

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

DEZVOLTAREA PROGRAMULUI DE DIAGNOSTIC
MOLECULAR ȘI STRATIFICARE PROGNOȘTICĂ ÎN
LEUCEMIA ACUTĂ MIELOIDĂ

STUDIUL LEUCEMIILOR ACUTE *FLT3*-ITD

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducătorul de doctorat:

PROF. UNIV. DR. VLĂDĂREANU ANA MARIA

Student-doctorand:

SOARE DAN-SEBASTIAN

2024

Cuprins

Partea generală

1. Capitolul 1: Leucemiile acute mieloide: diagnostic, clasificare.....4
2. Mutațiile *FLT3*-ITD și *NPM1*.....6

Contribuții personale

3. Ipoteza de lucru și obiectivele principale.....10
4. Metodologia generală a cercetării.....12
5. Implementarea testării moleculare a LAM.....14
6. Raportul alelic *FLT3*-ITD determinat pe ADN, dar nu nivelurile de ARNm *FLT3*-ITD, influențează caracteristicile biologice ale pacienților cu LAM.....17
7. Expresia CD7, CD33 și CD123 nu se corelează cu nivelurile de ADN și ARNm *FLT3*-ITD în LAM.....21
8. Concluzii și contribuții personale.....26

- Bibliografie.....31**

LISTA LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

1. **Dan S Soare**, Eugen Radu, Ion Dumitru, Aurora Arghir, Cristina Enache, Horia Bumbea, Ana M Vlădăreanu – FLT3-ITD DNA allelic burden, but not mRNA levels, influences the biological characteristics of AML patients. Revista Română de Medicină de Laborator, 2021;29(1):33-41. Factor de impact (Clarivate) 2023: 0.5. doi: 10.2478/rrml-2021-004. <https://rrml.ro/articole/download.php?ID=606> .
(**Capitolul 6**)
2. **Dan-Sebastian Soare**, Eugen Radu, Ion Dumitru, Viola Maria Popov, Horia Bumbea, Ana Maria Vlădăreanu - FLT3-ITD DNA and mRNA levels in AML do not correlate with CD7, CD33 and CD123 expression. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020 Iulie; 24(13):7675-7679. Factor de impact (Clarivate) 2023: 4.3. doi: [10.1111/jcmm.15255](https://doi.org/10.1111/jcmm.15255). (**Capitolul 7**)

Capitolul 1 – Leucemiile acute mieloidă: diagnostic, clasificare

1.1 Introducere

Leucemia acută mieloidă (LAM) este o afecțiune malignă clonală, caracterizată prin proliferarea și acumularea de blaști leucemici în măduva osoasă hematogenă. Consecința primară a proliferării și a acumulării blaștilor este modificarea micromediului măduvei osoase și supresia hematopoiezei normale [1–3], pacienții astfel prezentând diferite simptome sau complicații date de insuficiența medulară secundară, respectiv secundare anemiei, trombocitopeniei, scăderea imunității și/sau coagulopatiei asociate.

1.2 Clasificare și evaluare prognostică

Clasic, leucemia acută mieloidă (LAM) se definește prin prezența de celule blastice peste 20% din totalul celulelor nucleate din probe de aspirat medular și/sau sânge periferic.

În anul 2022, au fost publicate noile criterii de diagnostic al neoplaziilor mieloidă: a 5-a Ediție a Clasificării Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) a Neoplaziilor Mieloidă și Dendritice [4], și Consensul Internațional de Clasificare a Neoplasmelor Mieloidă și a Leucemiilor Acute [5]. În aceste clasificări, pragul de 20% de blaști mieloidi necesar diagnosticului de LAM a fost modificat astfel: în cazul prezenței mutațiilor recurente determinante (driver) LAM, pragul necesar diagnosticului de LAM a fost scăzut sub 20% [4,5]. Pentru LAM care nu sunt pozitive pentru nici una din mutațiile determinante recurente pragul este menținut la minim 20% blaști leucemici pentru diagnosticul de LAM.

De asemenea a fost propusă o nouă entitate, SMD/LAM (sindrom mielodisplazic/leucemie acută mieloidă) de către Consensul Internațional de Clasificare a Neoplasmelor Mieloidă și a Leucemiilor Acute din 2022 [5]. Afecțiunea SMD/LAM este definită prin absența mutațiilor recurente determinante specifice LAM și care prezintă un procent de celule blastice între 10 și 19% [4,5].

Lista mutațiilor determinante este prezentată comparativ, între cele două articole [4,5], în **Tabelul 1.1**. Excepțiile mutațiilor determinante, de la aceste noi clasificări sunt:

- (i) cazurile de LAM cu translocția *BCR::ABL1*, unde se menține de minim 20% pentru diferențierea cazurilor de leucemie mieloidă cronică (LMC) fază accelerată mieloidă (10-19% blaști) de fază blastică mieloidă ($\geq 20\%$ blaști) [4,5]
- (ii) conform a 5-ei Clasificării OMS 2022 [4], este LAM cu mutații *CEBPA*, care necesită un procent de 20% de blaști mieloidi pentru diagnostic.

Tabel 1.1 Prezentarea comparativă a noilor clasificări a leucemiilor acute mieloide conform mutațiilor recurente

Clasificare OMS a Neoplaziilor Mieloide și Dendritice, a 5-a ediție 2022 [4]	Consensul Internațional de Clasificare a Neoplasmelor Mieloide și a Leucemiilor Acute 2022 [5]
LAP cu fuziunea <i>PML::RARA</i> , <20% blaști	LAP cu t(15;17)(q24.1;q21.2)/ <i>PML::RARA</i> ≥10% blaști LAP cu alte rearanjamente <i>RARA</i> ≥10% blaști
LAM cu fuziunea <i>RUNX1::RUNX1T1</i> , <20% blaști	LAM cu t(8;21)(q22;q22.1) / <i>RUNX1::RUNX1T1</i> ≥10% blaști
LAM cu fuziunea <i>CBFB::MYH11</i> , <20% blaști	LAM cu inv(16)(p13.1q22) sau t(16;16)(p13.1;q22) / <i>CBFB::MYH11</i> , ≥10% blaști
LAM cu fuziunea <i>DEK::NUP214</i> , <20% blaști	LAM cu t(6;9)(p22.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> , ≥ 10% blaști
LAM cu rearanjamente <i>KMT2A</i> , <20% blaști	LAM cu t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> ≥10% blaști LAM cu alte rearanjamente <i>KMT2A</i> ≥10% blaști
LAM cu rearanjamente <i>MECOM</i> , <20% blaști	LAM cu inv(3)(q21.3q26.2) sau t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2::MECOM</i> ≥10% blaști LAM cu alte rearanjamente <i>MECOM</i> ≥10% blaști
LAM cu fuziunea <i>BCR::ABL1</i> , ≥20% blaști	LAM cu t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> ≥20% blaști
LAM cu fuziunea <i>RBM15::MRTFA</i> , <20% blaști	LAM cu alte translocatii recurente rare* ≥10% blaști
LAM cu rearanjamente <i>NUP98</i> , <20% blaști	
LAM cu alte modificări genetice determinante	
LAM cu mutația <i>NPM1</i> , indiferent de procentul de blaști	LAM cu mutație <i>NPM1</i> ≥10% blaști
LAM cu mutația <i>CEBPA</i> , ≥20% blaști	LAM cu mutații în-cadru <i>CEBPA</i> bZIP ≥10% blaști
N/A	LAM cu <i>TP53</i> mutat ≥20% blaști SMD/LAM cu <i>TP53</i> mutat 10-19% blaști
LAM cu mutații asociate SMD, ≥20% blaști <ul style="list-style-type: none"> • Modificări citogenetice definatorii <ul style="list-style-type: none"> ○ Cariotip complex (≥3 modificări) ○ Deleție 5q sau pierderea brațului 5q datorită unei translocatii neechilibrate ○ Monosomia 7, deleției 7q, sau pierderea brațului 7q datorită unei translocatii neechilibrate ○ Deleție 12p sau pierderea brațului 12p datorită unei translocatii neechilibrate ○ Monosomia 13 sau deleție 13q ○ Deleție 17p sau pierderea brațului 17p datorită unei translocatii neechilibrate ○ Izocromozomul 17q ○ Idic(X)(q13) • Mutații somatice definatorii: <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i>, <i>ZRSR2</i> 	LAM cu mutații asociate mielodisplaziei ≥20% blaști SMD/LAM cu mutații asociate mielodisplaziei 10-19% blaști Definite prin mutațiile <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> sau <i>ZRSR2</i> LAM cu modificări cromozomiale asociate mielodisplaziei ≥20% blaști SMD/LAM cu modificări cromozomiale asociate mielodisplaziei 10-19% blaști Definite prin detecția: <ul style="list-style-type: none"> • cariotipului complex (≥ 3 modificări în absența altor modificării definatorii de clasă) • del(5q)/t(5q)/add(5q) • -7/del(7q) • +8 • del(12p)/t(12p)/add(12p) • i(17q) • -17/add(17p) sau del(17p) • del(20q) idic(X)(q13)

LAP – leucemia acută promielocitară, LAM – leucemia acută mieloidă, OMS – Organizația Mondială a Sănătății, SMD – sindrom mielodisplazic, N/A – Not Applicable (nu este aplicabil)

Capitolul 2 – Mutațiile *FLT3-ITD* și *NPM1*

2.1 Introducere

Conform datelor prezentate mai sus mutațiile *FLT3-ITD* și *NPM1* se asociază frecvent și alcătuiesc una dintre cele mai frecvente subtipuri de LAM. Din acest motiv în cadrul acestui capitol vor fi prezentate în detaliu ambele gene *FLT3* și *NPM1*, rolul lor fiziologic, cele mai frecvente mutații întâlnite, rolul lor în apariția leucemiilor acute.

2.2 Mutația *FLT3-ITD*

Cele mai frecvente mutații întâlnite la nivelul genei *FLT3* sunt inserții *in-frame* (care păstrează cadrul de citire al codonilor genei) prin duplicații în tandem la nivelul exonului 14 sau 15. Exonul 14 codifică porțiunea juxtamembranară a receptorului, iar exonul 15 codifică domeniul tirozin kinazic 1. Inserțiile raportate sunt înalt heterogene, având atât lungimi variabile între 6 și 281 perechi de baze (pb), cât și inserții variabile situate aleator în intervalul de aminoacizi 567-670 [6–13].

2.3 Mutația *NPM1*

Cea mai frecventă mutație în LAM este mutația *NPM1*, întâlnită în aproximativ 30% din cazuri [14,15]. Mutațiile descrise sunt inserții care modifică cadrul de citire (*frame-shift insertion mutations*) întâlnite la nivelul exonului 12. Cele mai frecvente mutații sunt inserțiile de 4 pb între nucleotidele 960 și 961 de tip A, B, D [16–20]. Principala consecință este localizarea predominant citoplasmatică a proteinei *NPM1* [16,21,22].

Modificările astfel induse secvenței de aminoacizi în cazul mutațiilor *NPM1* sunt [16–19,23]: (i) modificarea reziduurilor de triptofan (W) din pozițiile 288 și/sau 290 necesare semnalului de localizare nucleolară; și (ii) crearea unui noi secvențe de export nuclear (VSLRK).

Combinarea acestor două modificări este necesară pentru localizare predominant citoplasmatică a proteinei mutate *NPM1* [24].

2.5 Evaluarea prognostică *FLT3-ITD/NPM1*

În ghidurile ELN 2017 și ELN 2022 de management a pacienților cu LAM [15,25] toți pacienții trebuie evaluați pentru prezența mutațiilor *NPM1* și *FLT3-ITD* pentru stabilirea prognosticului. Modelul ELN 2017 [15] de stabilire a prognosticului genetic în LAM cu

mutațiile *NPM1* & *FLT3*-ITD, este bazat pe o serie de studii retrospective [26–30], în care evaluare semicantitativă a mutațiilor *FLT3*-ITD, prin determinarea raportului alelic dintre *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT, coroborată cu prezența sau absența mutației *NPM1* permite ajustarea prognosticului.

Astfel, pacienții *NPM1*^{poz} / *FLT3*-ITD pozitivi dar cu un raport alelic *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT de <0.5 (*FLT3*-ITD^{low}) prezintă o evoluție relativ asemănătoare cu pacienții *NPM1*^{poz} / *FLT3*-WT, ambele grupuri de pacienți fiind incluse în categoria de risc favorabil [27–29]. De asemenea, datorită evoluției favorabile a acestor pacienți, nu se recomandă consolidare prin allotransplant de celule stem hematopoietice (allo-TCSH) în prima remisie [15,30].

În privința pacienților *NPM1*^{poz}/*FLT3*-ITD pozitiv cu raport alelic *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT crescut $\geq 0,5$ (*FLT3*-ITD^{high}) și a pacienților *NPM1*^{neg}/*FLT3*-ITD^{low}, aceștia sunt incluși în categoria de risc genetic intermediar [27–29].

Iar pacienții *NPM1*^{neg} / *FLT3*-ITD^{high} prezintă cea mai agresivă evoluție [26], fiind incluși în categoria de risc advers. Totodată acești pacienți prezintă cel mai mare beneficiu în consolidării prin allo-TCSH în CR1 [30].

Cu toate acestea, o dată cu publicarea noului ghid ELN 2022 [25], s-a renunțat la evaluarea prognostică a cazurilor *FLT3*-ITD pe baza RA. Motivațiile renunțării la stratificarea prognostică pe baza RA au fost: (i) lipsa standardizării metodei de evaluare a RA, și (ii) datele publicate de K. Döhner *et al* [31], în care suplimentar s-a arătat că adăugarea TKI-ului midostaurin îmbunătățește semnificativ prognosticul, în special în cazul pacienților cu RA *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT ≥ 0.5 .

2.6 Imunofenotipul blaștilor leucemici *FLT3*-ITD și *NPM1*

Deși LAM cu *FLT3*-ITD nu este considerată o entitate distinctă în clasificarea OMS din 2016 a neoplaziilor mieloidă [32], pacienții cu LAM *FLT3*-ITD prezintă un imunofenotip specific – caracterizat prin expresia înaltă a proteinelor CD33 și CD123 [33–38]. În plus, într-un articol a fost arătată corelarea directă între nivelul de expresie al CD33 și CD123, și raportul alelic *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT [34]. Printre alți markeri de suprafață descriși a fi asociați cu LAM *FLT3*-ITD este și expresia crescută a CD7 [10,39–41].

LAM *NPM1* sunt considerate un subtip specific de LAM cu mutații recurente, prezentând cel mai frecvent două forme morfologice la debut [42]: fie (i) LAM fără diferențiere sau cu minimă diferențiere, corespunzător subtipurilor French-American-British (FAB) M0 și M1 – caracterizate prin expresie CD117⁺, CD33⁺, CD13^{+/-}; fie (ii) LAM mielomonocitară sau monoblastică/monocitară – caracterizate prin expresie CD14⁺, CD64⁺.

Indiferent de subtipul morfologic, imunofenotipul leucemiilor acute *NPM1* pozitive este caracterizat prin expresie înaltă/foarte înaltă a markerilor CD33 și CD123 [33–38]. Altă caracteristică este absența sau expresia scăzută a markerului CD34 [16,43,44] în cazul leucemiilor M0 sau M1 FAB, iar minoritatea de cazuri LAM *NPM1* pozitive cu expresie CD34 se asociază cu prognostic nefavorabil comparativ cu cazurile CD34 negative [45,46].

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 3 – Ipotezele de lucru și obiectivele principale

3.1 Ipotezele de lucru

Ipoteza I – Implementarea diagnosticului molecular al tuturor cazurilor de LAM poate duce la îmbunătățirea semnificativă a managementului pacienților prin:

- i. confirmarea diagnosticului imunofenotipic;
- ii. stratificarea prognostică genetică
 - administrarea de tratament țintit – inhibitori de tirozin kinază cu acțiune de blocare specifică a mutației *BCR::ABL1* sau *FLT3-ITD*);
 - permite selecția optimă a planului de tratament consolidare: chimioterapie în doză mare *sau* consolidare prin allotransplant de celulele stem;
- iii. permiterea studierii cazurilor de LAM și alcătuirea loturilor de studiu pentru generarea de date originale, astfel ducând la o mai bună înțelegere a populației locale de pacienți cu LAM comparativ cu datele publicate din alte țări.

Ipoteza II - Mutațiile recurente *FLT3-ITD* reprezintă una dintre cele mai frecvente mutații întâlnite în LAM, iar pacienții pozitivi prezintă anumite caracteristici biologice și clinice particulare. Studiul acestei mutații va putea permite:

- i. caracterizarea clinică și biologică în premieră a unei populații de pacienți din România pozitivă pentru mutația *FLT3-ITD*;
- ii. descrierea unor particularități sau noi caracteristici biologice ale acestei populații pozitive pentru *FLT3-ITD*;
- iii. potențialul de îmbunătățire a managementului cazurilor *FLT3-ITD*: dacă aspectele prezentate anterior se adevăresc, ele vor permite pe lângă o mai bună înțelegere a acestei patologii și generarea unor noi direcții de cercetare, care pot duce la îmbunătățirea managementului acestor pacienți.

3.2 Obiectivele principale ale tezei de doctorat

Pornind de la ipotezele de lucru, principalele obiective ale tezei de doctorat au fost:

- 1. Îmbunătățirea Diagnosticului LAM:** realizat prin implementarea diagnosticul molecular și evaluarea prezenței mutațiilor recurente în toate cazurile de LAM. Acest obiectiv ne va permite confirmarea diagnosticul imunofenotipic, stratificarea prognostică genetică și astfel optimiza planurile de tratament.

2. **Formarea de Loturi de Studiu:** crearea de loturi de studiu ale pacienților cu LAM, bazată pe implementarea diagnosticului molecular. Loturile astfel create vor putea fi folosite în scop de cercetare și pentru generarea de date originale.
3. **Studiul Cazurilor LAM diagnosticate în cadrul SUUB:** descrierea populației de pacienți cu LAM din România și compararea rezultatelor cu date publicate din alte țări.
4. **Caracterizarea Mutațiilor *FLT3-ITD*:** descrierea și caracterizarea pacienților din România pozitivi pentru mutația *FLT3-ITD* din punct de vedere al datelor clinice și biologice. Aceasta include identificarea particularităților și a posibilelor noi caracteristici clinice sau biologice specifice acestei populații.

Capitolul 4 – Metodologia generală a cercetării

4.1 Introducere

Protocolul diagnosticului inițial al tuturor cazurilor de leucemie acută, inclusiv al leucemiilor acute mieloide [4,15,25,47], are la bază o ordine bine stabilită a testelor efectuate, acestea fiind: (i) evaluare morfologică – incluzând colorațiile specifice, (ii) imunofenotipare, (iii) evaluare citogenetică, și (iv) teste de biologie moleculară.

4.2 Populațiile de studiu

Toți pacienții au beneficiat de diagnostic complet al leucemiilor acute prin Subprogramul de Diagnostic al Leucemiilor Acute. Toți pacienții și-au exprimat acordul pentru evaluările diagnostice și pentru utilizarea datelor, iar datele pacienților au fost utilizate conform regulilor de bună practică clinică (GCP – Good Clinical Practice) și a declarației de la Helsinki.

Principala populația de studiu din **Capitolul 5 – subcapitolul 5.5 (Epidemiologia mutațiilor recurente în lotul de pacienți evaluați diagnostic în cadrul SUUB)** este reprezentată de un lot de 336 de pacienți diagnosticați în cadrul SUUB cu LAM care au prezentat rezultate validate pentru toate cele șase mutații recurente investigate.

A doua populație de studiu din **Capitolul 5 – subcapitolul 5.6 (Descrierea și stratificarea prognostică a pacienților cu LAM a secției de hematologie SUUB)**, a fost alcătuită din 108 pacienți proprii secției de Hematologie SUUB care au prezentat rezultate validate pentru toate cele șase mutații recurente investigate și pentru care am dispus de date privind **investigațiile citogenetice**.

Populația de studiu pentru **Capitolul 6:** 117 pacienți diagnosticați în cadrul SUUB cu diagnosticul de LAM și la care dispuneam de **date paraclinice complete**, dintre care 32 de pacienți au fost diagnosticați cu mutația *FLT3*-ITD și un lot control de 83 de pacienți.

Populația de studiu pentru **Capitolul 7:** 146 pacienți diagnosticați în cadrul SUUB cu diagnosticul de LAM și la care dispuneam de **toate datele brute de imunofenotipare**, 42 pacienți au fost diagnosticați cu mutația *FLT3*-ITD și un lot control de 104 de pacienți.

4.3 Testarea *FLT3*-ITD

Pentru analiza *FLT3*-ITD a fost efectuată o amplificare prin reacția de polimerizare în lanț (PCR – polymerase chain reaction) hot start (cu inițiere la temperatură înaltă) din

probe de ADNg și ANDc cu primeri marcați cu fluorescent, urmată de electroforeză capilară și analiză de fragmente.

Mutațiile *FLT3*-ITD au fost considerate prezente dacă au fost detectați ampliconi mai lungi decât produsele *FLT3*-WT, atât pentru determinarea din ADN, cât și din ARNm (ANDc) pe sistemul de analiză genetică CEQ8000 (Beckman Coulter Marea Britanie, High Wycombe, Regatul Unit).

Raportul alelic *FLT3*-ITD (RA) a fost calculat din probele de ADNg ca raportul dintre $ASV^{FLT3-ITD}/ASV^{FLT3-WT}$. Pentru pacienții care au prezentat mai multe populații *FLT3*-ITD (≥ 2 ampliconi *FLT3*-ITD), raportul alelic a fost calculată prin însumarea ASV a fiecărei populație *FLT3*-ITD și apoi împărțirea la $ASV^{FLT3-WT}$. Cuantificarea nivelului de ARNm *FLT3*-ITD, a fost determinat sub forma unui raport ARNm (RR), fiind calculat precum RA.

Specific **Capitolului 7**, pentru a testa influența expresiei mutației *FLT3*-ITD asupra expresie antigenelor de suprafață, un al treilea parametru a fost calculat, raportul între **RR** (raportul ARNm de expresie) și RA (raportul alelic). Acest parametru determinat reprezintă abundența relativă a ARNm *FLT3*-ITD la ADNg, fiind calculat ca raportul RR/AR.

4.4 Testarea *NPM1*

Pentru analiza *NPM1* a fost efectuată o reacție PCT-hot start din probe de ADNg cu primeri marcați cu fluorescent. Primerii *NPM1* utilizați au acoperit regiunea care cuprinde intronul 10 și exonul 11 al genei *NPM1*, conform [26].

Mutațiile *NPM1* au fost considerate prezente dacă au fost detectați ampliconi mai lungi decât produsul *NPM1*-WT, prin electroforeză capilară și analiză de fragmente pe sistemul de analiză genetică CEQ8000 (Beckman Coulter Marea Britanie).

4.5 Analiza statistică

Testul t student a fost folosit pentru a compara seturi de date cu distribuție normală. Pentru seturile de date distribuție non-normală a fost utilizat testul Mann-Whitney U – inclusiv pentru a compara valorile MFI-urilor (media geometrică a valorilor intensității fluorescenței – mean fluorescent index). Corelația Spearman a fost utilizată pentru a evalua relația dintre diferite variabile continue. Variabilele categorice au fost analizate folosind testul chi-pătrat Pearson, sau testul exact Fischer unde a fost cazul. Valorile $P < 0.05$ au fost considerate a fi semnificative statistic, fiind utilizate doar valorile P bilaterale.

Capitolul 5 – Implementarea testării moleculare a LAM și Epidemiologia mutațiilor recurente în rândul pacienților diagnosticați cu LAM

5.1 Introducere

Protocolul de diagnostic al leucemiilor acute [4,15,25,47], se bazează pe o ordine bine stabilită a testelor efectuate: (i) evaluare morfologică, (ii) imunofenotipare, (iii) evaluare citogenetică, și (iv) teste de biologie moleculară. Metodele implementate au fost:

- testarea pentru gene de fuziune recurente în LAM – *CBFB::MYH11*; *RUNX1::RUNX1T1*; și *PML::RARA* prin reacție 2-step-PCR urmată de electroforeză microcapilară.
- ulterior testarea de genelor de fuziune recurente prin metodă real-time PCR multiplex

5.2 Epidemiologia mutațiilor recurente în lotul de pacienți evaluați diagnostic în cadrul SUUB

Între februarie 2015 și februarie 2023, au fost validate un total de 440 de probe pentru genele de fuziune, 466 de probe pentru mutația *NPM1*, și 501 de probe pentru mutația *FLT3-ITD*. Din totalul de 440 de rezultate validate pentru identificarea genelor de fuziune au fost pozitive: (i) 13/440 pentru *CBFB::MYH11* (2.95%); (ii) 18/440 pentru *RUNX1::RUNX1T1* (4.09%); (iii) 32/440 pentru *PML::RARA* (7.27%); și (iv) 9/440 pentru *BCR::ABL1* (2.04%).

Pentru analiza corectă a frecvenței celor șase mutații investigate în cadrul SUUB, au fost selectați doar pacienții care au prezentat rezultate validate pentru toate mutațiile recurente investigate. Astfel, au fost incluși un total de 336 pacienți. Din toate cele șase mutații evaluate, doar cinci mutații (*CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *PML::RARA*, *BCR::ABL1*, și *NPM1*) sunt considerate mutații determinante (driver) [15,48,49].

Un total de 145/336 (43.15%) din pacienți au fost pozitivi pentru cel puțin 1 mutație din cele 6 evaluate. Comparativ cu datele publicate anterior [15,48,49], frecvența mutațiilor recurente determinante în populația noastră este în general mai mică, însă proporțiile sunt menținute: cea mai frecventă mutație – *NPM1*, iar *PML::RARA* cea mai frecventă genă de fuziune **Figura 5.1**.

În **Figura 5.2**, este prezentată distribuția pe județe a celor 336 de cazuri care au beneficiat de evaluare moleculară completă în centrul nostru. Cele mai frecvente cazuri au fost din București – 121 cazuri, județul Dolj – 30 cazuri, județul Argeș – 29 de cazuri, și județul Teleorman – 16 cazuri.

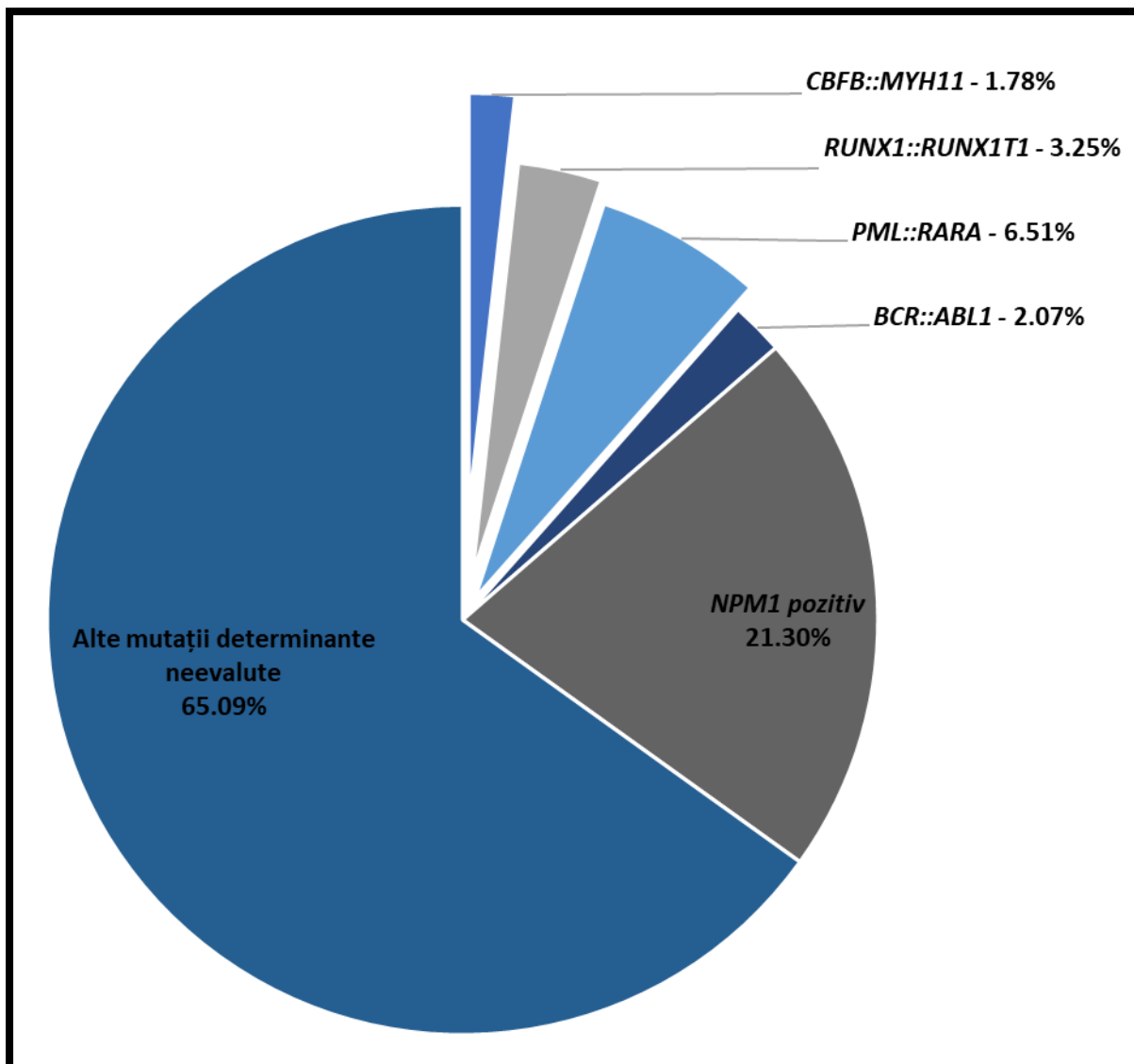


Figura 5.1 Diagramă circulară prezentând frecvențele mutațiilor determinante (driver) pentru LAM diagnosticate în cadrul SUUB. În perioada februarie 2015 – februarie 2023 un total de 336 pacienți au prezentat rezultate validate a evaluării prezenței mutațiilor recurente în LAM.

LAM – leucemie acută mieloidă, SUUB – Spitalul Universitar de Urgență București

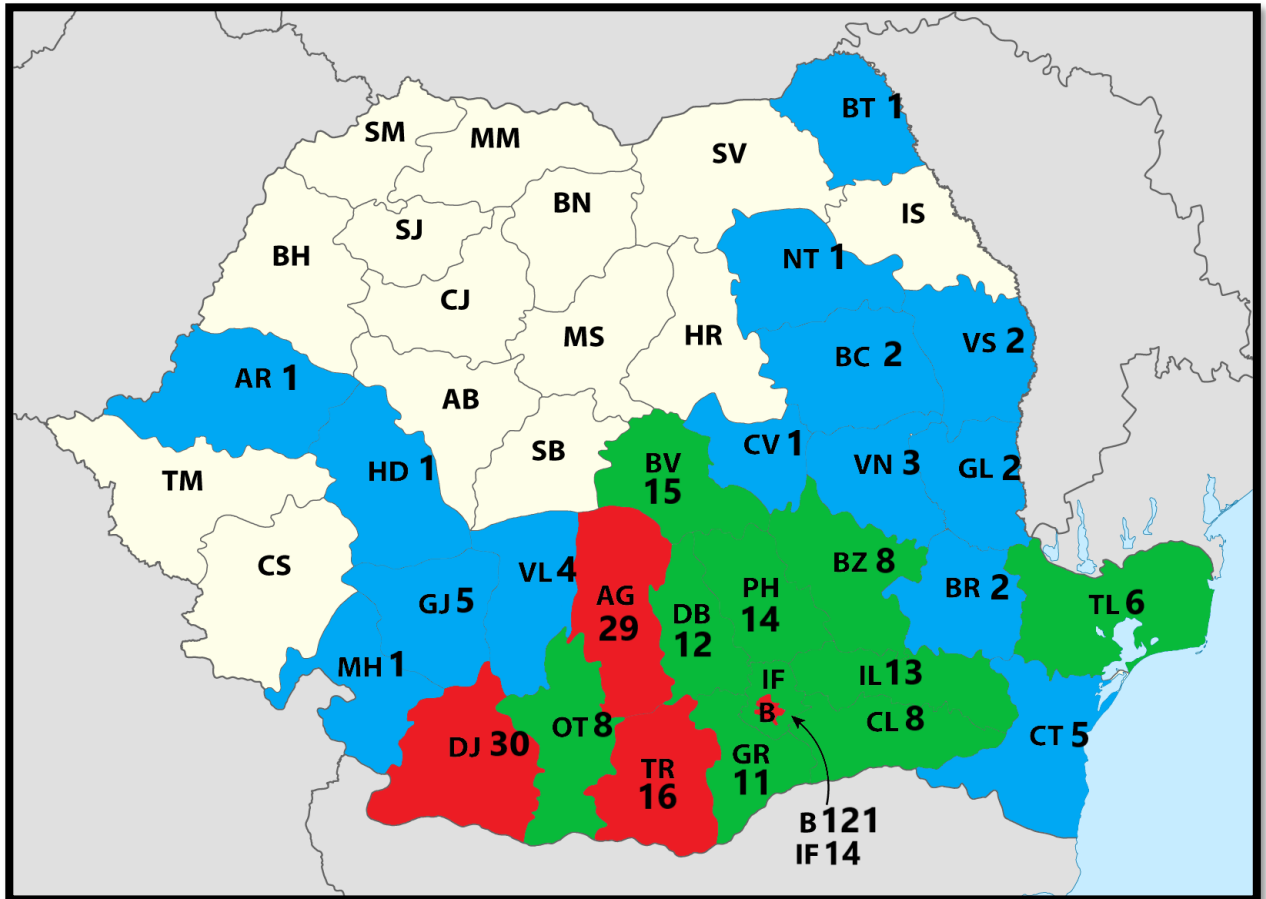


Figura 5.2 Distribuția pe județe a cazurilor de LAM care au beneficiat de evaluare moleculară completă în cadrul SUUB. În perioada februarie 2015 – februarie 2023 un total de 336 pacienți au prezentat rezultate validate a evaluării prezenței mutațiilor recurente în LAM. Cifrele din dreptul județelor reprezintă numărul total de cazuri de LAM diagnosticate în perioada respectivă de șase ani.

LAM – leucemie acută mieloidă, SUUB – Spitalul Universitar de Urgență București

5.4 Concluzii

Implementarea testării celor șase mutații recurente în LAM a permis diagnosticarea biomoleculară a aproape jumătate din cazurile evaluate 43.15% (145/336 cazuri).

Implementarea testării mutațiilor *FLT3*-ITD și *NPM1* prin reacție PCR multiplex cuplată cu electroforeză capilară a permis evaluarea simultană a două dintre cele mai frecvente mutații recurente în LAM, și ne-a permis determinarea raportului alelic *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT.

Implementarea diagnosticului molecular a permis încadrarea mai corectă a cazurilor de LAM în categoriile de risc genetic conform ELN 2017 [15] și ELN 2022 [25].

Capitolul 6 – Raportul alelic *FLT3*-ITD determinat pe ADN, dar nu nivelurile de ARNm *FLT3*-ITD, influențează caracteristicile biologice ale pacienților cu LAM

6.1 Introducere

Acest articol a fost publicat în Revista Română de Medicină de Laborator[50]

Mutațiile *FLT3*-ITD conferă un prognostic nefavorabil [51,52], iar ghidul European LeukemiaNet (ELN) din 2017 [15] recomandă ca fiecare pacient să fie testat pentru prezența mutației *FLT3*-ITD cu determinarea raportului alelic (RA) *FLT3*-ITD / *FLT3*-WT (*FLT3*-WT= *FLT3* wild type – alela normală a genei *FLT3*) pentru a stabili categoria de risc genetic.

În acest studiu, am evaluat dacă metoda curentă de evaluare a mutațiilor *FLT3*-ITD poate fi adaptat pentru analiza calitativă și semi-cantitativă a ARNm *FLT3*-ITD a probelor primare de LAM pentru adulți. De asemenea, am caracterizat și comparat diferiți parametri ai mutațiilor *FLT3*-ITD (lungime, raport ITD/WT) atât pentru ADN, cât și pentru ARNm, cu caracteristici demografice și biologice diferite ale populației noastre de pacienți.

6.2 Pacienți, materiale și metode

6.2.1 Pacienți

Dintr-un total de 42 de pacienți cu LAM diagnosticați cu *FLT3*-ITD între martie 2016 și iunie 2019, 32 de cazuri au avut probe de ARN total de bună calitate disponibile pentru analiză.

6.2.2 Evaluare *FLT3*-ITD și metode statistice

Metodele folosite în acest studiu, inclusiv determinările semi-cantitative ale mutației *FLT3*-ITD (AR, RR), și testele statistice folosite sunt descrise în **Capitolul 4 – Metodologia generală a cercetării**.

6.3 Rezultate

A existat o corelație foarte bună între lungimea mutației *FLT3*-ITD determinată din ADN și ARNm pentru primele populații mutante (coeficient Kendall $\tau_b = 0,937$, $P < 0,001$) și pentru populațiile mutante secundare (coeficient Kendall $\tau_b = 1,0$, $P < 0,001$). A existat o corelație puternică între *FLT3*-ITD/WT AR și RR (coeficient Kendall $\tau_b = 0,488$, $P < 0,001$).

6.3.1 Caracteristici biologice ale pacienților în funcție de parametri mutațiilor *FLT3*-ITD

Pentru a analiza relația dintre lungimea inserției ITD din probele de ADN și ARNm și parametrii clinici / biologici, au fost luați în considerare numai pacienții cu o singură

populație *FLT3*-ITD detectabilă. Pentru analiza RA *FLT3*-ITD/WT din ADN, pacienții au fost separați în două grupuri în funcție de valoarea RA pentru stratificarea riscului genetic ELN 2017 ($=0,5$) [15], astfel: un grup $RA < 0,5$ și un grup $RA \geq 0,5$. Pentru analiza RR *FLT3*-ITD/WT din ARNm, pacienții au fost separați în 2 grupuri în funcție de valoarea mediană a RR ($=0,72$) (**Tabelul 6.1**): un grup $RR < 0,7$ și un grup $RR \geq 0,7$.

Conform valorii RA, pacienții cu $RA \geq 0,5$ au prezentat un număr mai mare de leucocite (testul Mann-Whitney U, $P=0,01$), niveluri mai mari de LDH (testul Mann-Whitney U, $P=0,037$) și procente mai mari de blaști în sângele periferic (test t, $P = 0,023$) decât grupul $RA < 0,5$ (**Figura 6.1.A**). Am comparat în continuare numărul de leucocite, nivelurile de LDH și procentele de blaști din sângele periferic între grupul de control *FLT3*-ITD negativ și cele două grupuri RA. Am observat că nu au existat diferențe semnificative între grupul $RA < 0,5$ și grupul *FLT3*-ITD negativ (**Figura 6.1.A**). Nu au existat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri RR.

De asemenea, am efectuat o analiză de corelație bivariată între nivelurile RA și numărul de leucocite, valorile de LDH-ului și procentele de blaști din sângele periferic (**Figura 6.1.B**). Am observat corelații moderate, dar semnificative între nivelurile RA și cei trei parametri: (i) RA și număr de leucocite (Kendall $\tau_b = 0,384$, $P = 0,003$); (ii) RA și valorile LDH-ului (Kendall $\tau_b = 0,348$, $P = 0,011$); și (iii) procentele de blaști din sângele periferic (Kendall $\tau_b = 0,300$, $P = 0,036$).

6.4 Concluzii

Studiul nostru prezintă date noi privind utilitatea analizei *FLT3*-ITD pe bază de ARNm în contextul diagnosticării pacienților – testarea pe bază de ARNm fiind o alternativă datorită șansei mai mari de identificare a mutațiilor. Acest aspect este susținut de capacitatea de identificare a mai multor inserții ITD, cât și datorită faptului că RR este în general mai mare decât RA, fiind foarte util pentru confirmarea mutațiilor care prezintă o ASV $< 5\%$ pe testarea din ADN a prezenței *FLT3*-ITD.

Privind corelația dintre încărcătura mutațională *FLT3*-ITD și expresia de ARNm *FLT3*-ITD cu caracteristicile biologice ale pacienților – din rezultatele noastre se poate schița un posibil efect independent de doză al mutațiilor *FLT3*-ITD. Am observat diferențe semnificativ statistice doar între parametrii biologici și RA *FLT3*-ITD/-WT, care sugerează faptul că parametrii studiați sunt influențați doar de proporția celulelor *FLT3*-ITD pozitive și nu de nivelul de exprimare a ARNm *FLT3*-ITD.

Tabelul 6.1 Caracteristicile clinice și biologice ale pacienților pozitivi cu *FLT3*-ITD în funcție de raportul alelic *FLT3*-ITD/-WT (RA) și raportul ARNm *FLT3*-ITD/-WT (RR)

Caracteristică	<i>FLT3</i> -ITD/-WT RA <0.5 (n= 14)	<i>FLT3</i> -ITD/-WT RA ≥0.5 (n= 18)	P	<i>FLT3</i> -ITD/-WT RR <0.7 (n= 15)	<i>FLT3</i> -ITD/-WT RR ≥0.7 (n= 16)	P
Vârstă, ani	Mediana 68 Interval 27 – 80	Mediana 62 Interval 24 – 78	P= NS	Mediana 63 Interval 24 – 80	Mediana 65 Interval 29 – 78	NS
Sex B/F, n	4 / 10	9 / 9	P= NS	6 / 9	7 / 9	NS
Rural/Urban, n	4 / 10	10 / 8	P= NS	9 / 6	5 / 11	NS
Leucocite, x10 ⁹ /L	Mediana 29070 Interval 2610 – 150000	Mediana 98750 Interval 1860 – 287000	P= 0.01 [†]	Mediana 73 250 Interval 2 610 – 150 000	Mediana 50 855 Interval 1 860 – 287 000	NS
Hgb, g/dL	Mediana 7.5 Interval 6 – 10.7	Mediana 8.5 Interval 5.6 – 13.5	P= NS	Mediana 7.8 Interval 5.6 – 13.5	Mediana 8.25 Interval 5.6 – 11.6	NS
Trombocite, x10 ⁹ /L	Mediana 60 000 Interval 6 000 – 148 000	Mediana 32 500 Interval 13 000 – 103 000	P= NS	Mediana 23 000 Interval 8 000 – 148 000	Mediana 51 000 Interval 6 000 – 120 000	NS
LDH, UI/dL	Mediana 526 Interval 288 – 1617	Mediana 700 Interval 367 – 1613	P= 0.037 [†]	Mediana 535 Interval 333 – 1 617	Mediana 628 Interval 288 – 1 613	NS
Blaști sângele periferic, %	Mediana 27 Interval 0 – 92	Mediana 73.5 Interval 38 – 97	P= 0.023 [†]	Mediana 45 Interval 0 – 92	Mediana 76 Interval 20 – 97	NS
Blaști medulari, %	Mediana 60 Interval 32 – 95	Mediana 75 Interval 48 – 96	P= NS	Mediana 69 Interval 35 – 95	Mediana 67 Interval 32 – 96	NS
<i>NPM1</i> -MUT / total grup, n	9 / 14	8 / 10	P= NS	9 / 15	8 / 16	NS

[†]test t, ^{*}Mann-Whitney U-test, Interval= valori minime - maxime

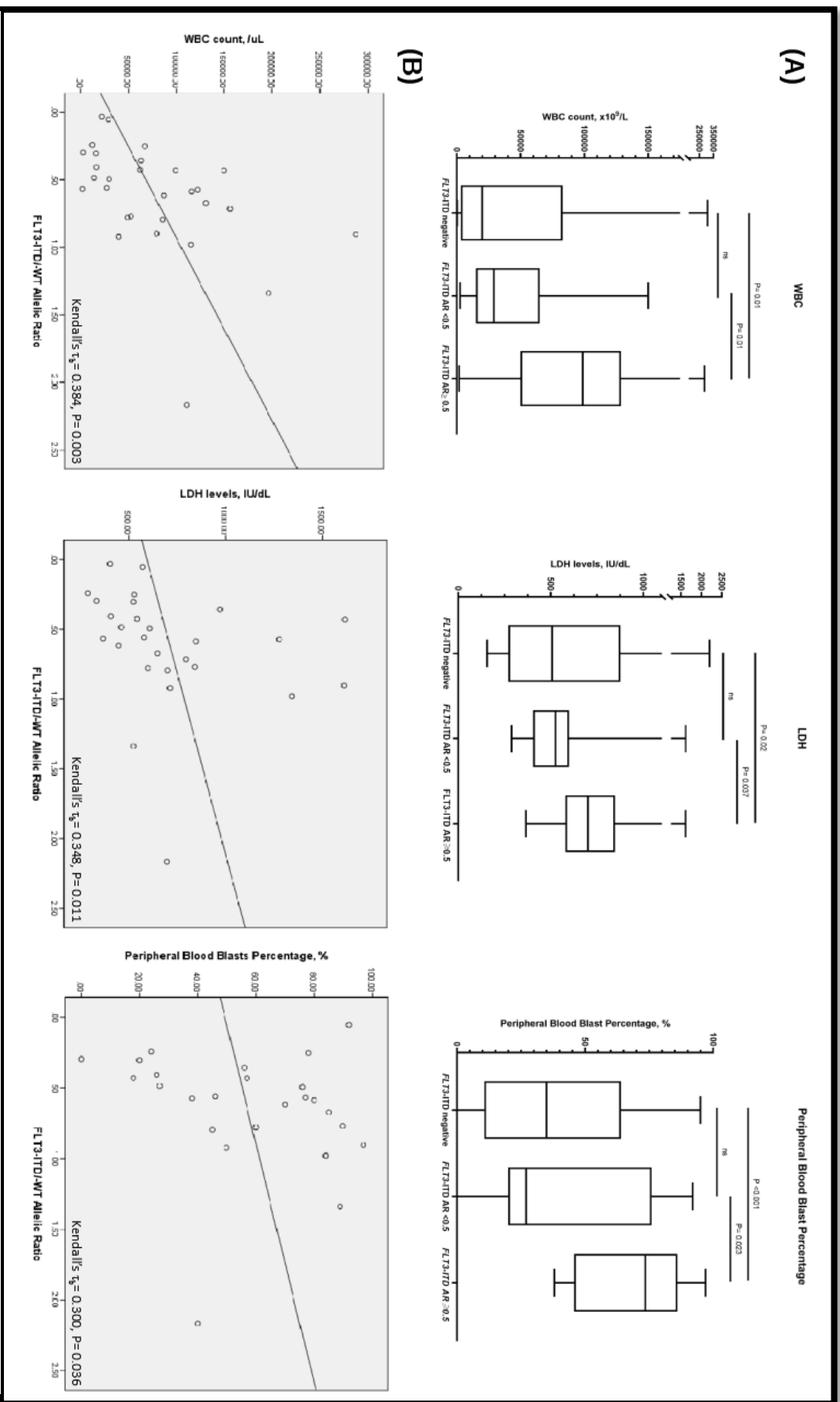


Figura 6.1 Raportul alelic FLT3-ITD și parametrii biologici. (A) Grafice box-plot care prezintă diferențele dintre grupul FLT3-ITD negativ, grupul RA scăzut <0,5 și grupul RA înalt $\geq 0,5$ pentru numărul de leucocite, valorile LDH-ului și procentul de blaști din sângele periferic. (B) Corelația dintre RA FLT3-ITD și numărul de leucocite, valorile LDH-ului și procentul de blaști din sângele periferic. RA= raport alelic

Capitolul 7 – Expresia CD7, CD33 și CD123 nu se corelează cu nivelurile de ADN și ARNm *FLT3-ITD* în LAM

7.1 Introducere

Datele prezentate în acest capitol au fost publicat în revista Journal of Cellular and Molecular Medicine[53].

La diagnostic, pacienții cu LAM *FLT3-ITD* prezintă un număr mare de leucocite, un procent mare de blaști în sângele periferic și în măduva osoasă. De asemenea, celulele leucemice *FLT3-ITD* au o expresie ridicată a CD33 și CD123 [34,54,55], care s-a dovedit a fi direct proporțională cu RA *FLT3-ITD/FLT3-WT* (AR) [34].

În acest studiu, am investigat expresia cantitativă a markerilor de suprafață celulară în LAM *FLT3-ITD* în cadrul populației noastre locale de pacienți diagnosticați și am evaluat impactul raporturilor ADN și ARNm dintre *FLT3-ITD/FLT3-WT* asupra nivelurilor de expresie a antigenelor de suprafață.

7.2 Pacienți, materiale și metode

7.2.1 Pacienții

Patruzeci și doi de pacienți cu LAM au fost diagnosticați cu *FLT3-ITD* în urma testării probelor de ADN. Dintre aceștia, 32 de pacienți au prezentat, probe de ARNm de bună calitate. Proba UPN-8334, a prezentat mutație *FLT3-ITD* identificată numai din proba de ADN, în timp ce pe proba de ARNm a fost detectat doar ampliconul *FLT3-WT*. În final, 31 de probe de ARNm au prezentat mutații *FLT3-ITD* și au fost analizate.

Un grup de control format din 104 pacienți *FLT3-ITD* negativi, a fost format selectați după sex, vârstă, subtip FAB, diagnostic citogenetic și statusul mutației *NPM1* comparativ cu pacienții *FLT3-ITD* pozitivi.

Toți pacienții și-au exprimat consimțământul informat în scris, iar studiul a fost realizat în conformitate cu Declarația de la Helsinki și ghidurile de bună practică clinică.

7.2.2 Imunofenotipare

Toate probele primare au fost analizate conform protocoalelor EuroFlow: (i) pregătirea probei, setarea instrumentului și calibrarea [56]; iar panelul de anticorpi, procedura de colorare și achiziția de date conform [57]. Probele au fost analizate pe un citometru FACSCanto II (BD Biosciences). Au fost înregistrate un total de 20000 de

evenimente per tub. Măsurătorile și analiza datelor dobândite au fost efectuate folosind software-ul FlowJo X (Tree Star, Ashland, OR, SUA). Strategia de gating s-a bazat pe poarta CD45/SSC (SSC – dispersia laterală, side scatter). Populațiile blastice leucemice au fost definite ca fiind CD45-mid și SSC-low. Verificarea strategiei de gating, populațiile selectate au fost retroverificate în funcție de expresia CD117, CD34 și HLA-DR.

Următoarele antigene au fost analizate: CD4, CD7, CD9, CD13, CD14, CD33, CD34, CD56, CD64, CD71, CD117 și CD123.

Expresia antigenică cantitativă de suprafață a fost determinată prin calcularea mediilor geometrice a intensităților fluorescenței (MFI) pentru populațiile de blaști leucemici a antigenelor selectate și normalizarea acestora la expresia determinată pe populațiile de limfocite de control (CD45-bright & SSC-low), negative pentru markerii respectivi, așa cum a fost descris anterior [34].

7.2.3 Testarea *FLT3*-ITD și metode statistice

Restul de metode folosite în acest studiu, inclusiv determinările semi-cantitative ale mutației *FLT3*-ITD (RA – **R**aport **A**lelic, RR – **R**aport **AR**Nm), și evaluarea statistică sunt descrise în **Capitolul 4 – Metodologia generală a cercetării**.

7.3 Rezultate

7.3.1 Profilul expresiei antigenice de suprafață specific mutațiilor *FLT3*-ITD

Cazurile *FLT3*-ITD pozitive au prezentat expresii semnificativ mai mari a antigenelor CD7, CD33 și CD123 în comparație cu grupul control *FLT3*-ITD negativ (testul U Mann-Whitney) – **Figura 7.1**.

7.3.2 Parametrii mutației *FLT3*-ITD & gruparea pacienților conform acestora

Pentru a analiza impactul RA asupra valorilor MFI, pacienții au fost separați în două grupuri conform stratificării riscului genetic ELN 2017 [15] într-un grup RA <0,5 (n= 16) și un grup RA ≥0,5 (n= 26). Pentru analiza impactului RR asupra expresiei antigenice pacienții au fost împărțiți în 2 grupuri în funcție de mediana RR (= 0,72): un grup RR <0,7 (n= 16) și un grup RR ≥0,7 (n= 15). Pentru analiza abundenței relative a ARNm *FLT3*-ITD la ADN (RR/RA), pacienții au fost separați în 2 grupuri în funcție de mediana RR/RA (= 1,27): un grup RR <1,3 (n= 16) și un grup RR ≥1,3 grup (n=15).

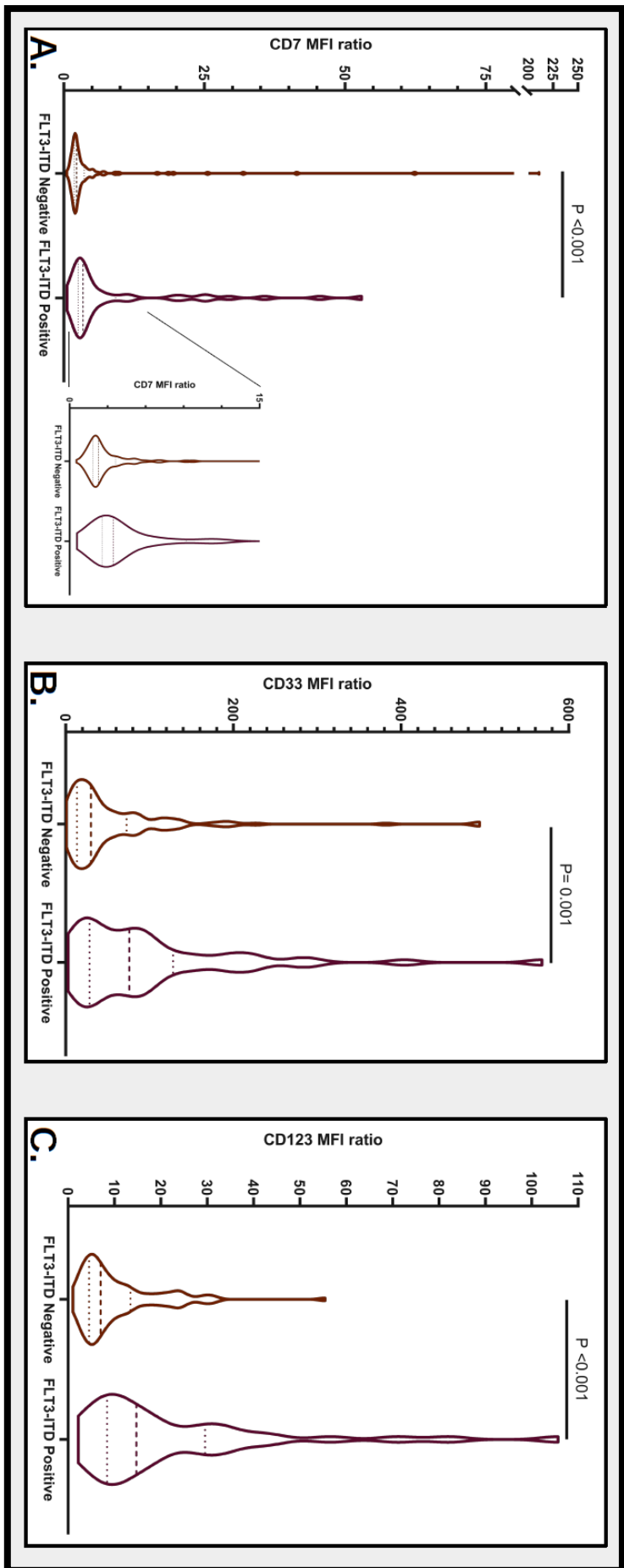


Figura 7.1 Valorile MFI pentru: **A.** CD7 (insert: detaliu al diagramei); **B.** CD33; și **C.** CD123 la pacienți cu LAM *FLT3-ITD* pozitivi vs. cei negativi. LAM – leucemie acută mieloidă; ITD – inserție prin duplicare în tandem (internal tandem duplication); MFI - media intensității fluorescenței (mean fluorescence intensity)

7.3.3 Parametri cantitativi ai mutațiilor *FLT3*-ITD în relație cu expresia antigenică de suprafață a CD7, CD33 și CD123

Pentru a evalua asocierea parametrilor cantitativi *FLT3*-ITD și expresia CD7, CD33 și CD123, pacienții pozitivi *FLT3*-ITD au fost grupați pentru fiecare parametru în două cohorte folosind următoarele valori de prag.

Singura diferență observată a fost între grupurile cu raportul RR/RA, grupul RR/RA înalt ($\geq 1,3$) prezentând valori mai mari ale CD33 decât grupul RR/RA scăzut (**Figura 7.2 C**). Nu au existat alte diferențe statistice între nivelurile CD7, CD33 și CD123 ale celorlalte grupuri *FLT3*-ITD comparativ cu grupul control (testul Mann-Whitney U), **Figura 7.2**.

De asemenea, am testat corelația bivariată între expresia CD7, CD33, CD123 și cei trei parametri cantitativi *FLT3*-ITD. A existat o corelație moderată între valorile MFI CD33 și valorile raportului RR/RA (ρ Spearman = 0,423. P = 0,01) (**Figura 7.2 D, E**).

7.5 Concluzii

În populația noastră de pacienți, mutațiile *FLT3*-ITD au fost asociate cu un profil specific de expresie antigenică constând din valori MFI ridicate pentru CD7, CD33, CD123. Cu toate acestea, nivelurile de expresie ale antigenelor specifice nu sunt influențate în mod evident de parametrii cantitativi ai mutațiilor *FLT3*-ITD, determinați atât pe probe de ADN cât și pe probele de ARNm. Astfel, expresia relativ crescută a antigenelor CD7, CD33, și CD123 este mai probabil secundară doar prezenței mutației *FLT3*-ITD.

Spre deosebire de datele publicate anterior, în care a fost descrisă o relație directă semnificativ statistică între raportul alelic *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT și expresia antigenică de CD33 și CD123, în lotul nostru de pacienți nu a fost observată această asociere. Acest fapt poate fi secundar diferențelor dintre cele două loturi de pacienți.

Studii suplimentare sunt necesare pentru elucidarea impactului mutației *FLT3*-ITD asupra expresiei antigenice.

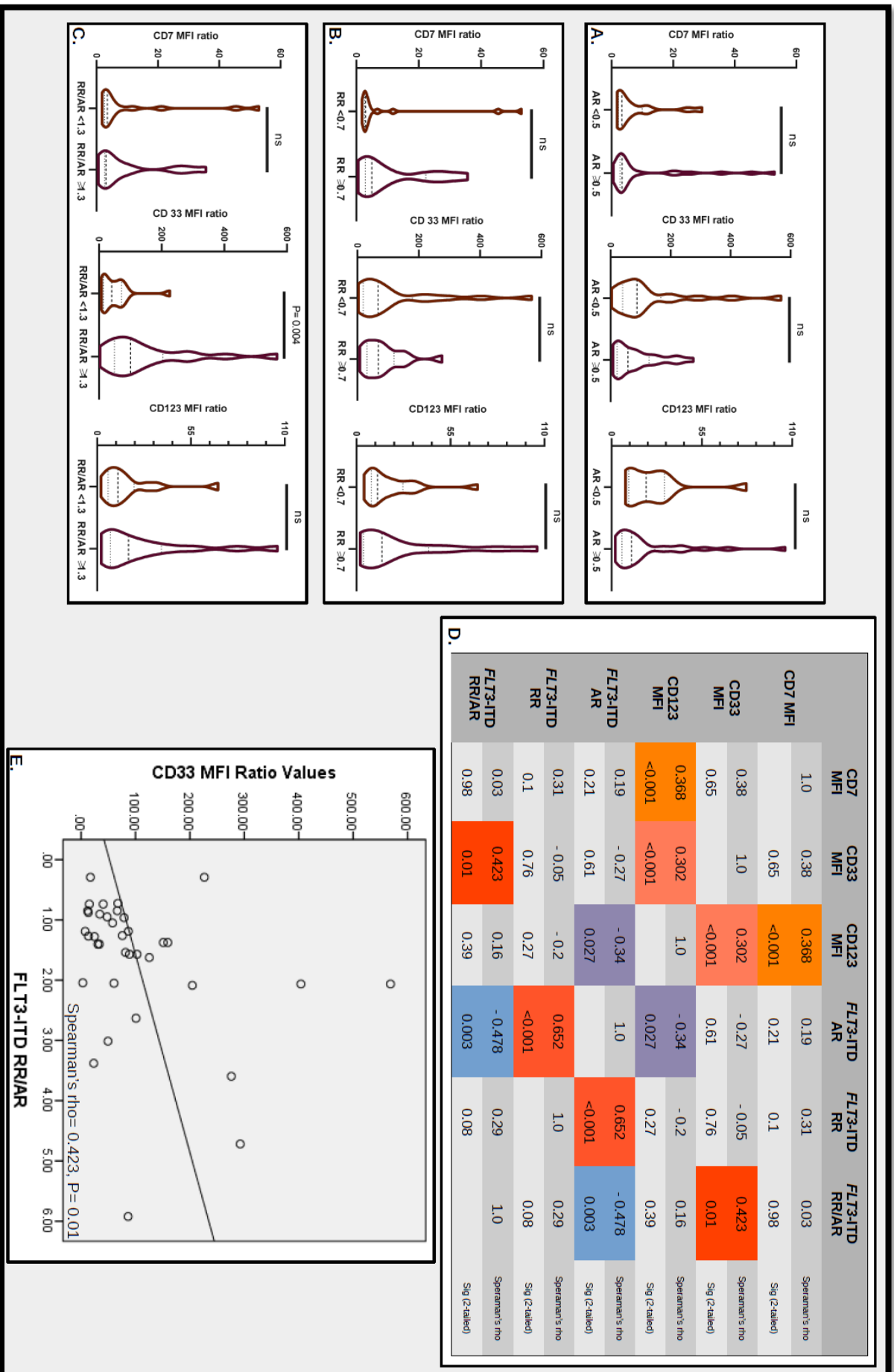


Figura 7.2 Analiza detaliată a valorilor MFI CD7, CD33 și CD123 conform parametrilor cantitativi FLT3-ITD. Grafice violin-plot ale nivelurilor de expresie de antigen conform raportului FLT3-ITD/-WT (A) RA, (B) RR, (C) RR/RA. D. Rezultatele analizei corelației dintre valorile MFI CD7, CD33, CD123 și raportul RA, RR și RR/RA. E. Corelația dintre valorile MFI CD33 și raportul RR/RA. RA – raport alelic; RR – raport ARNm; RR/RA – abundența relativă a ARNm FLT3-ITD la ADN; ITD – duplicare prin inserție în tandem (internal tandem duplication); MFI – media intensității fluorescenței (mean fluorescence intensity).

Capitolul 8 – Concluzii și contribuții personale

8.1 Discuție

Din datele prezentate în **Capitolul 7**, obținute din lotul de pacienți din România, se observă un impact mai mic decât cel așteptat al parametrilor *FLT3*-ITD semi-cantitativi (raportul alelic și nivelul de expresie de ARNm *FLT3*-ITD) în special în asupra evaluării expresiei antigenelor de suprafață a blastilor leucemici – unde nu s-au observat o corelație semnificativă statistic între nivelul de expresie a antigenelor specifice (CD7, CD33, și CD123) și parametri semicantitativi ai mutației *FLT3*-ITD.

Din articolele publicate anterior se confirmă expresia crescută a CD33 și CD123 [34,54,55], însă nu se confirmă corelare directă dintre valoare raportului alelic *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT și nivelul de expresie a antigenelor CD33 și CD123 [34]. Această diferență poate fi explicată inițial pe baza diferenței între diferitele populații de studiu (lot pacienți România comparativ cu lot de pacienți din Germania).

Însă, când comparăm datele epidemiologice obținute pe lotul local de pacienți cu datele epidemiologice obținute pe un lot de pacienți din Germania și Austria (AMLSG BiO) [14], se poate observa că cele 2 populații de pacienți sunt relativ asemănătoare – având aceeași vârstă mediană 65 de ani, iar procentele mutațiilor *NPM1* și *FLT3*-ITD sunt asemănătoare.

O altă observație privind impactul parametrilor semi-cantitativ ai mutației *FLT3*-ITD este că din datele prezentate în **Capitolul 6**, se observă o corelare semnificativă statistic între parametrii biologici (număr total de leucocite, valorile LDH, și procentul de blasti periferici) doar cu RA *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT și nu cu nivelul de exprimare a ARNm *FLT3*-ITD. De aici se poate sugera faptul că parametrii studiați sunt influențați doar de proporția celulelor *FLT3*-ITD pozitive și nu de nivelul de exprimare a ARNm *FLT3*-ITD.

În privința evaluării prognostice există nu există un consens, în special în privința impactului RA *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT. Modelul de evaluare prognostică genetică propus în ghidul ELN 2017 [15] este bazat pe o serie de articole retrospective [26–29] și prevede că pacienții cu RA *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT <0.5 au o evoluție mai bună decât pacienții cu RA ≥ 0.5 . Modelul de prognostic genetic ELN 2017 a fost ulterior confirmat într-un articol din 2020 publicat de K. Döhner *et al* [31].

Studiile care au evaluat impactul *ex-vivo* al raportului *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT au arătat că pe o populație pediatrică de LAM *FLT3*-ITD pozitivă [58] iar niveluri mai mari de ale RA

FLT3-ITD/FLT3-WT (≥ 0.5) au prezentat răspuns un mai bun *ex-vivo* la inhibitorul gilteritinib decât probele cu RA < 0.5 sau probele de control *FLT3-WT*. Aceste date au fost ulterior confirmate de Kivioja *et al* [59].

Însă, o serie de articole care au evaluat modelul de evaluare prognostică genetică ELN 2017 au concluzionat că RA nu permite o stratificare prognostică clară [60–63]. În plus, un alt studiu care a investigat importanța raportului *FLT3-ITD/FLT3-WT* determinat pe ARN ARNm ca biomarker alternativ pentru determinarea prognosticului pacienților cu LAM [64], a arătat că nivelurile de ARNm *FLT3-ITD* au un impact prognostic ridicat asupra supraviețuirii globale și a supraviețuirii fără recidivă numai la pacienții cu LAM cu mutații *NPM1* coexistente și nu a prezentat nici o valoare prognostică în cazurile de LAM *NPM1-WT*.

O dată cu publicarea noului ghid ELN 2022 [25], s-a renunțat la evaluarea prognostică a cazurilor *FLT3-ITD* pe baza RA menționând lipsa standardizării metodei de evaluare a RA, dar și citând articolul menționat anterior, publicat de K. Döhner *et al* [31], în care suplimentar s-a arătat că adăugarea TKI-ului midostaurin îmbunătățește semnificativ prognosticul, în special în cazul pacienților cu RA *FLT3-ITD/FLT3-WT* ≥ 0.5 .

Coroborând rezultatele prezentate în **Capitolele 6 și 7**, cu datele citate putem concluziona că impactul determinării RA *FLT3-ITD* sau a nivelurilor de ARNm *FLT3-ITD* prezintă rezultate relativ contradictorii. Sunt necesare studii suplimentare atât pentru standardizarea metodologiei determinării RA *FLT3-ITD/FLT3-WT* cât și pentru evaluarea în continuare a impactului clinic a raportului *FLT3-ITD/FLT3-WT* atât pe probe de ANDg cât și pe probe de ARNm. Iar renunțarea la determinarea RA, în cazul centrelor care îl determinau anterior considerăm că nu este oportună deoarece această determinare semi-cantitativă poate oferi în continuare informații pentru clinician în special dacă evaluare se face seriat astfel putând evalua dinamica răspunsului pacientului la tratamentul specific.

8.2 Concluzii generale

Mai jos este prezentată o listă a contribuțiilor personale aduse domeniului:

- Am demonstrat fezabilitatea și sustenabilitatea diagnosticului prin biologie moleculară a leucemiilor acute mieloide în cadrul Spitalului Universitar de Urgență București.
- Am descrierea asocierea pozitivă dintre parametrii biologici ai pacienților (număr total leucocite, procentul de blaști leucemici din sângele periferic, și

valoare LDH) și valoarea raportului alelic *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT, dar nu și asocierea cu nivelul de expresie *FLT3*-ITD (raportat prin raportul de ARNm *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT).

- Am descris și confirmat expresia antigenică de suprafață asociată cu mutația *FLT3*-ITD: expresie semnificativ crescută a antigenelor CD7, CD33, și CD123., însă fără asocierea directă între valorile de expresie a antigenelor respective și valoarea raportului alelic *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT sau a nivelului de expresie de ARNm *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT.
- Impactul determinării RA *FLT3*-ITD sau a nivelurilor de ARNm *FLT3*-ITD prezintă rezultate relativ contradictorii, sugerând oportunitatea unor studii suplimentare

8.3 Contribuții personale

Pornind de la ipotezele de lucru și obiectivele aferente, contribuțiile personale constau în:

1. **Îmbunătățirea diagnosticului LAM: a fost realizată** prin implementarea testării genelor de fuziune prin RT-PCR și a testării combinate *NPM1* & *FLT3*-ITD. Detaliile și rezultatele procesului de implementare a testării moleculare în LAM sunt prezentate în **Capitolul 5 – Implementarea testării moleculare a LAM.**
2. **Formarea de loturi de studiu: au fost definite loturile de studiu** folosind informațiile generate în urma testării moleculare, datele clinice și paraclinice. Loturile au fost constituite pentru a investiga parametrii de interes, specifici fiecărui capitol/subcapitol. Am ținut seama și de cazuistica disponibilă la momentul în care a fost realizat design-ul experimental al studiilor.
 - Astfel, pentru **Capitol 5**, pe baza implementării celor testării 6 mutații recurente în LAM – 4 gene de fuziune și mutațiile *NPM1* & *FLT3*-ITD – **am putut analiza și descrie** un total de 336 de pacienți. Din această populației 43.15% din cazuri (145/336 cazuri) au fost pozitive pentru cel puțin una din cele 6 mutații evaluate.

- Pentru **Capitol 6**: a fost format un lot de 117 pacienți diagnosticați cu LAM și la care dispuneam de **date paraclinice complete**, dintre care 32 de pacienți au fost diagnosticați cu mutația *FLT3*-ITD și un lot control de 85 de pacienți.
- Pentru **Capitol 7**: a fost format un lot de 146 pacienți diagnosticați cu LAM și la care dispuneam de toate datele brute de imunofenotipare, dintre care 42 de pacienți au fost diagnosticați cu mutația *FLT3*-ITD și un lot control de 104 de pacienți.

3. Caracterizarea Mutațiilor *FLT3*-ITD: a fost descrisă în Capitolele 6 și 7.

- În **Capitolul 6 – Raportul alelic *FLT3*-ITD determinat pe ADN, dar nu nivelurile de ARNm *FLT3*-ITD, influențează caracteristicile biologice ale pacienților cu LAM**, principala observație este că au fost observate corelații semnificative statistice între parametrii biologici (număr total leucocite, valorile LDH, și procentul de blaști leucemici din sângele periferic) și doar cu RA *FLT3*-ITD/-WT (RA – raportul alelic), care sugerează faptul că parametrii studiați sunt influențați doar de proporția celulelor *FLT3*-ITD pozitive și nu de nivelul de exprimare a ARNm *FLT3*-ITD.
- În **Capitolul 7 – Expresia CD7, CD33 și CD123 nu se corelează cu nivelurile de ADN și ARNm *FLT3*-ITD în LAM**, principala observație este că deși mutațiile *FLT3*-ITD au fost asociate cu un profil specific de expresie antigenică reprezentat de expresii crescute ale antigenelor CD7, CD33, CD123 – nivelurile de expresie ale antigenelor respective nu sunt influențate în mod evident de parametrii semi-cantitativi ai mutațiilor *FLT3*-ITD, determinați atât pe probe de ADN cât și pe probele de ARNm.

4. Îmbunătățirea Managementului Cazurilor *FLT3*-ITD:

În privința managementului clinic, prin implementarea testării combinate *NPM1* & *FLT3*-ITD prin metoda de electroforeză capilară (**Capitolul 5 – Implementarea testării moleculare a LAM**) pacienții au putut fi evaluați corect conform ghidurilor clinice ELN 2017 [15] și ulterior ELN 2022 [25] iar în urma rezultatelor eliberate s-a putut stabili indicația de administrare de TKI cu activitate specifică anti-*FLT3*-ITD, și/sau s-a putut stabili indicația de allotransplant de celule stem hematopoietice în funcție de statusul *NPM1* și *FLT3*-ITD.

Bibliografie

1. Kumar B, Garcia M, Weng L, Jung X, Murakami JL, Hu X, et al. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia*. 2018 Mar 1;32(3):575–87.
2. Boyiadzis M, Whiteside TL. Exosomes in acute myeloid leukemia inhibit hematopoiesis. Vol. 25, *Current Opinion in Hematology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018. p. 279–84.
3. Abdelhamed S, Butler JT, Doron B, Halse A, Nemecek E, Wilmarth PA, et al. Extracellular vesicles impose quiescence on residual hematopoietic stem cells in the leukemic niche. *EMBO Rep*. 2019 Jul;20(7).
4. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;(May).
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood [Internet]*. 2022 Sep 15 [cited 2023 Aug 14];140(11):1200–28. Available from: <https://dx.doi.org/10.1182/blood.2022015850>
6. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 .pdf. *Blood*. 2001;98(6):1752–60.
7. Thiede C, Studel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: Association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326–35.
8. Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, et al. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*. 2002 Sep 18;100(7):2387–92.
9. Vempati S, Reindl C, Kaza SK, Kern R, Malamoussi T, Dugas M, et al. Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential. *Blood*. 2007;110(2):686–94.
10. Chauhan PS, Bhushan B, Mishra AK, Singh LC, Saluja S, Verma S, et al. Mutation of FLT3 gene in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and its association with clinical and immunophenotypic features. *Medical Oncology*. 2011;28(2):544–51.
11. Fischer M, Schnetzke U, Spies-Weissart B, Walther M, Fleischmann M, Hilgendorf I, et al. Impact of FLT3-ITD diversity on response to induction chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2017 Apr;102(4):e129–31.
12. Schnitger S, Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (Exons 13-15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Oct;51(10):910–24.
13. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood*. 2009;114(12):2386–92.
14. Nagel G, Weber D, Fromm E, Erhardt S, Lübbert M, Fiedler W, et al. Epidemiological, genetic, and clinical characterization by age of newly diagnosed acute myeloid leukemia based on an academic population-based registry study (AMLSG Bio). *Ann Hematol*. 2017;96(12):1993–2003.
15. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood [Internet]*. 2017 Jan 26;129(4):424–47. Available from: <http://www.bloodjournal.org/lookup/doi/10.1182/blood-2016-08-733196>
16. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *New England Journal of Medicine [Internet]*. 2005 Jan 20;352(3):254–66. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa041974>
17. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Studel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood [Internet]*. 2006 May 15;107(10):4011–20. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/107/10/4011/109773/Prevalence-and-prognostic-impact-of-NPM1-mutations>
18. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: A tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Science*. 2013;22(5):545–56.
19. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017 Apr 23;31(4):798–807.
20. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106(8):2854–61.
21. Falini B. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood [Internet]*. 2006 Sep 15;108(6):1999–2005. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2006-03-007013>
22. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, Shing DC, Bonetti P, Luzi L, et al. Delocalization and Destabilization of the Arf Tumor Suppressor by the Leukemia-Associated NPM Mutant. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):3044–50.
23. Nishimura Y, Ohkubo T, Furuichi Y, Umekawa H. Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal Region of Protein B23.1 are Important for Its Nucleolar Localization. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66(10):2239–42.
24. Falini B, Bolli N, Shan J, Martelli MP, Liso A, Pucciarini A, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood*. 2006;107(11):4514–23.
25. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood [Internet]*. 2022 Jul 7;129(4):424–47. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/doi/10.1182/blood.2022016867/485817/Diagnosis-and-Management-of-AML-in-Adults-2022-ELN>
26. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2776–84.

27. Pratorcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood* [Internet]. 2013 Apr 4;121(14):2734–8. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-06-431122>
28. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood* [Internet]. 2014 Nov 27;124(23):3441–9. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2014-05-578070>
29. Linch DC, Hills RK, Burnett AK, Khwaja A, Gale RE. Impact of FLT3ITD mutant allele level on relapse risk in intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 2014 Jul 10;124(2):273–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24855211>
30. Ho AD, Schetelig J, Bochtler T, Schaich M, Schäfer-Eckart K, Hänel M, et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation Improves Survival in Patients with Acute Myeloid Leukemia Characterized by a High Allelic Ratio of Mutant FLT3-ITD. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2016;22(3):462–9.
31. Döhner K, Thiede C, Jahn N, Panina E, Gambietz A, Larson RA, et al. Impact of NPM1/FLT3-ITD genotypes defined by the 2017 European LeukemiaNet in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 2020 Jan 30 [cited 2023 Jul 22];135(5):371–80. Available from: <https://dx.doi.org/10.1182/blood.2019002697>
32. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2016 May 19;127(20):2391–405. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2016-03-643544>
33. Rollins-Raval M, Pillai R, Warita K, Mitsuhashi-Warita T, Mehta R, Boyiadzis M, et al. CD123 immunohistochemical expression in acute myeloid leukemia is associated with underlying FLT3-ITD and NPM1 mutations. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry [Internet]. 2013;21(3):212–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914610>
34. Ehninger A, Kramer M, Röllig C, Thiede C, Bornhäuser M, von Bonin M, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* [Internet]. 2014 Jun 13;4(6):e218–e218. Available from: <http://www.nature.com/articles/bcj201439>
35. Angelini DF, Ottone T, Guerrero G, Lavorgna S, Cittadini M, Buccisano F, et al. A Leukemia-Associated CD34/CD123/CD25/CD99+ Immunophenotype Identifies FLT3-Mutated Clones in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2015;21(17):3977–85.
36. de Propriis MS, Raponi S, Diverio D, Milani ML, Meloni G, Falini B, et al. High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin (NPM1) mutation. *Haematologica*. 2011;96(10):1548–51.
37. Riccioni R, Pelosi E, Riti V, Castelli G, Lo-Coco F, Testa U. Immunophenotypic features of acute myeloid leukaemia patients exhibiting high FLT3 expression not associated with mutations. *Br J Haematol*. 2011;153(1):33–42.
38. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. Immunoprofiling of leukemic stem cells CD34+/CD38-/CD123+ delineate FLT3/ITD-positive clones. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2016;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-016-0292-z>
39. Rausei-Mills V, Chang KL, Gaal KK, Weiss LM, Huang Q. Aberrant expression of CD7 in myeloblasts is highly associated with de novo acute myeloid leukemias with FLT3/ITD mutation. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(4):624–9.
40. Chauhan PS, Ihsan R, Singh LC, Gupta DK, Mittal V, Kapur S. Mutation of NPM1 and FLT3 genes in acute myeloid leukemia and their association with clinical and immunophenotypic features. *Dis Markers*. 2013;35(5):581–8.
41. Baqai J, Crisan D. Correlation of FLT3 mutations with expression of CD7 in acute myeloid leukemia. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry. 2015;23(2):104–8.
42. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues - Revised 4th Edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
43. Mori Y, Yoshimoto G, Kumano T, Miyamoto T, Iino T, Takenaka K, et al. Distinctive expression of myelomonocytic markers and down-regulation of CD34 in acute myelogenous leukaemia with FLT3 tandem duplication and nucleophosmin mutation. *Eur J Haematol*. 2007;79(1):17–24.
44. Falini B, Maciejewski K, Weiss T, Bacher U, Schnittger S, Kern W, et al. Multilineage dysplasia has no impact on biologic, clinicopathologic, and prognostic features of AML with mutated nucleophosmin (NPM1). *Blood* [Internet]. 2010 May 6;115(18):3776–86. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-08-240457>
45. Chen CY, Chou WC, Tsay W, Tang JL, Yao M, Huang SY, et al. Hierarchical cluster analysis of immunophenotype classify AML patients with NPM1 gene mutation into two groups with distinct prognosis. *BMC Cancer*. 2013;13(16).
46. Dang H, Chen Y, Kamel-Reid S, Brandwein J, Chang H. CD34 expression predicts an adverse outcome in patients with NPM1-positive acute myeloid leukemia. *Hum Pathol*. 2013;44(10):2038–46.
47. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. [cited 2022 Oct 9]; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/140/11/1200/1921032/bloodbld2022015850c.pdf>
48. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* [Internet]. 2016 Jan 7;127(1):29–41. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/127/1/29/34898/Molecular-landscape-of-acute-myeloid-leukemia-in>
49. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2016;374(23):2209–21. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1516192>
50. Soare DS, Radu E, Dumitru I, Arghir A, Bumbea H, Vlădăreanu AM. FLT3 -ITD DNA allelic burden, but not mRNA levels, influences the biological characteristics of AML patients. *Rev Rom Med Lab*. 2021;29(1):33–42.
51. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia* [Internet]. 2019;33(2):299–312. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-018-0357-9>
52. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* [Internet]. 2013;2013:220–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24319184>

53. Soare D, Radu E, Dumitru I, Popov VM, Bumbăa H, Vlădăreanu AM. FLT3 -ITD DNA and mRNA levels in AML do not correlate with CD7, CD33 and CD123 expression. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2020 Jul 27;24(13):7675–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jcmm.15255>
54. Bras AE, Haas V, Stigt A, Jongen-Lavrencic M, Beverloo HB, Marvelde JG, et al. CD123 expression levels in 846 acute leukemia patients based on standardized immunophenotyping. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2019 Mar 18;96(2):134–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cyto.b.21745>
55. Haubner S, Perna F, Köhnke T, Schmidt C, Berman S, Augsberger C, et al. Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. *Leukemia* [Internet]. 2019 Jan 26;33(1):64–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-018-0180-3>
56. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986–2010.
57. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908–75.
58. Cucchi DGJ, Denys B, Kaspers GJL, Janssen JJWM, Ossenkoppele GJ, de Haas V, et al. RNA-based FLT3 -ITD allelic ratio is associated with outcome and ex vivo response to FLT3 inhibitors in pediatric AML. *Blood* [Internet]. 2018 May 31;131(22):2485–9. Available from: <http://www.bloodjournal.org/lookup/doi/10.1182/blood-2017-12-819508>
59. Kivioja J, Malani D, Kumar A, Kontro M, Parsons A, Kallioniemi O, et al. FLT3-ITD allelic ratio and HLF expression predict FLT3 inhibitor efficacy in adult AML. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 7 [cited 2023 Jul 22];11(1):23565. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-03010-7>
60. Boddu PC, Kadia TM, Garcia-Manero G, Cortes J, Alfayez M, Borthakur G, et al. Validation of the 2017 European LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with NPM1 and FLT3 -internal tandem duplication genotypes. *Cancer* [Internet]. 2019 Apr 6;125(7):1091–100. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cncr.31885>
61. Sakaguchi M, Yamaguchi H, Najima Y, Usuki K, Ueki T, Oh I, et al. Prognostic impact of low allelic ratio FLT3- ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Adv* [Internet]. 2018 Oct 23;2(20):2744–54. Available from: <http://www.bloodadvances.org/lookup/doi/10.1182/bloodadvances.2018020305>
62. Harada Y, Nagata Y, Kihara R, Ishikawa Y, Asou N, Ohtake S, et al. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. *Leuk Res* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2019 Jul 2];66:20–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0145212618300067?via%3Dihub>
63. Huang Y, Hu J, Lu T, Luo Y, Shi J, Wu W, et al. Acute myeloid leukemia patient with FLT3-ITD and NPM1 double mutation should undergo allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in CR1 for better prognosis. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2019 May; Volume 11:4129–42. Available from: <https://www.dovepress.com/acute-myeloid-leukemia-patient-with-flt3-itd-and-npm1-double-mutation-peer-reviewed-article-CMAR>
64. Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, Schneider S, Dufour A, Benthaus T, et al. The FLT3ITD mRNA level has a high prognostic impact in NPM1 mutated, but not in NPM1 unmutated, AML with a normal karyotype. *Blood* [Internet]. 2012 May 10;119(19):4383–6. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/119/19/4383/29973/The-FLT3ITD-mRNA-level-has-a-high-prognostic>