior de la fiecare pacient. Primerii folosiți (750 μ L (20x)) au fost achiziționați de la TaqMan™. Toate reacțiile au fost făcute în duplicat pentru fiecare pacient și fiecare miR, utilizând un Thermal cycler în timp real (StepOnePlus System de la Applied Biosystems TaqMan® Assays). Volumul de reacție a fost stabilit pentru 10 μ L și modul de ciclare a inclus 3 pași: activare enzimatică la 95°C pentru 20 secunde, denaturare la 95°C pentru o secundă și normalizare/extensie la 60°C pentru 20 secunde, ultimele 2 pentru 40 de cicluri.

5.3.6. Concepte cheie

Valoarea Ct este determinată de ciclurile PCR, reprezentând rezultatul amplificării qPCR. Este măsurată în faza exponențială, atunci când curba de amplificare este liniară. Există un prag, care este plasat în partea liniară a ciclurilor de amplificare, acolo unde este de fapt măsurată valoarea Ct. Acest prag diferă pentru fiecare miR testat, dar este același pentru fiecare probă testată pentru același miR. Principiul pe care se bazează qPCR este că la fiecare ciclu, cantitatea miR-urilor testate se dublează. De cele mai multe ori un experiment qPCR oferă o expresie relativă, care este o variație a expresiei unui miR între două probe. Valoarea Ct este valoarea măsurată pentru analiză. Cu cât valoarea Ct este mai mare, cu atât mai puțin miR este prezent în probă, deoarece sunt necesare mai multe cicluri de amplificare pentru a obține fluorescență (178).

Controlul endogen reprezintă gena (de exemplu, o genă housekeeping, cum ar fi GAPDH) sau un miR care nu variază între toate probele analizate (179, 180).

Delta Ct (ΔCt) reprezintă diferența dintre numărul de cicluri de amplificare a miR-ului testat și cel al controlului.

Delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) reprezintă cantitatea de miR normalizată la un control endogen (181).

RQ (cuantificarea relativă) reprezintă un număr care oferă informații asupra miR-ului studiat, adică de câte ori este amplificat comparativ cu controlul (de exemplu, o valoare de 5 înseamnă că miR-ul testat este de 5 ori mai exprimat decât controlul, iar o valoare de 0.5 înseamnă că miR-ul testat este de 5 ori mai puțin exprimat) (181).

Normalizarea corectă a datelor este critică, dar de multe ori neglijată în analizele cantitative ale expresiei diferitelor gene sau miR. Pentru normalizare am ales hsa-miR-16 ca și control endogen, care a fost găsit în mai multe studii ca fiind un candidat bun pentru normalizare în tumori (180, 182). Cuantificarea relativă (de câte ori s-a amplificat un miR față de controlul endogen) am calculat-o cu ajutorul formulei $2^{\Delta\Delta Ct}$, care depinde de ΔCt (de exemplu: $Ct_{miR-21} - Ct_{miR-16}$), iar $\Delta\Delta Ct = -\Delta Ct_{miR-21} - \Delta Ct_{valoarea\ cea\ mai\ mare\ \Delta Ct\ obținută}$. Cea mai mare valoare ΔCt este valoarea în care s-a amplificat cel mai puțin miR-ul studiat.

5.3.7. Prelucrarea datelor

Pentru obtinerea curbelor de amplificare și a valorilor Ct am folosit programul StepOnePlus de la Applied Biosystems TaqMan®. Calculele de normalizare a datelor le-am realizat cu ajutorul Microsoft Excel. Pentru analiza statistică am folosit programul Prism GraphPad versiunea 10.2.3., cu ajutorul căruia am analizat datele obținute prin Wilcoxon signed rank test, Wilcoxon matched pairs test, teste t non-parametrice, testele de distribuție D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk și Kolmogorov-Smirnov, curbe de supraviețuire (Kaplan-Meier), corelații și matrice de corelații.

5.4. Rezultate

Am analizat 20 dintre cei 50 de pacienți recoltați în perioada 2018-2021, diagnosticați cu LAL, înainte de administrarea chimioterapiei citostatice. Din nefericire, 4 dintre pacienții care nu au avut răspuns satisfăcător la tratament au fost pretratați cu cortizon, iar 2 dintre ei și cu methotrexat, din cauza diagnosticului inițial greșit (de exemplu artrită idiopatică juvenilă, infecții respiratorii în cadrul imunodepresiei date de leucemie, care nu a fost diagnosticată la momentul respectiv). Dintre cei 20 de pacienți, 10 au avut răspuns bun la tratament, cu intrarea în remisie completă, iar ceilalți 10 fie au intrat în remisie completă, însă au recidivat, fie nu au răspuns la tratament și o parte din ei au decedat.

Media vârstei la diagnostic este de 8 ani, mai mare decât vârsta medie raportată în LAL (1). Media lunilor de supraviețuire pentru întreaga cohortă este de 42 de luni. Pentru pacienții care au răspuns bine la tratament este de 59 de luni, iar pentru cei care

au avut răspuns nesatisfăcător este de 24 de luni. Marea majoritate a pacienților a avut vârste ≥ 6 ani, leucocite mai mici de $20000/\text{mm}^3$, imunofenotip B, cariotip normal, translocția ETV6-RUNX1, răspuns bun la prednison în ziua a 8-a, încadrare în HRG, răspuns morfologic și MRD bun în ziua 15 și răspuns morfologic bun în ziua 33. Cu toate acestea, 5 copii au recidivat, iar 6 au decedat (Tabel 11).

Tabel 11. Caracteristicile pacienților.

Caracteristici	Categorii	Numărul pacienților
Sex	Feminin	11
	Masculin	9
Vârsta la diagnostic	<1 an	0
	1-6 ani	7
	≥ 6 ani	13
Număr de leucocite la diagnostic	$<20000/\text{mm}^3$	10
	$20000-100000/\text{mm}^3$	7
	$\geq 100000/\text{mm}^3$	3
Imunofenotip	B	16
	T	4
Cariotip	Normal	16
	Hiperdiploid	0
	Hipodiploid	1
Biologie moleculară	TEL-AML1/ETV6-RUNX1	7
	SIL-TAL1	2
	E2A-PBX1/TCF3-PBX1	3
	BCR-ABL minor (p190)	2
	MLL-AF4/KMT2A-AFF1	1
	BCR-ABL major (p210)	0
	Fără fuziuni	5
Afectare SNC	>5 elemente	3
Răspuns la prednison în ziua 8	PGR	15
	PPR	5
Grupa de risc	SRG	1
	MRG	8
	HRG	11
Răspuns morfologic medular în ziua 15	M1	11
	M2	2
	M3	5
	Aplazie	1
FCM-MRD în ziua 15	<0.1%	6
	0.1-1%	2
	1-10%	4
	>10%	4
Răspuns morfologic medular în ziua 33	M1	12

Recidivă Deces	M2	3
	M3	0
	Aplazie	4
	Da	5
	Da	7

Serurile acestor pacienți a fost analizat, conform pașilor și protocoalelor descrise în materiale și metode pentru amplificarea miR-21, miR-25 și miR-155, iar ca și control endogen am folosit miR-16. Pentru calcule am utilizat valoarea Ct medie (deoarece probele au fost lucrate în duplicat), din care am calculat ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ și RQ pentru fiecare probă (Tabelele 12, 13, 14).

Tabel 12. Normalizarea miR-21.

Pacient	Media Ct miR-16	Media Ct miR-21	ΔCt miR- 21	$\Delta\Delta Ct$ miR-21	RQ miR- 21
1	17,93	24,89	6,97	2,68	6,43
2	19,45	23,41	3,97	5,68	51,33
3	20,55	25,17	4,61	5,04	32,80
4	20,96	25,75	4,79	4,86	29,12
5	20,37	24,69	4,32	5,33	40,32
6	23,72	27,07	3,35	6,30	78,94
7	26,07	26,33	0,26	9,39	671,72
8	21,41	24,71	3,30	6,35	81,72
9	20,00	26,22	6,22	3,43	10,75
10	20,55	25,49	4,93	4,72	26,28
11	19,26	24,52	5,26	4,39	20,94
12	21,69	26,24	4,56	5,09	34,13
13	19,20	23,58	4,38	5,27	38,49
14	20,30	24,61	4,30	5,35	40,71
15	23,29	32,94	9,65	0,00	1,00
16	21,42	30,78	9,36	0,29	1,23
17	18,73	23,38	4,66	4,99	31,89
18	20,20	25,88	5,68	3,97	15,71
19	20,83	28,20	7,37	2,28	4,84
20	20,57	25,18	4,61	5,04	32,96

Tabel 13. Normalizarea miR-25.

Pacient	Media Ct miR-16	Media Ct miR-25	ΔCt miR- 25	$\Delta\Delta Ct$ miR-25	RQ miR- 25
1	17,93	26,14	8,21	4,58	23,94
2	19,45	25,83	6,38	6,41	84,80
3	20,55	25,39	4,84	7,95	247,56
4	20,96	27,33	6,36	6,43	86,04
5	20,37	33,16	12,79	0,00	1,00
6	23,72	30,94	7,22	5,57	47,42
7	26,07	32,65	6,58	6,21	74,18
8	21,41	25,24	3,83	8,96	498,28
9	20,00	27,06	7,06	5,73	52,90
10	20,55	27,60	7,05	5,74	53,58

11	19,26	25,39	6,13	6,66	101,06
12	21,69	28,14	6,46	6,33	80,67
13	19,20	25,11	5,91	6,88	117,88
14	20,30	26,10	5,80	6,99	127,53
15	23,29	33,65	9,65	0,00	1,00
16	21,42	26,09	9,36	0,29	1,23
17	18,73	28,43	4,66	4,99	31,89
18	20,20	27,11	5,68	3,97	15,71
19	20,83	28,74	7,37	2,28	4,84
20	20,57	28,47	4,61	5,04	32,96

Tabel 14. Normalizarea miR-155.

Pacient	Media Ct miR-16	Media Ct miR- 155	Δ Ct miR- 155	$\Delta\Delta$ Ct miR- 155	RQ miR- 155
1	17,93	31,60	13,67	0,00	1,00
2	19,45	27,55	8,10	5,57	47,52
3	20,55	28,35	7,80	5,87	58,34
4	20,96	33,00	12,04	1,63	3,10
5	20,37	32,55	12,17	1,50	2,83
6	23,72	34,83	11,11	2,56	5,89
7	26,07	27,87	1,80	11,87	3733,27
8	21,41	31,39	9,98	3,69	12,94
9	20,00	32,38	12,39	1,28	2,44
10	20,55	31,61	11,06	2,61	6,12
11	19,26	28,36	9,10	4,57	23,78
12	21,69	33,03	11,34	2,33	5,03
13	19,20	28,48	9,29	4,38	20,87
14	20,30	27,44	7,14	6,53	92,72
15	23,29	28,87	5,58	8,09	271,95
16	21,42	30,52	9,10	4,57	23,83
17	18,73	28,65	9,92	3,75	13,47
18	20,20	30,43	10,23	3,44	10,83
19	20,83	30,55	9,72	3,95	15,46
20	20,57	28,89	8,32	5,35	40,84

După calcularea RQ, adică diferența de cicluri de amplificare comparativ cu controlul endogen, am calculat media RQ a copiilor care au răspuns bine la tratament și RQ al celor care nu au răspuns bine la tratament. Există diferențe semnificative între mediile calculate pentru fiecare amplificare relativă a miR raportate la răspunsul la tratament (Tabel 15). După cum se poate vedea în tabelele 12, 13 și 14 există valori care sunt anormale și trebuie eliminate din calcule.

Tabel 15. Mediile RQ pentru miR-21, miR-25 și miR-155 în funcție de răspunsul la tratament.

Răspuns la tratament	Media RQ miR-21	Media RQ miR-25	Media RQ miR-155
Răspuns favorabil	39.74	52.98	15.57
Răspuns nefavorabil	22.19	62.09	27.42

Următorul pas a fost verificarea datelor, dacă sunt normal distribuite (distribuție gaussiană) prin testele D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk și Kolmogorov-Smirnov. Cu nici un test nu am putut dovedi că distribuția miR-urilor studiate au distribuție normală, drept urmare în loc de Student t test am folosit testul non-parametric Wilcoxon signed rank. Doar supraviețuirea în luni are distribuție normală (Figura 14).

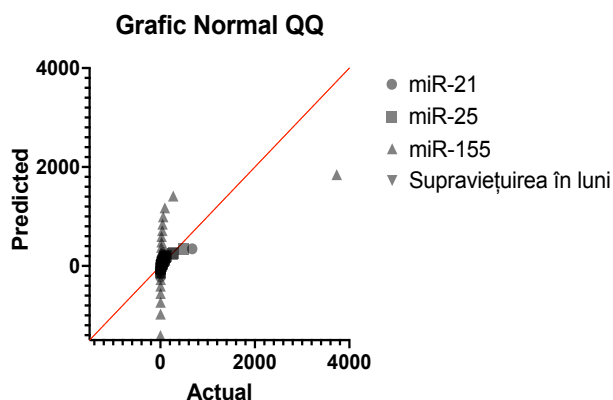


Fig.14. Testul de normalitate a distribuției variabilelor

Cu ajutorul testului Wilcoxon am evidențiat faptul că într-adevăr aceste diferențe între mediile RQ ale pacienților cu răspuns bun la tratament comparativ cu pacienții cu răspuns nefavorabil au semnificație statistică (Tabel 16).

Tabel 16. Testul Wilcoxon pentru miR-21, miR-25 și miR-155 în funcție de răspunsul la tratament.

miR testat	Mediana	Interval de confidență	Valoare p (metoda Pratt)
miR-21 răspuns favorabil	32.8	96.09	0.0039**
miR-21 răspuns nefavorabil	26.42	97.85	0.0039**
miR-25 răspuns favorabil	53.24	99.22	0.0156*
miR-25 răspuns nefavorabil	58.69	96.09	0.0039**
miR-155 răspuns favorabil	5.89	96.09	0.0078**
miR-155 răspuns nefavorabil	20.87	96.09	0.0039**

În reprezentarea grafică pentru fiecare miR în parte în funcție de răspunsul la tratament, folosind testul non-paired t test, am găsit doar o singură corelație semnificativă din punct de vedere statistic pentru miR-21.

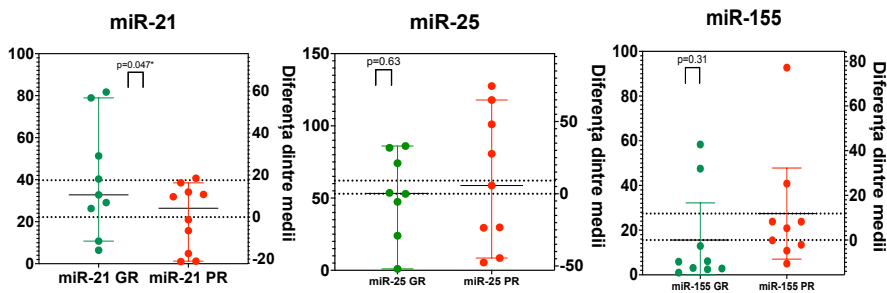


Fig.15. Reprezentarea grafică a diferenței dintre mediile RQ și răspunsul la tratament.

OS și EFS ale copiilor cu răspuns bun la tratament sunt de 100% (10 pacienți), iar OS a copiilor care nu au răspuns bine la tratament este de 30% (95%CI 2.22-52.88). OS a întregii cohorte este de 65% (95%CI 48.47-89.7), reprezentate în figurile 16 și 17.

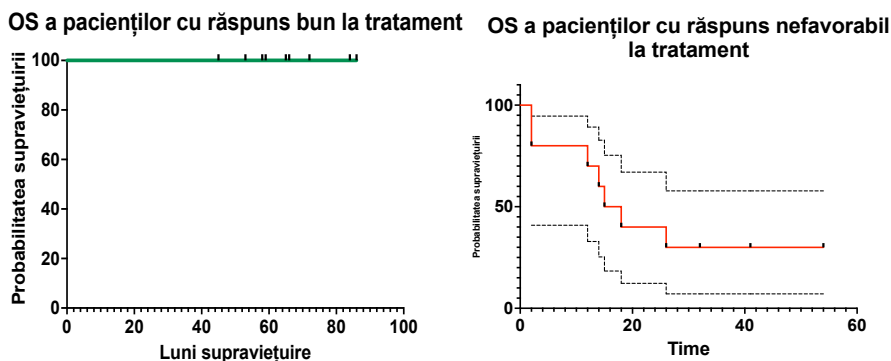


Fig.16. a) OS pacienților cu răspuns bun la tratament. b) OS a pacienților cu răspuns nefavorabil la tratament

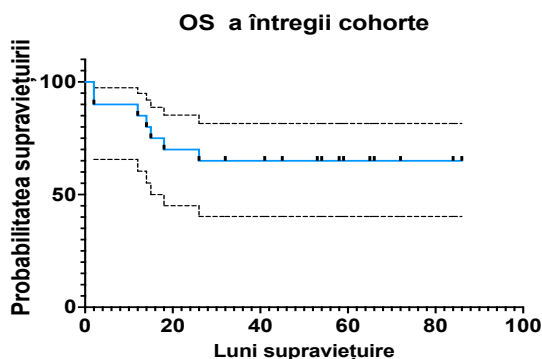


Fig.17. OS a întregii cohorte

OS și EFS ale copiilor cu răspuns bun la tratament sunt de 100% (10 pacienți), EFS a pacienților cu răspuns nefavorabil la tratament este 0. EFS a întregii cohorte este 52.13% (95%CI 32.17-76.92), reprezentată în figurile 18 și 19.

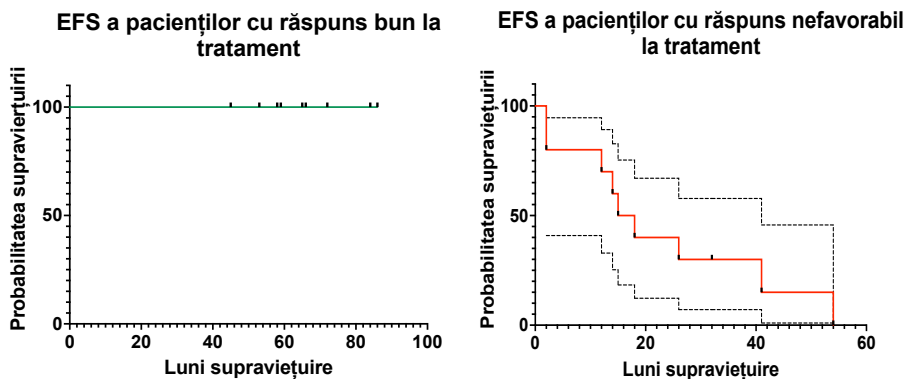


Fig.18. a) EFS pacienților cu răspuns bun la tratament. b) EFS a pacienților cu răspuns nefavorabil la tratament

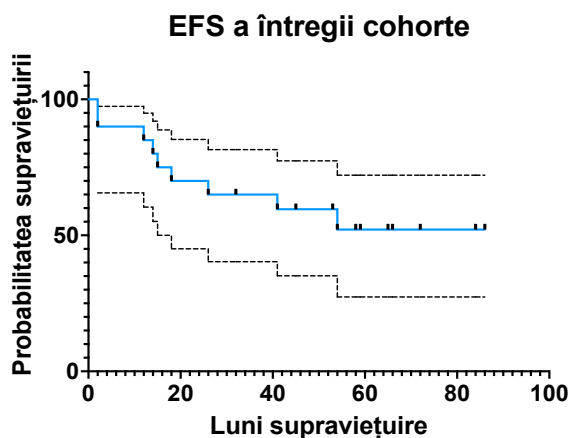


Fig.19. EFS a întregii cohorte

În privința legăturii dintre supraviețuire și RQ-ul fiecărui miR în parte am vrut să verific dacă există corelații semnificative din punct de vedere statistic. miR-155 nu se corelează cu supraviețuirea ($p=0.53$), însă miR-21 și miR-25 se corelează ($p=0.0087$, respectiv $p=0.0411$, 95%CI 0.15-0.81, respectiv 95%CI -113.2 și -2.599) și R^2 (coeficientul corelației) este 0.55 pentru miR-21 și 0.2 pentru miR-25, iar pentru miR-155 este -0.28 (Figurile 20 și 21).

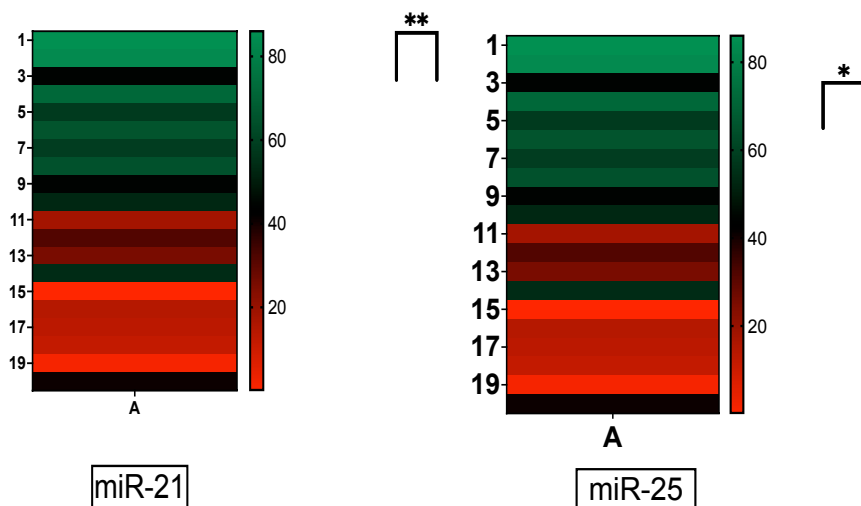


Fig.20. a) Corelația supraviețuirii cu expresia miR-21 și b) miR-25

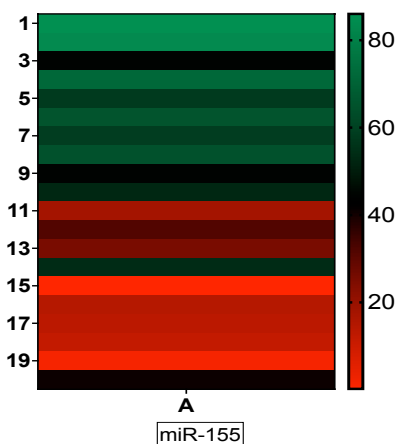


Fig.21. Corelația supraviețuirii cu expresia miR-155

În figura 22 este reprezentată corelația între răspunsul la tratament și supraviețuire pentru miR-21, miR-25 și miR-155. Cu nuanțe de verde sunt colorate variabilele care au relație inversă cu supraviețuirea, cu negru sunt colorate variabilele care au $R^2=0$, adică nu există nicio relație între variabile, iar cu nuanțe de roșu sunt colorate variabilele care se corelează pozitiv cu supraviețuirea. Nici una dintre variabile nu se apropie semnificativ de -1 sau 1.

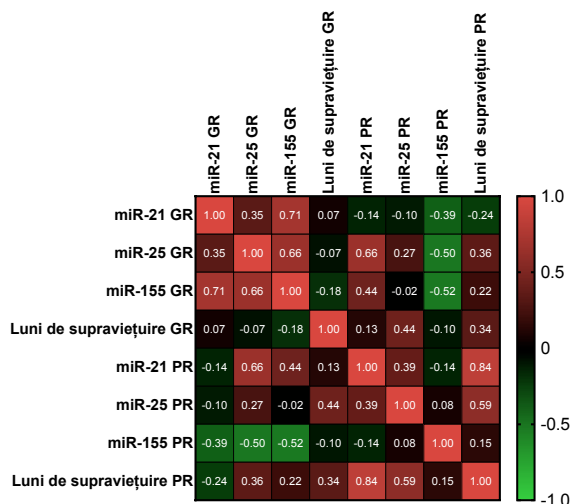


Fig.22. Corelația supraviețuirii cu răspunsul la tratament și fiecare miR în parte.

GR=răspuns bun la tratament, PR=răspuns nefavorabil la tratament.

5.5. Discuții

Nivelurile circulante de miR-21 sunt un biomarker al cancerului, iar pacienții cu niveluri ridicate în plasmă sau ser au un risc de 17 ori mai mare să fie diagnosticați cu cancer, comparativ cu copiii sănătoși. Un studiu recent a corelat hiperexpresia miR-21 cu un răspuns slab la terapia de inducție și cu OS și EFS scurte (96).

Niveluri expresie mici de miR-25 au fost descoperite la pacienții cu LAL pediatrică comparativ cu subiecții sănătoși, fiind asociat cu riscul de apariție al acestei boli (183).

Hiperexpresia miR-155 este corelată cu un prognostic nefast în LAL pediatrică, funcționând ca și oncogenă (111). miR-155 este asociat, de asemenea, și cu procente mari ale MRD, dar ar putea fi o țintă terapeutică promițătoare (97).

Majoritatea pacienților nu a avut factori de prognostic nefavorabil, însă cu toate acestea 5 copii au recidivat, iar 7 au decedat. Acest lucru demonstrează că există și alți factori implicați în răspunsul la tratament și supraviețuirea pe termen lung.

Prin normalizarea la miR-16 am aflat RQ fiecărui miR pentru fiecare pacient, adică de câte ori este amplificat un miR comparativ cu miR-16. Calculând mediile acestora pentru pacienții care au răspuns bine la tratament, comparativ cu cei care au răspuns nefavorabil, am observat că există diferențe semnificative între cele două grupuri, pentru fiecare miR analizat. De aceea am vrut să demonstrez din punct de vedere statistic că aceste diferențe sunt reale. Înainte de a demonstra acest lucru, am observat că diferențele de expresie nu au distribuție gaussiană, drept urmare nu pot fi alese teste parametrice. De asemenea, am observat că există valori mari, anormale, care nu pot fi reale. După îndepărtarea valorilor, mediile s-au schimbat. Am ales testul Wilcoxon signed rank și am obținut rezultate semnificativ statistice, adică există diferențe între

răspunsul la tratament pentru cele 3 miR-uri, cu confidențe actuale de între 96.09 și 99.22. În cazul miR-21 se poate observa că mediana expresiei relative pentru cei care au răspuns bine la tratament este mai mare decât mediana celor care nu au avut un răspuns favorabil. Acest lucru contrazice actualele descoperiri, că expresia ridicată se corelează cu un răspuns slab la terapia de inducție (96, 184).

În cazul miR-25 mediana pentru cei care au răspuns bine la tratament este mai mică decât a celor care au răspuns nefavorabil, ceea ce este confirmat de literatura de specialitate (183).

În cazul miR-155 se observă că mediana expresiei relative pentru copiii care au răspuns bine la tratament este mult mai mică decât a celor care au răspuns nefavorabil, acest aspect fiind confirmat de literatura de specialitate recentă (111).

La reprezentarea grafică a celor 3 miR comparativ cu răspunsul la tratament, doar miR-21 se corelează cu răspunsul. Pe de altă parte, există diferențe între mediile dintre cei care au răspuns favorabil și cei care nu au răspuns favorabil.

Curbele de supraviețuire (OS și EFS) ale copiilor care au răspuns bine la tratament sunt de 100%. Cei care nu au răspuns favorabil au supraviețuiri mult mai mici, chiar 0 pentru EFS. OS a întregii cohorte este de 65%, supraviețuire mai mică decât cea determinată pe 10 ani, dar există și un bias de selectare a pacienților. EFS pentru întreaga cohortă este de 52%, adică aproape jumătate dintre copii au suferit evenimente ca recidivă și/sau deces.

Am găsit corelații semnificative din punct de vedere statistic între supraviețuire și expresia miR-21 și miR-25. Însă valorile R^2 indică faptul că există corelații pozitive între expresia acestora și supraviețuire (atunci când crește expresia, crește și supraviețuirea). Pentru miR-155 nu am găsit nicio corelație, dar valoarea R^2 indică o relație inversă, adică atunci când expresia acestuia crește, scade supraviețuirea. Pe de altă parte, în graficele heatmap se observă că pacienții care au răspuns bine la tratament au o supraviețuire mai lungă, comparativ cu pacienții care au răspuns nefavorabil, care au supraviețuiri mai scurte.

Matricea de corelație a răspunsului la tratament cu supraviețuirea în funcție de cele trei miR-uri nu conține valori care să se apropie semnificativ de -1 sau 1, ci mai degrabă majoritatea se apropie de 0, deci nu am găsit relații importante între aceste variabile.

Limitarea majoră a studiului este numărul redus de pacienți, fiind nevoie de un lot mai mare de copii diagnosticați cu LAL, pentru a avea o putere statistică mai mare. De asemenea, am analizat serurile pacienților doar la diagnostic, nu și pe parcursul tratamentului. Acest lucru va fi studiat în viitor, pe toată cohorta de pacienți și vor fi incluse mai multe miR-uri.

Avantajul major al studiului este că nimeni din România nu a mai studiat miR în leucemia limfoblastică la copii, aceasta fiind prima analiză din țară. De asemenea,

determinarea expresiei miR-urilor din ser ca potențiali biomarkeri ar putea fi considerate ca adevărate biopsii lichide.

5.6. Concluzii

Factorii clasici de prognostic pozitiv în LAL pediatrică nu pot explica de ce în unele cazuri apar recidive și/sau decese. Este clar că intervin și alți factori în răspunsul la tratament și supraviețuirea pe termen lung.

În cadrul cohortei analizate există diferențe între nivelurile de expresie relativă a miR-25 și miR-155, fiind mai mici pentru copiii care au răspuns la tratament, cunoscut fiind faptul că hiperexpresia lor se asociază cu prognostic infaust.

Din punct de vedere al supraviețuirii, 65% dintre pacienții cuprinși în analiză au suferit evenimente adverse, ca recidiva sau decesul (EFS).

Există corelații între supraviețuire și miR-21 și 25, iar miR-155 se corelează negativ cu supraviețuirea prin coeficientul de corelație.

6. Discuții generale

Leucemia acută limfoblastică la copii este cea mai frecventă malignitate din cadrul cancerelor pediatrice. 80% dintre toate cancerurile la copii sunt diagnosticate ca și LAL (1). Există rezultate impresionante în obținerea remisie complete în ultimii ani, unele studii având rezultate de supraviețuire de peste 90%, dar încă aproape 20% dintre copii recidivează, iar în 15% din cazuri nu se obține o a doua remisie completă (3, 142). În țările cu venit mic sau mediu din toată lumea, ratele de supraviețuire variază între 50% și 75%, datorate în parte întârzierilor în stabilirea diagnosticului sau a inițierii tratamentului (143).

O multitudine de factori prognostici pot anticipa care dintre pacienți va avea o evoluție nefavorabilă, însă există pacienți aparent fără factori de prognostic negativi, care cad pradă bolii. Din această cauză, LAL la copii este încă o boală intens studiată.

În plus, există modificări epigenetice, iar în ultimii ani s-a descoperit faptul că ARN-urile non-codificante joacă roluri importante, în special microARN-urile. Acestea conlucrează în grupuri care reglează procese la nivel celular în diferite stadii ale limfopoiezei, cum ar fi supresia tumorală sau promoția tumorală. Drept urmare, în timpul proliferării blasturilor apar expresii anormale ale unor anumite miR-uri, care ar putea fi considerate ca o „semnătură” în leucemia acută limfoblastică. Modificarea expresiei are roluri importante în apariția LAL, rezistența la terapie și a altor procese, însă reversia expresiilor ar putea avea rol terapeutic.

Rezultatele acestei teze reprezintă un pas înainte în studiul leucemiei acute limfoblastice la copiii din România, unde nu sunt efectuate suficiente cercetări în această direcție. Este important de menționat aici faptul că în România există mari discrepanțe în rândul populației, cum ar fi lipsa de educație a părinților, venituri scăzute, șomaj, condiții de viață precare (aglomerație), copii care locuiesc în zone rurale izolate, care pot influența răspunsul la tratament și supraviețuirea pe termen lung.

Cohorta de pacienți a fost diagnosticată în Cluj-Napoca, în cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii, Departamentul de Oncologie și Hematologie Pediatrică, unde se tratează 7% din cancerurile diagnosticate din țară. Pe o perioadă de 10 ani, în acest departament au fost tratați 15.3% de copii cu LAL, fiind al treilea centru din România care a tratat această patologie.

Durata medie de urmărire a pacienților a fost de 44 luni (3.6 ani), cu extreme între 4.2 luni și 124.3 luni (10 ani). Motivele pentru această durată medie de urmărire relativ scurtă ar putea fi: adolescenții sunt redirecționați către centrele de adulți la împlinirea vârstei de 18 ani, alți pacienți au ales spitalele locale pentru urmărire (după încheierea chimioterapiei de întreținere), o parte din pacienți nu s-au mai prezentat pentru controalele regulate, iar alții fie au recidivat și/sau au fost transplantați în alte centre (în România sau transfrontalier) sau au decedat. Vârsta medie la diagnostic a fost de 5.6 ani,

fiind aliniată cu literatura internațională. Cea mai frecventă translocatie găsită este ETV6-RUNX1, dar mai mult de jumătate dintre copii nu a avut prezentă nicio translocatie. Aceste gene de fuziune nu au fost analizate în detaliu în acest studiu, deoarece nu toate au fost disponibile de la începutul studiului. Din punct de vedere al numărului de leucocite la diagnostic, cei mai mulți pacienți au avut sub 20000 leucocite/mm³ (60.1%), fiind recunoscut ca și marker de prognostic pozitiv. Marea majoritate a pacienților au avut un răspuns bun la prednison în ziua a 8-a, fiind un moment cheie din stratificarea în grupe de risc.

Am descoperit cu ajutorul MRD o schimbare importantă a distribuției grupelor de risc. Înainte de anul 2017, majoritatea copiilor erau alocați MRG (46%), SRG (39%) și HRG (15%). După anul 2017, doar 7% fiind încadrați în SRG, restul în MRG (57%) și HRG (36%), deci mai mulți pacienți au primit chimioterapie mai intensă. Înainte de adoptarea testării MRD am observat că mai mulți pacienți au recidivat și/sau au decedat, spre deosebire de următoarea perioadă, începând din anul 2017, când mai puțini copii au recidivat/au decedat. Acest fapt subliniază importanța MRD.

Un aspect important pe care l-am găsit este faptul că nici unul dintre copiii cu recidive foarte precoce nu a intrat în a doua remisie completă, drept urmare au decedat, dar toți pacienții cu recidive tardive au supraviețuit datorită obținerii o a doua remisie completă, acest lucru fiind confirmat de corelația statistică pe care am găsit-o ($p=0.0296$).

La analizarea incidenței cazurilor noi/an, scăderea bruscă din anul 2016 este confirmată și de incidențele calculate pe ani. Comparând aceste rezultate cu cele ale studiului de supraviețuire din 2024 a RNOHP am sesizat aceeași scădere a incidenței și că avut loc în toate centrele din România, nu numai în cohorta studiată în această teză. Aceasta scădere ar trebui studiată în profunzime pentru a decela motivele (scăderea ar putea fi datorată faptului că mai mulți apaținători au ales să înceapă tratamentul în alte țări și nu au fost investigați niciodată într-un departament public de hematologie pediatrică).

Curbele de supraviețuire ale cohortei 2011-2015 evidențiază la 5 ani OS și EFS identice, probabil din cauza faptului că toți pacienții cu recidivă au decedat. În cohorta 2016-2020 OS la 5 ani de 77% (59 pacienți) și EFS de 65% (50 pacienți), supraviețuirea globală fiind mai mare în această cohortă.

Supraviețuirea globală pentru cohorta 2011-2015 este de 75% (56 pacienți), dar pentru cohorta 2016-2020 am înregistrat o creștere de 2% (59 pacienți). OS la 10 ani, pentru cele două cohorte este de 76% (115 pacienți), iar EFS este de 48.3% (73 pacienți).

Pacienții cu mai puțin de 25% blaști în aspiratul osteomedular în ziua 15 au avut OS și EFS mai mare la cinci ani decât cei care au avut MRD <10%, dar adevărata îmbunătățire a ratelor de supraviețuire a fost în rândul copiilor cu MRD >10% comparativ cu pacienții cu >25% blaști în aspiratul osteomedular (70% versus 40%).

Majoritatea pacienților din cadrul studiului 3 nu a avut factori de prognostic nefavorabil, însă cu toate acestea 5 copii au recidivat, iar 7 au decedat. Acest lucru demonstrează că există și alți factori implicați în răspunsul la tratament și supraviețuirea pe termen lung.

Am remarcat faptul că există diferențe între răspunsul la tratament pentru cele 3 miR-uri, cu confidențe actuale de între 96.09 și 99.22. În cazul miR-21 se poate observa că mediana expresiei relative pentru cei care au răspuns bine la tratament este mai mare decât mediana celor care nu au avut un răspuns favorabil. Acest lucru contrazice actualele descoperiri, că expresia ridicată se corelează cu un răspuns slab la terapia de inducție (96, 184). În cazul miR-25 mediana pentru cei care au răspuns bine la tratament este mai mică decât a celor care au răspuns nefavorabil, ceea ce este confirmat de literatura de specialitate (183). În cazul miR-155 se observă că mediana expresiei relative pentru copiii care au răspuns bine la tratament este mult mai mică decât a celor care au răspuns nefavorabil, acest aspect fiind confirmat de literatura de specialitate recentă (111).

Am găsit corelații semnificative din punct de vedere statistic între supraviețuire și expresia miR-21 și miR-25. Însă valorile R^2 indică faptul că există corelații pozitive între expresia acestora și supraviețuire (atunci când crește expresia, crește și supraviețuirea). Pentru miR-155 nu am găsit nicio corelație, dar valoarea R^2 indică o relație inversă, adică atunci când expresia acestuia crește, scade supraviețuirea.

Aceste studii au câteva limitări, cum ar fi numărul relativ mic de pacienți, care a făcut dificilă evaluarea a mai multor variabile sau numărul mic de studii la nivel de centre de Onco-Hematologie Pediatrică, cu care să îmi pot compara datele. Limitarea studiului 3 este numărul redus de pacienți, fiind nevoie de mai mulți copii diagnosticați cu LAL, pentru a avea o putere statistică mai mare. De asemenea, am analizat serurile pacienților doar la diagnostic, nu și pe parcursul tratamentului, dar acest lucru va fi studiat în viitor.

Avantajul major al studiului 3 este că, din cunoștințele mele, este primul studiu realizat în România a rolului miR în leucemia acută limfoblastică la populația pediatrică.

7. Concluzii generale

Introducerea testării MRD a fost un moment cheie în acest studiu, deoarece a condus la schimbări importante în stratificarea pe grupe de risc. Mai mulți pacienți au fost împărțiți în grupele de risc mediu și înalt, care a condus la administrarea chimioterapiei mai intense și, în unele cazuri, la transplant hematopoietic de celule stem, ceea ce a rezultat în îmbunătățirea supraviețuirii globale. Faptul că niciun pacient cu recidivă foarte precoce nu a intrat în remisie și a decedat, iar că toți pacienții cu recidive tardive au intrat în remisie completă este un detaliu important și merită explorat în profunzime.

Din rezultatele obținute, ratele de supraviețuire ale copiilor diagnosticați cu LAL indică o creștere constantă în timp, apropiindu-se de cele din țările dezvoltate europene. Supraviețuirea a crescut cu 2% în ultimii ani, însă acest studiu s-a desfășurat până în anul 2020, după acest interval fiind adoptate majoritatea terapiilor inovatoare în România.

Pacienții cu mai puțin de 25% blaști în aspiratul osteomedular în ziua 15 au avut OS și EFS mai mari la cinci ani decât cei care au avut MRD <10%, dar adevărata îmbunătățire a ratelor de supraviețuire a fost în rândul copiilor cu MRD >10% comparativ cu pacienții cu >25% blaști în aspiratul osteomedular (70% versus 40%).

Pacienții cu imunofenotip T sau cu număr mare de leucocite la diagnostic au suferit mai multe evenimente (recidivă, deces), însă toate evenimentele au survenit în primul an de la diagnostic. De asemenea, în ultimii ani am observat o creștere a supraviețuirii a pacienților cu imunofenotip T.

În cadrul cohortei analizate există diferențe între nivelurile de expresie relativă a miR-25 și miR-155, fiind mai mici pentru copiii care au răspuns la tratament, hiperexpresia acestora asociindu-se cu un prognostic infaust. Există corelații între supraviețuire, miR-21 și 25, iar miR-155 se corelează negativ cu supraviețuirea prin coeficientul de corelație.

8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Având în vedere faptul că în România există puține studii făcute despre leucemia acută limfoblastică la copii, studiile retrospective din această teză reprezintă o analiză detaliată a LAL dintr-un singur centru din țară. Am arătat faptul că introducerea testării bolii reziduale minime a produs o schimbare în stratificarea în grupe de risc, iar acest lucru a condus la o creștere a supraviețuirii din ultimii ani cu 2%.

De asemenea, analizarea nivelurilor de expresie a miR-21, miR-25 și miR-155 sugerează că diferențele de expresie se corelează cu supraviețuirea. Este primul studiu de acest fel realizat în România pe populația pediatrică diagnosticată cu leucemie acută limfoblastică și are potențial de cercetare mult mai detaliat în viitor. De asemenea, faptul că aceste miR-uri au putut fi determinate din ser, o metodă mult mai puțin dureroasă, spre deosebire de aspiratul osteomedular, au potențialul de a fi considerate adevărate biopsii lichide.

REFERINȚE

1. Saletta F, Seng MS, Lau LM. Advances in paediatric cancer treatment. *Transl Pediatr.* 2014;3(2):156-82.
2. Frei E, 3rd, Sallan SE. Acute lymphoblastic leukemia: treatment. *Cancer.* 1978;42(2 Suppl):828-38.
3. Thomas A. How can we improve on the already impressive results in pediatric ALL? Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book. 2015;2015(1):414-9.
4. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):2938-48.
5. Calderon-Hernandez J, Jarquin-Yanez L, Reyes-Arreguin L, Diaz-Padilla LA, Gonzalez-Compean JL, Gonzalez-Montalvo P, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia survival and spatial analysis of socio-environmental risks in Mexico. *Front Oncol.* 2023;13:1236942.
6. Jaime-Perez JC, Garcia-Arellano G, Herrera-Garza JL, Marfil-Rivera LJ, Gomez-Almaguer D. Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2019;41(1):57-61.
7. Tasian SK, Gardner RA. CD19-redirected chimeric antigen receptor-modified T cells: a promising immunotherapy for children and adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Ther Adv Hematol.* 2015;6(5):228-41.
8. Kebriaei P, Wilhelm K, Ravandi F, Brandt M, de Lima M, Ciurea S, et al. Feasibility of allografting in patients with advanced acute lymphoblastic leukemia after salvage therapy with inotuzumab ozogamicin. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013;13(3):296-301.
9. Hochberg J, Khaled S, Forman SJ, Cairo MS. Criteria for and outcomes of allogeneic haematopoietic stem cell transplant in children, adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission. *Br J Haematol.* 2013;161(1):27-42.
10. Gascoyne R, Campo E, Jaffe E, Swerdlow S, Harris N, Pileri S, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC. 2017.
11. Behm FG. Classification of acute leukemias: perspective 2. *Treatment of Acute Leukemias: New Directions for Clinical Research: Springer;* 2003. p. 43-58.
12. Antony R, Roebuck D, Hann IM. Unusual presentations of acute lymphoid malignancy in children. *Journal of the Royal Society of Medicine.* 2004;97(3):125-7.
13. Chang C-Y, Chiou T-J, Hsieh Y-L, Cheng S-N. Leukemic infiltration of the urinary bladder presenting as uncontrollable gross hematuria in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology.* 2003;25(9):735-9.

14. Sultan I, Kravaka JM, Lazarchick J. CD19 negative precursor B acute lymphoblastic leukemia presenting with hypercalcemia. *Pediatric blood & cancer*. 2004;43(1):66-9.
15. Pui C-H, Behm FG, Singh B, Schell MJ, Williams DL, Rivera GK, et al. Heterogeneity of presenting features and their relation to treatment outcome in 120 children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. 1990.
16. Jones OY, Spencer CH, Bowyer SL, Dent PB, Gottlieb BS, Rabinovich CE. A multicenter case-control study on predictive factors distinguishing childhood leukemia from juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics*. 2006;117(5):e840-e4.
17. Jonsson OG, Sartain P, Ducore JM, Buchanan GR. Bone pain as an initial symptom of childhood acute lymphoblastic leukemia: association with nearly normal hematologic indexes. *The Journal of pediatrics*. 1990;117(2):233-7.
18. Neglia JP, Day DL, Swanson TV, Ramsay NK, Robison LL, Nesbit Jr ME. Kidney size at diagnosis of childhood acute lymphocytic leukemia: lack of prognostic significance for outcome. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 1988;10(4):296-300.
19. Gaydos LA, Freireich EJ, Mantel N. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1962;266(18):905-9.
20. Calpin C, Dick P, Poon A, Feldman W. Is bone marrow aspiration needed in acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura to rule out leukemia? *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 1998;152(4):345-7.
21. Homans A, Cohen J, Barker B, Mazur E. Aplastic presentation of acute lymphoblastic leukemia: evidence for cellular inhibition of normal hematopoietic progenitors. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 1989;11(4):456-62.
22. Kikuchi M, Ohsaka A, Chiba Y, Sato M, Muraosa Y, Hoshino H. Bone marrow aplasia with prominent atypical plasmacytic proliferation preceding acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 1999;35(1-2):213-7.
23. Coupland SE. *Lymphoid Neoplasms: Classification Systems*. Ocular and Adnexal Lymphoma: Springer; 2013. p. 1-10.
24. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(1):44-54.
25. Felix C, Poplack D. Characterization of acute lymphoblastic leukemia of childhood by immunoglobulin and T-cell receptor gene patterns. *Leukemia*. 1991;5(12):1015-25.
26. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *The lancet oncology*. 2009;10(2):147-56.
27. Harrison CJ, Haas O, Harbott J, Biondi A, Stanulla M, Trka J, et al. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Münster study group. *British journal of haematology*. 2010;151(2):132-42.
28. Aldrich MC, Zhang L, Wiemels JL, Ma X, Loh ML, Metayer C, et al. Cytogenetics of Hispanic and White children with acute lymphoblastic leukemia in California. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006;15(3):578-81.
29. Wiemels J, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden O, Addison G, Masera G, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *The Lancet*. 1999;354(9189):1499-503.
30. Loh ML, Rubnitz JE. TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Current opinion in hematology*. 2002;9(4):345-52.

31. Forestier E, Heyman M, Andersen MK, Autio K, Blennow E, Borgström G, et al. Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *British journal of haematology*. 2008;140(6):665-72.
32. Jeha S, Pei D, Raimondi SC, Onciu M, Campana D, Cheng C, et al. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t (1; 19)/TCF3-PBX1. *Leukemia*. 2009;23(8):1406-9.
33. Hunger SP. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. 1996.
34. Cline MJ. The molecular basis of leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(5):328-36.
35. Muntean AG, Hess JL. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2012;7(1):283-301.
36. Slany RK. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica*. 2009;94(7):984.
37. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(10):3407-15.
38. Aricò M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(14):998-1006.
39. Schultz K, Carroll A, Heerema N, Bowman W, Aledo A, Slayton W, et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. *Leukemia*. 2014;28(7):1467-71.
40. Biondi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Castor A, Lucchini G, Gandemer V, et al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *The lancet oncology*. 2012;13(9):936-45.
41. Slayton WB, Schultz KR, Kairalla JA, Devidas M, Mi X, Pulsipher MA, et al. Dasatinib plus intensive chemotherapy in children, adolescents, and young adults with philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Results of children's oncology group trial AALL0622. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(22):2306-14.
42. Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, Yagasaki F, et al. Karyotype at diagnosis is the major prognostic factor predicting relapse-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib-combined chemotherapy. *Haematologica*. 2008;93(2):287-90.
43. Moorman AV, Schwab C, Ensor HM, Russell LJ, Morrison H, Jones L, et al. IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(25):3100-8.
44. Sutton R, Lonergan M, Tapp H, Venn N, Haber M, Norris M, et al. Two cases of hypereosinophilia and high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008;22(7):1463-5.
45. Zhang J, McCastlain K, Yoshihara H, Xu B, Chang Y, Churchman ML, et al. Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*. 2016;48(12):1481-9.

46. Gu Z, Churchman M, Roberts K, Li Y, Liu Y, Harvey RC, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature communications*. 2016;7(1):13331.
47. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, et al. ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *haematologica*. 2017;102(1):118.
48. Sulong S, Moorman AV, Irving JA, Strefford JC, Konn ZJ, Case MC, et al. A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;113(1):100-7.
49. Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia*. 2014;28(5):1015-21.
50. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *The lancet oncology*. 2009;10(2):125-34.
51. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(5):470-80.
52. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2017;130(19):2064-72.
53. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, Davidson GS, Bedrick EJ, et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2010;116(23):4874-84.
54. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(23):9414-8.
55. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell*. 2002;1(1):75-87.
56. Liu Y, Easton J, Shao Y, Maciaszek J, Wang Z, Wilkinson MR, et al. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*. 2017;49(8):1211-8.
57. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris IV JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-71.
58. Lemež P, Attarbaschi A, Béné MC, Bertrand Y, Castoldi G, Forestier E, et al. Childhood near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia: an EGIL study on 36 cases. *European journal of haematology*. 2010;85(4):300-8.
59. Pui C-H, Rebora P, Schrappe M, Attarbaschi A, Baruchel A, Basso G, et al. Outcome of children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia: a retrospective multinational study. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(10):770-9.

60. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Zhang T, Hutchinson RJ, Nachman JB, et al. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18(9):1876-87.
61. Paulsson K, Forestier E, Andersen MK, Autio K, Barbany G, Borgström G, et al. High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the NOPHO ALL 1992/2000 protocols. *haematologica*. 2013;98(9):1424.
62. Stary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E, Donska S, et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *Journal of clinical oncology*. 2014;32(3):174-84.
63. Castillo L, Janic D, Jazbec APDJ, Kaiserova E, Konja J, Kovacs G, et al. ALL IC-BFM 2009.
64. Stock W, Luger SM, Advani AS, Yin J, Harvey RC, Mullighan CG, et al. A pediatric regimen for older adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia: results of CALGB 10403. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2019;133(14):1548-59.
65. Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, Loh ML, Raetz EA, Salzer WL, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;126(8):964-71.
66. Schrappe M, Hunger SP, Pui C-H, Saha V, Gaynon PS, Baruchel A, et al. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(15):1371-81.
67. Maury S, Chevret S, Thomas X, Heim D, Leguay T, Huguët F, et al. Rituximab in B-lineage adult acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(11):1044-53.
68. Raetz EA, Cairo MS, Borowitz MJ, Lu X, Devidas M, Reid JM, et al. Re-induction chemoimmunotherapy with epratuzumab in relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL): phase II results from Children's Oncology Group (COG) study ADVL04P2. *Pediatric blood & cancer*. 2015;62(7):1171-5.
69. Löffler A, Kufer P, Lutterbüse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19× CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2000;95(6):2098-103.
70. von Stackelberg A, Locatelli F, Zugmaier G, Handgretinger R, Trippett TM, Rizzari C, et al. Phase I/phase II study of blinatumomab in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(36):4381-9.
71. Topp MS, Kufer P, Gökbuğet N, Goebeler M, Klinger M, Neumann S, et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(18):2493-8.
72. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(16):1507-17.

73. Maude SL. Tisagenlecleucel in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O*. 2018;16(10):664-6.
74. Qin H, Ramakrishna S, Nguyen S, Fountaine TJ, Ponduri A, Stetler-Stevenson M, et al. Preclinical development of bivalent chimeric antigen receptors targeting both CD19 and CD22. *Molecular Therapy-Oncolytics*. 2018;11:127-37.
75. Bhojwani D, Sposto R, Shah NN, Rodriguez V, Yuan C, Stetler-Stevenson M, et al. Inotuzumab ozogamicin in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2019;33(4):884-92.
76. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard therapy for acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(8):740-53.
77. Neaga A, Jimbu L, Mesaros O, Bota M, Lazar D, Cainap S, et al. Why Do Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Fare Better Than Adults? *Cancers (Basel)*. 2021;13(15).
78. Miller D, Leikin S, Albo V, Vitale L, Sather H, Coccia P, et al. Use of prognostic factors in improving the design and efficiency of clinical trials in childhood leukemia: Children's Cancer Study Group Report. *Cancer treatment reports*. 1980;64(2-3):381-92.
79. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;111(12):5477-85.
80. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2010;115(16):3206-14.
81. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, et al. Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *JAMA oncology*. 2017;3(7):e170580-e.
82. Chen X, Wood BL. How do we measure MRD in ALL and how should measurements affect decisions. Re: Treatment and prognosis? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2017;30(3):237-48.
83. Eapen M. Relapsed acute lymphoblastic leukemia: Is it crucial to achieve molecular remission prior to transplant? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2017;30(4):317-9.
84. Wood B, Wu D, Crossley B, Dai Y, Williamson D, Gawad C, et al. Measurable residual disease detection by high-throughput sequencing improves risk stratification for pediatric B-ALL. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2018;131(12):1350-9.
85. Pulsipher MA, Carlson C, Langholz B, Wall DA, Schultz KR, Bunin N, et al. IgH-V (D) J NGS-MRD measurement pre-and early post-allotransplant defines very low-and very high-risk ALL patients. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;125(22):3501-8.
86. Maimaitiyiming Y, Ye L, Yang T, Yu W, Naranmandura H. Linear and circular long non-coding RNAs in acute lymphoblastic leukemia: from pathogenesis to classification and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(8):4442.
87. Rodriguez PD, Paculova H, Kogut S, Heath J, Schjerven H, Frietze S. Non-coding RNA signatures of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(5):2683.

88. Ranjbar R, Karimian A, Aghaie Fard A, Tourani M, Majidinia M, Jadidi-Niaragh F, et al. The importance of miRNAs and epigenetics in acute lymphoblastic leukemia prognosis. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(4):3216-30.
89. Luan C, Yang Z, Chen B. The functional role of microRNA in acute lymphoblastic leukemia: relevance for diagnosis, differential diagnosis, prognosis, and therapy. *OncoTargets and therapy*. 2015;2903-14.
90. Kyriakidis I, Kyriakidis K, Tsezou A. MicroRNAs and the diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: systematic review, meta-analysis and re-analysis with novel small RNA-seq tools. *Cancers*. 2022;14(16):3976.
91. Sbirkov Y, Vergov B, Mehterov N, Sarafian V. miRNAs in lymphocytic leukaemias—the miRror of drug resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(9):4657.
92. Grobbelaar C, Ford AM. The role of MicroRNA in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: challenges for diagnosis and therapy. *Journal of Oncology*. 2019;2019(1):8941471.
93. Swellam M, El-Khazragy N. Clinical impact of circulating microRNAs as blood-based marker in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Tumor Biology*. 2016;37:10571-6.
94. El-Khazragy N, Noshi MA, Abdel-Malak C, Zahran RF, Swellam M. miRNA-155 and miRNA-181a as prognostic biomarkers for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(4):6315-21.
95. El-Khazragy N, Elshimy AA, Hassan SS, Matbouly S, Safwat G, Zannoun M, et al. Dysregulation of miR-125b predicts poor response to therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of cellular biochemistry*. 2019;120(5):7428-38.
96. Kyriakidis I, Kyriakidis K, Tsezou A. MicroRNAs and the Diagnosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Systematic Review, Meta-Analysis and Re-Analysis with Novel Small RNA-Seq Tools. *Cancers (Basel)*. 2022;14(16).
97. Deng W. Advancements in the Regulatory Role of microRNAs in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Mechanisms and Clinical Implications. *Technol Cancer Res Treat*. 2024;23:15330338241273143.
98. Lammens T, Ghazavi F, Speleman F, Benoit Y, De Moerloose B. MicroRNA-based diagnosis, prognosis and treatment of paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Belgian Journal of Hematology*. 2011;2(3):94-100.
99. Kaddar T, Chien W, Bertrand Y, Pages M, Rouault J, Salles G, et al. Prognostic value of miR-16 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia relationships to normal and malignant lymphocyte proliferation. *Leukemia Research*. 2009;33(9):1217-23.
100. Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Illades-Aguir B, Alarcon-Romero LDC, Saavedra-Herrera MV, Rivera-Ramirez AB, et al. High miR-24 expression is associated with risk of relapse and poor survival in acute leukemia. *Oncology reports*. 2015;33(4):1639-49.
101. Nemes K, Csóka M, Nagy N, Márk Á, Váradi Z, Dankó T, et al. Expression of certain leukemia/lymphoma related microRNAs and its correlation with prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pathology & Oncology Research*. 2015;21:597-604.
102. Li W, Zhang H, Assaraf YG, Zhao K, Xu X, Xie J, et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resistance Updates*. 2016;27:14-29.

103. Ghodousi ES, Rahgozar S. MicroRNA-326 and microRNA-200c: Two novel biomarkers for diagnosis and prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(7):6024-32.
104. Yan J, Jiang N, Huang G, Tay JLS, Lin B, Bi C, et al. Deregulated MIR 335 that targets MAPK 1 is implicated in poor outcome of paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2013;163(1):93-103.
105. Stumpel D, Schotte D, Lange-Turenhout E, Schneider P, Seslija L, de Menezes RX, et al. Hypermethylation of specific microRNA genes in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia: major matters at a micro scale. *Leukemia*. 2011;25(3):429-39.
106. Agirre X, Martínez-Climent JA, Odero M, Prosper F. Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia*. 2012;26(3):395-403.
107. Georgantas III RW, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu C-g, Heimfeld S, et al. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(8):2750-5.
108. Han B-W, Feng D-D, Li Z-G, Luo X-Q, Zhang H, Li X-J, et al. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Human molecular genetics*. 2011;20(24):4903-15.
109. Piatopoulou D, Avgeris M, Marmarinos A, Xagorari M, Baka M, Doganis D, et al. miR-125b predicts childhood acute lymphoblastic leukaemia poor response to BFM chemotherapy treatment. *British journal of cancer*. 2017;117(6):801-12.
110. Wang H, Gou X, Jiang T, Ouyang J. The effects of microRNAs on glucocorticoid responsiveness. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2017;143:1005-11.
111. Barrios-Palacios D, Organista-Nava J, Balandran JC, Alarcon-Romero LDC, Zubillaga-Guerrero MI, Illades-Aguiar B, et al. The Role of miRNAs in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse and the Associated Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2023;25(1).
112. Liu J, Chen Z, Cui Y, Wei H, Zhu Z, Mao F, et al. Berberine promotes XIAP-mediated cells apoptosis by upregulation of miR-24-3p in acute lymphoblastic leukemia. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(4):3298.
113. Scheibner KA, Teaboldt B, Hauer MC, Chen X, Cherukuri S, Guo Y, et al. MiR-27a functions as a tumor suppressor in acute leukemia by regulating 14-3-3 σ . *PloS one*. 2012;7(12):e50895.
114. Feng DD, Zhang H, Zhang P, Zheng YS, Zhang XJ, Han BW, et al. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(10):2164-75.
115. Tapeh BEG, Mohammadi A, Alivand MR, Solali S. Effect of Mimic Hypoxia on the Proliferation and Expression of miR-27a, miR-9, miR-370 and their Target Genes in MOLT-4 and KG1a Cell Lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2021;22(6):1975.
116. Schotte D, De Menezes RX, Moqadam FA, Khankahdani LM, Lange-Turenhout E, Chen C, et al. MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *haematologica*. 2011;96(5):703.
117. Moqadam FA, Lange-Turenhout E, Ariès I, Pieters R, Den Boer M. MiR-125b, miR-100 and miR-99a co-regulate vincristine resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*. 2013;37(10):1315-21.

118. Schmidt MV, Paez-Pereda M, Holsboer F, Hausch F. The prospect of FKBP51 as a drug target. *ChemMedChem*. 2012;7(8):1351-9.
119. Zhou L, Bai H, Wang C, Wei D, Qin Y, Xu X. microRNA-125b promotes leukemia cell resistance to daunorubicin by inhibiting apoptosis. *Molecular Medicine Reports*. 2014;9(5):1909-16.
120. So AY-L, Sookram R, Chaudhuri AA, Minisandram A, Cheng D, Xie C, et al. Dual mechanisms by which miR-125b represses IRF4 to induce myeloid and B-cell leukemias. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2014;124(9):1502-12.
121. Puissegur M, Eichner R, Quelen C, Coyaude E, Mari B, Lebrigand K, et al. B-cell regulator of immunoglobulin heavy-chain transcription (Bright)/ARID3a is a direct target of the oncomir microRNA-125b in progenitor B-cells. *Leukemia*. 2012;26(10):2224-32.
122. Verstreppe L, Verhelst K, van Loo G, Carpentier I, Ley SC, Beyaert R. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochemical pharmacology*. 2010;80(12):2009-20.
123. Rzepiel A, Horvath A, Kutszegi N, Gezsi A, Sagi JC, Almasi L, et al. MiR-128-3p as blood based liquid biopsy biomarker in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cell Probes*. 2023;67:101893.
124. Zhu Y, Yu F, Jiao Y, Feng J, Tang W, Yao H, et al. Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(22):7105-15.
125. Li M, Fu W, Wo L, Shu X, Liu F, Li C. miR-128 and its target genes in tumorigenesis and metastasis. *Experimental cell research*. 2013;319(20):3059-64.
126. Palumbo T, Fauch FR, Azevedo M, Xekouki P, Iliopoulos D, Stratakis CA. Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTEN-AKT pathway. *Oncogene*. 2013;32(13):1651-9.
127. Rzepiel A, Kutszegi N, Gezsi A, Sagi JC, Egyed B, Peter G, et al. Circulating microRNAs as minimal residual disease biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Med*. 2019;17(1):372.
128. Lv M, Zhang X, Jia H, Li D, Zhang B, Zhang H, et al. An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor- α and cAMP/PKA pathways. *Leukemia*. 2012;26(4):769-77.
129. Dahlhaus M, Roelf C, Ruck S, Lange S, Freund M, Junghanss C. Expression and prognostic significance of hsa-miR-142-3p in acute leukemias. *Neoplasma*. 2013;60(4):432-8.
130. Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, et al. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+ CD25- T cells and CD4+ CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO reports*. 2009;10(2):180-5.
131. Olivas-Aguirre M, Torres-López L, Pottosin I, Dobrovinskaya O. Overcoming glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia: repurposed drugs can improve the protocol. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:617937.
132. Liang C, Li Y, Wang L-N, Zhang X-L, Luo J-S, Peng C-J, et al. Up-regulated miR-155 is associated with poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia and promotes cell proliferation targeting ZNF238. *Hematology*. 2021;26(1):16-25.

133. Sun X, Guan G, Dai Y, Zhao P, Liu L, Wang Q, et al. microRNA-155-5p initiates childhood acute lymphoblastic leukemia by regulating the IRF4/CDK6/CBL axis. *Laboratory Investigation*. 2022;102(4):411-21.
134. Pouyanrad S, Rahgozar S, Ghodousi ES. Dysregulation of miR-335-3p, targeted by NEAT1 and MALAT1 long non-coding RNAs, is associated with poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Gene*. 2019;692:35-43.
135. Lehmann U. Aberrant DNA methylation of microRNA genes in human breast cancer—a critical appraisal. *Cell and tissue research*. 2014;356:657-64.
136. Pils D, Tong D, Hager G, Obermayr E, Aust S, Heinze G, et al. A combined blood based gene expression and plasma protein abundance signature for diagnosis of epithelial ovarian cancer—a study of the OVCAD consortium. *Bmc Cancer*. 2013;13:1-13.
137. Chakravarty D, Sboner A, Nair SS, Giannopoulou E, Li R, Hennig S, et al. The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. *Nature communications*. 2014;5(1):5383.
138. Wang Z, Katsaros D, Biglia N, Shen Y, Fu Y, Loo LW, et al. High expression of long non-coding RNA MALAT1 in breast cancer is associated with poor relapse-free survival. *Breast cancer research and treatment*. 2018;171:261-71.
139. Chen L, Shi Y, Li J, Yang X, Li R, Zhou X, et al. LncRNA CDKN2B-AS1 contributes to tumorigenesis and chemoresistance in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia through miR-335-3p/TRAF5 axis. *Anti-Cancer Drugs*. 2020.
140. Freyer CW. Tisagenlecleucel: the first CAR on the highway to remission for acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the advanced practitioner in oncology*. 2018;9(5):537.
141. Zhang Q, Hu H, Chen S-Y, Liu C-J, Hu F-F, Yu J, et al. Transcriptome and regulatory network analyses of CD19-CAR-T immunotherapy for B-ALL. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. 2019;17(2):190-200.
142. Pui C-H. Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers of medicine*. 2020;14(6):689-700.
143. Jaime-Pérez JC, García-Arellano G, Herrera-Garza JL, Marfil-Rivera LJ, Gómez-Almaguer D. Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center. *Hematology, transfusion and cell therapy*. 2019;41(1):57-61.
144. Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):407-16.
145. Radu LE, Colita A, Pasca S, Tomuleasa C, Popa C, Serban C, et al. Day 15 and Day 33 Minimal Residual Disease Assessment for Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated According to the BFM ALL IC 2009 Protocol: Single-Center Experience of 133 Cases. *Front Oncol*. 2020;10:923.
146. Contreras Yametti GP, Ostrow TH, Jasinski S, Raetz EA, Carroll WL, Evensen NA. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: current practice and future directions. *Cancers*. 2021;13(8):1847.
147. Stock W. Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology 2010, the American Society of Hematology Education Program Book*. 2010;2010(1):21-9.
148. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang YL, Pei D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1005-15.

149. Fang Q, Song Y, Gong X, Wang J, Li Q, Liu K, et al. Gene Deletions and Prognostic Values in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Oncol.* 2021;11:677034.
150. Russell LJ, Enshaei A, Jones L, Erhorn A, Masic D, Bentley H, et al. IGH@ translocations are prevalent in teenagers and young adults with acute lymphoblastic leukemia and are associated with a poor outcome. *J Clin Oncol.* 2014;32(14):1453-62.
151. Alecsa MS, Moscalu M, Trandafir LM, Ivanov AV, Rusu C, Miron IC. Outcomes in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia-A Single-Center Romanian Experience. *J Clin Med.* 2020;9(12).
152. Brenner H, Hakulinen T. On crude and age-adjusted relative survival rates. *Journal of clinical epidemiology.* 2003;56(12):1185-91.
153. Commission E. Revision of the European Standard Population — Report of Eurostat's task force 2013;Population and social conditions 121.
154. Mogensen H, Erdmann F, Mader L, Vrelits Sorensen G, Talback M, Tjornelund Nielsen T, et al. Early mortality in children with cancer in Denmark and Sweden: The role of social background in a setting with universal healthcare. *Int J Cancer.* 2024;154(10):1719-30.
155. World Bank Country and Lending Groups [cited 2024 10.08.2024]. Available from: <https://datahelpdesk.worldbank.org/knowledgebase/articles/906519-world-bank-country-and-lending-groups>.
156. ROMANIAN NATIONAL REGISTRY FOR PEDIATRIC ONCOLOGY AND HEMATOLOGY <https://www.daruiestearipi.ro/en/2024> [cited 2024 04.08.2024]. EXECUTIVE REPORT 2010 - 21]. Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpgclcfndmkaj/<https://www.daruiestearipi.ro/wp-content/uploads/2024/05/Raport-RNOHP-cu-studiu-2024.pdf>.
157. Correa BT, Silva GSS, Mendes WJS, Maia AM, Aleluia ACM, Fonseca TCC, et al. Association of the clinical profile and overall survival of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Front Pediatr.* 2023;11:1223889.
158. Papadantonakis N, Advani AS. Recent advances and novel treatment paradigms in acute lymphocytic leukemia. *Ther Adv Hematol.* 2016;7(5):252-69.
159. Ledford H. The perfect blend. *Nature.* 2016;532(7598):162-4.
160. Hallbook H, Gustafsson G, Smedmyr B, Soderhall S, Heyman M, Swedish Adult Acute Lymphocytic Leukemia G, et al. Treatment outcome in young adults and children >10 years of age with acute lymphoblastic leukemia in Sweden: a comparison between a pediatric protocol and an adult protocol. *Cancer.* 2006;107(7):1551-61.
161. Hocking J, Schwarzer AP, Gasiorowski R, Patil S, Avery S, Gibson J, et al. Excellent outcomes for adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia and lymphoma without allogeneic stem cell transplant: the FRALLE-93 pediatric protocol. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(12):2801-7.
162. Sallan SE. Myths and lessons from the adult/pediatric interface in acute lymphoblastic leukemia. *ASH Education Program Book.* 2006;2006(1):128-32.
163. Litzow M, Kenderian. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults – from genomics to the clinics. *Clinical Oncology in Adolescents and Young Adults.* 2013.
164. Devine S, Dagher RN, Weiss KD, Santana VM. Good clinical practice and the conduct of clinical studies in pediatric oncology. *Pediatric Clinics of North America.* 2008;55(1):187-209.

165. Ali S, Moreau A, Melchiorri D, Camarero J, Josephson F, Olimpier O, et al. Blinatumomab for Acute Lymphoblastic Leukemia: The First Bispecific T-Cell Engager Antibody to Be Approved by the EMA for Minimal Residual Disease. *Oncologist*. 2020;25(4):e709-e15.
166. DeAngelo DJ, Jabbour E, Advani A. Recent Advances in Managing Acute Lymphoblastic Leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2020;40:330-42.
167. Amankwah EK, Devidas M, Teachey DT, Rabin KR, Brown PA. Six candidate miRNAs associated with early relapse in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer research*. 2020;40(6):3147-53.
168. Boldrin E, Gaffo E, Niedermayer A, Boer JM, Zimmermann M, Weichenhan D, et al. MicroRNA-497/195 is tumor suppressive and cooperates with CDKN2A/B in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2021;138(20):1953-65.
169. Chaber R, Gurgul A, Tabarkiewicz J, Wrobel G, Szmatoła T, Jasielczuk I, et al. MicroRNA gene methylation landscape in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Adv Clin Exp Med*. 2022;31(3):293-305.
170. Di Pace AL, Pelosi A, Fiore PF, Tumino N, Besi F, Quatrini L, et al. MicroRNA analysis of Natural Killer cell-derived exosomes: the microRNA let-7b-5p is enriched in exosomes and participates in their anti-tumor effects against pancreatic cancer cells. *Oncoimmunology*. 2023;12(1):2221081.
171. Egyed B, Horvath A, Semsei AF, Szalai C, Muller J, Erdelyi DJ, et al. Co-Detection of VEGF-A and Its Regulator, microRNA-181a, May Indicate Central Nervous System Involvement in Pediatric Leukemia. *Pathol Oncol Res*. 2022;28:1610096.
172. Fayed D, Donia T, El-Shanshory M, Ali EMM, Mohamed TM. Evaluation of MicroRNA92, MicroRNA638 in Acute Lymphoblastic Leukemia of Egyptian Children. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021;22(5):1567-72.
173. Gebarowska K, Mroczek A, Kowalczyk JR, Lejman M. MicroRNA as a Prognostic and Diagnostic Marker in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2021;22(10).
174. Iwakawa H-o, Tomari Y. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends in cell biology*. 2015;25(11):651-65.
175. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:402.
176. Amankwah EK, Devidas M, Teachey DT, Rabin KR, Brown PA. Six Candidate miRNAs Associated With Early Relapse in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Anticancer Res*. 2020;40(6):3147-53.
177. Hastings ML, Palma J, Duelli DM. Sensitive PCR-based quantitation of cell-free circulating microRNAs. *Methods*. 2012;58(2):144-50.
178. Bustin SA. Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE. *Methods*. 2010;50(4):217-26.
179. Racz GA, Nagy N, Tovari J, Apati A, Vertessy BG. Identification of new reference genes with stable expression patterns for gene expression studies using human cancer and normal cell lines. *Sci Rep*. 2021;11(1):19459.
180. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008;14(5):844-52.
181. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
182. Shahid S, Shahid W, Shaheen J, Akhtar MW, Sadaf S. Circulating miR-146a expression as a non-invasive predictive biomarker for acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep*. 2021;11(1):22783.

183. Yuan D, Wu S, Huang S, Jiang W, Ke Y. Association between expression of plasma miRNA and the risk of childhood acute lymphocytic leukemia. *Zhonghua liu Xing Bing xue za zhi= Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi*. 2017;38(9):1252-8.
184. Labib HA, Elantouny NG, Ibrahim NF, Alnagar AA. Upregulation of microRNA-21 is a poor prognostic marker in patients with childhood B cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2017;22(7):392-7.

ANEXE

Anexa 1: Populația europeană standard

GRUPE DE VÂRSTĂ (ANI)	POPULAȚIA EUROPEANĂ STANDARD	PONDEREA POPULAȚIEI
0	1 000	0,233
1-4	4000	0,256
5-9	5500	0,256
10-14	5500	0,256
15-19	5500	0,233