



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS  
A HEMATOLOGIA**



**AVALIAÇÃO DE VARIANTES DO *FLT3* EM PACIENTES COM LEUCEMIA  
MIELOIDE AGUDA ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE  
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

**MARLÚCIA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**MANAUS - AM**

**2024**

**MARLÚCIA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DE VARIANTES DO *FLT3* EM PACIENTES COM LEUCEMIA  
MIELOIDE AGUDA ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE  
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientador (a): Prof. Dr. George Allan Villarouco da Silva

Coorientador (a): Prof. Dra. Leny Nascimento da Motta Passos

**MANAUS - AM**

**2024**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

M349aa SANTOS, MARLUCIA OLIVEIRA DOS

Avaliação de variantes do FLT3 em pacientes com leucemia mieloide aguda atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas / MARLUCIA OLIVEIRA DOS SANTOS. Manaus : [s.n], 2024.

105 f.: il.; 29 cm.

Dissertação - PGSS - Ciências Aplicadas à Hematologia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2024.

Inclui bibliografia

Orientador: Silva, Dr. George Allan Villarouco da

Coorientador: Passos, Dra. Leny Nascimento da Motta

1. Leucemia Mieloide Aguda. 2. FLT3. 3. Duplicação interna em tandem. 4. Inibidores de FLT3. 5. Variantes missense. I. Silva, Dr. George Allan Villarouco da (Orient.). II. Passos, Dra. Leny Nascimento da Motta (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Avaliação de variantes do FLT3 em pacientes com leucemia mieloide aguda atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 02/2024

No segundo dia do mês de maio do ano de 2024, às 09h00min, realizou-se no auditório do bloco A, 2º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 - Chapada, a Defesa de Dissertação da discente **Marlúcia Oliveira dos Santos**, sob o título: “**Avaliação de variantes do FLT3 em pacientes com leucemia mieloide aguda atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas**”, tendo como orientador o Prof. Dr. **George Allan Villarouco da Silva** e coorientadora a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Leny Nascimento da Motta Passos**, segundo encaminhamento da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. George Allan Villarouco da Silva – Presidente (HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <u>George A. V. da Silva</u> CPF: <u>850.870.462-03</u>
Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa – Membro (UFAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <u>[Assinatura]</u> CPF: <u>337.163.652-37</u>
Prof. Dr. Celso Arrais Rodrigues da Silva – Membro (UNIFESP)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: <u>CAFFRAIS/S</u> CPF: <u>780.760.301-10</u>

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

Aprovado

Não Aprovado

George A. V. da Silva  
Presidente da Banca Examinadora

Coordenação PPGH-UEA/HEMOAM

• Endereço: Avenida Constantino Nery, 4397 – Chapada  
• Manaus-AM – CEP 69050-001 / • Fone: (92) 3655-0123  
• E-mail: [mestrado@hemoam.am.gov.br](mailto:mestrado@hemoam.am.gov.br)  
• Site: <http://www.pos.uea.edu.br/hematologia>  
• [www.instagram.com/hnhh\\_uea](http://www.instagram.com/hnhh_uea)



## DEDICATÓRIA

Aos meus amados filhos **Adrielly** e **Arthur** por todo amor e compreensão com a mamãe.

Ao meu esposo **Ademar**, por todo incentivo, amor, apoio, compreensão e preocupação.

Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.

Amo todos vocês!!!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de concretizar este sonho, ter iluminado meus caminhos, da minha família, por me permitir errar, aprender, crescer e não nunca desistir dos meus objetivos. Minha fé é meu alicerce que me sustenta e como sempre digo, nunca foi sorte ...sempre foi Deus!!

Gostaria de expressar minha eterna gratidão ao meu orientador, Dr. George Allan Villarouco, que carinhosamente chamamos de “pai científico”, pela sua orientação, parceria, dedicação, paciência e profissionalismo. Como todo bom pai, também puxa a orelha do filho quando é necessário, e não foi diferente comigo. Agradeço pelas palavras de incentivo e toda a orientação durante o desenvolvimento da pesquisa. Obrigada por acreditar em mim teacher!! Tenho uma enorme admiração por você, um profissional de excelência.

À Dra. Leny Passos obrigada pela co-orientação, pelo incentivo, e por ter acreditado em mim neste projeto.

Aos meus filhos, Adrielly e Arthur por todo amor incondicional que vocês sempre me deram. Obrigada por compreenderem a mamãe, pela minha ausência em alguns momentos de lazer, falei que dois anos iria passar rapidinho...amo vocês!!!

Ao meu esposo Ademar, por todo amor, carinho, compreensão e apoio nos momentos difíceis desta caminhada. Obrigado por permanecer ao meu lado!! você que sempre me incentivou a ingressar no mestrado, obrigada por tudo amore.

A minha mãe Francisca (*in memoriam*), sempre senti sua presença aqui comigo em todas as fases da minha vida e sei que estás orgulhosa da mulher que me tornei. Saudades mãezinha!!

Ao meu pai Simião e meus irmãos Marlene e Fabio por todo amor, incentivo, apoio e por compreenderem minha ausência em alguns momentos.

Meus sinceros agradecimentos a minha amiga Katiane pelo apoio, parceria e sempre me incentivando a continuar firme em meus objetivos. Lembro-me de momentos difíceis e suas palavras foram extremamente importante pra mim. Agora, já podemos pensar no projeto do Doutorado amiga!!!!

Agradeço a meus amigos da equipe de pesquisa, em especial a Talita, Gabriele, Vinicius e Mylena pela parceria, troca de ideias e experiências no laboratório, e em vários outros momentos que pude contar com o apoio de vocês.

Gratidão a equipe do Laboratório Genômica do HEMOAM, em especial o Wagner e a Rafaela pelo apoio. Vocês são profissionais excelentes sempre muito solícito e suas contribuições foram importante para meus desenvolvimentos no laboratório. A dra Andrea

Tarrago, agradeço pela suas considerações, revisões, correções na minha escrita e todas outras contribuições foram importantíssima .

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH) e à Universidade do Estado do Amazonas (UEA), agradeço imensamente pela oportunidade e poder realizar esta etapa da minha vida profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), expresso minha gratidão pelo apoio financeiro fornecido para o desenvolvimento desta pesquisa e por incentivar e valorizar o crescimento científico no nosso Estado do Amazonas.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta e indiretamente para a realização desta pesquisa, o meus sinceros agradecimentos.

## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

**Introdução:** A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma doença hematológica, heterogênea, que se desenvolve na medula óssea a partir de alterações genéticas e epigenéticas nos precursores hematopoiético, resultando na proliferação clonal de células blásticas da linhagem mieloide. Alterações no gene *FMS- Like Tirosina quinase 3 (FLT3)*, como duplicação interna em *tandem (FLT3-ITD)* e variante no códon D835 são relatadas com frequência de 30% e 10% dos casos, respectivamente. Essas variantes são relacionadas a baixa sobrevida e risco de recaída. Entretanto, dados sobre outras alterações no gene *FLT3* são pouco relatadas. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo avaliar variantes no *FLT3* em pacientes com LMA atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. **Metodologia:** Foram avaliados 36 pacientes com diagnóstico de LMA de ambos os gêneros com idade entre 18-92 anos. Amostras de medula óssea foram coletadas e a identificação de alterações no gene *FLT3* foi realizada pelo sequenciamento de Sanger. **Resultados:** Diferentes variantes do gene *FLT3* foram identificadas, total de 26 variantes em 18 pacientes. Variantes tipo missense foram encontradas nos domínios funcionais, como 6 (23,1%) extracelular (EC), 3 (11,5%) transmembranar (TM), 1 (3,9%) justamembranar (JM), 5 (19,2%) no domínio tirosina quinase I (TKD1) e 4 (15,4%) domínio tirosina quinase II (TKD2). *FLT3-ITD* foram identificadas 3 (11,5%) no domínio JM e 4 no TKD1 (15,4%). As variantes classificadas como patogênicas foram 19 (73,1%) com frequência alélica das variantes (VAF) de 11-62,5%. Variantes tipo missense foram relacionadas com intensa plaquetopenia ( $p=0,038$ ) e aumento de blastos no sangue periférico ( $p=0,014$ ). Maiores concentrações de hemoglobina foram observadas em pacientes com *FLT3-ITD* ( $p=0,049$ ). A presença de variante no gene *FLT3* pode ser identificada em paciente com LMA secundária e na recaída, como abordado em relato de 4 casos, portanto a maioria foram identificados em LMA novo (75%). **Conclusão:** Este estudo destaca a ocorrência de diferentes variantes patogênicas no gene *FLT3* em pacientes com LMA, as variantes missense como mais prevalentes e estão relacionadas com alterações hematológicas, destacando a importância do rastreamento de variantes no gene *FLT3*.

**Palavras Chaves:** Leucemia Mieloide Aguda, *FLT3*, Duplicação Interna em Tandem, Inibidores do *FLT3*, variantes missense.

## ABSTRACT

**Introduction:** Acute myeloid leukemia (AML) is a disease heterogeneous hematological, which develops in the bone marrow after genetic and epigenetic changes in hematopoietic precursors, resulting in the clonal proliferation of blast cells of the myeloid lineage. Variations in the *FMS-Like Tyrosine kinase 3 (FLT3)* gene, as internal tandem duplication (*FLT3-ITD*) and variant in the D835 codon are reported frequently 30% and 10% of the cases, respectively. These mutations are associated with poor survival and risk of relapse. However, data on other variants in the *FLT3* exome are not reported. **Objective:** This study aimed to evaluate variants in *FLT3* in patients with AML treated at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. **Methodology:** Were evaluated 36 patients diagnosed with AML of both genders and aged between 18-92. Bone marrow samples were collected and identification of *FLT3* exome variants was performed by Sanger sequencing. **Results:** Different *FLT3* gene variants were identified, total of 26 variants in 18 patients. Missense variants were found in functional domains, as 6 (23.1%) extracellular (EC), 3 (11.5%) transmembrane (TM), 1 (3.9%) juxtamembrane (JM), 5 (19.2%) in the tyrosine kinase I domain (TKD1) and 4 (15.4%) tyrosine kinase II domain (TKD2). *FLT3-ITD* variants were identified 3 (11.5%) in the JM domain and 4 in TKD1 (15.4%). The allele frequency (VAF) of pathogenic variants ranged from 11-62.5%. Missense variants were related with intense thrombocytopenia ( $p=0.038$ ) and increased blasts in peripheral blood ( $p=0.014$ ). Higher hemoglobin values were observed in patients with *FLT3-ITD* ( $p=0.049$ ). The presence of a variant in the *FLT3* gene can be identified in patients with secondary AML and in relapse, as discussed in a report of 4 cases, therefore the majority were identified in new AML (75%). **Conclusion:** This study highlights the occurrence of different potentially pathogenic variants in the *FLT3* gene in patients with AML, the missense variants as most prevalent and related with hematological changes, highlighting the importance of screening variants in the *FLT3* exome.

**Keywords:** Acute Myeloid Leukemia, *FLT3*, Internal Tandem Duplication, *FLT3* Inhibitors, missense variants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência Mundial de LMA/100.000 habitantes .....	20
Figura 2 – Fisiopatologia da Leucemia Mieloide Aguda.....	22
Figura 3 - Desregulação das propriedades de HSC durante o surgimento de LSC e desenvolvimento de leucemia.....	23
Figura 4 - Estrutura gênica e protéica do <i>FLT3</i> .....	33
Figura 5 - <i>FLT3</i> monomérico ancorado na membrana plasmática .....	33
Figura 6 - Vias de sinalização do receptor de <i>FLT3</i> .....	34
Figura 7 - <i>FLT3</i> <sup>selvagem</sup> monomérica e fator ligante (FL) .....	35
Figura 8 - Distribuição das diferentes mutações de <i>FLT3</i> .....	36
CAPÍTULO I - Avaliação do gene FLT3 na Leucemia Mieloide Aguda em uma população do Amazonas: baixa contagem de plaquetas e alta porcentagem de blastos em pacientes com variantes missense:	
Figura Suplementar S1 - Características citogenéticas, classificação de risco citogenético ELN e FAB dos pacientes com LMA .....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativa de novos casos e taxas brutas de incidência de LMA no Brasil.....	20
Tabela 2 - Volume e concentração final do mix para síntese de cDNA.....	42
Tabela 3 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na PCR.....	43
Tabela 4 - Reagentes utilizados na reação do sequenciamento.....	45
 CAPÍTULO I - Avaliação do gene <i>FLT3</i> na Leucemia Mieloide Aguda em uma população do Amazonas: baixa contagem de plaquetas e alta porcentagem de blastos em pacientes com variantes missense:	
Tabela 1 – Características clínicas e demográficas dos pacientes com LMA.....	52
Tabela 2 – Características hematológicas e bioquímicas dos pacientes com LMA .....	53
Tabela 3 – Variantes <i>FLT3</i> patogênica.....	54
Tabela 4 – Comparação dados clínicos e laboratoriais entre <i>FLT3</i> negativas e positivas .....	54
Tabela Suplementar S1 – Dados laboratoriais dos pacientes <i>FLT3</i> positivo de acordo com a razão alélica (AR) .....	72
 CAPÍTULO II - Mutações no gene <i>FLT3</i> são observadas em casos de LMA recaída e secundária: um estudo de 4 casos:	
Tabela 1: Características clínicas, imunofenótipo, citogenética e molecular .....	80
Tabela 2: Dados hematológicos no momento da análise molecular .....	81

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação FAB das leucemias mieloides aguda.....	25
Quadro 2 - Classificação da LMA pela Organização Mundial de Saúde em 2022 .....	26
Quadro 3 - Estratificação de riscos da LMA e anormalidades genéticas <i>ELN</i> 2022 .....	29
Quadro 4 - Categoria funcional de genes afetados na LMA e a frequência .....	32
Quadro 5 - Variantes do <i>FLT3</i> que levam a resistência ao inibidor de <i>FLT3</i> .....	38
Quadro 6 - Programação de ciclagens de amplificação dos fragmentos.....	44
Quadro 7 - Programação do sequenciamento.....	45
CAPÍTULO I - Avaliação do gene <i>FLT3</i> na Leucemia Mieloide Aguda em uma população do Amazonas: baixa contagem de plaquetas e alta porcentagem de blastos em pacientes com variantes missense:	
Quadro Suplementar S1 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) e programação de ciclagens utilizados na PCR de amplificação dos fragmentos .....	67
Quadro Suplementar S2 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) e programação de ciclagens utilizados na PCR de amplificação do fragmento <i>FLT3</i> - ITD.....	67
Quadro Suplementar S3 - Variantes detectadas pelo sequenciamento nucleotídico do gene <i>FLT3</i> em pacientes com LMA .....	69

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS**

- ASXL1** - Transcriptional Regulator 1 (Regulador Transcricional 1)
- CAAE** – Certificado de Apresentação de Apreciação
- CD** - *Cluster of differentiation* – (Grupo de diferenciação)
- CFM** – Fluxo multiparamétrico
- cDNA** - Ácido Desoxirribonucleico complementar
- DNMT3A** - DNA (citosina-5)-metiltransferase 3A
- dNTPs** - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DRM** – Doença residual mensurável
- EC** – Extracelular
- EDTA** – Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
- ELN** - European Leukemia Network – (Rede Europeia de Leucemia)
- FAB** - *Franco-Americano-Britânico*
- FDA** - *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)
- FL** - Fator ligante
- FLT3** - FMS-like tirosina quinase 3 (gene)
- FLT-3** - FMS-like tirosina quinase 3 (proteína)
- HEMOAM** - Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
- HSCs** - Células Troncos Hematopoiéticas
- IDH** - Índice de Desenvolvimento Humano
- IDH1** - Isocitrato desidrogenase 1
- INCA** - Instituto Nacional de Câncer
- ITD** - Duplicação interna em tandem
- JM** - Justamembranar
- LDH** - Lactato Desidrogenase
- LLA** - Leucemia Linfoide Aguda
- LLC** - Leucemia Linfoide Crônica
- LMA** - Leucemia Mieloide Aguda
- LMC** - Leucemia Mieloide Crônica
- LPA** - Leucemia Promielocítica Aguda
- LSCs** - Células Troncos Leucêmicas
- MgCl<sub>2</sub>**- Cloreto de Magnésio

**min** - Minutos

**mL** - Mililitro

**mM** – milimolar

**mRNA** - Ácido Ribonucleico mensageiro

**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para a Informação Biotecnológica)

**NMP** - Neoplasias mieloproliferativa

**NPM1** - Nucleofosmina

**PMO** - Mieloperoxidase

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase

**PEG** – Polietilenoglicol

**PI3K** - Phosphoinositide 3-kinase (Fosfatidil-Inositol Quinase 3)

**PV** - Policitemia Vera

**RA** – Razão Alélica

**RC** - Remissão completa

**RNA**- Ácido Ribonucleico

**RTK** - Receptor Tirosina Quinase

**SEG** – Segundos

**SG** – Sobrevida global

**SLD** - Sobrevida livre de doença

**SLE** - Sobrevida livre de eventos

**SMD** – Neoplasias Mielodisplásica

**STAT** – Transcription factor signal transducer receptor complex and transcription activator (Complexo receptor do transdutor de sinal dos fatores de transcrição e ativador da transcrição)

**TE** - Trombocitemia essencial

**TKD** – Domínio Tirosina Quinase

**TM** - Transmembranar

**μL** – Microlitro

**μM** – Micromolar

**VAF**– Frequência alélica variante

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1. Leucemia Mieloide Aguda: Definição e Epidemiologia.....	19
2.2. Fisiopatologia da Leucemia Mieloide Aguda.....	22
2.3. Manifestações Clínicas da LMA.....	24
2.4. Classificação da LMA.....	24
2.5. Diagnóstico da LMA.....	27
2.6. Prognóstico e Estratificação Risco.....	28
2.7. Tratamento.....	30
2.8. Aspectos genéticos e moleculares da LMA.....	31
2.9. Aspectos moleculares do FMS-Like <i>Tirosina Quinase 3 (FLT3)</i> .....	32
2.10. Variantes e aspectos funcionais do <i>FLT3</i> .....	35
2.11. Inibidores direcionados ao <i>FLT3</i> e resistência terapêutica.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Tipo de Estudo.....	40
4.2 Local de estudo.....	40
4.3 População de estudo.....	40
4.4 Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão.....	40
4.5 Aspectos Éticos.....	41
4.6 Coleta de dados clínicos e laboratoriais.....	41
4.7 Material Biológico.....	41
4.8 Extração de RNA.....	42
4.9 Síntese de cDNA.....	42
4.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	43
4.11 Confirmação da amplificação do produto da PCR (Gel de Agarose).....	44
4.12 Purificação da PCR.....	44
4.13 Reação de Sequenciamento nucleotídico.....	44
4.14 Purificação do Sequenciamento.....	45
4.15 Eletroforese Capilar.....	46
4.16 Análise genética do <i>FLT3</i> .....	46
4.17 Interpretação das Variantes.....	46

4.18 Análise de dados estatística.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
CAPÍTULO I:.....	47
Avaliação do gene <i>FLT3</i> na Leucemia Mieloide Aguda em uma população do Amazonas: baixa contagem de plaquetas e alta porcentagem de blastos em pacientes com variantes missense .....	47
CAPÍTULO II: .....	73
Mutações no gene <i>FLT3</i> são observadas em casos de LMA recaída e secundária: um estudo de 4 casos .....	73
6. CONCLUSÃO.....	86
7. REFERÊNCIAS .....	87
8. ANEXO .....	94
8.1 Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM) .....	94
8.2 Resumos publicados em anais de eventos:.....	101
8.3 Divulgação científica e participação em eventos .....	103
8.3.1 Banner apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, HEMO 2023 .....	103
8.3.2 Short-taik apresentado no <i>8th International Symposium on Immunology and Hematology</i> <i>2024</i> .....	104

## 1. INTRODUÇÃO

A leucemia é um grupo de doenças onco-hematológica que se desenvolve na medula óssea, caracterizada pelo aumento no número de glóbulos brancos anormais prejudicando proliferação, diferenciação, apoptose das células hematopoiética.<sup>1,2</sup> São descritos mais de 12 tipos de leucemias clinicamente heterogêneas e sua classificação baseia-se no tipo de linhagem celular afetada, sendo as quatro principais subdivididas em aguda ou crônica e, em mieloide ou linfóide: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC).<sup>1,3</sup>

A LMA ocorre com maior frequência em adultos com idade superior a 65 anos, enquanto a LLA é mais incidente na faixa etária pediátrica, menores de 15 anos.<sup>4</sup>

O processo de malignidade da LMA está relacionado com a diversidade de alterações genéticas e epigenéticas nos precursores mielóides, ocasionando desregulação e desenvolvimento anormal dos componentes sanguíneos.<sup>5,6</sup>

Alterações cromossômicas numéricas e estruturais são alterações citogenéticas presentes em mais da metade dos casos de LMA.<sup>6</sup> Entretanto, uma média de 45% dos pacientes com LMA estão associados ao cariótipo sem anormalidades citogenéticas, evidenciando que outros fatores contribuem para o desenvolvimento das leucemias mielóides agudas, como alterações em os genes que participam na regulação de vias intracelulares de transdução de sinais de apoptose e proliferação.<sup>7</sup>

Anormalidades moleculares recorrente, como no gene FMS-like tirosina quinase 3 (*FLT3*), é detectada em aproximadamente 30% dos pacientes de LMA.<sup>7</sup> O *FLT3* é um receptor de tirosina quinase expresso nas células hematopoiéticas, conferindo vantagens proliferativas e de sobrevivência.<sup>7</sup> São descritos duas principais alterações: duplicação interna em tandem (*FLT3* - ITD) e variantes no domínio tirosina quinase (*FLT3* – TKD).<sup>7</sup> Essa alteração no *FLT3* ativam constitutivamente os receptores aumentando a proliferação e diminuição da apoptose, e caracteriza um prognóstico desfavorável com maior risco de recaída e menor sobrevida.<sup>7</sup>

Para o tratamento da LMA as principais terapias disponíveis são baseadas em quimioterápicos que possuem altos índices de toxicidades e riscos elevados, e atualmente, vários inibidores direcionados ao *FLT3* foram desenvolvidos e oferecem novas opções terapêuticas para pacientes com variantes do *FLT3*.<sup>8</sup> Em média, 57% dos pacientes recidivam e ou se mostra refratário ao primeiro ciclo de tratamento, tornando o prognóstico

ruim, com uma sobrevida média de 12 meses em cerca de 30% desses pacientes.<sup>9</sup> O *FLT3* é um importante biomarcador de prognóstico e terapêutico recomendada pela Diretriz Internacional *European Leukemia Net (ELN)*, revisada recentemente em 2022, e classifica o paciente no grupo de risco intermediário<sup>10</sup>

Considerando que anormalidades genéticas têm significado importante para a conduta terapêutica e que alterações no *FLT3* estão associados ao prognóstico e desfecho clínico dos pacientes com LMA, esse estudo visa identificar possíveis variantes genéticas no *FLT3*, assim como a frequência alélica das variantes e associar com dados clínicos/laboratorial dos pacientes com LMA diagnosticados na Fundação HEMOAM.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Leucemia Mieloide Aguda: Definição e Epidemiologia

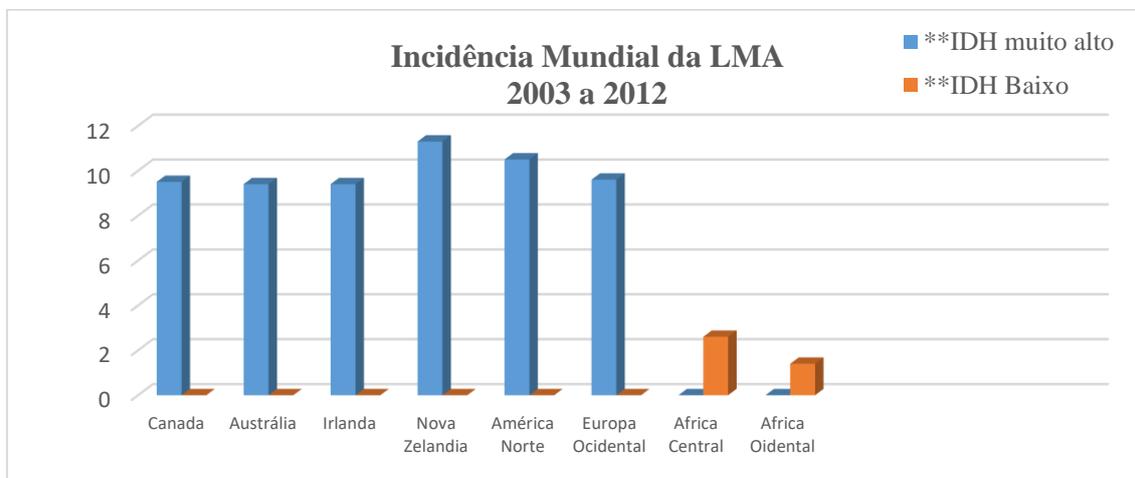
A leucemia mieloide aguda (LMA) é um câncer hematopoiético de origem clonal maligno, caracterizada por acúmulo de blastos altamente proliferativos, com consequente interrupção na diferenciação maturativa dos precursores mieloides imaturos que iniciam na medula óssea e migram para o sangue periférico.<sup>4,11,12</sup> Menos frequente, mas potencialmente grave na LMA, as alterações extra medulares são: infiltrações de células leucêmicas em outros sistemas e órgãos, e pode acometer a pele, mucosa gengival, outros tecidos moles, fígado (hepatomegalia), baço (esplenomegalia) e no sistema nervoso central manifestando cefaleia, sintomas auditivos ou visuais e estado mental alterado.<sup>13,14</sup>

A estimativa mundial aponta a ocorrência de 475 mil casos novos de leucemias no ano de 2020, representando 2,5% entre todos os cânceres existentes. A leucemia é a décima neoplasia mais incidentes no homem, e foram registrados 270 mil casos em 2020, com risco estimado de 6,3 casos/100 mil homens. Nas mulheres, foram 205 mil casos novos com taxa de incidência de 4,5 casos/100 mil mulheres, ocupando a décima segunda posição.<sup>3,15</sup>

No estudo realizado por Miranda Filho e colaboradores,<sup>16</sup> foi avaliado a incidência mundial das leucemias nos cinco continentes nos anos de 2003 a 2012, utilizando os dados registrados pelo *Cancer Incidence in Five Continents Volume X (CI5-X)* e na *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, e demonstrou elevadas taxas de incidência da doença em países com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) alto, como Canadá (9,5/100.000), Austrália (9,4/100.000), Irlanda (9,4/100.000), Nova Zelândia (11,3/100.000), América do Norte (10,5/100.000) e Europa Ocidental (9,6/100.000); enquanto em países com o IDH muito baixo, como África Ocidental (1,4 por 100.000) e África Central (2,6 por 100.000) a incidência foi muito baixa (Figura 1).<sup>16</sup> Essa discrepância geográfica pode ser parcialmente conferida às condições de acesso ao sistema de saúde e diagnóstico diferencial disponíveis entre os diferentes países, outros fatores etiológicos incluindo interações ambientais e genéticos também podem influenciar nessas variações.<sup>16</sup>

A LMA é a leucemia aguda mais prevalente em adultos (cerca de 80%), e em relação a faixa etária pediátrica menor de 15 anos, representando 15% a 20%. A incidência para todos os tipos de leucemia é maior em homens do que entre as mulheres, e em pessoas

idosas com idade ao diagnóstico acima de 65 anos.<sup>1</sup> Com o aumento da idade, as anormalidades citogenéticas são mais frequentes, desfavorecendo o prognóstico com o tratamento padrão e com desfechos piores nessa faixa etária.<sup>11,17</sup>



**Figura 1** - Incidência mundial de LMA/100.000 habitantes referente ano de 2003 a 2012. Fonte: *Miranda Filho e colaboradores, 2016.* \*\*IDH (Índice de Desenvolvimento Humano).

Nos Estados Unidos da América (EUA) foram estimados em 2019 cerca de 21.450 casos novos de LMA (1,2% de todos os tipos de câncer) frequentemente com incidência maior na faixa etária mais elevada: 25,1% em adultos com 65 a 74 anos e 33,7% em adultos acima de 75 anos. A sobrevivência de cinco anos foi de 28,3%, e estimativa de 10.920 óbitos por LMA em 2019, com taxa de morte maior na faixa etária acima de 75 anos (43,7%).<sup>18</sup>

A incidência de LMA no Brasil é desconhecida, e o Instituto Nacional de Câncer (INCA) descreve dados referente as leucemias de modo geral. A estimativa de casos de leucemias para cada ano do triênio de 2023-2025, corresponde a 11.540 novos casos, com incidência estimada de 5,33/100 mil habitantes (Tabela 1). A incidência de LMA Os dados informados pelo instituto são infelizmente de casos geral das leucemias agudas e crônicas.<sup>15</sup> Os casos de leucemias por regiões do Brasil estão descritos na tabela 1.<sup>15</sup>

**Tabela 1** – Estimativas de novos casos e taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes no Brasil.

Estimativas de Novos Casos para ano de 2023						
Leucemias	Homens		Mulher		Total	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa bruta	Total	Taxa bruta
Região Norte	440	4,53	350	3,64	790	4,08
Região Nordeste	1.770	6,23	1530	5,08	3.300	5,64
Região Sul	1.100	7,28	1.090	6,97	2.190	7,12
Região Sudeste	2.580	5,83	2.030	4,36	4.610	5,08
Região centro- Oeste	360	4,29	290	3,27	650	3,78
Brasil	6.250	5,9	5.290	4,78	11.540	5,33

Fonte: INCA.2023<sup>15</sup>

Dados sobre incidência de leucemias por regiões brasileiras é bastante diversificados e aponta a região Norte com a quarta maior incidência de leucemia, em homens com risco estimados 4,53/100 mil habitantes e em mulheres de 3,64/100 habitantes.<sup>15</sup>

Em 2017 no Brasil, a mortalidade de todas as formas de leucemia, resultou em 6.788 óbitos.<sup>3</sup> Entre os anos de 2008 e 2017 houve um aumento de 23% no número de óbitos e a faixa etária acima de 50 anos como a mais prevalente.<sup>19</sup> Em 2020 ocorreram 6.738 óbitos por leucemia no Brasil com estimativa de 6,73 por 100 mil habitantes, e em homens 3.703 óbitos (3,58/100 mil) e mulheres 3.035 óbitos (2,80/100 mil).<sup>15</sup>

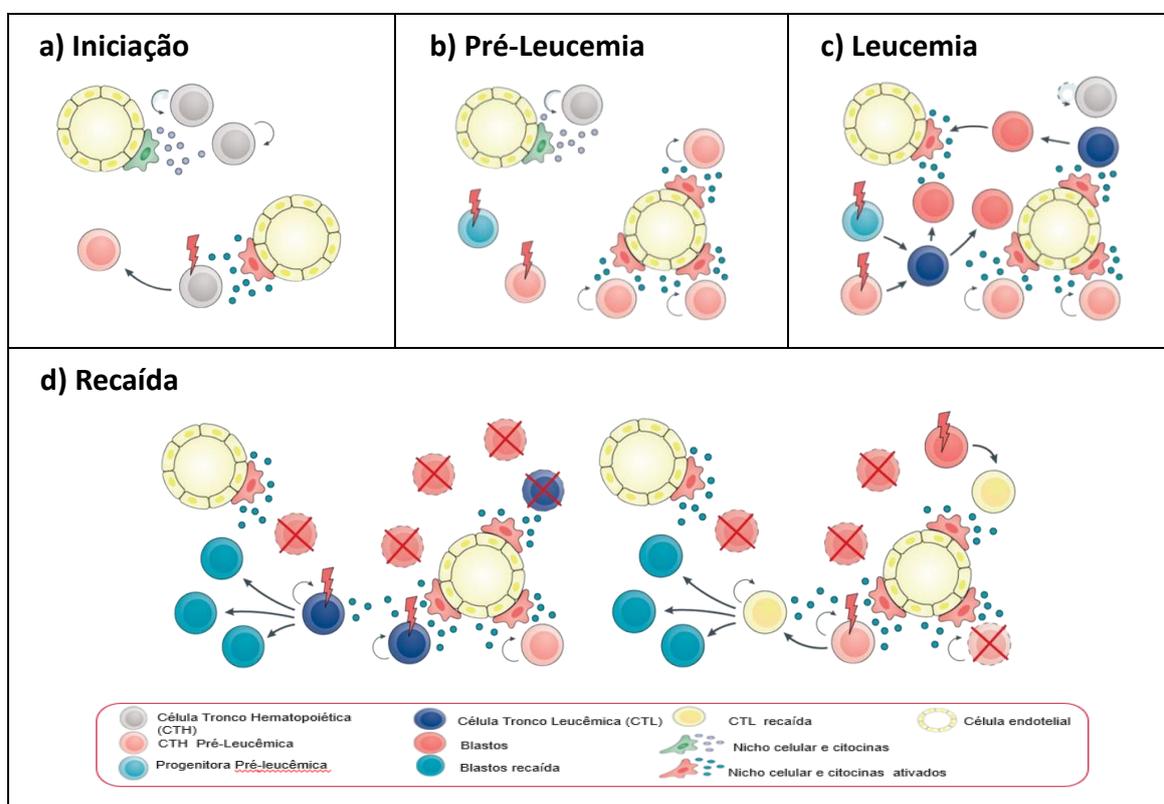
Em estudo retrospectivo realizado no Amazonas, no centro de referência para tratamento dessas neoplasias (HEMOAM), identificou-se entre os anos de 2005 a 2015 um total de 266 casos de LMA novo com uma média aproximadamente de 20-30 novos casos por ano, e cerca de 50% dos pacientes evoluíram ao óbito em até dois anos após o diagnóstico.<sup>20</sup>

A etiologia da LMA é bastante diversificada e multifatorial, envolvendo fatores ambientais, como exposição à agentes tóxicos; aspectos genéticos e epigenéticos, tais como aquisição de mutações e/ou alterações cromossômicas e alterações no mecanismo de metilação do DNA e/ou acetilação das histonas, respectivamente.<sup>21,22</sup> Outros fatores associados aos riscos predisponentes desta doença são: agentes que danificam o DNA, como benzeno (presente na gasolina e indústria química), uso de álcool, fumaça de cigarro, exposição a herbicidas, pesticidas, radiação, quimioterapia citotóxica como os agentes alquilantes (clorambucil, ciclofosfamida e melfalano), agentes inibidores da topoisomerase II (etoposídeo, mitoxantrona e antraciclina), e doenças como síndrome de Down entre outras desordens genéticas (síndrome de Klinefelter, anemia de Fanconi).<sup>3,4,11</sup>

Essa neoplasia pode ser referida como LMA primária (ou *de novo*), quando não há conhecimento do desencadeamento da doença ou LMA secundária (LMAs), ocasionado após exposição a agentes citotóxicos ou ao agravamento de outras neoplasias predisposta, como nas mieloproliferativa (NMP) (Policitemia Vera - PV, Trombocitemia Essencial - TE, Leucemia Mieloide Crônica - LMC) ou neoplasias mielodisplásicas (SMD).<sup>21</sup> Aproximadamente 10 a 15% dos pacientes com diagnóstico de LMA tem o desenvolvimento da doença relacionado exposição prévia a quimioterápicos citotóxicos ou radioterapia que potencialmente induz dano na produção de células hematopoiéticas.<sup>23,24</sup>

## 2.2. Fisiopatologia da Leucemia Mieloide Aguda

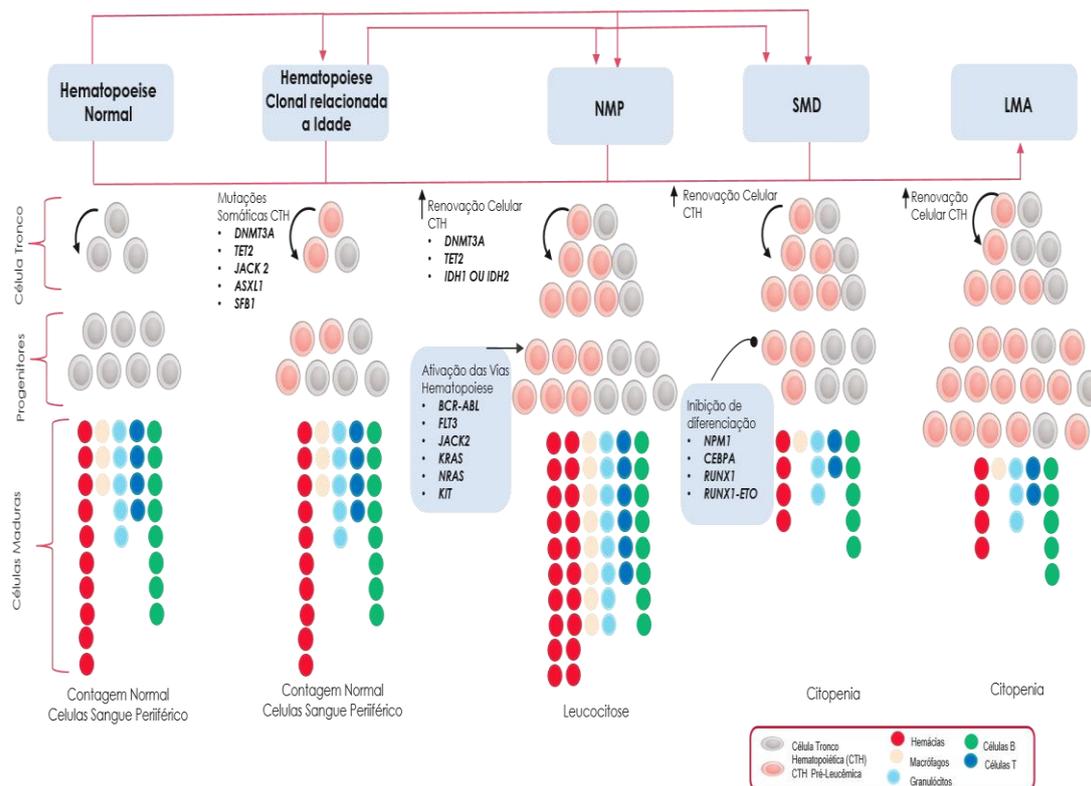
O desenvolvimento inicial da leucemia ocorre pelo surgimento de alterações genéticas e epigenéticas, resultando na transformação das células troncos hematopoiéticas (HSCs)<sup>25</sup> em célula clonal maligna.<sup>26</sup> Algumas mutações iniciais presente nas HSCs caracterizam um estado pré-leucêmico, e alterações no microambiente medular, como aumento da biodisponibilidade de ligante de crescimento e citocinas inflamatórias contribuem para a expansão clonal das células leucêmicas.<sup>27</sup> As HSCs normais e mutadas apresentam aptidão competitiva e diferenciada diante da pressão seletiva, tornando as HSCs mutadas mais geneticamente heterogêneas e estimulando a progressão de clones de HSCs pré-leucêmicos.<sup>27</sup> Aquisições de mutações adicionais nas HSCs pré-leucêmicas dão origem as células troncos leucêmicas (LSC)<sup>27</sup> e consequente formação de blastos leucêmicos indiferenciados transformando-se em LMA.<sup>28</sup> A recaída após o tratamento quimioterápico é um processo frequente na LMA, ocorrendo em aproximadamente 40 a 50% nos jovens e maioria dos idosos<sup>8</sup>, destacando a possibilidade de existência de clones de HSCs pré-leucêmicos resistentes, que adquiriam outras mutações ao invés de LSC que sobreviveram ao tratamento permitindo o restabelecimento da leucemia (Figura 2).<sup>27</sup>



**Figura 2** - Formação da Leucemia Mieloide Aguda. a) Fase de iniciação: mutações iniciadoras nas HSCs. b) Fase pré-leucêmica: HSCs transformadas em estado pré-leucêmica c) Fase leucêmica: mutações adicionais

transformadas em LSCs. d) Fase de recaída: HSCs pré-leucêmicas resistente e aquisição de outras mutações. Fonte: Masayuki, *et al.*<sup>27</sup>

Algumas mutações nas HSCs estão associadas ao aumento da renovação celular ou inibição da diferenciação progenitora, ocasionando a proliferação aumentada de células sanguíneas maduras nas NMPs, ou displasia e citopenias de células sanguíneas, como na SMD respectivamente.<sup>27</sup> Aquisição de outras mutações condutoras nessas patologias pode resultar em posterior transformação leucêmica (Figura 3).<sup>27</sup>



**Figura 3** - Desregulação das propriedades de HSC durante o surgimento de LSC e desenvolvimento de leucemia. Mutações associadas a formação da Leucemia Mieloide Aguda. Fonte: Masayuki<sup>27</sup>

A incidência da leucemia eleva-se com o avançar da idade<sup>26,29</sup>. Mutações somáticas nas HSCs são encontradas no processo de envelhecimento, principalmente em indivíduos acima de 60 anos<sup>26</sup> sem doenças hematológicas. Em estudo realizado por Siddhartha e colaboradores, avaliou a frequência de mutações somáticas associadas com a leucemia em indivíduos saudáveis, e foram descritas mutações em 5,6% dos idosos com 60 a 69 anos; 9,5% em 70 a 79 anos; 11,7% em 80 a 89 e 18,4% acima de 90 anos e raramente em indivíduo abaixo de 40 anos.<sup>26</sup> São alterações clonais relacionadas a idade (ARCH) que não comprometem a formação das células sanguíneas maduras, mas em contrapartida estão associadas a um risco aumentado na incidência de transformação em LMA (Figura 3).<sup>27</sup>

Alterações nos genes *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* e *ASXL1* são recorrentes em pacientes com LMA e surgem no início da evolução clonal estabelecendo sua identidade como HSCs pré-leucêmica.<sup>30,31</sup> A permanência destas alterações na medula óssea, foram encontradas em pacientes com LMA em remissão, caracterizando um perfil de resistência à terapia e tornando um potencial reservatório para posterior progressão leucêmica.<sup>31,32</sup>

### **2.3. Manifestações Clínicas da LMA**

A doença apresenta-se com um quadro de insuficiência hematopoiética e uma implicação na formação dos componentes sanguíneos maduros como as hemácias, plaquetas e leucócitos.<sup>5,33</sup>

Sintomas como fraqueza, fadiga e falta de ar aos pequenos esforços são frequentes, devido a diminuição da produção de hemácias. São observados em cerca de 50% dos casos: sangramentos nas mucosas, hemorragias, hematomas e epistaxe em consequente da plaquetopenia. Febre, infecções graves/ recorrentes de etiologia bacteriana, fúngica ou viral são frequentes e podem evoluir rapidamente, sendo potencialmente fatal por causa da diminuição dos leucócitos maduros. Outras manifestações inespecíficas como perda de peso e apetite, dores ósseas ou articulares são queixas observadas. A doença tem progressão rápida podendo levar a óbito em dias, semanas ou meses caso não seja adequadamente tratada.<sup>4,5,13</sup>

É uma doença clinicamente heterogênea tendo como características as variações genéticas, moleculares e diversas anormalidades cromossômicas, contribuindo para estratificação de risco e manejo clínico que influenciam nas respostas farmacológicas e sobrevivência pós-tratamento.<sup>11</sup>

### **2.4. Classificação da LMA**

O sistema de classificação da LMA é apresentado a partir de diversos avanços nos métodos diagnósticos e dividida em diferentes subtipos com características cromossômicas e variações gênicas pontuais. A classificação da LMA baseia-se frequentemente em dois sistemas: o sistema de estadiamento FAB (*Franco-Americano-Britânico*) e o sistema da Organização Mundial da Saúde (OMS). O sistema FAB fundamenta-se nas características morfológicas e citoquímicas, sendo dividida em oito subgrupos de M0 a M7 e classificadas de acordo com o desenvolvimento celular.<sup>11,34</sup>

As formas imaturas dos glóbulos brancos compreendem os subtipos M0 ao M5. O subtipo M6 está associado a imaturidade das células eritróide e M7 na imaturidade das células que formam as plaquetas. As descrições dos antígenos marcadores que auxiliam na classificação e estão descritos conforme o quadro 1 abaixo.<sup>34</sup>

Nas últimas décadas a classificação da LMA tem sido constantemente atualizada, de uma classificação baseada na morfologia exclusiva para uma modificação mais fundamentada com base na genética molecular, e as alterações citogenéticas e moleculares representadas recentemente são as mais utilizadas.<sup>35,36</sup>

**Quadro 1** - Classificação Franco-Americano-Britânico das leucemias mielóides aguda.

<b>Classificação Franco-Americano-Britânico (FAB) e Marcadores Imunofenotípico</b>		
<b>Subtipo</b>	<b>Nome</b>	<b>Marcadores e Características</b>
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada	Pelo menos 1 marcador: CD13, CD33, CD11b
M1	Leucemia mieloblástica aguda com maturação celular mínima	Pelo menos 3 marcadores: CD13, CD33, CD34, CD117, CD4, CD11b e o HLA-DR
M2	Leucemia mieloblástica aguda com maturação	CD19 ou CD56+CD33 e CD34
M3	Leucemia promielocítica aguda (conhecida também por LPA)	CD13 e CD3; CD34, HLA-DR, CD14 negativo
M4	Leucemia mielomonocítica aguda (conhecida também por LMMA)	CD13 e CD33 + CD14, CD15 e CD11b
M5	Leucemia monocítica aguda	CD14, CD36, CD64, CD4, CD38, CD11c
M6	Leucemia eritróide aguda	CD 36, CD45 negativo; CD71 + Glicoforina positivo
M7	Leucemia megacarioblástica aguda	CD13, CD36 + CD41, CD42 ou CD61 positivo

Fonte: adaptado de Santos e Cordeiro, 2021<sup>34</sup>

A classificação da OMS é o principal sistema que subdivide as LMA considerando os marcadores moleculares e translocações cromossômicas, esses fatores afetam o prognóstico e a escolha terapêutica.<sup>24</sup>

O sistema de classificação da OMS foi revisada recentemente como parte da sua 5ª edição da Classificação da Organização Mundial da Saúde de Tumores Hematolinfóides 2022 e divide a LMA em 04 subgrupos: 1) LMA com anormalidades genéticas definidoras; 2) LMA relacionados à mielodisplasia; 3) LMA com outras alterações genéticas definidoras e 4) LMA definidas por diferenciação.<sup>24</sup>

**Quadro 2 - Classificação das leucemias mieloides aguda segundo a Organização Mundial de Saúde em 2022.** <sup>24</sup>

Grupo	Classificação
<p><b>Leucemia mieloide aguda com anormalidades genéticas definidoras:</b></p>	<p>LMA com fusão PML:RARA / t (15:17)  LMA com fusão RUNX1:RUNX1T1/ t(8:21)(q22;q22.1)  LMA com fusão CBFβ:MYH11 / inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)  LMA com fusão DEK:NUP214 / t(6:9)(p23;q34.1)  LMA com fusão RBM15:MRTFA / t(1:22)(p13.3;q13.3)  LMA com fusão BCR:ABL1 / t(9:22)  LMA com rearranjo KMT2A  LMA com rearranjo MECOMMA  LMA com rearranjo NUP98  LMA com mutação NPM1  LMA com mutação CEBPA</p>
<p><b>Leucemia mieloide aguda relacionada à mielodisplasia **</b></p>	<p><b>**Anormalidades citogenéticas e moleculares definindo LMA relacionada a mielodisplasias</b></p> <p><b>Definindo anormalidades citogenéticas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cariótipo complexo ( ≥ 3 anormalidades)</li> <li>▪ Deleção de 5q ou perda de 5q devido a translocação desequilibrada</li> <li>▪ Monossomia 7, deleção de 7q ou perda de 7q devido a translocação desequilibrada</li> <li>▪ Deleção de 11q</li> <li>▪ Deleção de 12p ou perda de 12p devido a translocação desequilibrada</li> <li>▪ Deleção de 13 ou 13q de monossomia</li> <li>▪ Deleção de 17p ou perda de 17p devido a translocação desequilibrada</li> <li>▪ Isocromossomo 17q</li> <li>▪ Idic(X) (q13)</li> </ul> <p><b>Definindo mutações somáticas:</b></p> <p><b>ASXL1, BCOR , EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2</b></p>
<p><b>Leucemia mieloide aguda com outras alterações genéticas definidas</b></p>	
<p><b>Leucemia mieloide aguda definida por diferenciação:</b></p>	<p>LMA com diferenciação mínima  LMA sem maturação  LMA com maturação  Leucemia basofílica aguda  Leucemia mielomonocítica aguda  Leucemia monocítica aguda  Leucemia eritróide aguda  Leucemia megacarioblástica aguda</p>

## 2.5. Diagnóstico da LMA

O achado laboratorial mais comum na suspeita clínica de LMA incluem alterações quantitativas no hemograma nas três linhagens sanguínea (eritrócitos, plaquetas e neutrófilos) onde frequentemente a anemia e plaquetopenia são evidente, os leucócitos podem estar aumentados, normal ou baixo.<sup>4</sup>

A biópsia e o aspirado de medula óssea é obrigatório para diagnóstico da doença e frequentemente evidencia uma hiperplasia medular com números baixos de células hematopoiéticas normais e difusa população blástica.<sup>37</sup> São também fundamentais para análise morfológica, imunofenotípica, cariotípicas e/ou molecular podendo assim classificar a leucemia, conforme estágio de maturação.<sup>20</sup>

A contagem de mieloblastos na medula óssea ou sangue periférico, para definir LMA, deve ser igual ou superior a 20% de blastos e realizada por citometria de fluxo. Em casos de LMA com presença de anormalidades genéticas definidoras (Quadro 2), diagnóstico independe da contagem de blasto, conforme estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na última atualização em 2022, assim correlacionando os achados morfológicos e alterações genéticas moleculares.<sup>24</sup>

Somente pelas características morfológicas não é possível diferenciar os blastos da linhagem mieloide e da linhagem linfóide.<sup>38</sup> Atualmente o exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) é uma ferramenta importante para o diagnóstico, identificação dos subtipos de leucemias e quantificar a doença residual mensurável (DRM).<sup>38</sup> Para avaliação da linhagem de uma nova leucemia aguda, alguns marcadores precisam ser avaliados, como marcadores mielomonocítico e linfóides. A existência de marcadores de superfície (CD – *Cluster of differentiation*) nas células hematopoiéticas possibilita identificar a LMA utilizando anticorpos monoclonais para confirmação de imaturidade blástica e expressão antigênica aberrante que irão diferenciar células neoplásicas e normais<sup>34</sup>. Os mieloblastos se distingue de células mais maduras por expressarem marcadores de imaturidade como CD117, CD34, e ausência de marcadores de maturação CD11b, CD15 e CD16.<sup>34 38</sup> Alguns marcadores específicos da linhagem mieloide incluem CD13, CD117, CD15, CD33, HLA-DR e enzima intracitoplasmática conhecida como mieloperoxidase (MPO). Marcadores monocíticos são expressos pelos antígenos CD4, CD14, CD33 e CD64. Para a avaliação inicial da LMA os marcadores linfóides devem ser incluídos e assim contribuir para diferenciar os blastos mieloide.<sup>34</sup>

A citogenética possibilita a identificação de alterações cromossômicas como translocações, inversão e deleção, sendo essas anormalidades um achado frequente em aproximadamente 55% dos casos de indivíduos com LMA.<sup>39</sup> As técnicas citogenéticas mais utilizadas incluem cariótipo convencional Banda G e o *FISH* (hibridação *in situ* por fluorescência), sendo o cariótipo importante para análise estrutural/numérica dos cromossomos e o *FISH* permite identificar alterações presentes nos cromossomos, contribuindo para o diagnóstico e/ou prognóstico, classificação de risco (favorável, intermediário ou desfavorável) e na escolha terapêutica dos subgrupos de pacientes com LMA.<sup>39</sup>

Com as metodologias de biologia molecular é possível detectar mutações genéticas isoladas ou em combinação, presentes na LMA ao diagnóstico ou no momento da recidiva contribuindo para estratificação de risco principalmente em pacientes com cariótipo normal e são cada vez mais reconhecidos como marcadores essenciais para compreensão da heterogeneidade da LMA e direção de novas terapias.<sup>40</sup> Muitas alterações genéticas foram identificadas em pacientes com LMA graças ao avanço em estudos moleculares e muitas mutações podem ser frequentemente adquiridas ou perdidas durante o curso da doença<sup>8</sup>. A triagem de mutações deve ser uma prática de rotina no diagnóstico da LMA e mutações importantes como *FLT3-ITD* e *DNMT3a* estão associadas a um alto risco de recaída e baixa sobrevida, por outro lado, outras mutações como *NPM1* estão associadas a desfechos mais favoráveis.<sup>4</sup>

## 2.6. Prognóstico e Estratificação Risco

Existem diferentes critérios para estratificação de risco da LMA e alguns aspectos estão relacionados ao paciente e outros com a doença.<sup>37</sup> Na avaliação relacionada ao paciente, a idade avançada (superior a 65 anos) está associada a uma pior sobrevida livre de recaída mesmo em condições citogenéticas “favoráveis” quando comparados a grupos de pacientes com idade inferior e com mesmos achados citogenéticos e moleculares (Quadro 3).<sup>41</sup> Contudo, a idade não deve ser o único fator determinante sobre o manejo terapêutico, logo as condições clínicas, estado geral, comorbidades específicas, estado de desempenho também contribuem para tolerância da quimioterapia nessa faixa etária e não sendo aptos à terapia mais intensiva.<sup>10</sup>

Fatores específicos da patologia, que predizem um desempenho ruim estão associados ao aumento de leucócitos no diagnóstico, condição hematológica, citogenética

e marcadores moleculares com mutações (*NPM1*, *FLT3*, *IDH1/2*, *TP53*, *CEBPA*, *RUNX1*, *ASXL1*)<sup>8,37</sup> que estão associados a grande relevância prognóstica e rotineiramente devem ser utilizados na prática atual.<sup>10</sup> Recentemente as diretrizes *European Leukemia Net* (ELN) foi revisada e novas recomendações foram atualizadas em 2022,<sup>10</sup> e para avaliação do impacto prognóstico<sup>42</sup> categorizou-se os riscos da LMA, divididos em três grupos: favorável, intermediário e adversos.

**Quadro 3** – Classificação de risco genético *ELN* 2022 e prognóstico.

Categoria de risco	Anormalidades Genéticas
<b>Favorável</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t(8;21)(q22;q22.1) / <i>RUNX1::RUNX1T1</i></li> <li>• inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) / <i>CBFB::MYH11</i></li> <li>• <i>NPM1</i><sup>mutante</sup> sem <i>FLT3-ITD</i></li> <li>• <i>CEBPA</i> mutação <i>in-frame</i> bZIP *</li> </ul>
<b>Intermediário</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>NPM1</i><sup>mutante</sup> com <i>FLT3-ITD</i></li> <li>• <i>NPM1</i><sup>selvagem</sup> com <i>FLT3-ITD</i></li> <li>• t(9;11)(p21.3;q23.3) / <i>MLLT3::KMT2A</i></li> <li>• Anormalidades citogenéticas e/ou moleculares não classificadas como favorável ou adversa</li> </ul>
<b>Adverso</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t(6;9)(p23;q34.1) / <i>DEK::NUP214</i></li> <li>• t(v;11q23.3) / <i>KMT2A</i> rearranjado</li> <li>• t(9;22)(q34.1;q11.2) / <i>BCR::ABL1</i></li> <li>• t(8;16)(p11;p13) / <i>KAT6A::CREBBP</i></li> <li>• inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3)(q21.3;q26.2) / <i>GATA2</i>, <i>MECOM(EVII)</i></li> <li>• -5 ou del(5q); -7; -17/abn (17p)</li> <li>• Cariótipo complexo, cariótipo monossômico</li> <li>• <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i> ou <i>ZRSR2</i> (mutantes)</li> <li>• <i>TP53</i><sup>mutante</sup></li> </ul>

\* Região básica do zíper de leucina (bZIP) do *CEBPA*. Fonte: Döhner H, *et al*<sup>10</sup> e Bullinger L, *et al*<sup>43</sup>

Na categoria favorável inclui as anormalidades citogenéticas t(8:21), inv(16) e estudo recente comprovaram que paciente com variantes *NPM1* sem *FLT3-ITD* também é significativamente favorável.<sup>10</sup> As alterações em *RUNX1*, *ASXL1* e *TP53*, t(6;9), t(9;22), inv(3), rearranjo *KMT2A*, cariótipo monossômico ou complexo são agrupados no risco adverso.<sup>18,10</sup> O risco intermediário incluem cariótipo normal, t(9,11), e recentemente revisada pelas diretrizes ELN, *FLT3-ITD* associada com *NPM1* são agora classificadas neste risco.<sup>18,10</sup>

Em estudos recentes uma abordagem de pós tratamento na LMA, em especial na prática de identificação da doença residual mensurável (DRM), o limite inferior à 5% de

blasto na MO tem sido descrito à resultados prognóstico<sup>32</sup> e assim estabelecer um estado de remissão completa, resposta sobre o tratamento pós-remissão, identificação de recaídas emergente (intervenções mais precoces), monitoramento rigoroso no pós transplante.<sup>32</sup>

## 2.7. Tratamento

A escolha terapêutica na LMA é baseada no subtipo e na estratificação de risco dos pacientes e o cuidado terapêutico envolve o uso de intensa quimioterapia (à depender do bom estado geral do paciente incluindo idade), e algumas medidas de suporte, como transfusão de sangue, plaquetas, profilaxia antimicrobiana, terapia citorrredutora entre outras.<sup>18</sup> Frequentemente o tratamento padrão da LMA para adultos jovens <60 anos inicia-se com uma fase de indução, onde administra-se quimioterapia citotóxica baseada em altas doses de citarabina por sete dias e uma antraciclina (idarrubicina ou daunorrubicina) por três dias, conhecido como regime “3+7”, com o objetivo de controlar a doença e atingir remissão completa (RC) ou seja, ausência de sinais e sintomas da doença.<sup>4</sup> Pacientes com idade mais avançada (>60 anos), devido à alta toxicidade dos medicamentos, tornam-se ineleável para terapia padrão sendo assim tratados com baixas doses de citarabina.<sup>2, 18</sup>

Outra fase pós indução é a chamada terapia de consolidação, que consiste em ciclos adicionais de quimioterapia convencional ou tratamento com intensa doses de citarabina até 3000 mg/m<sup>2</sup> (em pacientes idosos a dose pode ser reduzida), seis doses em cada ciclos e um total de quatro ciclos e, seguidos ou não de transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCHC) autólogo ou alogênico.<sup>18</sup> Em pacientes mais jovens, 60 a 80% atingem a RC com o regime padrão<sup>2</sup>, onde a taxa de cura nessa faixa etária é de 30 a 40% e, pacientes >60 anos (40 a 60%) conseguem atingir a RC com taxa de 5% a 15% de cura.<sup>18</sup>

Um subtipo distinto de LMA, a leucemia promielocítica aguda (LPA), caracteriza-se por presença de promielócitos hipergranulares envolvendo translocação t(15;17), resultando no gene de fusão PML-RARA e possuindo uma abordagem terapêutica diferenciada. A fase de indução com antraciclina e ácido retinoico foi evidenciado em pesquisas uma taxa de RC superior a 90% e taxa de cura de 80%.<sup>40</sup>

Atualmente, no Brasil o tempo médio de sobrevida dos pacientes com LMA é de 8,5 meses, e a taxa de sobrevida global em 5 anos é de 24%.<sup>2</sup> Nos grandes centros mundiais a taxa de cura da LMA é aproximadamente de 20 a 75% dependendo da citogenética apresentada.<sup>44</sup> Algumas terapias individualizadas são propostas, após aprovação de drogas

direcionadas a alguns subgrupos específicos de LMA<sup>2</sup>, como terapia com inibidor de *BCL-2* (Venetoclax), droga hipometilantes (azacitidina e decitabina), inibidores de *FLT3* e inibidores de *IDH1/2*.<sup>8</sup>

## 2.8. Aspectos genéticos e moleculares da LMA

Nas últimas duas décadas, diferentes ensaios clínicos e experimentais tem revelado mais de 300 translocações cromossômicas e mutações genéticas associadas à LMA.<sup>45</sup> Aproximadamente 45 a 50% dos pacientes com LMA possuem cariótipo normal, especificando que outras alterações podem estar envolvidas na leucemogênese.<sup>11</sup>

As possíveis razões para a gênese da LMA está relacionada com variabilidade de episódios mutagênicos e expressão em alguns genes, como os envolvidos na ativação das vias de transdução de sinal associados à vantagem proliferativa e sobrevivência, sendo classificados como mutações de classe I, como exemplos *FLT3*, *RAS*, *c-KIT*, *PTPN11*, *NF1*, *TEL-PDGRβ* e as mutações de classe II compreendendo os que afetam fatores de transcrição do ciclo celular produzindo alterações na diferenciação como exemplos genes de fusão *CBFB-MYH11*, *AML1-ETO*, *TEL-AML1*, *PML-RARA*, *NLL*, *NUP98-HOXA9*, *CEPBA*, *NPM1*, *AML1*, *AML-AMP19*.<sup>45</sup>

Uma terceira classe envolve mutações em genes que codificam modificadores epigenéticos como *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *IDH1* e *IDH2* são frequentemente encontrados em pacientes com LMA principalmente em idosos, conferindo significado importante para patogênese da doença.<sup>40,43</sup>

As anormalidades genéticas mais prevalentes na LMA e associadas com cariótipo normal estão *NPM1* e *FLT3* equivalendo 45 a 55% e a 35% a 45% dos casos, respectivamente.<sup>45</sup> Essas alterações estão associadas ao prognóstico, e mutações no gene *NPM1* possuem prognóstico favorável, enquanto mutações no gene *FLT3* estão associadas à prognóstico desfavorável.<sup>45</sup>

No projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), foram analisados o genoma de 200 pacientes adultos com LMA *de novo*, e foram encontradas uma média de 13 mutações nos genes incluindo variações de nucleotídeo único (SNVs) e pequenas inserções/deleções (InDel).<sup>46</sup> Mutações recorrentes foram identificadas em 23 genes, e aproximadamente 99% das amostras apresentavam pelo menos uma mutação não sinônima, dentre as nove categorias funcionais dos genes que são regularmente associado a leucemogênese.(Quadro 4).<sup>46</sup>

**Quadro 4** - Categoria funcional de genes afetados na LMA e a frequência.

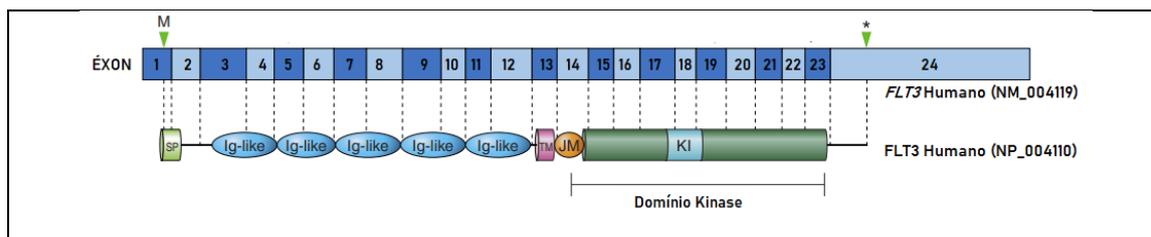
<b>Categoria Funcional</b>	<b>Gene mutantes na LMA</b>	<b>Importância na Leucemogênese</b>	<b>Frequência no coorte TCGA*</b>
Genes de sinalização	<i>FLT3, KIT, KRAS, NRAS</i>	Sinalização ativada confere vantagem proliferativa através das vias de sinalização RAS/RAF, JAK/STAT, PI3K/AKT	59 %
Gene associado a metilação de DNA	<i>DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2</i>	Padrões desregulares de metilação do DNA levam a desregulação transcricional do gene relevantes para leucemia. Em mutações em IDH, a produção de oncometabólitos 2-hidroxiglutarato tem impacto na metilação DNA através do comprometimento de TET2	44 %
Fusões de gene fator transcrição	<i>PML-RARA, MYH11-CBFb, RUNX1-RUNX1T1</i>	A função aberrante da fusão resulta em desregulação transcricional e diferenciação hematopoiética prejudicada.	18%
Gene fator transcrição (TF) mielóide	Mutação TF ( <i>RUNX1, CEBPA</i> )	A função aberrante do TF resulta em desregulação transcricional e diferenciação hematopoiética prejudicada.	22%
Gene modificadores da cromatina	Mutações <i>ASXL1, EZH2</i> Fusões <i>KMT2A (MLL)</i>	Desregulação da cromatina (metilação das histonas H3 e H2A) e comprometimento causado pela fusão KMT2A levam a desregulação da transcrição	30%
Gene que codifica a nucleofosmina	<i>NPM1</i>	Mutações nessa proteína transportadora multifuncional resultam em múltiplas desordens nas vias celulares regulados pelo gene NPM1	27%
Gene supressor do tumor	<i>TP53, WT1, PHF6</i>	Mutações levam a desregulação da transcrição e degradação	16%
Genes do complexo de spliceossoma	<i>SRSF2, U2AF1,</i>	Alterações na funcionalidade de spliceossoma e desregulação no processamento do RNA ocasiona padrões de splicing aberrante	12 %
Genes do complexo de coesina	<i>STAG2, RAD21, SMC1 E SMC3</i>	Mutações podem levar a segregação precisa dos cromossomos e afetar a regulação da transcrição.	13%

Fonte: Adaptado de Bullinger, Lars *et al.* 2017. <sup>43</sup>

Em um estudo de coorte realizado com 280 pacientes com LMA secundária transformada de NMP, houve uma incidência significativa da presença da variante *JAK2* neste grupo (15,3%).<sup>47</sup> Outras alterações concomitantes foram observadas, e incluíam *FLT3* (17,4%), *WT1*(2,3%), *RUNX1*(11,6%), *IDH1/2*(25,6%) e *NRAS* (17,4%) onde algumas variantes de *JAK2* são descritas como indutoras de alterações funcionais e são altamente relevante para transformação em leucemias.<sup>47</sup>

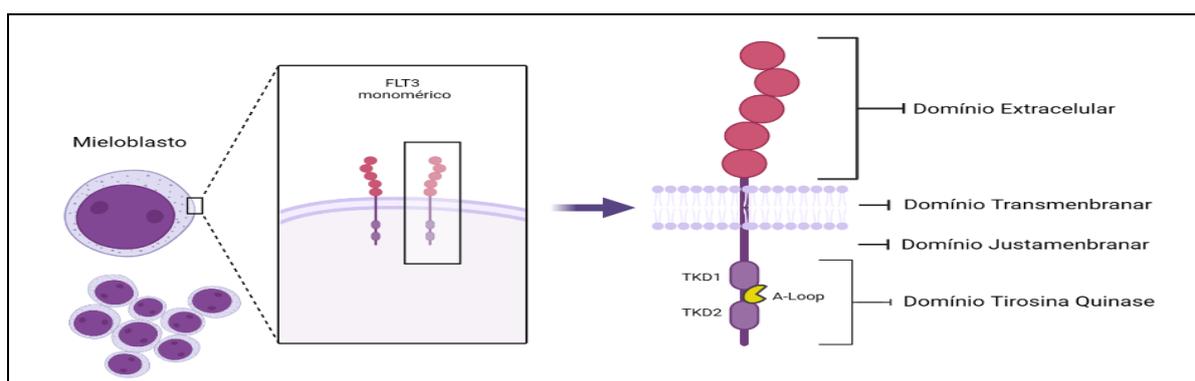
## 2.9. Aspectos moleculares do FMS-Like *Tirosina Quinase 3 (FLT3)*

O gene *FLT3* foi isolado pela primeira vez em 1990,<sup>48</sup> por grupos de pesquisadores independentes (*Rosnet et al.*) usando células troncos humanas. Este gene codifica um receptor tirosina quinase (RTK) do tipo FMS classe III.<sup>7,48,49</sup> O *FLT3* (ID NCBI:2322) está localizado no cromossomo 13, locus q12.2.<sup>50</sup> O gene completo é constituído de 104.953 nucleotídeos, distribuídos em 24 éxons. (Figura 4)<sup>50</sup>



**Figura 4** - Estrutura gênica *FLT3* (NM\_004119) contendo 24 éxons. Estrutura proteica (NP\_004110) do *FLT3* Humano *FMS-like* tirosina quinase 3. <sup>51</sup> Fonte: Adaptado de *Kazi e Rönnstrand* <sup>55</sup>

A tradução do gene *FLT3* inicia no meio do éxon 1 e finaliza até parte do éxon 24.<sup>51</sup> Uma proteína com 933 aminoácidos (aa) é codificada, com estrutura compreendida em quatro domínios funcionais: domínio extracelular, composto pelo peptídeo sinal (éxon 1 e 2, tem 26 aa) e cinco subdomínio semelhantes a imunoglobulina (Ig) no éxon 3 a 12; um domínio transmembranar (TM) entre aminoácidos 542 a 564 codificado pelo éxon 13; o domínio justamembranar (JM) no éxon 14 e 572 a 603 aa; domínio intracelular C-terminal: compreendido por dois subdomínio tirosina quinase (TKD1 e TKD2) variando do éxon 15 ao 23, que são conectados por um loop de ativação (A-loop). (Figura 4 e 5).<sup>48,51,52,53,54</sup>

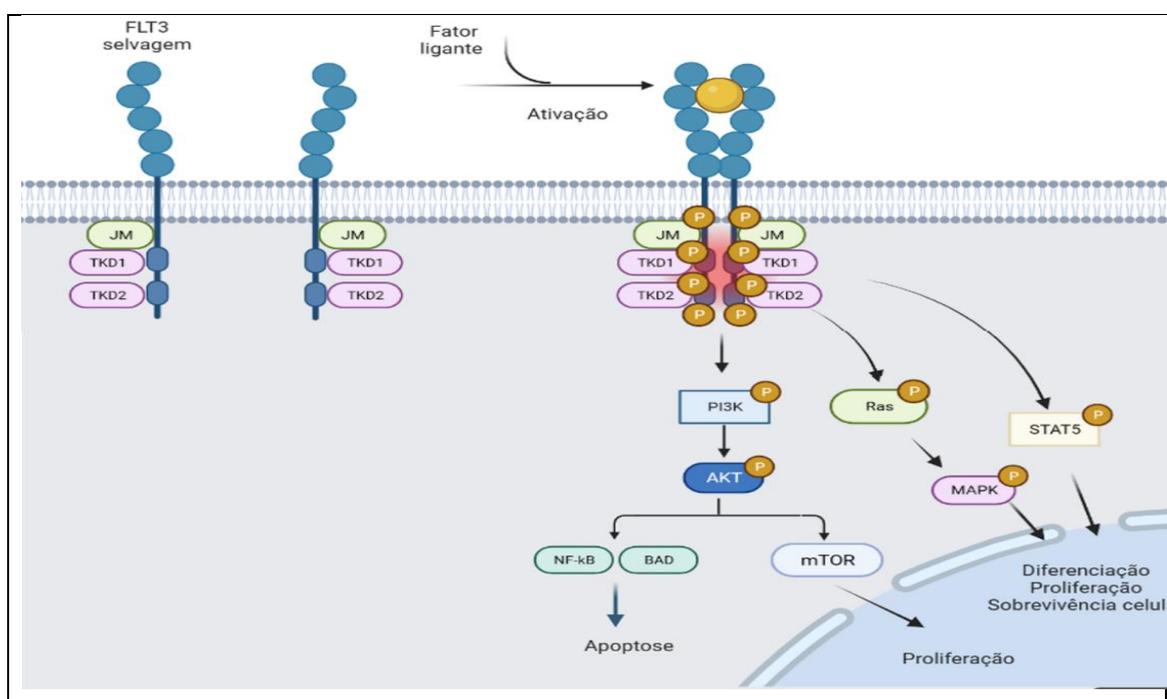


**Figura 5** - Ilustração de um *FLT3* monomérico ancorado na membrana plasmática com o domínio transmembranar (TM), e o domínio ligação ao ligante semelhante Ig projetado para meio extracelular. No citoplasma o domínio justamembranar (JM) se conecta com os dois lobos do domínio quinase (TK1 e TK2) que estão ligados pelo loop de ativação (A-loop). Fonte: O Santos M (2023) adaptado *Tecik e Adan* <sup>54</sup>

Essa proteína é um membro da família de receptor de tirosina quinase ligado a membrana (RTK), e amplamente expresso nas células progenitoras hematopoiéticas imaturas da linhagem mieloide e linfóide na medula óssea, possui participação importante na hematopoiese incluindo o processo de proliferação, diferenciação e apoptose.<sup>50</sup> O receptor *FLT3* do tipo selvagem (*FLT3<sup>selvagem</sup>*) em condições normais, é monomérico quando inativo,<sup>56</sup> e devido a interação do domínio JM e TK, desempenha um importante papel regulatório ao bloquear o sítio de ligação de ATP e permanecer nesta condição até

que o domínio extracelular interaja com o ligante, iniciando o processo dimérico (Figura 5).<sup>55</sup>

O fator ligante (FL) é uma proteína extracelular tipo 1, expressa com uma forma ligada a membrana ou solúvel pelas células do estroma na medula.<sup>56</sup> A ligação do FL ao domínio extracelular de FLT3, resultando no processo de dimerização e posteriormente autofosforilação dos resíduos de tirosina no receptor, induzindo múltiplas vias de sinalização intracelular, como PI3K(*phosphatidylinositol 3-kinase*), RAS/ERK/MAPK (*mitogen-activated Kinase protein*) e STAT5 (*Signal Transducer and activator of transcription 5A*) aumentando a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular hematopoiética (Figura 6).<sup>7,50, 57</sup>



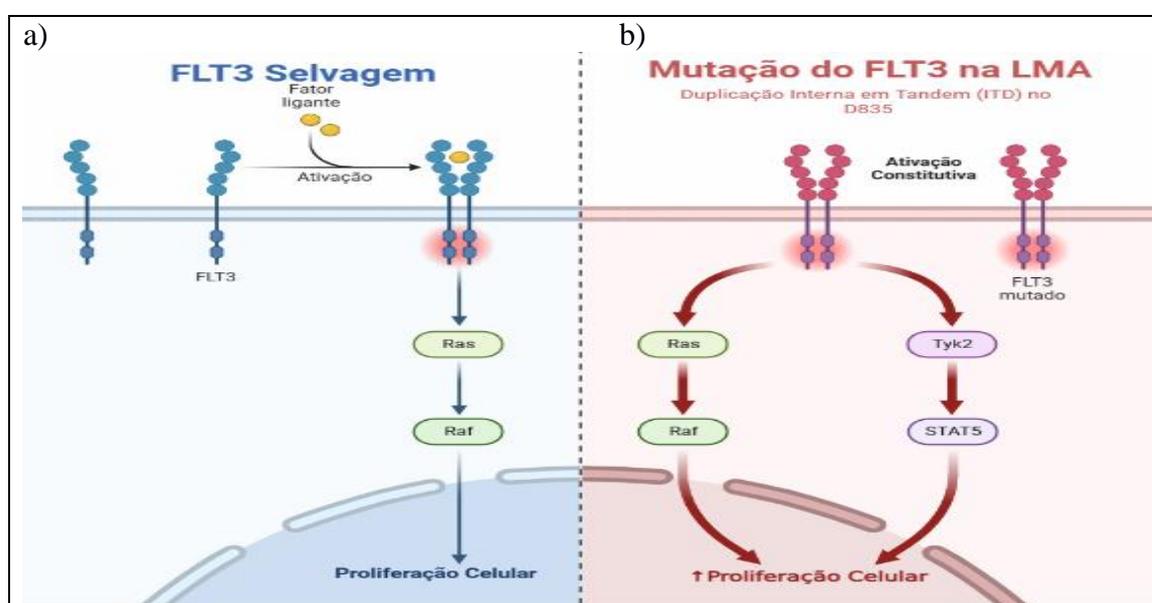
**Figura 6** - Vias de sinalização envolvidas na ativação do receptor FTL3 com o fator ligante.  
Fonte: O Santos M (2023)<sup>57</sup>

O FL não induz sozinho a proliferação hematopoiética normal, age em sinergismo com outros fatores de crescimento hematopoiético e interleucinas ao se ligar ao *FLT3*, estimulando a atividade do receptor da tirosina quinase e o crescimento das células progenitoras na medula óssea.<sup>52</sup> Além do *FLT3* conferir importância aos processos fisiológicos normais das células hematopoiéticas, também está associado a leucemogênese. Essa via de sinalização está expressa em 70% a 100% dos blastos leucêmicos de pacientes com LMA.<sup>58</sup> O *FLT3* é um proto-oncogene, possui capacidade de estimular a proliferação e inibição da apoptose contribuindo para sobrevivência das células blásticas na leucemia.

## 2.10. Variantes e aspectos funcionais do *FLT3*

Variantes no *FLT3* têm sido descritos como a alteração genética mais observada na LMA *de novo* em adultos, ocorrendo cerca de 30% dos casos, e pacientes que progridem de SMD para LMA são relatadas aproximadamente 15% dos casos com mutações no *FLT3*.<sup>11,57,58</sup>

A existência de variantes no *FLT3* resulta na dimerização e ativação constitutiva do receptor, independente da presença do ligante. Com o *FLT3* alterado, ocorre a autofosforilação do receptor, resultando na ativação da sinalização intracelular e aumentado risco de recaída (Figura 7).<sup>36,55,59</sup>

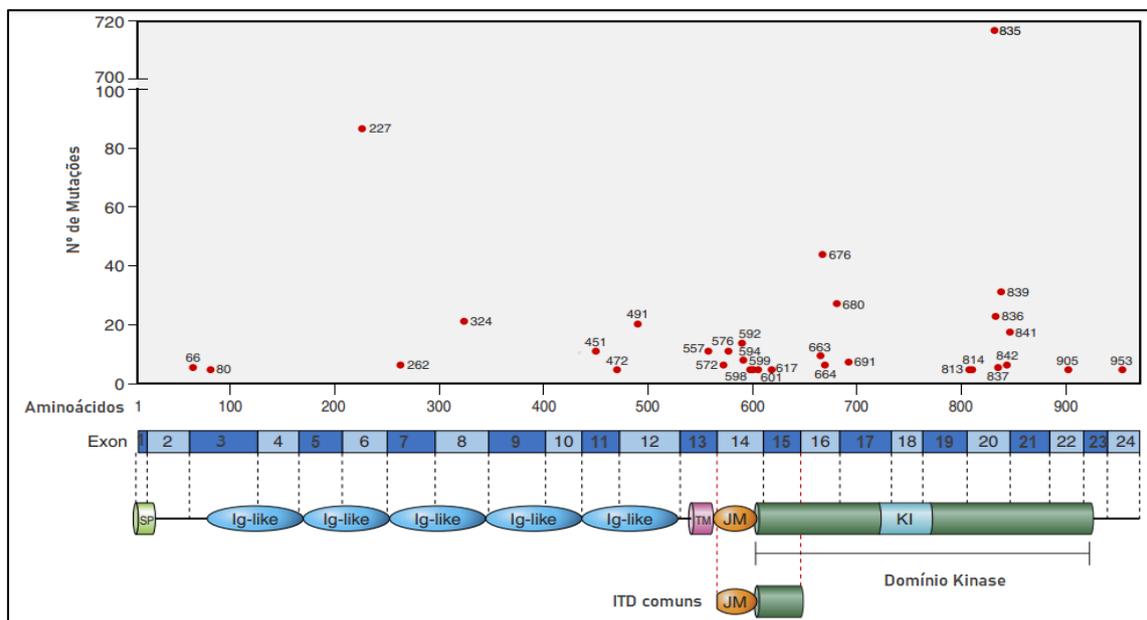


**Figura 7** - a) *FLT3* selvagem monomérica e fator ligante (FL) ocorrendo autofosforilação e ativação das vias de sinalização intracelular. b) *FLT3* mutado forma um dímero independentemente de ligante, resultando ativação constitutiva do receptor e aumento da proliferação celular.<sup>57</sup> Fonte: Adaptado de Biorend

Dois principais tipos de alterações estão atribuídos ao receptor de FLT-3, e a mais frequente (69,5%) é a de duplicações interna em tandem (*FLT3-ITD*) localizado no domínio justamembranar (JM) nos éxons 14 e 15 do gene,<sup>7</sup> com variação de tamanhos de 3 até 1000 pares de base (pb).<sup>36,60</sup>

Variantes no loop de ativação do domínio tirosina quinase II (*FLT3-TKD2*)<sup>58</sup> é o segundo tipo mais comum no receptor de FLT3 (30,5%) e está presente em aproximadamente 7% dos pacientes adultos com LMA.<sup>61</sup> Envolve frequentemente variantes pontuais do D835 no domínio de ativação do TKD2 (90,5%),<sup>59</sup> modificando a codificação da proteína em substituição do ácido aspártico por um resíduo de tirosina

(Asp835Tyr) no éxon 20.<sup>7</sup> Outra , com menor escala, ocorre dentro do TKD1 (9,5%) nos resíduos N676 e F691. Raras variantes pontuais, inserções/deleções foram identificadas em menos de 1% dentro do domínio extracelular: na posição S451.<sup>42</sup>



**Figura 8** - Distribuição das diferentes mutações em *FLT3*, descritas na literatura e sua localização. A maioria das variantes ocorrem nos éxons 14,15 e 20. Fonte: Adaptado de Kazi e Rönnstrand<sup>55</sup>

Estudos relatam *FLT3-ITD* na LMA, associados a redução da taxa de sobrevida com risco aumentado de recaída<sup>36</sup> e piores resultados dependendo da frequência alélica variante e comprimento da duplicação interna em tandem.<sup>62</sup> Um estudo realizado nos Estados Unidos por Whitman *et al.*, avaliou impacto prognóstico de mutação *FLT3-TKD* no domínio D835/I836 em pacientes com LMA <60 anos com cariótipo normal concluindo que essa variante também está associada com a redução do tempo de remissão e pior sobrevida livre de doença<sup>61</sup> igualmente já descrito em pacientes com *FLT3-ITD* com resultado pior e sobrevida mediana de 13,1%.<sup>63</sup>

Em um estudo de coorte realizado no Brasil, na cidade de Minas Gerais, avaliou a prevalência de variantes do *FLT3* em pacientes adultos com LMA no ano de 2004 a 2013 e um total de 144 amostras foram testadas. Neste estudo observou *FLT3-ITD* em 13,9% (20/144) pacientes, e descrito concomitante com *NPM1* em 8,6% (12/144) e *NPM1* alterado em 5,7% (8/144). Todos *FLT3-ITD* com informações citogenéticas à disposição (N=14) foram agrupados no grupo de risco intermediário.<sup>64</sup>

O impacto prognóstico no *FLT3* podem ser afetados de acordo com resultados citogenético e recomenda-se a pesquisa de mutação no *FLT3* para estratificar os pacientes

em grupos de riscos distintos.<sup>42,57</sup> Como descrito anteriormente pacientes de LMA com variantes em *NPM1* estão relacionados a um prognóstico favorável porém se paciente apresentar simultaneamente mutação no *FLT3* (ITD/TKD) o prognóstico é modificado.<sup>7</sup>

### **2.11. Inibidores direcionados ao *FLT3* e resistência terapêutica**

O gene *FLT3* tornou-se um dos alvos terapêuticos importantes na LMA, e diferentes inibidores direcionados ao *FLT3* foram desenvolvidos e categorizados em inibidores de primeira e segunda geração.<sup>51,56,57</sup> Os inibidores de *FLT3* de primeira geração são inibidores multiquinase, e entretanto não seletivo para *FLT3* (midostaurina, sorafenibe, sunitinibe e ponatinibe) ao contrário dos inibidores de segunda geração que inibem seletivamente o *FLT3* (quizartinibe, gilteritinibe e crenolanibe).<sup>56</sup> Após estudos envolvendo diferentes inibidores de *FLT3* (estudo RATIFY), a droga midostaurina (Rydapt®) um inibidor de multiquinase (*FLT3* com mutação ITD, TKD, C-Kit, *FLT3* selvagem tipo selvagem e outras) quando associada à quimioterapia convencional de indução e consolidação mostrou superioridade na sobrevida global (SG) e foi aprovada em 2017 pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA como o primeiro inibidor de *FLT3* combinado com a quimioterapia padrão<sup>57</sup> para pacientes com diagnóstico recente.<sup>65</sup>

Outras drogas de segunda geração com atividade inibitória mais sensível e seletivas foram desenvolvidas. Em 2018, no Japão, foi aprovado o gilteritinibe (Xospata®) um inibidor duplo *FLT3/AXL*, altamente seletivo e potente como agente único para pacientes com LMA recidiva/refratária (R/R) com variantes *FLT3*, onde um estudo de fase 3 (estudo ADMIRAL) evidenciou remissão completa (RC), recuperação hematológica parcialmente, SG mediana (9,3 meses) tendo maior significância em comparação a quimioterapia convencional (SG 5,6 meses). O Quizartinib (Vanflyta®, AC220) aprovado em 2019, também no Japão, é um inibidor *FLT3* tipo 2 altamente mais seletivo para *FLT3-ITD* mas não em *FLT3-TKD*, pacientes que foram tratados com quizartinib a mediana SG (6,2 meses) foi superior a terapia convencional (4,7 meses).<sup>57</sup> Diferentes ensaios clínicos estão em andamento envolvendo outros inibidores de *FLT3*, como inibidor de multiquinase Sorafenibe; Crenolanibe inibidor de segunda geração com ampla afinidade para *FLT3* e outras estruturalmente relacionado *PDGRF*, c-kit.<sup>65</sup>

A terapia com inibidores alvo de *FLT3* nos últimos anos tornou-se desafiador, uma vez que essas mutações ITD/TKD rapidamente desenvolveram resistência aos fármacos<sup>65</sup> e mutações secundárias foram adquiridas principalmente nos domínios kinase.<sup>55</sup> São

descritos mutações pontuais em TKD1 (N676,F691 e G697) e TKD2 (D835 e Y842 no loop de ativação), que após a terapia com diversos inibidores de *FLT3* estão relacionados a resistência das células blásticas.<sup>66</sup>

**Quadro 5** - Mutações no *FLT3* que levam a resistência ao inibidor.<sup>65</sup>

Inibidor	Mutações
Midostaurina	N676K, F691L, Y693C, G697S, D698N
Gilteritinibe	F691La
Quizartinib	F691L, D835F/V/Y, Y842C/H
Sorafenibe	F691L, D835F/V/Y, Y842C/H
Crenolanibe	F691L

O mecanismo de resistência no *FLT3* às drogas inibitórias pode ser multifatorial, incluindo fatores intrínsecos ou extrínsecos ao gene, como aquisição de mutações adicionais além das já preexistentes do *FLT3* ou mecanismos que reativam outras vias sinalizadoras fornecendo caminhos alternativos de sobrevivência das células neoplásicas, mesmo com *FLT3* inibido.<sup>51,56</sup>

De acordo com estudo recente, Tingyong e colaboradores evidenciaram que pacientes com *FLT3-ITD* induz um aumento significativo na expressão do ligante de quimiocina12 (CXCL12) ao receptor 4 de quimiocinas (CXCR4) nas células leucêmicas, através da via sinalização a jusante STAT5. Esse eixo CXCL12/CXCR4 é altamente expresso no nicho da medula óssea e demonstra como a principal causa de resistência a quimioterapia e recidiva na LMA. Assim combinação de antagonista CXCR4 com inibidores de *FLT3* apresentaram melhores respostas na sensibilidade das células à quimioterapia e na resistência aos medicamentos.<sup>33</sup> O desenvolvimento de inibidores pan-*FLT3* atualmente é uma possível estratégia de inibir *FLT3/ITD*, *FLT3* selvagem e a maioria ou todas as mutações resistentes, como o desenvolvimento do FLX925 um inibidor duplo associado contra dois alvos moleculares, *FLT3* e CDK6, apesar de não aprovado devido à toxicidade relacionada a altas doses o mesmo mostrou resposta de atividade modesta nas doses toleradas, demonstrando que o desenvolvimento de inibidores duplos podem ser úteis e eficazes contra essas resistências.<sup>65</sup>

Os objetivos de desenvolver esses inibidores de *FLT3*, estrategicamente está baseado em superar as mutações de resistência, apesar de não garantir cura à LMA, há uma contribuição importante para pacientes permanecerem em remissão mais prolongada.<sup>65</sup>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar variantes no gene *FLT3* em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Descrever o perfil clínico e epidemiológico dos pacientes com LMA atendidos na Fundação HEMOAM;
2. Caracterizar as variantes no gene do *FLT3* em pacientes com LMA associados aos domínios funcionais da proteína;
3. Avaliar uma possível relação das variantes do *FLT3* e a frequência alélica mutante com dados clínicos e laboratoriais;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo do tipo observacional transversal. Foi realizada a caracterização do perfil clínico-epidemiológico dos pacientes com LMA, identificação de variantes no gene *FLT3* e as frequências alélicas das variantes encontradas. Apartir desses achados, verificou-se a relação com os dados clínicos e laboratoriais.

### 4.2 Local de estudo

Foi realizado na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), centro de referência para doenças onco-hematológicas do Estado do Amazonas e que presta atendimento ao Sistema Único de Saúde (SUS). A amostragem foi constituída por demanda espontânea de indivíduos atendidos nesta instituição, durante o período de janeiro de 2022 a novembro de 2023, que foram diagnosticados pela equipe médica com LMA. A análise genética foi realizada no laboratório de Genômica (LABGEN) da Fundação HEMOAM.

### 4.3 População de estudo

A população de estudo foram pacientes adultos com diagnóstico confirmado de LMA que requereram atendimento espontâneo no Serviço de Hematologia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) no período de estudo. De acordo com os dados registrados pelo Serviço de Atendimento Médico Especializado (SAME) da Fundação HEMOAM, nos últimos cinco anos (2017-2021) foram diagnosticados em média 17 casos/ano de LMA na faixa etária maior que 18 anos.

### 4.4 Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão

Foram incluídos na pesquisa pacientes que receberam diagnóstico de LMA (CID 92.0), de ambos os gêneros, com idade superior a 18 anos, atendidos na Fundação HEMOAM. Não foram incluídos paciente em tratamento com quimioterápico no momento da coleta do material biológico, paciente com dados importantes para caracterizar a clínica da doença devido estarem ausente no prontuário. Foram excluídos pacientes com amostras

insuficientes para análise: material não adequado devido falha no processo de extração, ou purificação do material amplificados.

#### 4.5 Aspectos Éticos

Este projeto está vinculado a um projeto maior intitulado “**Estudo Genético das Neoplasias Mieloides Agudas e Crônicas**”, coordenado pelo Dr. George Allan Villarouco da Silva, e segue as recomendações estabelecidas na Resolução CNS nº 466/2012, conforme avaliado, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), com CAAE: 59781222.7.0000.0009 no dia 14 de dezembro de 2022. (Anexo 8.1)

As informações referentes aos dados pessoais, clínicos, laboratoriais dos pacientes utilizados no estudo foram protegidas por anonimato durante todos o desenvolvimento do estudo. As informações coletadas têm finalidade científica e foram assegurados os procedimentos de sigilo e confidencialidade durante o uso dos dados.

#### 4.6 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Foram coletadas informações referentes aos dados clínico-epidemiológicos, como as seguintes informações: nome, gênero, idade, tipo de LMA (LMA *novo*, secundária ou recaída) e exames laboratoriais, como hemograma, mielograma, lactato desidrogenase (LDH), cariótipo Banda G, testes moleculares de rotina da instituição para translocações da LMA pelo método de RT-PCR (*AML1-A/ETO-B*; *PML-RARA/CBFB-A/MYH11* e *BCR-ABL*). Utilizou-se busca no sistema de prontuário eletrônico (iDoctor), sistema de cadastro de exames laboratoriais (Softlab) e no prontuário físico arquivado no serviço médico especializado (SAME).

#### 4.7 Material Biológico

Amostras de medula óssea com volume de 1 a 2 ml foram coletadas durante o atendimento de rotina pela equipe médica da Fundação HEMOAM e encaminhadas ao Laboratório de Genômica/FHEMOAM, posteriormente processadas e armazenadas em microtubos de 2mL contendo reagente Trizol no freezer -80°C, até o momento de uso para as análises genéticas laboratoriais do estudo.

#### 4.8 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o protocolo de *Trizol® Reagent* (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Avaliou-se a qualidade e concentração do RNA extraído, utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop modelo 2000c* (*Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA*) para aferir as concentrações e, foram aceito valores com concentrações >150 ng/uL; a qualidade do RNA foi definido quanto a pureza e qualidade aceitável pela leituras de 260/280 e 260/230, apresentando valores >1,8 e também realizou-se por meio da separação do RNA em eletroforese gel de agarose a 0,8% à visualização do perfil de fragmentos do RNA extraído. Após a extração, o material ficou armazenado a -80°C para realização dos próximos ensaios para amplificação do gene *FLT3*.

#### 4.9 Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi obtido através de reação de retrotranscrição, utilizando o kit *GoScript™ Transcriptase Reversa®* (Promega Corporation), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Para a produção do cDNA utilizou-se os seguintes reagentes: *Buffer* [5x],  $MgCl_2$  [25nM], *PCR nucleotide mix* [10 mM], RNAsin (inibidor de RNASE), enzima retrotranscriptase oligo dT, e amostra de RNA extraída. Os volumes e concentrações estão descrita na **Tabela 2**. Em seguida, a fim de obter a síntese de cDNA, o mix foi submetido a uma Reação em Cadeia da Polimerase Retrotranscriptase (RT-PCR) com a seguinte programação de ciclagem: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C. Ao final da reação, o cDNA foi armazenado a -80°C para procedimentos posteriores para sequenciamento genético.

**Tabela 2** - Volume e concentração final do mix para síntese de cDNA\*.

Reagente	Volume na Reação	Concentração Final
Buffer (5x)	4,0 uL	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,7 uL	2,1 mM
PCR <i>Nucleotide mix</i> (10 mM)	1,0 uL	0,5 mM
RNAsin	0,12 uL	1 U
Oligo DT	1 uL	0,5 mM
Enzima retrotranscriptase (2000 U)	1,0 uL	200 U
Amostra de RNA extraída	2,5 uL	200-500 ng
Água Ultrapura	qsp 20uL	

\*Volume do cDNA = 20 uL

#### 4.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do gene do *FLT3* foi realizada por Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, utilizou-se o equipamento ABI *Applied Biosystems Veriti*™. Para obtenção de fragmentos de tamanho viável para o sequenciamento em Sanger e abrangência total do gene do *FLT3*, a amplificação do *FLT3* foi realizada em três reações de PCR individuais. Os oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados nas reações estão descritos na **Tabela 3**, e foram desenhados utilizando a sequência de referência NM\_004119.3 (3826 pb), registrada no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), e utilizou-se o *software Geneious* para desenho e alinhamento dos iniciadores. Posteriormente, as sequências dos *primers* (oligonucleotídeos) foram avaliadas (tamanho da sequência, percentual de bases Guanina-Citosina, temperatura ótima de ligação e, capacidade de *Hairpin*, *Self-Dimer* e *Hetero-dimer* a partir dos valores de  $\Delta G$ ) através do programa OligoAnalyser Tool - (<https://www.idtdna.com>). Para validação dos *primers*, utilizou a ferramenta PRIMER-BLAST NCBI visando conhecer possível ligação inespecífica dos oligonucleotídeos com outras regiões do genoma.

**Tabela 3** - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR.

PCR	Nome	Sequência (5' → 3')	Tamanho	Região
PCR 1	FLT3_Forward 1	GCTGCTCGTTGTTTTTCTGC	1098 pb	Éxons 1 - 9
	FLT3_Reverse 1	GTGGGTAGGCTTTAAACCTGA		
PCR 2	FLT3_Forward 2	TTCCTCTTCAAAGCATCCCAGT	1239 pb	Éxons 8 - 18
	FLT3_Reverse 2	CTTCTCTTGAACCAGGCATG		
PCR 3	FLT3_Forward 3	GAGAATATTGTGAACCTGCTGG	1117 pb	Éxons 16 - 24
	FLT3_Reverse 3	TAAACGCAGACAGCTTCTAGAG		

Para a amplificação dos fragmentos utilizou-se uma reação no volume total de 25 uL, contendo por reação: > 200 ng/uL de cDNA, tampão de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> a 1,5-2,5 mM, *primers Forward e Reverse* a 0,2 mM, dNTP 0,2 mM e 1U Taq DNA polimerase. A programação utilizada na amplificação dos fragmentos está descrita no **Quadro 5**.

**Quadro 6** – Programação de ciclagens de amplificação dos fragmentos.

	PCR1	PCR 2	PCR3
Desnaturação Inicial	95°C/ 5 min	95°C/ 5 min	95°C/ 5 min
Desnaturação	95°C/ 30 seg / 35 ciclos	95°C/ 30 seg / 35 ciclos	95°C/ 30 seg / 35 ciclos
Hibridação Iniciadores	64°C/ 30 seg / 35 ciclos	63°C/ 30 seg / 35 ciclos	57°C/ 30 seg / 35 ciclos
Extensão	72°C/ 1 min, 20 seg / 35 ciclos	72°C/ 1 min, 30 seg / 35 ciclos	72°C/ 1 min, 10 seg / 35 ciclos
Extensão Final	72°C/ 7 min	72°C/ 7 min	72°C/ 7 min

#### 4.11 Confirmação da amplificação do produto da PCR (Gel de Agarose)

A confirmação da amplificação do gene *FLT3* foi realizada com eletroforese em gel de agarose 1,5%, os *amplicons* foram separados em eletroforese de gel e coradas com brometo de etídio, sendo identificado o fragmento de tamanho específico correspondente de cada reação (**Tabela 3**).

#### 4.12 Purificação da PCR

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o reagente Polietilenoglicol 8000 (PEG) a 20%, com objetivo de remover oligonucleotídeos não incorporados na PCR para não interferir na reação do sequenciamento, seguido por etapa de lavagem com Etanol 80% gelado e armazenamento dos *amplicons* -20°C.

#### 4.13 Reação de Sequenciamento nucleotídico

Para o sequenciamento genético, em reações individualizadas, em cada *amplicon* foi utilizado *primers* da PCR (*Forward* e *Reverse* – **Tabela 3**). Para o sequenciamento do *FLT3* aproximadamente 20-50 ng de DNA das amostras foram aplicadas na reação. A reação de sequenciamento utilizou-se o *Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Os reagentes utilizados na reação de sequenciamento estão descritos na **Tabela 4**. A programação do sequenciamento está descrita no **Quadro 6**.

**Tabela 4** - Reagente utilizados na reação do sequenciamento.

Reagente	Volume na reação	Concentração
<i>BigDye® Terminator</i>	0,3 uL	0,06 x
Tampão BigDye 5x	2 uL	1x
Iniciador a 3,3 mM	1 uL	0,3 mM
Produto purificado	2-5 uL	10-40 ng

**Quadro 7** – Programação do sequenciamento.

Reação do Sequenciamento		
Desnaturação Inicial	96°C/ 1 min	1 ciclo
Desnaturação	96°C/ 10 seg	15 ciclos
	60°C/ 15 seg	
	60°C/ 1 min e 15 seg	
Hibridação Iniciadores	96°C/ 10 seg	5 ciclos
	60°C/ 15 seg	
	60°C/ 1 min e 30 seg	
Extensão	96°C/ 10 seg	
	60°C/ 15 seg	
	60°C/ 2 min	
Extensão Final	4°C	1 ciclos

#### 4.14 Purificação do Sequenciamento

Ao término da reação de sequenciamento, foi realizada a purificação por precipitação com EDTA/Etanol (Applied Biosystems), com objetivo de remover oligonucleotídeos, enzimas e sais que não foram utilizados na reação para não interferir na leitura do sequenciador. A purificação foi realizada com utilização do EDTA (125 mM) e etanol a 100% e 70%, a precipitação foi realizada com centrifugações a 2000 rcf e 1650 rcf por 45 min e 15 min respectivamente a 4° C. Seguida de secagem das placas no termociclador por 10 min a 60°C e armazenadas por até 30 dias em -20°C.

#### 4.15 Eletroforese Capilar

Foi realizado eletroforese capilar para separação dos fragmentos de DNA obtidos na reação de sequenciamento, utilizando o equipamento ABI 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA) utilizando o Polímero POP-7™.

#### 4.16 Análise genética do *FLT3*

As sequências obtidas dos fragmentos de DNA foram analisadas no software *Sequence Analysis* (Applied Biosystems). Posteriormente foram alinhados e comparadas com a sequência de referência do *FLT3* (GenBank ID: NM\_004119.3); As análises das mutações foram realizadas no *software Geneious*, para obtenção dos *contigs*. A análise para aferir a frequência alélica mutante (VAF) das variantes identificadas foram realizadas utilizando o software *Minor Variant Finder* (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Inc.) com limite de detecção de 5% e *EditR* ([moriaritylab.shinyapps.io/editr\\_v10](http://moriaritylab.shinyapps.io/editr_v10)).

#### 4.17 Interpretação das Variantes

As variantes identificadas foram analisadas nos bancos de variantes *ClinVar* do *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), *COSMIC* (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), *CancerVar* ([cancervar.wglab.org/index.php](http://cancervar.wglab.org/index.php)), e valores preditores *in silico* *REVEL* ([sites.google.com/site/revelgenomics/about?authuser=0](https://sites.google.com/site/revelgenomics/about?authuser=0)).

#### 4.18 Análise de dados estatística

A características dos pacientes foram determinadas pela frequência absoluta (n) e relativa (%). Os dados laboratoriais passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados de concentração de hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos, porcentagem de blastos, DHL foram utilizados nas análises o teste de Kruskal-Wallis. Foram relacionados os dados laboratoriais dos pacientes com *FLT3*-ITD positivo, *FLT3* missenses e *FLT3* negativos, utilizando os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com significância estatística aqueles com  $p < 0.05$ . A razão alélica (RA)  $< 0.5$  e  $> 0.5$  das variantes patogênicas com os dados laboratoriais, foram realizadas com teste de Mann-Whitney. As análises estatísticas foram realizadas no programa o software GraphPad Prism 10 versão 10.1.2 (GraphPad Software, Inc.).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### CAPÍTULO I:

#### **Avaliação do gene *FLT3* na Leucemia Mieloide Aguda em uma população do Amazonas: baixa contagem de plaquetas e alta porcentagem de blastos em pacientes com variantes missense**

Marlúcia Oliveira dos Santos <sup>(1)</sup>, Talita Cruz dos Santos <sup>(1)</sup>, Gabriele Souza Parente Braz <sup>(1)</sup>, Mylena Oliveira do Nascimento <sup>(3)</sup>, Vinicius Clementino da Costa <sup>(3)</sup>, Lucivana Prata Souza Mourão <sup>(1,2)</sup>, Nilberto Dias de Araujo <sup>(3)</sup>, Andréa Monteiro Tarragô <sup>(1,3)</sup>, Leny Nascimento da Motta Passos <sup>(1,3)</sup>, George Allan Villarouco da Silva <sup>(1,3)</sup>

(1) Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia – Universidade do Estado do Amazonas (PPGH/UEA), Manaus, AM, Brasil

(2) Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brasil

(3) Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM), Manaus, AM, Brasil

### **Resumo**

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença maligna hematológica heterogênea. Diferentes alterações genéticas são associadas com a leucemogênese da LMA, como variantes no gene *FMS- Like tirosina quinase 3 (FLT3)*, ocorrendo aproximadamente em 30% dos casos. Neste estudo caracterizamos variantes do *FLT3* em pacientes adultos com LMA, investigando possível relação laboratoriais. Realizou-se um estudo prospectivo em pacientes com LMA com idade entre 18-92 anos, diferentes variantes do gene *FLT3* foram identificadas por sequenciamento nucleotídico. Um total de 26 variantes foram identificadas em 18 pacientes. Variantes tipo missense foram encontradas nos domínios funcionais, como 6 (23,1%) extracelular (EC), 3 (11,5%) transmembranar (TM), 1 (3,9%) justamembranar (JM), 5 (19,2%) no domínio tirosina quinase I (TKD1) e 4 (15,4%) domínio tirosina quinase II (TKD2). Variante *FLT3-ITD* foram identificadas, 3 (11,5%) no domínio JM e 4 TKD1 (15,4%). As variantes classificadas como patogênicas foram 19 (73,1%). A frequência alélica (VAF) das variantes patogênicas variou de 11-62,5%. Variantes tipo missense foram associadas com intensa plaquetopenia (p=0,038) e aumento de blastos no sangue periférico (p=0,014). Maiores valores de hemoglobina foi observado em pacientes com duplicação interna em tandem (*FLT3-ITD*) (p=0,049). Este estudo destaca a ocorrência de variantes patogênicas no gene *FLT3* em paciente com LMA, sendo as variantes missense mais prevalentes comparadas a *FLT3-ITD*, os resultados apontam uma relação com alterações hematológicas, destacando a importância do rastreamento de variantes no gene *FLT3*.

**Palavras-chaves:** Neoplasia mieloide; *FLT3-ITD*; Frequência alélica mutante; Leucemogênese.

## Introdução

A leucemia mieloide aguda (LMA) é um doença onco-hematológica heterogênea e geneticamente alterada, caracterizada pela proliferação clonal descontrolada e indiferenciada das células blásticas da linhagem mieloide, na medula óssea, sangue periférico e outros tecidos <sup>1,2</sup>. No mundo, a incidência da LMA aumentou 87,3% nas últimas décadas (1990 - 2017)<sup>3</sup>. As regiões com alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) como, Sul da Ásia, Europa Ocidental, leste Asiático e América do Norte obtiveram maiores números de incidência (21,46 - 11,7 x10<sup>3</sup> casos) e números de mortalidade padronizada por idade (18,07 - 7,91 x10<sup>3</sup> óbitos) maiores do que países subdesenvolvidos, como na África do Sul e Central (incidência: 1,14 - 0,92 x10<sup>3</sup>; óbitos: 0,86 - 0,77 x10<sup>3</sup>) <sup>3,4,5</sup>.

Nas últimas décadas, estudos genômicos demonstraram que alterações genéticas no gene *FMS - Like tirosina quinase 3 (FLT3)* ocorrem em aproximadamente 25-30% dos pacientes com LMA recém diagnosticados <sup>6,7</sup>. O gene *FLT3* (ID NCBI: 2322) está localizado no cromossomo 13, *locus* q12.2, constituído de 104.953 nucleotídeos, distribuídos em 24 éxons <sup>8</sup>. Codifica uma proteína receptora de tirosina quinases tipo III com 993 aminoácidos, chamada de FLT-3, e contém 5 domínios funcionais: *loops* tipo imunoglobulina (IG) no domínio extracelular (EC), domínio transmembranar (TM), domínio justamembranar (JM) e domínios tirosina quinase I e II (TKD1 e TKD2) <sup>8</sup>. A proteína FLT-3 é expressa em progenitores hematopoiéticos imaturos e suprimida quando essas células se diferenciam <sup>9,10</sup>. Na LMA, o RNAm do gene *FLT3* está altamente expresso em mais de > 90% dos blastos leucêmicos, <sup>11,12</sup> contribuindo para proliferação, diminuição da apoptose e aumento da sobrevida dessas células<sup>11</sup>.

Dentre as principais alterações ativadoras do *FLT3*, a mais frequente (15-25%) a duplicação interna em tandem (*FLT3-ITD*), com comprimentos que variam de 3->400 pares de bases (pb) <sup>10</sup> no domínio justamembranar (JM) que inserem aminoácidos na proteína;<sup>13</sup> e alterações do tipo missense no domínio tirosina quinase II (TKD2) nos códons D835/I836 ocorrem em 7-10% dos pacientes com LMA <sup>7,14</sup>. A proteína FLT-3 mutada ocasiona a autofosforilação e ativação constitutiva do receptor, contribuindo para leucemogênese da doença <sup>15</sup>. Mutações no gene *FLT3* estão associadas a diferentes implicações clínicas e prognóstica, como menor taxa de remissão completa (RC), baixa na sobrevida global (SG), sobrevida livre de doença (SLD), sobrevida livre de eventos (SLE), sendo um fator independente de mau prognóstico <sup>16</sup>. A mutação *FLT3-ITD* é classificada no risco intermediário (*European LeukemiaNet*, ELN 2022). Assim, testes moleculares que detectam alterações no *FLT3* é recomendado em pacientes com LMA recém diagnosticado

e na recidiva, contribuindo a implicações prognósticas e benéfica da terapia direcionada<sup>17,18</sup>. O uso de inibidores de FLT-3 tem promovido uma recuperação hematológica e melhor expectativa de vida dos pacientes com LMA<sup>2,19,20</sup>.

Em diferentes estudos, a identificação de mutações na proteína FLT-3 tem sido apenas relatada nos domínios JM/TKD1 (éxon 14-15) e TKD2 (éxon 20)<sup>16,21,22</sup>. O sequenciamento completo do *FLT3* pode identificar outras variantes ao longo do gene, como tem sido observado em pacientes classificados como negativos para ITD e TKD em ensaios moleculares específicos<sup>23</sup>. Neste estudo realizamos o sequenciamento completo do gene *FLT3* em pacientes com LMA, visando caracterizar molecularmente alterações presentes em pacientes no Estado do Amazonas, Brasil.

## **Materiais e Métodos**

### **Aspectos éticos**

Trata-se de um estudo prospectivo realizado com pacientes de LMA, diagnosticados de janeiro 2022 a novembro de 2023. Todos os pacientes foram atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Centro de referência para tratamento de doenças onco-hematológicas no Amazonas. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Institucional (CAAE: 59781222.7.0000.0009).

### **Características dos pacientes**

Foram incluídos 36 pacientes com LMA com idade superior a 18 anos (18 - 92), ambos os gêneros, procedentes do Estado do Amazonas. O diagnóstico da LMA foi realizado pela equipe médica com base aos critérios da Organização Mundial de Saúde. Os dados clínicos, gênero, idade, tipo de LMA, dados laboratoriais como hemograma, bioquímica, mielograma, imunofenotipagem, cariótipo de banda G e testes moleculares RT-PCR (*AML1-A/ETO-B*; *PML-RARA*; *CBFB-A/MYH11* e *BCR-ABL*), foram obtidos dos prontuários e sistema de resultados de exames.

### **Material biológico e extração DNA/RNA**

Amostras de medula óssea foram coletadas em tubos a vácuo contendo etilenodiaminotetracético (EDTA) (*Becton Dickinson*) em seguida, foi realizada extração de DNA/RNA pelo método Trizol®, de acordo com as recomendações do fabricante

(Thermo Fisher Scientific, EUA). O material foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

### **Reação em cadeia da polimerase do gene *FLT3***

Aproximadamente 0,5-1  $\mu\text{g}$  de RNA foi utilizado para síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit *GoScript™ Transcriptase Reversa®* (Promega Corporation), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida o gene do *FLT3* (éxon 1 ao 24) foi amplificado por reação em cadeia polimerase (PCR). Os primers e o tamanho dos produtos amplificados são mostrados no Quadro Suplementar S1. As condições de PCR foram as seguintes: 0,4  $\mu\text{M}$  de cada primer, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada desoxirribonucleotídeo, 1,5 ou 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 U de Taq polimerase em um volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo 500 mmol/L de KCl e 100 mmol /L Tris-HCl do tampão Taq polimerase. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese com gel de agarose a 1,5%. A purificação da PCR foi realizada com polietilenoglicol a 20%, conforme descrito anteriormente.<sup>24,25</sup>

### **Análise de fragmentos para variantes *FLT3-ITD***

As variantes *FLT3-ITD* foram amplificadas utilizando os primers 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' e 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3', *forward* e *reverse* respectivamente, direcionados para éxons 14-15 do gene. A PCR foi realizada e analisada com as condições descritas anteriormente (Quadro Suplementar S2). A carga alélica mutante (*FLT3-ITD*) foi avaliada em gel de agarose a 2% utilizando aplicação *Lane Profile* (intensidade de fluorescência) no software Image Lab (Bio-Rad), e eletroforese capilar (Tapestation Systems™) utilizando reagentes de alta sensibilidade, kit *Agilent High Sensitivity D1000 Screen Tap* sobre *Agilent Tapestation 2200*. A carga alélica mutante foi semelhante entre os métodos e quando comparados entre amostras de DNA e cDNA.

### **Sequenciamento nucleotídico**

Aproximadamente 20-50 ng de DNA foram usadas na reação de sequenciamento. O sequenciamento nucleotídico foi realizado utilizando o *Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, California) com mesmos primers utilizados na PCR. Visando obtenção de seqüências com alta qualidade, os fragmentos da reação de sequenciamento foram purificados segundo recomendações do fabricante. A

eletroforese capilar foi realizada utilizando Polímero POP-7<sup>TM</sup> no Sequenciador 3500 XL Genetic Analyzer®.

### **Análise de Sequências**

As sequências de DNA foram analisadas no software *Sequence Analysis* (Applied Biosystems) em seguida, alinhadas com a sequência de referência do *FLT3* (GenBank ID: NM\_004119) no software *Geneious 6.0.6* (Biomatters, Inc.) para obtenção dos *contigs*. O score de qualidade foi avaliado, sendo consideradas apenas sequências de alta qualidade (Qualis  $\geq 40$ ). A reação de sequenciamento foi repetida para cada variante identificada. A análise da frequência alélica de variante (VAF) foi realizada utilizando os softwares *Minor Variant Finder* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.) e *EditR* ([moriaritylab.shinyapps.io/editr\\_v10](http://moriaritylab.shinyapps.io/editr_v10/)). Com base na frequência alélica (VAF) das variantes *FLT3* calculamos a razão alélica (RA) usando como ponto de corte razão alélica (RA) de 0,5.

### **Intepretação de Variantes Patogênicas**

As variantes identificadas foram submetidas a bancos de variantes *ClinVar* do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>), CancerVar ([cancervar.wglab.org/index.php](http://cancervar.wglab.org/index.php)), e os valores preditores *in silico* REVEL ([sites.google.com/site/revelgenomics/about?authuser=0](https://sites.google.com/site/revelgenomics/about?authuser=0))<sup>26</sup> com pontuação acima de 0,5 (threshold – 0.45) como patogênica.<sup>26</sup> No geral as variantes foram classificadas patogênicas, de significado incerto, ou benigna.<sup>27</sup>

### **Análise estatística**

As características gerais dos pacientes foram descritas e determinadas pela contagem direta e relativa (%). Os dados hematológicos e bioquímicos são expressos em mediana e intervalo interquartil (25 e 75%). O teste Kruskal-Wallis foi utilizado nas análises de concentração de hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos, porcentagem de blastos, DHL dos pacientes LMA novo, secundária e recaída. Foram comparados entre os pacientes com *FLT3*-ITD positivo, *FLT3* missense e *FLT3* negativos, usando o teste Kruskal-Wallis e o teste Mann-Whitney com significância estatística aqueles com  $p < 0.05$ . A relação das variantes genéticas com razão alélica (RA)  $< 0.5$  e  $> 0.5$  com os dados laboratoriais foram realizadas utilizando o teste Mann-Whitney. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 10 versão 10.1.2 (GraphPad Software, Inc.).

## Resultados

### Características da população de estudo

Os pacientes incluídos neste estudo, 26 casos de LMA de novo (72.2%), 6 de LMA secundária (16.7%) e 4 casos de recaída (11.1%). Os pacientes apresentam uma mediana de idade de 53,5 anos, sendo observado uma maior frequência de pacientes do gênero feminino (Tabela 1). Segundo a classificação *Franco-Americano-Britânico* (FAB), M1 (30.6%), M2 (22.2%), M5 (19.4%) e M3 (16.7%) foram mais prevalentes. Em relação a cariótipo banda G, 22 (61.1%) apresentam alterações cromossômicas sendo mais frequente a t(15;17), e 14 (38.9%) pacientes não apresentaram alterações (Figura Suplementar S1). De acordo com diretrizes *European LeukemiaNet* (ELN 2022), incluindo resultados citogenético e molecular, 3 (8,3%) pacientes apresentaram prognóstico favorável, 29 (80,6%) como intermediário e 4 (11,1%) como adverso (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características clínicas e demográficas dos pacientes com LMA.

Características	Nº de Pacientes (n=36)
<b>Gênero</b>	N (%)
Feminino	21 (58,3)
Masculino	15 (41,7)
<b>Idade (anos)</b>	
Mediana (IQR)	53,5 (30,25 – 70,75)
<b>Tipo de LMA</b>	
LMA Primária (novo)	26 (72,2)
LMA Secundária (SMD)	5 (13,9)
LMA Secundária (LMC)	1 (2,8)
Recaída	4 (11,1)
<b>Classificação FAB</b>	
M0	1 (2,8)
M1	11 (30,6)
M2	8 (22,2)
M3	6 (16,7)
M4	3 (8,3)
M5	7 (19,4)
M6	0
M7	0
<b>Cariótipo Banda G</b>	
Sem alterações	14 (38,9)
Alterações citogenéticas	22 (61,1)
<b>Risco citogenético ELN 2022</b>	
Favorável	3 (8,3)
Intermediário	29 (80,6)
Adverso	4 (11,1)

LMA, leucemia mieloide aguda; FAB, *Franco-Americano-Britânico*; ELN, *European LeukemiaNet 2022*.

## Dados hematológicos

Alterações hematológicas foram semelhantes entre os grupos, observados anemia, plaquetopenia, neutropenia (Tabela 2). Os pacientes de LMA *de novo* foi observado uma discreta leucocitose comparada LMA secundária e recaída. A média de contagens de blastos na medula óssea foi de 49,8% (alcance de 20-91%). Os valores de desidrogenase láctica (DHL) estavam aumentados em todos os grupos, com valores mais altos em LMA novo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Características hematológicas e bioquímicas dos pacientes com Leucemia Mieloide Aguda.

Características	LMA novo (1)	LMA secundário (2)	LMA em Recaída (3)	<i>p</i> -Value <sup>a</sup> 1 vs 2 vs 3
Eritrócitos, mm <sup>3</sup>	2.72 (2.1 – 3.22)	2.51 (2.23 – 3.04)	3.09 (2.73 – 3.35)	0.361
Hemoglobina, g/dL	7.6 (6.7 – 9.4)	7.9 (7.2 – 10.2)	9.25 (8.9 – 9.4)	0.283
Hematócrito, %	23.30 (19.25 – 27.75)	24.10 (21.58 – 31.25)	27.55 (26.68 – 28.95)	0.256
Plaquetas, mm <sup>3</sup>	23000 (14000 -157000)	45000 (14750 - 83750)	47500 (23250 - 138500)	0.627
Leucócitos totais, mm <sup>3</sup>	13.919 (4,225 –75,535)	7.170 (1.860 – 56,960)	7.055 (2.143 - 22.318)	0.462
Neutrófilos, %	8 (4.5 – 17.5)	15 (9 – 26.5)	13.5 (6.25 – 32.75)	0.494
Blastos MO, %	47 (23.75 – 71.25)	32 (23 – 41)	48 (16.8 – 76.5)	0.438
DHL, U/L	821.5 (439.3 -1396)	540.5 (418.3 -853.8)	582.5 (209.8-2847)	0.559

MO, Medula óssea; DHL, Desidrogenase láctica. <sup>a</sup> teste Kruskal-Wallis.

## Variantes *FLT3* identificadas

Ao todo, foram identificadas 26 variantes do éxon 3 ao 20 do gene *FLT3* em 18 (50%) pacientes (Quadro Suplementar S3). Não foram localizadas variantes nos éxons 4, 5, 9, 12, 18 e 19. Variantes missense foram encontradas nos domínios funcionais: 6 (23,1%) extracelular (EC), 3 (11,5%) transmembranar (TM), 1 (3,9%) Justamembranar (JM), 5 (19,2%) no domínio tirosina quinase I (TKD1) e 4 (15,4%) domínio tirosina quinase II (TKD2). Variante *FLT3*-ITD foram identificadas 3 (11,5%) no domínio JM e 4 TKD1 (15,4%). As variantes foram classificadas como, 5(19,2%) benigna (T329S, Q338L, C407W, E672A e F760V), 2 (7,7%) variantes de significado incerto (D247H e L561M) e 19 (73,1%) patogênica (Quadro Suplementar S3).

Pelo menos uma variante patogênica foi identificada em 16 pacientes (44,4%), sendo 12 LMA novo, 2 LMA secundária e 2 em recaída. As variantes *FLT3* missense foram mais prevalentes, 12 (63,2%), seguido pelas variantes *FLT3*-ITD 7 (36,8%) (Tabela 3). A frequência alélica das variantes (VAF) foram de 11% a 62,5%, enquanto a VAF da variante A680V foi de 100% (Tabela 3). A coocorrência de variantes patogênicas foi observada em 4 pacientes: (1) Y416N/ *FLT3*-ITD (42 pb) [VAF 36%/32%]; (2) A680V/R834G [VAF

100%/25%]; (3) C681S/L703P [VAF 23%/19%]; (4) D698A/Y702S [VAF 24%/39%]. Não houve significância entre as razões alélicas (RA) das variantes *FLT3* com os dados hematológicos e DHL. (Tabela Suplementar S1).

**Tabela 3:** Variantes *FLT3* patogênica.

Variante	Éxon	Domínio	Posição	VAF	RA	Predictor <sup>a</sup>
Y416N	10	EC	c.1246	36%	0,56	0.881
L561P	13	TM	c.1682	32%	0,47	0.686
L601P	14	JM	c.1802	30%	0,42	0.558
ITD (42 pb)	14	JM	c.1785_1827	32 %	0,47	CV
ITD (27 pb)	14	JM	c.1804_1831	62.5%	1,66	CV
ITD (60 pb)	14	JM	c.1808_1868	17.6%	0,21	CV
ITD (81 pb)	15	TKD1	c.1838_1919	46.6%	0,87	CV
ITD (81 pb)	15	TKD1	c.1842_1923	11%	0,12	CV
ITD (81 pb)	15	TKD1	c.1847_1928	14.4%	0,17	CV
ITD (81 pb)	15	TKD1	c.1860_1941	11.6%	0,13	CV
A680V	16	TKD1	c.2039 (T/T)	100%	1,00	0.673
C681S	16	TKD1	c.2042	23%	0,29	0.865
D698A	17	TKD1	c.2093	24%	0,31	0.896
Y702S	17	TKD1	c.2105	39%	0,63	0.788
L703P	17	TKD1	c.2108	19%	0,23	0.914
R834G	20	TKD2	c.2500	25%	0,33	0.779
D835Y	20	TKD2	c.2503	45%	0,81	0.875
D835E	20	TKD2	c.2505	12.7%	0,14	0.629
I836M	20	TKD2	c.2508	12%	0,13	0.554

<sup>a</sup>Meta predictor *in silico* Revel, score (theshold – 0.45); CV – variante patogênica classificada conforme pelo banco ClinVar; VAF - Frequência alélica da variante; RA - razão alélica; EC, Extracelular; TM, Transmembranar; JM, Justamembranar; TKD, Domínio tirosina quinase

### Variantes *FLT3* positivas e alterações hematológicas

Alterações hematológicas foram observadas entre pacientes variantes *FLT3* positivo e *FLT3* negativos (Tabela 4). Os valores de hemoglobina foram significativamente elevados em pacientes com *FLT3*-ITD (p=0.049). Por outro lado, contagens expressivamente baixas de plaquetas foram observados em pacientes com *FLT3* missense (p=0.038). Blastos no sangue periférico foram significativamente mais elevados em variantes *FLT3* missense (p=0.014).

**Tabela 4:** Comparação dados clínicos e laboratoriais entre *FLT3* negativas e positivas.

CARACTERÍSTICAS	<i>FLT3 neg</i> (1) n= 20	<i>FLT3-ITD</i> (2) n= 7	<i>FLT3 missense</i> (3) n= 9	p-Value			
				1 vs 2 vs 3 <sup>a</sup>	1 vs 2 <sup>b</sup>	1 vs 3 <sup>b</sup>	2 vs 3 <sup>b</sup>
Eritrócitos, mm <sup>3</sup>	2,5 (2,19 – 3,24)	3 (2,73 – 3,56)	2,6 (1,84 – 3,15)	0.108	0.056	0.561	0.090
Hemoglobina, g/dL	7,6 (6,9 – 8,9)	9,4 (7,46 – 10,8)	7,9 (6,2 – 9,5)	0.140	<b>0.049</b>	>0.999	0.149
Hematócrito, %	22,5 (20,9 – 27,2)	27,1 (23,3 – 34,7)	24,4 (18,5 – 28,2)	0.218	0.061	0.708	0.182
Plaqueta, mm <sup>3</sup>	35.000 (14.000 – 64.000)	56.000 (44.000 – 140.000)	18.000 (9.000 – 48.000)	0.064	0.061	0.313	<b>0.038</b>
Leucócitos totais, mm <sup>3</sup>	5.600 (2.840 – 23.150)	10,680 (2.050 – 26.140)	15.070 (9.430 – 131.800)	0.176	0.865	0.068	0.252
Blastos SP, %	25 (13,5 – 56,5)	36 (28 – 80)	71 (36 – 85)	<b>0.039</b>	0.203	<b>0.014</b>	0.217
Blastos MO, %	46 (20 – 73,5)	58 (32 – 85)	45 (35 – 65)	0.436	0.210	0.824	0.292
DHL, U/L	514,5 (329,8 – 1.089)	971.3 (598 – 1.095)	767 (514,5 – 1.832)	0.408	0.453	0.212	0.863

SP, Sangue periférico; MO, Medula óssea; DHL, Desidrogenase láctica. <sup>a</sup> teste Kruskal-Wallis. <sup>b</sup> teste Mann-Whitney

## Discussão

Alterações gênicas na tirosina quinase 3 (*FLT3*) ocasionam alterações funcionais na proteína,<sup>28</sup> como mutações nos domínios JM e TKD que ativam constitutivamente a proteína FLT-3.<sup>16</sup> As alterações de duplicações interna em tandem (ITD) leva a proteína FLT-3 a perda auto inibitória na região JM sobre o domínio TKD, ativando vias intracelulares independente do fator ligante (FL).<sup>29</sup> Variantes *FLT3*-TKD mudam o circuito de ativação para permanentemente aberta, também levando a sinalização constitutiva.<sup>29</sup> Alterações *FLT3*-ITD têm sido associadas a desfechos desfavorável, como elevada taxa de recaída e baixa sobrevida global,<sup>13,16,30,31</sup> enquanto *FLT3*-TKD (D835) foi associado a desfecho favorável.<sup>16,32</sup> Nos últimos anos, inibidores de FLT-3<sup>33</sup> têm sido utilizados em monoterapia ou em combinação com quimioterapia padrão, proporcionando maior sobrevida aos pacientes.<sup>11,20</sup> Assim identificar variantes do *FLT3* é importante para o diagnóstico e tratamento dos pacientes com LMA.

A LMA apresenta um quadro de insuficiência medular com implicações na formação dos componentes sanguíneos<sup>34</sup>, os primeiros achados encontrados no diagnóstico. Em nosso estudo pacientes com LMA *de novo* apresentaram valores reduzidos de hemoglobina, hematócrito, plaquetas e valores aumentados na contagem de leucócitos totais e DHL (Tabela 2).

Este estudo descreve pela primeira vez variantes do gene do *FLT3* em pacientes com LMA no estado do Amazonas, podem influenciar nas alterações hematológicas. No presente estudo, 16 (44,4%) dos pacientes com LMA apresentaram variantes relacionadas a patogenicidade em pelo menos um domínio funcional da proteína FLT-3. As variantes missense foram mais prevalentes, 12 (63,2%) foram identificadas nos éxons 10, 13, 14, 16, 17 e 20, seguido pelas variantes ITD 7 (36,8%). As variantes missense Y416N, L561P, L601P, A680V, C681S, D698A, Y702S, L703P, 834G, D835Y, D835E e I836M foram associadas com plaquetopenia intensa quando comparado ao *FLT3*-ITD (18,000 mm<sup>3</sup> versus 56,000 mm<sup>3</sup>, p=0,038) e uma superior contagem de blastos comparados ao *FLT3* negativo (71% versus 25%, p=0,014). Pacientes com variantes *FLT3*-ITD apresentaram maiores contagens de hemoglobina em comparação a pacientes *FLT3* negativos e variantes missense (9,4g/dL vs 7,6 e 7,9 g/dL, p=0,049).

Embora LMA ao diagnóstico seja mais frequente em homens e faixa etária mais avançada,<sup>35</sup> clinicamente, a presença de *FLT3*-ITD foi observada em pacientes mais jovem

(<60 anos) e com baixa sobrevida global na população feminina<sup>36,37,38</sup>. Assim, observamos no presente estudo o *FLT3*-ITD foi mais prevalente em mulheres (71,4%), abaixo de 60 anos (80%).

A prevalência de *FLT3*-ITD (JM / TKD1) e alteração no códon D835 no domínio quinases II (TKD2) são as variantes mais relatadas nos pacientes com LMA, em 15-35% e 5-10% dos casos, respectivamente.<sup>16,21,22,39,40</sup> Diferentes estudos realizados na China, Noruega, Síria e Estados Unidos mostraram frequências da *FLT3*-ITD entre 15-28%<sup>16,21,39,40</sup>. No Brasil, a frequência do *FLT3*-ITD foi de 13,9% em Minas Gerais,<sup>41</sup> 23,6% e 33,3% em dois estudos realizados em São Paulo<sup>42,43</sup>. Em nosso estudo, a frequência da *FLT3*-ITD foi observada em 7 pacientes (19,4%), consistente com estudos internacionais e nacionais.<sup>16,21,39,40,41,42,43</sup>

Enquanto, variantes *FLT3* missense no domínio TKD apresentam uma frequência em pacientes com LMA variando de 2-9,7%<sup>16,21,42</sup>, no Brasil, variantes *FLT3*-TKD são observadas com baixa frequência (<1%) nos pacientes com LMA<sup>42,43</sup>. No presente estudo, a frequência de variantes no domínio TKD foi de 25%, superior ao descrito na literatura<sup>11,22</sup>. Ao nosso conhecimento, as frequências diferem entre os estudos pode ser devido a regiões geográficas, tamanho e características da população de estudo, e métodos utilizados à detecção de variantes *FLT3*.<sup>65</sup>

A presença de variantes no *FLT3* e a relação com dados hematológicos têm sido controversos em diferentes estudos<sup>16,44,45</sup>. A falta de associação com os dados hematológicos entre os *FLT3* positivos e *FLT3* negativos têm sido relatadas<sup>45,46,47</sup>. Outros relatam o *FLT3* positivo associado a baixa contagem de leucócitos e elevada contagem plaquetas<sup>44</sup>. Por outro lado, diferentes estudos relatam associação de variantes *FLT3*-ITD e TKD com contagens mais altas de leucócitos, níveis aumentados de blastos no sangue periférico (SP), medula óssea (MO) e valores séricos elevados de DHL ao diagnóstico<sup>16,48,49</sup>. Neste estudo, variantes missense foram associadas com plaquetopenia intensa e alta contagem de blastos no sangue periférico, e *FLT3*-ITD associado com maiores contagens de hemoglobina (Tabela 4).

Variações no tamanho e localização do ITD foram relacionados a importância prognóstica<sup>10,50</sup>. Inserções ITD maiores (>30 pb) foram associados à diminuição da sobrevida global (SG)<sup>38,51</sup>. O *FLT3*-ITD foi relatado em aproximadamente 30% no domínio TKD1 e está associado desfecho desfavorável, como taxas inferiores de RC, menor SG, SLR, resistência a quimioterapia e inibição da tirosina<sup>38,49,52</sup>. Em nosso estudo

tamanho do ITD variou de 27 a 81 pb, e inserções ITD em TKD1 foram mais prevalentes 4 (57,14%) (Tabela 3).

Embora alterações no *FLT3* em estudos anteriores tenham sido relatados em pacientes sem alterações cromossômicas,<sup>16,38</sup> em nosso estudo encontramos maior frequência de variantes *FLT3* no grupo cariótipo alterado, aproximadamente 68,75%, e a presença da translocação t(15;17) como mais frequente no *FLT3* positivo (30,55%), conforme descrito em estudos anteriores<sup>30,31,53,54</sup>. A presença de t(15;17) define a Leucemia Promielocítica (M3), está relacionada maiores chances de cura, porém a presença de variantes *FLT3*-ITD e TKD têm sido relatadas a prognóstico desfavorável em relação a sobrevida global (SG)<sup>55,56</sup>, sobrevida livre de recaída (SLR), sobrevida livre de progressão (SLP).<sup>56,57</sup>

Estudos descrevem variantes genéticas em outros domínios do *FLT3*<sup>11,58,59</sup>, e no presente estudo observamos variantes com maior prevalência no domínio TKD1 (34,6%), seguida no EC (23,1%), TKD2 (15,4%), JM (15,4%) e TM (11,5%). As variantes benignas Q388L (13,9%) e T329S (8,4%), e variantes sem significado clínico (D247H e L561M) (5,6%) também foram identificadas nos pacientes com LMA.

O polimorfismo rs1933437 C>T (Thr227Met) presente no éxon 6 do gene *FLT3* foi descrita com frequência alélica menor (MAF) variando de 54-74%<sup>60</sup>, e encontrada em subpopulações africana, europeia, asiática e hispânica saudáveis com frequência variando de 30% a 73%<sup>61</sup>. No presente estudo, o SNP rs1933437 C>T foi observado em 66,7% da população (dados não mostrados), 10 (27,8%) com genótipos C/T e 14 (38,9%) T/T. Pouco se sabe sobre o significado clínico desta variante, entretanto foi associada à resposta ao tratamento e com efeito protetor para leucopenia e trombocitopenia induzida por fármacos mielotóxicos em pacientes com genótipo alélico C/T e C/C<sup>62,63</sup>. Em estudo realizado com pacientes com carcinoma de células renais relata que aqueles com genótipo rs1933437 T/T apresentam risco aumentado de 700% de apresentar leucopenia e de 170% para neutropenia<sup>64</sup>. Demais estudos são necessários para esclarecer possível envolvimento deste SNV com alterações hematológicas e possível envolvimento com a doença.

Podemos destacar diferentes limitações no estudo, primeiramente o pequeno número amostral de pacientes, uma vez que recentemente o centro de referência tem iniciado os exames genéticos para os pacientes com LMA, o que justifica a natureza do estudo ser prospectivo. Porém destacamos a importância que próximos estudos possam envolver outros centros de referência abordando um maior número possível de pacientes com LMA. Aqui realizamos coletas de amostras de medula óssea no momento do

diagnóstico, a coleta de material durante ou após o tratamento poderia evidenciar aquelas mutações resistentes, como tem sido observado em dois casos de recaída. Por fim, sequenciamento nucleotídico utilizado no presente estudo é uma metodologia que apresenta um baixo nível de sensibilidade comparada a metodologias de nova geração. Com isso buscamos preferencialmente utilizar amostras de medula óssea que apresentavam alta contagem de blastos (49,8%; 20-91), evitando pacientes falsos negativos para mutações do *FLT3*. Podemos destacar que as metodologias utilizadas neste estudo foram otimizadas, observamos variantes patogênicas com VAF  $\geq 10\%$  (metodologia repetida pelo menos uma vez), a ocorrência de duas ou mais variantes em alguns pacientes sugerem heterogeneidade de clones.

Em nosso estudo relatamos pela primeira vez a frequência de variantes *FLT3* em pacientes com LMA no estado do Amazonas, Brasil. Apesar das limitações observadas no presente estudo, mutações potencialmente patogênicas no gene *FLT3* são frequentemente observadas em pacientes de LMA. Destacamos que o *FLT3* apresenta uma alta incidência de variantes missense ao longo do gene, e possivelmente associadas com alterações hematológicas, como plaquetopenia intensa e alta porcentagem de blastos no sangue periférico, destacando a importância do rastreamento de variantes no gene do *FLT3*. Portanto os parâmetros hematológicos devem ser mais bem explorados.

## Referências

1. Kennedy, Vanessa E., e Catherine C. Smith. “FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies”. *Frontiers in Oncology*, vol. 10, dezembro de 2020, p. 612880. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.612880>.
2. Tecik, Melisa, e Aysun Adan. “Therapeutic Targeting of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Novel Approaches”. *OncoTargets and Therapy*, vol. 15, 2022, p. 1449–78. PubMed, <https://doi.org/10.2147/OTT.S384293>.
3. Yi, Ming, et al. “The Global Burden and Attributable Risk Factor Analysis of Acute Myeloid Leukemia in 195 Countries and Territories from 1990 to 2017: Estimates Based on the Global Burden of Disease Study 2017”. *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 13, nº 1, dezembro de 2020, p. 72. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00908-z>.

4. Miranda-Filho, Adalberto, et al. “Epidemiological Patterns of Leukaemia in 184 Countries: A Population-Based Study”. *The Lancet Haematology*, vol. 5, nº 1, janeiro de 2018, p. e14–24. *DOI.org (Crossref)*, [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30232-6](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30232-6).
5. Shallis, Rory M., et al. “Epidemiology of Acute Myeloid Leukemia: Recent Progress and Enduring Challenges”. *Blood Reviews*, vol. 36, julho de 2019, p. 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.04.005>.
6. Grimwade, David, et al. “Molecular Landscape of Acute Myeloid Leukemia in Younger Adults and Its Clinical Relevance”. *Blood*, vol. 127, nº 1, janeiro de 2016, p. 29–41. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-604496>.
7. Marhäll, Alissa, et al. “Internal Tandem Duplication Mutations in the Tyrosine Kinase Domain of FLT3 Display a Higher Oncogenic Potential than the Activation Loop D835Y Mutation”. *Annals of Hematology*, vol. 97, nº 5, maio de 2018, p. 773–80. *PubMed*, <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3245-5>.
8. National Center for Biotechnology Information. FLT3 - receptor tirosina quinase 3 relacionado ao fms. 2023. p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=flt3>. Acessado em 16/01/24
9. Gilliland, D. Gary, e James D. Griffin. “The Roles of FLT3 in Hematopoiesis and Leukemia”. *Blood*, vol. 100, nº 5, setembro de 2002, p. 1532–42. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0492>.
10. Rosnet O, Matteï MG, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*.1991;9(2):380–5.
11. Patnaik, Mrinal M. “The Importance of *FLT3* Mutational Analysis in Acute Myeloid Leukemia”. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 59, nº 10, outubro de 2018, p. 2273–86. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1399312>.
12. Mekawy, Mohamed Amin, et al. “FLT3 Receptor/CD135 Expression by Flow Cytometry in Acute Myeloid Leukemia: Relation to FLT3 Gene Mutations and mRNA Transcripts”. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, vol. 19, nº 4, outubro de 2018, p. 345–51. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2018.04.006>.
13. Haage, Tobias R., et al. “How ITD Insertion Sites Orchestrate the Biology and Disease of FLT3-ITD-Mutated Acute Myeloid Leukemia”. *Cancers*, vol. 15, nº 11, maio de 2023, p. 2991. <https://doi.org/10.3390/cancers15112991>.

14. Tarantini, Francesco, et al. “Can the New and Old Drugs Exert an Immunomodulatory Effect in Acute Myeloid Leukemia?” *Cancers*, vol. 13, n° 16, agosto de 2021, p. 4121. *PubMed*, <https://doi.org/10.3390/cancers13164121>.
15. Bergeron, Julie, et al. “The Clinical Utility of FLT3 Mutation Testing in Acute Leukemia: A Canadian Consensus”. *Current Oncology*, vol. 30, n° 12, dezembro de 2023, p. 10410–36. <https://doi.org/10.3390/curroncol30120759>.
16. Guan, Wei, et al. “Profiling of Somatic Mutations and Fusion Genes in Acute Myeloid Leukemia Patients with FLT3-ITD or FLT3-TKD Mutation at Diagnosis Reveals Distinct Evolutionary Patterns”. *Experimental Hematology & Oncology*, vol. 10, n° 1, dezembro de 2021, p. 27. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1186/s40164-021-00207-4>.
17. Döhner, Hartmut, et al. “Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 Recommendations from an International Expert Panel on Behalf of the ELN”. *Blood*, vol. 140, n° 12, setembro de 2022, p. 1345–77. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>.
18. Tallman, Martin S., et al. “Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology”. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, vol. 17, n° 6, junho de 2019, p. 721–49. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.0028>.
19. Friedman, Ran. “The Molecular Mechanisms behind Activation of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia and Resistance to Therapy by Selective Inhibitors”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1877, n° 1, janeiro de 2022, p. 188666. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188666>.
20. Erba, Harry P., et al. “Quizartinib plus Chemotherapy in Newly Diagnosed Patients with FLT3-Internal-Tandem-Duplication-Positive Acute Myeloid Leukaemia (QuANTUM-First): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial”. *The Lancet*, vol. 401, n° 10388, maio de 2023, p. 1571–83. *DOI.org (Crossref)*, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00464-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00464-6).
21. Moualla, Yahia, et al. “Prognostic Relevance of DNMT3A, FLT3 and NPM1 Mutations in Syrian Acute Myeloid Leukemia Patients”. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 23, n° 4, abril de 2022, p. 1387–95. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.4.1387>.

22. Cheng, Jie, et al. “High Expression of FLT3 Is a Risk Factor in Leukemia”. *Molecular Medicine Reports*, vol. 17, n° 2, fevereiro de 2018, p. 2885–92. *PubMed*, <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8232>.
23. Alkhatabi, Heba A., et al. “Application of Newly Customized Myeloid NGS Panel in the Diagnosis of Myeloid Malignancies”. *International Journal of General Medicine*, vol. 17, 2024, p. 37–48. *PubMed*, <https://doi.org/10.2147/IJGM.S437327>.
24. Da Silva, George A. V., et al. “A Single Haplotype of IFNG Correlating With Low Circulating Levels of Interferon- $\gamma$  Is Associated With Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania Guyanensis*”. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 71, n° 2, julho de 2020, p. 274–81. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1093/cid/ciz810>.
25. Lis, John T. “[42] Fractionation of DNA Fragments by Polyethylene Glycol Induced Precipitation”. *Methods in Enzymology*, vol. 65, Elsevier, 1980, p. 347–53. *DOI.org (Crossref)*, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(80\)65044-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(80)65044-7).
26. Li, Quan, et al. “CancerVar: An Artificial Intelligence–Empowered Platform for Clinical Interpretation of Somatic Mutations in Cancer”. *Science Advances*, vol. 8, n° 18, maio de 2022, p. eabj1624. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj1624>.
27. Li, Marilyn M., et al. “Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer”. *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 19, n° 1, janeiro de 2017, p. 4–23. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002>.
28. Daver, Naval, et al. “Targeting FLT3 Mutations in AML: Review of Current Knowledge and Evidence”. *Leukemia*, vol. 33, n° 2, fevereiro de 2019, p. 299–312. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0357-9>.
29. Santos, Fabio P. S., et al. “Prognostic Value of FLT3 Mutations among Different Cytogenetic Subgroups in Acute Myeloid Leukemia”. *Cancer*, vol. 117, n° 10, maio de 2011, p. 2145–55. *PubMed*, <https://doi.org/10.1002/cncr.25670>.
30. Song, Yu-Hua, et al. “Potential Effects of the FLT3-ITD Mutation on Chemotherapy Response and Prognosis of Acute Promyelocytic Leukemia”. *Cancer Management and Research*, vol. 13, 2021, p. 2371–78. *PubMed*, <https://doi.org/10.2147/CMAR.S297421>.
31. Cabrera, Maria Elena, et al. “Incidence and Clinical Significance of FLT3 and Nucleophosmin Mutation in Childhood Acute Myeloid Leukemia in Chile”.

- Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, vol. 45, n° 1, 2023, p. 77–82. *PubMed*, <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.06.003>.
32. Bacher, Ulrike, et al. “Prognostic Relevance of FLT3-TKD Mutations in AML: The Combination Matters—an Analysis of 3082 Patients”. *Blood*, vol. 111, n° 5, março de 2008, p. 2527–37. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-091215>.
33. Ribeiro, Sara, et al. “Genomic Abnormalities as Biomarkers and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia”. *Cancers*, vol. 13, n° 20, outubro de 2021, p. 5055. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.3390/cancers13205055>.
34. Cao, Tingyong, et al. “The FLT3-ITD Mutation and the Expression of Its Downstream Signaling Intermediates STAT5 and Pim-1 Are Positively Correlated with CXCR4 Expression in Patients with Acute Myeloid Leukemia”. *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, agosto de 2019, p. 12209. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48687-z>.
35. Siegel, Rebecca L., et al. “Cancer Statistics, 2024”. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 74, n° 1, janeiro de 2024, p. 12–49. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
36. Juliusson, Gunnar, et al. “The Prognostic Impact of FLT3-ITD and NPM1 Mutation in Adult AML Is Age-Dependent in the Population-Based Setting”. *Blood Advances*, vol. 4, n° 6, março de 2020, p. 1094–101. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001335>.
37. Hellesøy, Monica, et al. “Sex Disparity in Acute Myeloid Leukaemia with *FLT3* Internal Tandem Duplication Mutations: Implications for Prognosis”. *Molecular Oncology*, vol. 15, n° 9, setembro de 2021, p. 2285–99. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13035>.
38. Liu, Song-Bai, et al. “Pattern and Prognostic Value of *FLT 3* - ITD Mutations in Chinese de Novo Adult Acute Myeloid Leukemia”. *Cancer Science*, vol. 109, n° 12, dezembro de 2018, p. 3981–92. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1111/cas.13835>.
39. Engen, Caroline, et al. “FLT3-ITD Mutations in Acute Myeloid Leukaemia – Molecular Characteristics, Distribution and Numerical Variation”. *Molecular Oncology*, vol. 15, n° 9, setembro de 2021, p. 2300–17. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12961>.

40. Ohgami, Robert S., et al. “Next-Generation Sequencing of Acute Myeloid Leukemia Identifies the Significance of TP53, U2AF1, ASXL1, and TET2 Mutations”. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 28, n° 5, maio de 2015, p. 706–14. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.160>.
41. Cruz, Nathália Gomide, et al. “Characterization of *NPM1* , *FLT3* , and *IDH1* Mutations in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Brazilian Cohort Study”. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 57, n° 12, dezembro de 2016, p. 2901–04. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.3109/10428194.2016.1165811>.
42. Velloso, Elvira Deolinda Rodrigues Pereira, et al. “Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies”. *Einstein (São Paulo)*, vol. 9, n° 2, junho de 2011, p. 184–89. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1590/s1679-45082011ao2041>.
43. Lucena-Araujo, Antonio R., et al. “Results of FLT3 Mutation Screening and Correlations with Immunophenotyping in 169 Brazilian Patients with Acute Myeloid Leukemia”. *Annals of Hematology*, vol. 89, n° 2, fevereiro de 2010, p. 225–28. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1007/s00277-009-0817-4>.
44. Chen, Yang, et al. “Correlation of Blood Cell Counts with Mutant Subtypes and Impact Prognosis in Acute Myeloid Leukemia Patients with FLT3 Mutations”. *Hematology*, vol. 28, n° 1, dezembro de 2023, p. 2172296. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1080/16078454.2023.2172296>.
45. Rezaei, Narges, et al. “FMS-Like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) and Nucleophosmin 1 (NPM1) in Iranian Adult Acute Myeloid Leukemia Patients with Normal Karyotypes: Mutation Status and Clinical and Laboratory Characteristics”. *Turkish Journal of Haematology: Official Journal of Turkish Society of Haematology*, vol. 34, n° 4, dezembro de 2017, p. 300–06. *PubMed*, <https://doi.org/10.4274/tjh.2016.0489>.
46. Merdin, Alparslan, et al. “Analysis of Pre-Chemotherapy WBC, PLT, Monocyte, Hemoglobin, and MPV Levels in Acute Myeloid Leukemia Patients with WT1, FLT3, or NPM Gene Mutations”. *Medicine*, vol. 99, n° 14, abril de 2020, p. e19627. *PubMed*, <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019627>.
47. Sabir, Kinza, et al. “Prevalence Of FLT-3 Mutation In Acute Myeloid Leukaemia”. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC*, vol. 33, n° 3, 2021, p. 399–402.

48. Heiblig, Maël, et al. “Prognostic Value of Genetic Alterations in Elderly Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Single Institution Experience”. *Cancers*, vol. 11, n° 4, abril de 2019, p. 570. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.3390/cancers11040570>.
49. Haage, Tobias R., et al. “How ITD Insertion Sites Orchestrate the Biology and Disease of FLT3-ITD-Mutated Acute Myeloid Leukemia”. *Cancers*, vol. 15, n° 11, maio de 2023, p. 2991. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.3390/cancers15112991>.
50. Stirewalt, Derek L., et al. “Size of FLT3 Internal Tandem Duplication Has Prognostic Significance in Patients with Acute Myeloid Leukemia”. *Blood*, vol. 107, n° 9, maio de 2006, p. 3724–26. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3453>.
51. Kayser, Sabine, et al. “Insertion of FLT3 Internal Tandem Duplication in the Tyrosine Kinase Domain-1 Is Associated with Resistance to Chemotherapy and Inferior Outcome”. *Blood*, vol. 114, n° 12, setembro de 2009, p. 2386–92. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209999>.
52. Ei Ei Aung, Nang, et al. “FLT3 Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia Patients in Northeast Thailand”. *Medical Science Monitor Basic Research*, vol. 28, novembro de 2022, p. e937446. *PubMed*, <https://doi.org/10.12659/MSMBR.937446>.
53. Deka, Riju Rani, et al. “FLT3-ITD Mutation Does Not Influence Survival Outcome in Adult Acute Promyelocytic Leukemia Patients Treated With ATO and ATRA-Based Therapeutic Regimen: Experience From a North Indian Tertiary Care Centre”. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, vol. 22, n° 6, junho de 2022, p. 416–23. *PubMed*, <https://doi.org/10.1016/j.clml.2021.12.007>.
54. De Lourdes Chauffaille, Maria, et al. “Acute Promyelocytic Leukemia with t(15;17): Frequency of Additional Clonal Chromosome Abnormalities and FLT3 Mutations”. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 49, n° 12, janeiro de 2008, p. 2387–89. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1080/10428190802511248>.
55. Lucena-Araujo, Antonio R., et al. “Internal Tandem Duplication of the FLT3 Gene Confers Poor Overall Survival in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia Treated with All-Trans Retinoic Acid and Anthracycline-Based Chemotherapy: An International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia Study”. *Annals of*

- Hematology*, vol. 93, nº 12, dezembro de 2014, p. 2001–10. *PubMed*, <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2142-9>.
56. Breccia, Massimo, et al. “FLT3-ITD Confers Poor Prognosis in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia Treated with AIDA Protocols: Long-Term Follow-up Analysis”. *Haematologica*, vol. 98, nº 12, dezembro de 2013, p. e161-163. *PubMed*, <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.095380>.
57. Fröhling, Stefan, et al. “Identification of Driver and Passenger Mutations of FLT3 by High-Throughput DNA Sequence Analysis and Functional Assessment of Candidate Alleles”. *Cancer Cell*, vol. 12, nº 6, dezembro de 2007, p. 501–13. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.11.005>.
58. Garg, Manoj, et al. “Profiling of Somatic Mutations in Acute Myeloid Leukemia with FLT3-ITD at Diagnosis and Relapse”. *Blood*, vol. 126, nº 22, novembro de 2015, p. 2491–501. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-646240>.
59. Ülgen, Ege, et al. “Sequential Filtering for Clinically Relevant Variants as a Method for Clinical Interpretation of Whole Exome Sequencing Findings in Glioma”. *BMC Medical Genomics*, vol. 14, nº 1, dezembro de 2021, p. 54. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1186/s12920-021-00904-3>.
60. Poiré, Xavier, et al. “Arsenic Trioxide in Front-Line Therapy of Acute Promyelocytic Leukemia (C9710): Prognostic Significance of FLT3 Mutations and Complex Karyotype”. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 55, nº 7, julho de 2014, p. 1523–32. *PubMed*, <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.842985>.
61. Bodian, Dale L., et al. “Germline Variation in Cancer-Susceptibility Genes in a Healthy, Ancestrally Diverse Cohort: Implications for Individual Genome Sequencing”. *PloS One*, vol. 9, nº 4, 2014, p. e94554. *PubMed*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094554>.
62. van Erp, Nielka P., et al. “Pharmacogenetic Pathway Analysis for Determination of Sunitinib-Induced Toxicity”. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 27, nº 26, setembro de 2009, p. 4406–12. *PubMed*, <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.7679>.
63. van Erp, N. P., et al. “Myelosuppression by Sunitinib Is Flt-3 Genotype Dependent”. *British Journal of Cancer*, vol. 103, nº 5, agosto de 2010, p. 757–58. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605813>.

64. Chu, Ying-Hsia, et al. "Association of ABCB1 and FLT3 Polymorphisms with Toxicities and Survival in Asian Patients Receiving Sunitinib for Renal Cell Carcinoma". *PloS One*, vol. 10, n° 8, 2015, p. e0134102. *PubMed*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134102>.
65. Berenstein, Rimma. "Class III Receptor Tyrosine Kinases in Acute Leukemia - Biological Functions and Modern Laboratory Analysis". *Biomarker Insights*, vol. 10, n° Suppl 3, 2015, p. 1–14. *PubMed*, <https://doi.org/10.4137/BMI.S22433>.

## Suplementar

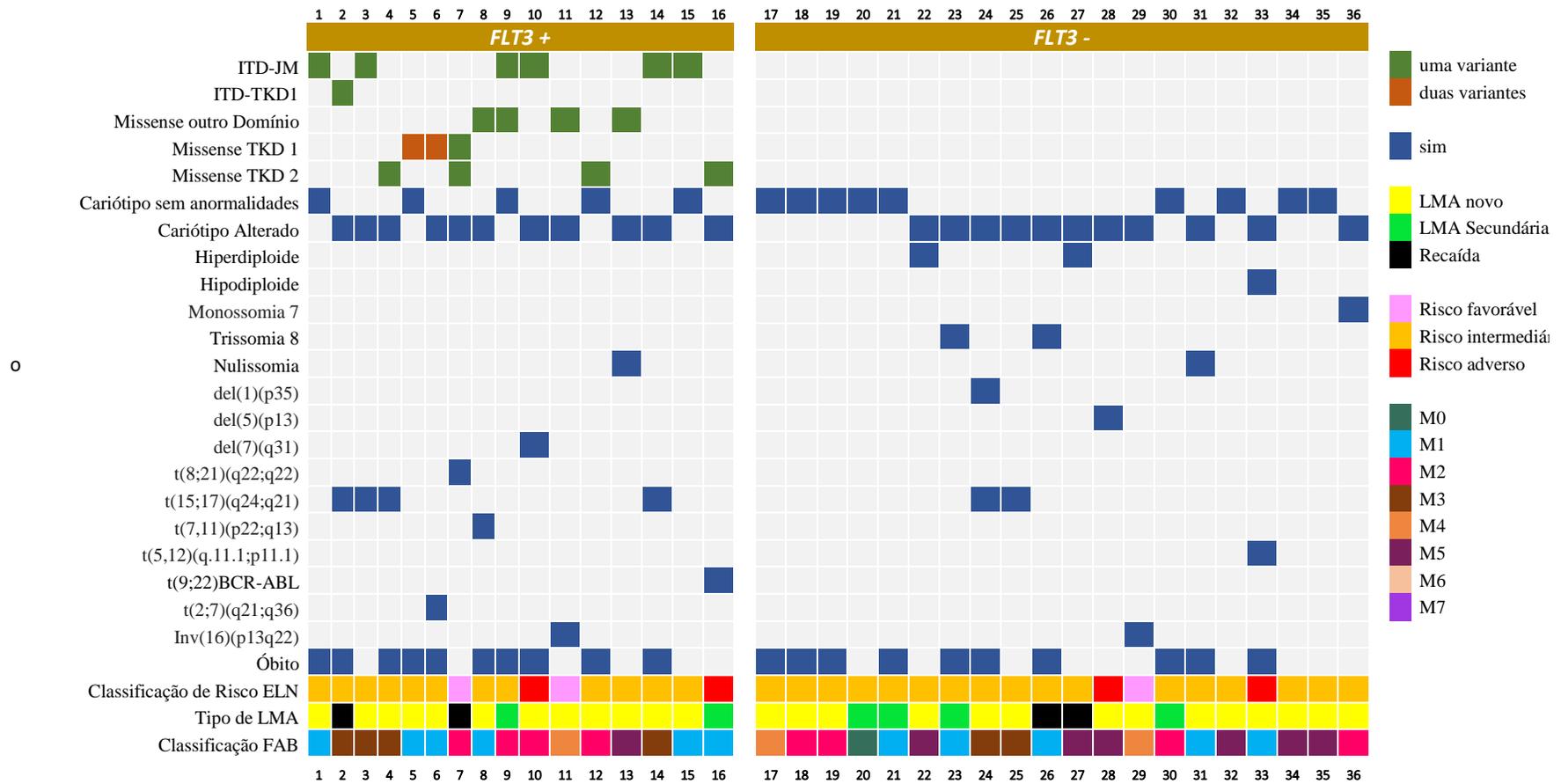
**Quadro S1.** Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e programação de ciclagens utilizados na PCR de amplificação dos fragmentos.

PCR	Nome	Sequência (5' → 3')	Tamanho	Região	Ciclagem
PCR 1	FLT3_Forward 1	GCTGCTCGTTGTTTTTCTGC	1098 pb	Éxons 1 - 9	95°C/ 5 min; 95°C/ 30 seg / 35 ciclos; 64°C/ 30 seg / 35 ciclos; 72°C/ 1 min, 20 seg / 35 ciclos; 72°C/ 7 min
	FLT3_Reverse 1	GTGGGTAGGCTTTAAACCTGA			
PCR 2	FLT3_Forward 2	TTCCTCTTCAAAGCATCCCAGT	1239 pb	Éxons 8 - 18	95°C/ 5 min; 95°C/ 30 seg / 35 ciclos; 63°C/ 30 seg / 35 ciclos; 72°C/ 1 min, 30 seg / 35 ciclos; 72°C/ 7 min
	FLT3_Reverse 2	CTTCTCTGAACCAGGCATG			
PCR 3	FLT3_Forward 3	GAGAATATTGTGAACCTGCTGG	1117 pb	Éxons 16 - 24	95°C/ 5 min; 95°C/ 30 seg / 35 ciclos; 57°C/ 30 seg / 35 ciclos; 72°C/ 1 min, 10 seg / 35 ciclos; 72°C/ 7 min
	FLT3_Reverse 3	TAAACGCAGACAGCTTCTAGAG			

**Quadro S2.** Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e programação de ciclagens utilizados na PCR de amplificação do fragmento *FLT3*- ITD.

PCR	Nome	Sequência (5' → 3')	Tamanho	Região	Ciclagem
PCR <i>FLT3-ITD</i>	ITD_Forward	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	232 pb	Éxons 14 - 15	95°C/ 5 min; 95°C/ 30 seg / 40 ciclos; 60°C/ 30 seg / 40 ciclos; 72°C/ 45 seg / 40 ciclos; 72°C/ 7 min
	ITD_Reverse	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC			

## Suplementar



**Figura S1** - Características citogenéticas, classificação de risco citogenético ELN e FAB dos pacientes com LMA.

## Suplementar

Quadro S3 - Variantes detectadas pelo sequenciamento nucleotídico do gene *FLT3* em pacientes com LMA.

VARIANTES FLT3	V85I	T227M	D247H	G295V	T329S	Q338L	C407W	Y416N	V557I	L561P
POSIÇÃO CDS	c.253	c.680	c.742	c.884	C.985	c.1014	c. 1221	c.1246	c.1669	c.1682
NM_004119	G	C	G	G	A	A	C	T	G	T
ALELO VARIANTE	A	T	C	T	T	T	G	A	A	C
POSIÇÃO NO CÓDON	GTA	ACG	GAT	GGC	ACT	CAA	TGC	TAT	GTT	CTA
	ATA	ATG	CAT	GTC	TCT	CTA	TGG	AAT	ATT	CCA
TIPO DE VARIANTE	missense	Missense	missense	missense	missense	missense	missense	missense	missense	missense
EXON	3	6	7	8	8	8	10	10	13	13
DOMINIO FUNCIONAL	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	TM	TM
VARIAÇÃO DA PROTEÍNA	Val85Ile	Thr227Met	Asp247His	Gly295Val	The329Ser	Gln338Leu	Cys407Trp	Tyr416Asn	Val557Ile	Leu561Pro
SIGNIFICADO CLÍNICO	Benigna	* SNP	Incerto	Benigna	Benigna	Benigna	Benigna	Patogênica	*SNP	Patogênica

\*SNP - polimorfismo de nucleotídico único.





## Suplementar

**Tabela S1:** Dados laboratoriais dos pacientes *FLT3* positivo de acordo com a razão alélica (AR).

<b>DADOS LABORATORIAIS</b>	<b>RA &lt; 0,5 n = 9</b>	<b>RA &gt; 0,5 n = 7</b>	<b>p-Value <sup>a</sup></b>
Eritrócitos, x mm <sup>3</sup> ,	2,73 (2,22 – 3,38)	2,95 (2,37 – 3,28)	0.461
Hemoglobina, g/dL	7,9 (6,7 – 10,1)	9,4 (7,6 – 9,6)	0.631
Hematócrito, %	23,3 (20,15 – 28,65)	27,1 (24,4 – 31,90)	0.432
Plaqueta, mm <sup>3</sup>	44.000 (11.000 – 140.500)	48.000 (18.000 – 49.000)	0.736
Leucócitos totais, mm <sup>3</sup>	14.760 (6.925 – 131.800)	10.850 (3.690 – 26.140)	0.606
Blastos SP, %	77 (32,5 – 86,5)	36 (28 -71)	0.340
Blastos MO, %	60 (45 – 85)	35 (32 - 58)	0.141
DHL, U/L	1.089 (794,3 – 1.655)	598 (501 – 860)	0.152

<sup>a</sup> teste de Mann-Whitney

## CAPÍTULO II:

### **Mutações no gene *FLT3* são observadas em casos de LMA recaída e secundária: um estudo de 4 casos**

Marlúcia Oliveira dos Santos <sup>(1)</sup> Talita Cruz dos Santos <sup>(1)</sup>, Gabriele Souza Parente Braz <sup>(1)</sup> Mylena Oliveira do Nascimento <sup>(3)</sup>, Vinicius Clementino da Costa <sup>(3)</sup>, Lucivana Prata Souza Mourão <sup>(1,2)</sup>, Nilberto Dias de Araujo <sup>(3)</sup>, Andréa Monteiro Tarragô <sup>(1,3)</sup>, Leny Nascimento da Motta Passos <sup>(1,3)</sup>, George Allan Villarouco da Silva <sup>(1,3)</sup>

(1) Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia – Universidade do Estado do Amazonas (PPGH/UEA), Manaus, AM, Brasil

(2) Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Manaus, AM, Brasil

(3) Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

### **Introdução**

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia geneticamente transformada, heterogênea, caracterizada pela progressão clonal de precursores mieloides imaturos que resultam em hematopoiese ineficaz e insuficiência da medula óssea.<sup>1,2</sup>

A LMA é a leucemia aguda mais frequente no adulto (80%), principalmente acima de 65 anos.<sup>3</sup> Os pacientes apresentam baixa taxa de sobrevida e a recidiva da doença é umas das principais causas de falhas do tratamento<sup>4</sup>. Aproximadamente 40 a 50% dos jovens e maioria dos idosos recidivam e/ou se mostra refratário ao primeiro ciclo de tratamento, tornando o prognóstico ruim, com uma sobrevida média de 12 meses.<sup>4,5</sup> Alterações moleculares em neoplasias mieloproliferativa ou mielodisplásicas podem resultar em posterior transformação leucêmica, caracterizada como leucemia mieloide aguda secundária (LMAs).<sup>6</sup> A LMA constitui um grupo heterogêneo que representa uma proporção de 15 a 26% dos casos de LMA e foram associados a pior prognóstico quando comparados a LMA novo.<sup>7</sup>

Aqui relatamos casos prospectivos de pacientes com LMA que apresentaram recaída ao tratamento (2 casos) e LMA secundária (2 casos) que foram positivos para *FLT3* mutado. Revisamos e avaliamos os prontuários médicos, realizando o *follow-up* até o presente momento. Utilizamos os dados registrados pelo Serviço de Atendimento Médico Especializado (SAME) da Fundação HEMOAM.

## Apresentação dos casos

**Caso 01** – Paciente sexo feminino, 65 anos, primeiro atendimento em outubro de 2022, em investigação de pancitopenia, apresentou lesões eritematosas nodulares e perda de peso nos últimos 3 meses. Avaliação hematológica, apresentou leucopenia ( $1.960 \text{ mm}^3$ ) hemácias ( $3,02 \text{ mm}^3$ ), hemoglobina ( $9,7 \text{ g/dL}$ ), hematócrito (31,5%) e plaquetas ( $64.000 \text{ mm}^3$ ). Mielograma apresentou-se com hipocelularidade, porém sem presença de blasto. Iniciou uso de prednisona  $40 \text{ mg/dia}$ . Após 2 meses apresentou sintomas de equimoses em membro superior, plaqueta ( $13.000 \text{ mm}^3$ ). O resultado da biópsia de medula óssea foi compatível com neoplasia mielodisplásica (SMD) e o tratamento foi baseado em suporte clínico e transfusional, pois não havia disponibilidade de terapia direcionada (azacitidina ou decitabina). Em fevereiro de 2023 paciente apresentou hemograma com 30% de blastos. A citometria de fluxo do sangue medula óssea demonstrou imunofenótipo compatível com LMA (Tabela 1). O resultado do exame de cariótipo Banda G, sem presença de anomalias. Foi realizada análise molecular de *FLT3*, *NPM1* e *TP53* pelo sequenciamento em Sanger e detectado: variante missense no gene *FLT3*, Y416N (VAF 36%) e uma inserção duplicação interna em tandem *FLT3-ITD* (42 pb e VAF 32%), variante E129Q no gene *NPM1* e E62Q no gene *TP53*. A paciente recebeu terapia de indução com 7+3 (citarabina + daunorrubicina  $45\text{mg/m}^2$ ) e ficou internada por 20 dias. Inibidores de *FLT3*, não estavam disponíveis para terapia direcionada. Paciente foi a óbito após 45 dias devido a complicações.

**Caso 02** – Paciente sexo feminino, 67 anos, encaminhado em fevereiro de 2023 para atendimento ao hematologista devido hemoglobina ( $11,1 \text{ g/dL}$ ) e plaquetopenia ( $46.000 \text{ mm}^3$ ) leucócitos ( $14.000 \text{ mm}^3$ ). Aos exames solicitados, eletroforese com provável distorção na fração gama, e prescrita cianocobalamina (Vit. B12) por 2 meses, sem melhoras. Ainda relatando fraqueza, sangramento gengival e discreta anictérica. Em novo hemograma realizado em maio de 2023, apresentou leucocitose ( $38.650 \text{ mm}^3$ ) com desvio a esquerda, blasto (8%) e pro-monócitos (8%) hemoglobina ( $8,6 \text{ g/dL}$ ), plaquetopenia ( $18.000 \text{ mm}^3$ ), Mielograma compatível com Leucemia mielomonocítica crônica (43% granulocítica e 11% monocítica) e biópsia com presença de nincho de blastos que não firmam diagnóstico. O exame qualitativo de transcrito BCR/ABL p190 e p210 foram negativos. Repetido nova biópsia e mielograma. Paciente apresentou piora do cansaço, anemia, palidez cutânea, astenia. Recebeu transfusão sanguínea e plaquetas para melhoras do quadro clínico. Novo hemograma em agosto/2023 apresentou leucocitose ( $195.800 \text{ mm}^3$ ), 34% blastos no sangue periférico, com desvio a esquerda, hemoglobina (Hb) ( $7,6 \text{ g/dL}$ ) e plaquetopenia ( $12.000 \text{ mm}^3$ ), foi prescrito

hidroxiuréia 2 comp./dia para citorredução. Realizado imunofenotipagem, apresentou compatível com LMA (tabela 1), presença de 35% de blastos mieloides. Mielograma com hipocelularidade, e 47% de blastos mieloides. Após 15 dias com citorredução, contagens de leucócitos de 47.460 mm<sup>3</sup>, blastos 54%, plaquetas 6.000 mm<sup>3</sup>, hemoglobina 7,2 g/dL. O cariótipo Banda G revelou t(9;22) (q34;q11.2) com presença de cromossomo Philadelphia em 75% das metáfases (15/20 analisadas). Avaliação molecular BCR/ABL P210 foi novamente negativo. O teste sequenciamento Sanger molecular do *FLT3* identificou alteração pontual D835Y com VAF de 45%. Recebeu indução com citarabina 20 mg por 10 dias e 30 dias depois foi prescrito protocolo 5+2 (citarabina e daunorrubicina). Paciente apresentou severas complicações e novo hemograma com leucócitos 115 mil com 80% de blastos e inúmeras equimoses. Devido a dificuldade de controle da doença propôs-se quimioterapia paliativa com Hidroxiuréia 2 cp de 12/12, paciente em acompanhamento ambulatorial.

**Caso 03** - Paciente sexo feminino, 44 anos, em maio de 2017 foi encaminhada para investigação de bicitopenia, relata apresentar há 2 meses astenia, tontura, cefaleia, hematomas, petéquias, metrorragia e perda ponderal de 3 kg. O hemograma com hemoglobina (7.0 g/dL), hematócrito (20%), plaquetas (20.000 mm<sup>3</sup>), leucócitos (5.240 mm<sup>3</sup>) com 70% de blastos. Imunofenotipagem compatível com LMA. O teste cariótipo Banda G e análise molecular RT-PCR revelaram t(15;17) e transcrito *PML:RARA* respectivamente. Foi diagnosticada com LMA-M3 (Leucemia Promielocítica Aguda), recebeu quimioterapia de indução ácido transretinóico (ATRA)+ idarrubicina, com remissão morfológica. Após, realizou 3 ciclos da quimioterapia de consolidação (ATRA+ idarrubicina) com boa resposta hematológica e molecular. Seguiu em quimioterapia de manutenção (Protocolo PETHEMA - 2005), durante 12 meses (dez/2017 a dez/2018). Após 10 meses (out/2019) queixou sangramento uterino, hematomas, e a avaliação hematológica notou-se leucocitose (86.250 mm<sup>3</sup>) com 94% de blastos, Hb 8.0 g/dL, hematócrito 22,9% e plaquetas 12.000 mm<sup>3</sup>. Imunofenótipo MPO+, CD33+, CD113+, CD117+, CD38+ e foi evidenciado recaída da LMA em out/2019. Realizou 1 ciclo de indução (ATRA) e 3 ciclos de consolidação, com remissão hematológica e molecular (PML-RARA indetectável). Em outubro de 2020 realizou transplante medula óssea (TMO) aparentado (irmão) sem intercorrências graves. Apresentou cardiopatia devido drogas cardiotoxícas. Permaneceu em remissão por 19 meses pós TMO, entretanto em maio/2022 apresentou no serviço de urgência queixou astenia, equimose, petéquias exantemas, onde avaliação foi notável leucócitos (22.160mm<sup>3</sup>) com 66% de blasto. Imunofenotípico evidenciaram 2º recaída de LMA (Tabela 1), e ausência de transcrito para *PML-RARA* por RT-PCR. Foi realizado sequenciamento de Sanger, identificou-se variante duplicação interna *in*

*tandem* (*FLT3*-ITD 81pb e VAF de 46,6%) e variante *frameshift* tipo A em *NPM1* (W228fs VAF 43,7%). Não havia disponibilidade de inibidores de *FLT3* na unidade hospitalar. Seu quadro clínico foi complicado, com piora cardiorrespiratória e declínio funcional foi a óbito em julho 2022.

**Caso 04-** - Paciente sexo feminino, 28 anos, em novembro de 2021 queixou-se de otite média, sem melhora com antibioticoterapia. O hemograma apresentava contagem de leucócitos ( $62.390 \text{ mm}^3$ ) com 91% de blastos, Hemoglobina (8,7 g/dL), Hematócrito (25,8%) e plaquetas ( $70.000 \text{ mm}^3$ ). A citometria de fluxo, demonstrou imunofenotípico compatível com LMA. Foi confirmado por RT-PCR presença transcrito *AML1-ETO-B* t(8;21). Portanto, a paciente foi diagnosticada LMA-M2 e classificada como risco citogenético favorável com base aos dados de biologia citogenética e molecular de acordo com o *ELN 2017*. Recebeu indução com 7+3 (Citarabina e Daunorrubicina 20 mg), levou a remissão morfológica. Recebeu consolidação com 2+5 (Citarabina e Daunorrubicina 20 mg), seguida de 4 ciclos de intensificação com altas doses de citarabina. Paciente sem doador aparentado e sem doador compatível no banco de doador. Permaneceu em remissão completa por aproximadamente 4 meses pós-tratamento, e em novembro de 2022 apresentou foco infeccioso em região infra-axilar e neutropenia febril. A citometria de fluxo demonstrou marcadores compatível com LMA (Tabela 1), caracterizando recidiva. Foi identificado através do sequenciamento de Sanger, duas mutações *FLT3* não sinônimas coocorrentes A680V (VAF 100% T/TT homozigose) e R834G (VAF de 25%). Recebeu 2 ciclos de mitoxantrona e fludarabina como terapia de resgate. Paciente judicializou inibidor de tirosina quinase (ITK), iniciou tratamento com midostaurina em março de 2023. E, em agosto de 2023 realizou Transplante Medula óssea (TMO) haploidêntico com 50% de compatibilidade. Ela permanece em remissão morfológica completa 7 meses após o transplante e em acompanhamento ambulatorial.

### Discussão

A leucemia mieloide aguda (LMA) se desenvolve a partir de anormalidades genéticas condutoras (mutações somáticas), com uma média de 13 mutações em mais de 60 gene recorrentes na LMA.<sup>8,9</sup> É uma doença clinicamente heterogênea e alterações citogenéticas/moleculares tem relevância prognóstica, influenciando na prática clínica e adoção de estratificação de grupos de riscos.<sup>10</sup>

Alterações no genes *FMS-like* tirosina quinase 3 (*FLT3*) e gene que codifica a nucleofosmina (*NPM1*) são frequentemente observadas em 30% e 40% dos pacientes com

LMA, respectivamente, alterações que influenciam no aumento da proliferação celular e diminuição do apoptose, contribuindo para leucemogênese.<sup>9</sup>

A presença de mutações *FLT3-ITD* e *NPM1* coocorrem em aproximadamente 53% dos casos de LMA<sup>11,12</sup> e relatada com maior frequência no cariótipo sem alterações,<sup>13,14,15</sup> fornecendo importante informações prognósticas.<sup>16</sup> Estudos anteriores associaram a carga alélica mutante do *FLT3-ITD* (baixa ou alta) com *NPM1* a diferentes desfechos,<sup>17,18,19</sup> no entanto atualmente o risco prognóstico ELN não considera mais esses achados, e mutações *FLT-ITD* são atualmente categorizados no grupo de risco intermediário.<sup>20</sup> Alterações em *NPM1* sem *FLT3-ITD* estão categorizadas como risco favorável,<sup>20</sup> porém a presença de anormalidades citogenéticas foram associadas a desfechos adversos.<sup>17,21</sup> Neste estudo observamos 2 casos de LMA secundária e 2 casos de recaída que apresentam mutações nos genes *FLT3* sendo observado a coocorrência de mutações nos genes, *NPM1*, *TP53* e alterações cromossômicas, classificando como grupo de risco favorável t(8,21), intermediário t(15;17) e adverso (t(9;22))<sup>20</sup>.

Embora, aproximadamente 40 a 80% dos pacientes com LMA respondem ao tratamento de indução padrão (3+7), alcançam a remissão completa (RC), eventualmente alguns pacientes recaem, representando a principal causa de falha do tratamento.<sup>19</sup> Foi relatado que mutações *FLT3-ITD* têm impacto adverso na sobrevida global (SG) devido às altas taxas de recidiva. Estudos mostram que mutações genéticas *FLT3-ITD* e *TP53* foram frequentemente observadas em casos de recidiva, e estão associadas a desfechos desfavoráveis.<sup>9,22</sup> Entretanto, mutações *NPM1* foram reduzidas na recaída.<sup>19</sup> Assim, sugere que mutações *FLT3-ITD* e *TP53* têm importante contribuição para condução leucemogênese e fornece informações para avaliar a dinâmica de risco de LMA.

Estudos anteriores relatam a presença de *FLT3-ITD* na LMA com t(15;17), ou LPA (leucemia promielocítica aguda) com alta frequência de 20-33%<sup>23,24,25</sup>. Embora a LPA seja associada a melhores taxas de cura, a identificação de *FLT-ITD* na LPA é um fator desfavorável em termos de sobrevida global (SG), sobrevida livre de recidiva (SLR), e sobrevida livre de doença (SLD).<sup>23,26</sup> Assim o *FLT3* mutado na LPA sugere um importante marcador prognóstico do risco. Relatamos um acaso de LMA com t(15;17) e coocorrência de mutação de *FLT3-ITD*, *NPM1* e *TP53* em 2ª recaída, a frequência alélica semelhante são sugestivo de abrigar mutações no mesmo clone e que essa mutações contribuíram para expansão clonal e resistência a terapia.<sup>27</sup>

A LMA com t(8;21) (q22;q22) é relatada em aproximadamente 15% dos pacientes com adulto,<sup>28</sup> estratificada no subgrupo de prognóstico favorável, no entanto. Estudos anteriores relatam reduzidas SG e SLR na presença de *FLT3* (13%)<sup>29</sup>. Aqui relatamos um caso de LMA

de *novo* (primária) com t(8;21) estratificada no grupo favorável, após realizar quimioterapia padrão, recaiu após 10 meses e a presença de 2 variantes patogênicas em *FLT3* e *TP53* com frequência alélica diferente, sendo sugestivo de heterogeneidade clonal e subclonal conforme descrito.<sup>27</sup>

A translocação t(9;22)(q34.1;q11.2) ou cromossomo Filadélfia, corresponde a fusão dos genes *BCR:ABL* e são detectadas 90-95% na Leucemia Mieloide Crônica (LMC) no ponto de quebra M-bcr (p210).<sup>30</sup> No entanto, também são observadas em 10 a 20% na Leucemia Linfóide Aguda (LLA) em adulto, ponto de quebra m-bcr (p190) e, raramente na LMA (<1%)<sup>31,32</sup> Além disso, são relatados vários transcritos *BCR:ABL* atípicos que podem estar associados a prognósticos distintos.<sup>33,34,35,36</sup> Aqui relatamos um caso de Leucemia Crônica que agudizou para fase blástica (LMA) com presença de cromossomo Filadélfia, detectado pelo cariótipo Banda G e foi negativa para os transcritos *BCR:ABL* mais frequentemente detectado pela RT-PCR (p210 e p190) e mutação pontual *FLT3* D835Y. Na LMA a translocação t(9;22)(q34.1;q11.2) é estratificada no grupo de risco adverso e são frequentemente refratário quimioterapia<sup>37</sup>

Devido a heterogeneidade da SMD o tratamento atualmente disponível é limitado e a abordagem terapêutica com hipometilantes (azacitidina ou decitabina) considerados padrão de tratamento, melhorou significativamente a sobrevida global, SLR, a qualidade de vida e nos desfechos.<sup>38</sup> Portanto, acredita-se que a indisponibilidade da terapia adequada possa ter contribuído para rápida progressão leucêmica aqui apresentada. Aproximadamente 1/3 dos pacientes com SMD progridem para LMA.<sup>39</sup> São descritas alterações genéticas em clones leucêmicos dominantes que estão associados a progressão leucêmica, como *FLT3*, *NPM1* e *TP53*.<sup>40,41</sup> O que pode sugerir como potenciais marcadores genéticos da LMA. Alterações no gene *TP53* estão presentes em aproximadamente 8-13% dos pacientes com SMD e estão associadas a riscos de progressão para LMA, resistência a terapia e piores desfechos.<sup>40,41</sup> A presença de variantes *NPM1* raramente é detectada ao diagnóstico da SMD, mais presente após progressão leucêmica.<sup>42</sup>

Estudos anteriores relatam a presença de variantes *FLT3* (60%) e *NPM1* (17%) na SMD que evoluem pra LMA,<sup>42,43,44</sup> indicando que essas alterações são eventos secundários que contribuem na transformação leucêmica.<sup>20</sup> A presença de *FLT3-ITD* após transformação SMD para LMA, foi associada a baixa sobrevida (2,4 meses versus 7,5 meses) quando comparados a pacientes sem *FLT3-ITD*.<sup>45</sup> Observamos em todos os casos aqui a presença de alterações em genes recorrente na LMA e que a terapia direcionada foi um fator limitador, o acesso a terapia

alvo no *FLT3* ainda não estava disponível para os pacientes aqui correlacionados. Uma única paciente (caso 4) conseguiu utilizar o inibidor de *FLT3* após judicialização.

As mutações no *FLT3* são frequentemente relatadas na LMA e tem implicações importantes para manejo clínico e terapêutico da doença. A presença de mutação de *FLT3* em pacientes com LMA está relacionada a pior prognóstico e a coocorrência de outras mutações drive retratando a heterogeneidade clonal da doença, o que torna ainda mais propensos a recaída após o tratamento. Assim a incorporação de pesquisa do status mutacional do *FLT3* em todo aspecto do manejo da LMA é fundamental para tratamento clínico com terapia direcionada ao *FLT3*.

**Tabela 1:** Características clínicas, imunofenótipo, citogenética e molecular.

Caso	Diagnóstico de LMA	Gênero/Idade	FAB	Imunofenotipagem	Cariótipo Banda G/ RT-PCR	<i>FLT3</i> +	<i>NPM1</i> +	<i>TP53</i> +
1	LMA Secundária a SMD	F/65	M2	cMPO <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> ,CD117 <sup>+</sup> ,CD33 <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> , CD38 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , <b>CD56<sup>+</sup></b> , <b>CD7<sup>+</sup></b>	46,XX	Y416N (VAF 36%); ITD (42 pb) (VAF 32%)	E129Q (VAF 44%)	E62Q (VAF 25%)
2	LMA Secundária a LMC	F/67	M1	CD13 <sup>+</sup> , CD117 <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> , CD38 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> , <b>CD7<sup>+</sup></b> , <b>CD123<sup>+</sup></b> ,	46,XX, t(9;22)(q34;q11,2)	D835Y (VAF 45 %)	W288fs	negativa
3	LMA Recaída	F/44	M3	cMPO <sup>+</sup> , <b>CD13<sup>+</sup></b> , <b>CD117<sup>+</sup></b> , <b>CD33<sup>+</sup></b> , <b>CD38<sup>+</sup></b> , CD64 <sup>+</sup>	46,XX, t(15;17) (q24;q21)/ PML-RARA	ITD (81 pb) (VAF 46,6%)	E129Q VAF 41% W288fs-VAF 43,6 %	P60Q (VAF 40%) E62Q (VAF 40%)
4	LMA Recaída	F/28	M2	cMPO <sup>+</sup> , CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> , CD117 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , HLA-DR <sup>+</sup> ,	46,XX, t(8;21) (q22:22)/ AML1- A:ETO-B	A680V (VAF 100% T/TT); R834G (VAF25%)	negativa	E62Q (VAF 8%)

LMA, leucemia mieloide aguda; SMD , neoplasia mielodisplásica; LMC, leucemia mieloide crônica, RT-PCR, Reação em Cadeia da Polimerase Retrotranscriptase; FAB, *Franco-Americano-Britânico*; *FLT3*, FMS like tirosina quinase 3; *NPM1*, nucleofosmina; *TP53*, gene supressor de tumor.

**Tabela 2:** Dados hematológicos no momento da análise molecular para os genes *FLT3*, *NPM1* e *TP53*.

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>CASO 1</b>	<b>CASO 2</b>	<b>CASO 3</b>	<b>CASO 4</b>
<b>Idade (anos)</b>	65	67	44	28
<b>Gênero</b>	F	F	F	F
<b>Leucócitos (mm<sup>3</sup>)</b>	10.680	195.800	26.140	10.850
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	10,8	7,6	9,4	9,4
<b>Plaquetas (mm<sup>3</sup>)</b>	49.000	12.000	56.000	18.000
<b>Blastos SP %</b>	28	34	80	71
<b>Blasto MO%</b>	32	35	85	45
<b>Quimioterapia Indução</b>	7+3	Paliativa	Atra	7+3
<b>Óbito</b>	SIM	NÃO	SIM	NÃO
<b>Transplante MO</b>	NÃO	NÃO	SIM	SIM
<b>Classificação FAB,</b>	M2	M1	M3	M2

SP, sangue periférico; MO, medula óssea; FAB, *Franco-Americano-Britânico*;

## Referências

1. Papaemmanuil, Elli, et al. “Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia”. *The New England Journal of Medicine*, vol. 374, n° 23, junho de 2016, p. 2209–21. *PubMed*, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>.
2. Jaiswal, Siddhartha, et al. “Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes”. *The New England Journal of Medicine*, vol. 371, n° 26, dezembro de 2014, p. 2488–98. *PubMed*, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>
3. Cagnetta, Antonia, et al. “Role of Genotype-Based Approach in the Clinical Management of Adult Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics”. *Leukemia Research*, vol. 38, n° 6, junho de 2014, p. 649–59. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.03.006>.
4. Thol, Felicitas, e Arnold Ganser. “Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia”. *Current Treatment Options in Oncology*, vol. 21, n° 8, junho de 2020, p. 66. *PubMed*, <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00765-5>.
5. Daver, Naval, et al. “New Directions for Emerging Therapies in Acute Myeloid Leukemia: The next Chapter”. *Blood Cancer Journal*, vol. 10, n° 10, outubro de 2020, p. 107. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00376-1>.
6. Yamashita, Masayuki, et al. “Dysregulated Haematopoietic Stem Cell Behaviour in Myeloid Leukaemogenesis”. *Nature Reviews. Cancer*, vol. 20, n° 7, julho de 2020, p. 365–82. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0260-3>.
7. Hulegårdh, Erik, et al. “Characterization and Prognostic Features of Secondary Acute Myeloid Leukemia in a Population-Based Setting: A Report from the Swedish Acute Leukemia Registry”. *American Journal of Hematology*, vol. 90, n° 3, março de 2015, p. 208–14. *PubMed*, <https://doi.org/10.1002/ajh.23908>.
8. Cancer Genome Atlas Research Network, et al. “Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia”. *The New England Journal of Medicine*, vol. 368, n° 22, maio de 2013, p. 2059–74. *PubMed*, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>.
9. Vosberg, Sebastian, e Philipp A. Greif. “Clonal Evolution of Acute Myeloid Leukemia from Diagnosis to Relapse”. *Genes, Chromosomes & Cancer*, vol. 58, n° 12, dezembro de 2019, p. 839–49. *PubMed*, <https://doi.org/10.1002/gcc.22806>.
10. Khoury, Joseph D., et al. “The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms”. *Leukemia*, vol. 36, n° 7, julho de 2022, p. 1703–19. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.
11. Chang, H., et al. “A Histochemical and Pathological Study on the Interrelationship between TCDD-Induced AhR Expression, AhR Activation, and Hepatotoxicity in Mice”. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, vol. 68, n° 17–18, setembro de 2005, p. 1567–79. *PubMed*, <https://doi.org/10.1080/15287390590967513>.
12. Liu, Song-Bai, et al. “Impact of FLT3-ITD Length on Prognosis of Acute Myeloid Leukemia”. *Haematologica*, vol. 104, n° 1, janeiro de 2019, p. e9–12. *PubMed*, <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.191809>.

13. Schnittger, Susanne, et al. “Nucleophosmin Gene Mutations Are Predictors of Favorable Prognosis in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype”. *Blood*, vol. 106, n° 12, dezembro de 2005, p. 3733–39. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2248>.
14. Angenendt, Linus, et al. “Chromosomal Abnormalities and Prognosis in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Pooled Analysis of Individual Patient Data From Nine International Cohorts”. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 37, n° 29, outubro de 2019, p. 2632–42. *PubMed*, <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00416>.
15. Guan, Wei, et al. “Profiling of Somatic Mutations and Fusion Genes in Acute Myeloid Leukemia Patients with FLT3-ITD or FLT3-TKD Mutation at Diagnosis Reveals Distinct Evolutionary Patterns”. *Experimental Hematology & Oncology*, vol. 10, n° 1, abril de 2021, p. 27. *PubMed*, <https://doi.org/10.1186/s40164-021-00207-4>.
16. Döhner, Hartmut, et al. “Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 Recommendations from an International Expert Panel on Behalf of the ELN”. *Blood*, vol. 140, n° 12, setembro de 2022, p. 1345–77. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>.
17. Pratorcorona, Marta, 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*, vol. 121, n° 14, abril de 2013, p. 2734–38. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-431122>.
18. Angenendt, Linus, et al. “Chromosomal Abnormalities and Prognosis in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Pooled Analysis of Individual Patient Data From Nine International Cohorts”. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 37, n° 29, outubro de 2019, p. 2632–42. *PubMed*, <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00416>.
19. Wang, Mengzhen, et al. “Difference in Gene Mutation Profile in Patients with Refractory/Relapsed versus Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Based on Targeted next-Generation Sequencing”. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 62, n° 10, outubro de 2021, p. 2416–27. *PubMed*, <https://doi.org/10.1080/10428194.2021.1919661>.
20. Khoury, Joseph D., et al. “The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms”. *Leukemia*, vol. 36, n° 7, julho de 2022, p. 1703–19. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.
21. Angenendt, Linus, et al. “Chromosomal Abnormalities and Prognosis in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Pooled Analysis of Individual Patient Data From Nine International Cohorts”. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 37, n° 29, outubro de 2019, p. 2632–42. *PubMed*, <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00416>.
22. Döhner, Hartmut, et al. “Prognostic Impact of NPM1 and FLT3 Mutations in Patients with AML in First Remission Treated with Oral Azacitidine”. *Blood*, vol. 140, n° 15, outubro de 2022, p. 1674–85. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood.2022016293>.
23. Song, Yu-Hua, et al. “1”. *Cancer Management and Research*, vol. 13, 2021, p. 2371–78. *PubMed*, <https://doi.org/10.2147/CMAR.S297421>.

24. Cabrera, Maria Elena, et al. “Incidence and Clinical Significance of FLT3 and Nucleophosmin Mutation in Childhood Acute Myeloid Leukemia in Chile”. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, vol. 45, n° 1, 2023, p. 77–82. *PubMed*, <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.06.003>.
25. Deka, Riju Rani, et al. “FLT3-ITD Mutation Does Not Influence Survival Outcome in Adult Acute Promyelocytic Leukemia Patients Treated With ATO and ATRA-Based Therapeutic Regimen: Experience From a North Indian Tertiary Care Centre”. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, vol. 22, n° 6, junho de 2022, p. 416–23. *PubMed*, <https://doi.org/10.1016/j.clml.2021.12.007>.
26. Breccia, Massimo, et al. “FLT3-ITD Confers Poor Prognosis in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia Treated with AIDA Protocols: Long-Term Follow-up Analysis”. *Haematologica*, vol. 98, n° 12, dezembro de 2013, p. e161-163. *PubMed*, <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.095380>.
27. Zuo, Zhuang, et al. “Acute Myeloid Leukemia with Concurrent NPM1 and RUNX1 Mutations”. *Leukemia Research Reports*, vol. 20, 2023, p. 100385. *PubMed*, <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2023.100385>.
28. Kuykendall, Andrew, et al. “Acute Myeloid Leukemia: The Good, the Bad, and the Ugly”. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, vol. 38, maio de 2018, p. 555–73. *PubMed*, [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_199519](https://doi.org/10.1200/EDBK_199519).
29. Paschka, Peter, et al. “Mutations in the Fms-Related Tyrosine Kinase 3 (FLT3) Gene Independently Predict Poor Outcome in Acute Myeloid Leukemia (AML) with t(8;21): A Study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSG).” *Blood*, vol. 114, n° 22, novembro de 2009, p. 825–825. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1182/blood.V114.22.825.825>.
30. Carter, Bing Z., et al. “The Elusive Chronic Myeloid Leukemia Stem Cell: Does It Matter and How Do We Eliminate It?” *Seminars in Hematology*, vol. 47, n° 4, outubro de 2010, p. 362–70. *PubMed*, <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.06.006>.
31. Konoplev, Sergej, et al. “Molecular Characterization of de Novo Philadelphia Chromosome-Positive Acute Myeloid Leukemia”. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 54, n° 1, janeiro de 2013, p. 138–44. *PubMed*, <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.701739>.
32. Döhner, Hartmut, et al. “Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 Recommendations from an International Expert Panel on Behalf of the ELN”. *Blood*, vol. 140, n° 12, setembro de 2022, p. 1345–77. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>.
33. Piedimonte, Monica, et al. “A Rare BCR-ABL1 Transcript in Philadelphia-Positive Acute Myeloid Leukemia: Case Report and Literature Review”. *BMC Cancer*, vol. 19, n° 1, janeiro de 2019, p. 50. *PubMed*, <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5265-5>.
34. May, Philippa C., et al. “FISH-Negative BCR::ABL1-Positive E19a2 Chronic Myeloid Leukaemia: The Most Cryptic of Insertions”. *BMC Medical Genomics*, vol. 16, n° 1, julho de 2023, p. 172. *PubMed*, <https://doi.org/10.1186/s12920-023-01607-7>.

35. Pane, F., et al. “Neutrophilic-Chronic Myeloid Leukemia: A Distinct Disease with a Specific Molecular Marker (BCR/ABL with C3/A2 Junction)”. *Blood*, vol. 88, n° 7, outubro de 1996, p. 2410–14.
36. Li, S., et al. “The P190, P210, and P230 Forms of the BCR/ABL Oncogene Induce a Similar Chronic Myeloid Leukemia-like Syndrome in Mice but Have Different Lymphoid Leukemogenic Activity”. *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 189, n° 9, maio de 1999, p. 1399–412. *PubMed*, <https://doi.org/10.1084/jem.189.9.1399>.
37. Soupir, Chad P., et al. “Philadelphia Chromosome-Positive Acute Myeloid Leukemia: A Rare Aggressive Leukemia with Clinicopathologic Features Distinct from Chronic Myeloid Leukemia in Myeloid Blast Crisis”. *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 127, n° 4, abril de 2007, p. 642–50. *PubMed*, <https://doi.org/10.1309/B4NVER1AJJ84CTUU>.
38. Marques, Fabiana Kalina, e Adriano De Paula Sabino. “Myelodysplastic Neoplasms: An Overview on Diagnosis, Risk-Stratification, Molecular Pathogenesis, and Treatment”. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 156, dezembro de 2022, p. 113905. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113905>.
39. Woll, Petter S., et al. “Targeting Stem Cells in Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia”. *Journal of Internal Medicine*, vol. 292, n° 2, agosto de 2022, p. 262–77. *PubMed*, <https://doi.org/10.1111/joim.13535>.
40. Makishima, Hideki, et al. “Dynamics of Clonal Evolution in Myelodysplastic Syndromes”. *Nature Genetics*, vol. 49, n° 2, fevereiro de 2017, p. 204–12. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/ng.3742>.
41. Fröhling, Stefan, et al. “Prognostic Significance of Activating FLT3 Mutations in Younger Adults (16 to 60 Years) with Acute Myeloid Leukemia and Normal Cytogenetics: A Study of the AML Study Group Ulm”. *Blood*, vol. 100, n° 13, dezembro de 2002, p. 4372–80. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1440>.
42. Reinig, Erica, et al. “Targeted Next-Generation Sequencing in Myelodysplastic Syndrome and Chronic Myelomonocytic Leukemia Aids Diagnosis in Challenging Cases and Identifies Frequent Spliceosome Mutations in Transformed Acute Myeloid Leukemia”. *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 145, n° 4, abril de 2016, p. 497–506. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw016>.
43. Zhang, Su-Jiang, et al. “The Investigation of Mutation and Single Nucleotide Polymorphism of Receptor Tyrosine Kinases and Downstream Scaffold Molecules in Acute Myeloid Leukemia”. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 47, n° 12, dezembro de 2006, p. 2610–16. *PubMed*, <https://doi.org/10.1080/10428190600948048>.
44. Meggendorfer, Manja, et al. “Karyotype Evolution and Acquisition of FLT3 or RAS Pathway Alterations Drive Progression of Myelodysplastic Syndrome to Acute Myeloid Leukemia”. *Haematologica*, vol. 100, n° 12, dezembro de 2015, p. e487-490. *PubMed*, <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.127985>.
45. Badar, Talha, et al. “Detectable FLT3-ITD or RAS Mutation at the Time of Transformation from MDS to AML Predicts for Very Poor Outcomes”. *Leukemia Research*, vol. 39, n° 12, dezembro de 2015, p. 1367–74. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2015.10.005>.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo, os casos de LMA em adultos foram mais frequentes em pacientes abaixo de 60 anos com o gênero feminino mais prevalente. As alterações citogenéticas são frequentemente observadas e a maioria classificadas quanto a estratificação de risco no grupo intermediário.

A LMA primária estava em 72,2% dos pacientes e o subtipo FAB mais frequentes foram M1, M2, M5 e M3. Diferentes variantes estão presentes no gene *FLT3*, sendo observados patogênica em 44,4% dos pacientes. Variantes patogênicas missense no *FLT3*-TKD foram mais prevalentes (25%). A frequência de *FLT3*-ITD (19,4%) está de acordo com estudos nacionais e internacionais. Observou-se uma relação de variantes *FLT3*-ITD com o aumento do número de hemoglobina. As variantes missenses foram relacionados com plaquetopenia intensa e aumento a contagem de blasto no sangue periférico. A VAF não apresenta relação com as alterações hematológicas.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Rodriguez-Abreu, D., et al. “Epidemiology of Hematological Malignancies”. *Annals of Oncology*, vol. 18, fevereiro de 2007, p. i3–8. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl443>.
2. Bornshten, Rut, et al. “Projection of Expression Profiles to Transcription Factor Activity Space Provides Added Information”. *Genes*, vol. 13, nº 10, outubro de 2022, p. 1819. *PubMed*, <https://doi.org/10.3390/genes13101819>.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro; 2019. 122 p. Available from: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)
4. Khwaja, Asim, et al. “Acute Myeloid Leukaemia”. *Nature Reviews. Disease Primers*, vol. 2, março de 2016, p. 16010. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.10>.
5. Marco Antonio Zago Roberto Passetto Falcao RP. Tratado de Hematologia. 1º Edição. Sao Paulo; 2013. 900 p.
6. Cagnetta A, Adamia S, Acharya C, Patrone F, Miglino M, Nencioni A, et al. Role of genotype-based approach in the clinical management of adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Leuk Res* [Internet]. 2014;38(6):649–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2014.03.006>
7. Licíni MA, da Silva MCS. Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda - Classificação da Organização Mundial de Saúde 2008. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(6):476–81
8. Thol, Felicitas, e Arnold Ganser. “Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia”. *Current Treatment Options in Oncology*, vol. 21, nº 8, junho de 2020, p. 66. *PubMed*, <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00765-5>.
9. Daver N, Wei AH, Pollyea DA, Fathi AT, Vyas P, DiNardo CD. New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: the next chapter. *Blood Cancer J* [Internet]. 2020;10(10):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-020-00376-1>
10. Döhner, Hartmut, et al. “Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 Recommendations from an International Expert Panel on Behalf of the ELN”. *Blood*, vol. 140, nº 12, setembro de 2022, p. 1345–77. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>.

11. Kumar, C. Chandra. “Genetic Abnormalities and Challenges in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia”. *Genes & Cancer*, vol. 2, nº 2, fevereiro de 2011, p. 95–107. *PubMed*, <https://doi.org/10.1177/1947601911408076>.
12. Löwenberg, B., et al. “Acute Myeloid Leukemia”. *The New England Journal of Medicine*, vol. 341, nº 14, setembro de 1999, p. 1051–62. *PubMed*, <https://doi.org/10.1056/NEJM199909303411407>.
13. Manual MSD Available from: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/hematologia-e-oncologia/leucemia/leucemia-mielóide-aguda-lma>. Acessado em 30 de maio de 2023.
14. Gasparini KT, Guariento KN, Nai GA, Bressa R de C, Bressa JAN, Abreu MAMM de. Infiltração por leucemia mieloide aguda na pele: relato de caso. *Biblioteca Virtual em Saúde* [Internet]. 2018;23(18):[85-89]. Available from: [http://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/01/969279/rdt\\_v23n3\\_85-89.pdf](http://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/01/969279/rdt_v23n3_85-89.pdf)
15. Incidência de Câncer no Brasil. 2023 <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acessado em 01 de janeiro de 2023.
16. Miranda-Filho, Adalberto, et al. “Epidemiological Patterns of Leukaemia in 184 Countries: A Population-Based Study”. *The Lancet Haematology*, vol. 5, nº 1, janeiro de 2018, p. e14–24. *DOI.org (Crossref)*, [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30232-6](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30232-6).
17. Farias MG, Castro SM de. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J Bras Patol e Med Lab*. 2004;40(2):91–8.
18. Newell, Laura F., e Rachel J. Cook. “Advances in Acute Myeloid Leukemia”. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, vol. 375, outubro de 2021, p. n2026. *PubMed*, <https://doi.org/10.1136/bmj.n2026>.
19. TENDÊNCIAS DA MORTALIDADE POR LEUCEMIA NO BRASIL [Internet]. Observatório de Oncologia. 2020. Available from: [https://observatoriodeoncologia.com.br/mortalidade\\_leucemias/](https://observatoriodeoncologia.com.br/mortalidade_leucemias/)
20. Silva-Junior, Alexander Leonardo, et al. “Acute Lymphoid and Myeloid Leukemia in a Brazilian Amazon Population: Epidemiology and Predictors of Comorbidity and Deaths”. *PLOS ONE*, vol. 14, nº 8, de ago. de de 2019, p. e0221518. *PLoS Journals*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221518>.
21. POZZO AR. Mecanismo de resistencia as antraciclinas e a citarabina em Leucemia Mielóide Aguda. *INCA*. 2017;(Rio de Janeiro):1–152.

22. CARLOS EDUARDO LIMA DE SOUZA CRUZ. Marcadores biomoleculares no manejo clínico de pacientes com leucemia mieloide aguda. *Med Curso*. 2021;1–42
23. Winer ES. Secondary Acute Myeloid Leukemia: A Primary Challenge of Diagnosis and Treatment. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2020;34(2):449–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2019.11.003>
24. Khoury, Joseph D., et al. “The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms”. *Leukemia*, vol. 36, nº 7, julho de 2022, p. 1703–19. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.
25. Lane, Steven W., et al. “The Leukemic Stem Cell Niche: Current Concepts and Therapeutic Opportunities”. *Blood*, vol. 114, nº 6, agosto de 2009, p. 1150–57. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-202606>.
26. Jaiswal, Siddhartha, et al. “Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes”. *The New England Journal of Medicine*, vol. 371, nº 26, dezembro de 2014, p. 2488–98. *PubMed*, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>.
27. Yamashita, Masayuki, et al. “Dysregulated Haematopoietic Stem Cell Behaviour in Myeloid Leukaemogenesis”. *Nature Reviews. Cancer*, vol. 20, nº 7, julho de 2020, p. 365–82. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0260-3>.
28. Chopra, Martin, e Stefan K. Bohlander. “The Cell of Origin and the Leukemia Stem Cell in Acute Myeloid Leukemia”. *Genes, Chromosomes & Cancer*, vol. 58, nº 12, dezembro de 2019, p. 850–58. *PubMed*, <https://doi.org/10.1002/gcc.22805>.
29. Grimwade, David, et al. “Molecular Landscape of Acute Myeloid Leukemia in Younger Adults and Its Clinical Relevance”. *Blood*, vol. 127, nº 1, janeiro de 2016, p. 29–41. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-604496>.
30. Uckelmann, Hannah J., et al. “Therapeutic Targeting of Preleukemia Cells in a Mouse Model of NPM1 Mutant Acute Myeloid Leukemia”. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 367, nº 6477, janeiro de 2020, p. 586–90. *PubMed*, <https://doi.org/10.1126/science.aax5863>.
31. Shlush, Liran I., et al. “Identification of Pre-Leukaemic Haematopoietic Stem Cells in Acute Leukaemia”. *Nature*, vol. 506, nº 7488, fevereiro de 2014, p. 328–33. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/nature13038>.
32. Schuurhuis, Gerrit J., et al. “Minimal/Measurable Residual Disease in AML: A Consensus Document from the European LeukemiaNet MRD Working Party”. *Blood*, vol. 131, nº 12, março de 2018, p. 1275–91. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-801498>.

33. Cao, Tingyong, et al. “The FLT3-ITD Mutation and the Expression of Its Downstream Signaling Intermediates STAT5 and Pim-1 Are Positively Correlated with CXCR4 Expression in Patients with Acute Myeloid Leukemia”. *Scientific Reports*, vol. 9, nº 1, agosto de 2019, p. 12209. *PubMed*, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48687-z>.
34. Santos, Geovana Cristine de Araujo, e Natália de Moraes Cordeiro. *A imunofenotipagem no diagnóstico da leucemia mieloide aguda*. dezembro de 2021. doi.org (Datacite), <https://doi.org/10.5281/ZENODO.7447454>.
35. Helman, Ricardo, et al. “Acute myeloid leukemia: update in diagnosis and treatment in Brazil”. *Einstein (São Paulo)*, vol. 9, nº 2, junho de 2011, p. 179–83. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1590/s1679-45082011ao1853>.
36. Moualla, Yahia, et al. “Evaluating the Clinical Significance of FLT3 Mutation Status in Syrian Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Patients with Normal Karyotype”. *Heliyon*, vol. 8, nº 11, novembro de 2022, p. e11858. *PubMed*, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11858>.
37. Blackburn, Lisa M., et al. “Acute Leukemia: Diagnosis and Treatment”. *Seminars in Oncology Nursing*, vol. 35, nº 6, dezembro de 2019, p. 150950. *PubMed*, <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.150950>.
38. Döhner, Hartmut, et al. “Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel”. *Blood*, vol. 129, nº 4, janeiro de 2017, p. 424–47. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.
39. César Dos Santos, Gabriela. “Caracterização da LMA por meio de técnicas citogenéticas e biomoleculares: uma revisão bibliográfica”. *Revista EVS - Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, vol. 48, nº 1, janeiro de 2022, p. 8739. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.18224/evs.v48i1.8739>.
40. Ferrara, Felicetto, e Charles A. Schiffer. “Acute Myeloid Leukaemia in Adults”. *Lancet (London, England)*, vol. 381, nº 9865, fevereiro de 2013, p. 484–95. *PubMed*, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61727-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61727-9).
41. Estey, Elihu H. “Acute Myeloid Leukemia: 2021 Update on Risk-Stratification and Management”. *American Journal of Hematology*, vol. 95, nº 11, novembro de 2020, p. 1368–98. *PubMed*, <https://doi.org/10.1002/ajh.25975>.
42. Patnaik, Mrinal M. “The Importance of *FLT3* Mutational Analysis in Acute Myeloid Leukemia”. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 59, nº 10, outubro de 2018, p. 2273–86. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1399312>.

43. Bullinger, Lars, et al. “Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways”. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 35, n° 9, março de 2017, p. 934–46. *PubMed*, <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.2208>.
44. Cruz NG. Análise de Mutações nos genes NPM1 e sua associação com as características clinica e biológicas em pacientes com leucemia mielóide aguda. Universidade Federal de Minas Gerais. 2014;156.
45. Velloso, Elvira Deolinda Rodrigues Pereira, et al. “Molecular and Cytogenetic Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia: Review and Case Studies”. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, vol. 9, n° 2, junho de 2011, p. 184–89. *PubMed*, <https://doi.org/10.1590/S1679-45082011AO2041>.
46. The Cancer Genome Atlas Research Network. “Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia”. *New England Journal of Medicine*, vol. 368, n° 22, maio de 2013, p. 2059–74. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>.
47. Benton, Christopher B., et al. “Janus Kinase 2 Variants Associated with the Transformation of Myeloproliferative Neoplasms into Acute Myeloid Leukemia”. *Cancer*, vol. 125, n° 11, junho de 2019, p. 1855–66. *PubMed*, <https://doi.org/10.1002/cncr.31986>.
48. Rosnet, O., et al. “Isolation and Chromosomal Localization of a Novel FMS-like Tyrosine Kinase Gene”. *Genomics*, vol. 9, n° 2, fevereiro de 1991, p. 380–85. *PubMed*, [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90270-o](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90270-o).
49. Drexler, Hans G., e Hilmar Quentmeier. “FLT3: Receptor and Ligand”. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, vol. 22, n° 2, junho de 2004, p. 71–73. *PubMed*, <https://doi.org/10.1080/08977190410001700989>.
50. National Center for Biotechnology Information. FLT3 - receptor tirosina quinase 3 relacionado ao fms. 2023. p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=flt3>. Acesso em janeiro de 2023.
51. Ribeiro, Sara, et al. “Genomic Abnormalities as Biomarkers and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia”. *Cancers*, vol. 13, n° 20, outubro de 2021, p. 5055. *PubMed*, <https://doi.org/10.3390/cancers13205055>.
52. Gilliland, D. Gary, e James D. Griffin. “The Roles of FLT3 in Hematopoiesis and Leukemia”. *Blood*, vol. 100, n° 5, setembro de 2002, p. 1532–42. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0492>.

53. Jensen, Christopher E., et al. “Clinical and Molecular Features of FLT3 Juxtamembrane Domain Missense Mutations in Acute Myeloid Leukaemia”. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 26, n° 24, dezembro de 2022, p. 6079–82. *PubMed*, <https://doi.org/10.1111/jcmm.17608>.
54. Tecik, Melisa, e Aysun Adan. “Therapeutic Targeting of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Novel Approaches”. *OncoTargets and Therapy*, vol. 15, 2022, p. 1449–78. *PubMed*, <https://doi.org/10.2147/OTT.S384293>.
55. Kazi, Julhash U., e Lars Rönstrand. “FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications”. *Physiological Reviews*, vol. 99, n° 3, julho de 2019, p. 1433–66. *PubMed*, <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2018>.
56. Gebru, Melat T., e Hong-Gang Wang. “Therapeutic Targeting of FLT3 and Associated Drug Resistance in Acute Myeloid Leukemia”. *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 13, n° 1, novembro de 2020, p. 155. *PubMed*, <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00992-1>.
57. Kiyoi, Hitoshi, et al. “FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Therapeutic Paradigm beyond Inhibitor Development”. *Cancer Science*, vol. 111, n° 2, fevereiro de 2020, p. 312–22. *PubMed*, <https://doi.org/10.1111/cas.14274>.
58. Parcels, Bertrand W., et al. “FMS-like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia”. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, vol. 24, n° 5, maio de 2006, p. 1174–84. *PubMed*, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0519>.
59. Tarantini, Francesco, et al. “Can the New and Old Drugs Exert an Immunomodulatory Effect in Acute Myeloid Leukemia?” *Cancers*, vol. 13, n° 16, agosto de 2021, p. 4121. *PubMed*, <https://doi.org/10.3390/cancers13164121>.
60. Yohe, Sophia. “Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia”. *Journal of Clinical Medicine*, vol. 4, n° 3, março de 2015, p. 460–78. *PubMed*, <https://doi.org/10.3390/jcm4030460>.
61. Whitman, Susan P., et al. “FLT3 D835/I836 Mutations Are Associated with Poor Disease-Free Survival and a Distinct Gene-Expression Signature among Younger Adults with de Novo Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Lacking FLT3 Internal Tandem Duplications”. *Blood*, vol. 111, n° 3, fevereiro de 2008, p. 1552–59. *PubMed*, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-107946>.
62. Ghiaur, Gabriel, e Mark Levis. “Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors and the Role of the Bone Marrow Microenvironment”. *Hematology/Oncology Clinics of North*

- America*, vol. 31, nº 4, agosto de 2017, p. 681–92. *PubMed*, <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.04.005>.
63. Campregher, Paulo Vidal, et al. “Successful Treatment of Post-Transplant Relapsed Acute Myeloid Leukemia with FLT3 Internal Tandem Duplication Using the Combination of Induction Chemotherapy, Donor Lymphocyte Infusion, Sorafenib and Azacitidine. Report of Three Cases”. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, vol. 15, nº 3, 2017, p. 355–58. *PubMed*, <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RC3784>.
64. Cruz, Nathália Gomide, et al. “Characterization of NPM1, FLT3, and IDH1 Mutations in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Brazilian Cohort Study”. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 57, nº 12, dezembro de 2016, p. 2901–04. *PubMed*, <https://doi.org/10.3109/10428194.2016.1165811>.
65. Friedman, Ran. “The Molecular Mechanisms behind Activation of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia and Resistance to Therapy by Selective Inhibitors”. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, vol. 1877, nº 1, janeiro de 2022, p. 188666. *PubMed*, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188666>.
66. Zhang, Weiguo, et al. “Reversal of Acquired Drug Resistance in FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia Cells via Distinct Drug Combination Strategies”. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 20, nº 9, maio de 2014, p. 2363–74. *PubMed*, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2052>.

## 8. ANEXO

### 8.1 Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Estudo Genético das Neoplasias Mieloides Agudas e Crônicas

**Pesquisador:** George Allan Villarouco da Silva

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 4

**CAAE:** 59781222.7.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.816.468

##### Apresentação do Projeto:

As Neoplasias Mieloides (NMs) compreendem um grupo de doenças hematológicas heterogêneo, caracterizadas por alterações cromossômicas e genéticas resultam em assinatura molecular específica da doença. Nas últimas duas décadas, a genética das neoplasias agudas e crônicas tem sido amplamente estudada, possibilitando ampliação do conhecimento referente aos mecanismos moleculares funcionais e sua relação com os aspectos clínico epidemiológicos. Atualmente, a caracterização hematológica e genética compõe o conjunto de recomendações da Organização Mundial da Saúde para auxílio no diagnóstico das NMs, assim como na identificação de valores preditivos de prognóstico frente ao tratamento recomendado. Este estudo visa realizar a caracterização genética e molecular das Neoplasias Mieloides em pacientes atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM). Será um estudo prospectivo longitudinal, abordagem quali-quantitativo com a caracterização do perfil epidemiológico, clínico, genético, imunogenético e moleculares das diferentes NMs, Leucemia Mieloide Crônica, Leucemia Mieloide Aguda e das Neoplasias Mieloproliferativas. A extração de DNA/RNA será realizada a partir de amostras de sangue periférico coletadas durante o atendimento e tratamento dos pacientes na FHEMOAM. Em paralelo, será realizada a dosagem de marcadores sorológicos a partir do plasma sanguíneo para investigação e associação da genética/funcional, avaliando a produção de possíveis marcadores moleculares relacionados com a carcinogênese das NMs. A aplicação de

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.816.468

metodologias de sequenciamento genético permite identificar variações genéticas pontuais em diferentes genes envolvidos nas NMs. Esta pesquisa apresenta importante relevância no atendimento dos pacientes atendidos na FHEMOAM, visando o desenvolvimento de exames genéticos, possibilitando uma melhor assistência quanto ao diagnóstico com a caracterização genética, definição dos aspectos moleculares envolvidos e sua relação à resistência ao tratamento. Em resumo, o rastreamento de mutações em marcadores moleculares relacionados com oncogênese das NMs tem possibilitado a elaboração de novas estratégias de terapia-alvo recentemente abordada pela Medicina de Precisão.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Caracterizar o perfil genético e molecular das Neoplasias Mieloides em pacientes atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM).

Objetivo Secundário:

- 1) Descrever o perfil clínico e epidemiológico dos pacientes com Neoplasias Mieloides (NM) atendidos na Fundação HEMOAM.
- 2) Identificar mutações genéticas em oncogenes e genes supressores das NMs durante o período de tratamento na Fundação HEMOAM.
- 3) Investigar uma possível associação entre mutações genéticas e expressão de moléculas envolvidas na oncogênese das NMs.
- 4) Caracterizar o perfil imunogenético dos pacientes com NM e associação de polimorfismos genéticos com a produção de citocinas.
- 5) Investigar possível associação entre alterações genéticas e resposta ao tratamento durante atendimento na FHEMOAM.
- 6) Verificar a associação entre variações genéticas e aspectos clínicoepidemiológicos e, desfechos clínicos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Como o projeto será incluso e adaptado na rotina, os pacientes que preencherem os critérios de inclusão, durante a consulta de rotina, serão abordados e entrevistados no ambulatório de atendimento da FHEMOAM. Os riscos estão relacionados à constrangimento do indivíduo no momento da entrevista/aplicação do questionário (após aplicação do TCLE). Os participantes da pesquisa devem receber assistência integral gratuita pela equipe do hospital no qual o estudo

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.816.468

ocorre (pela equipe de saúde multidisciplinar da FHMOAM), podendo optar por não responder alguma questão e sendo orientado quanto à coleta, previamente e durante o procedimento. Toda informação obtida no estudo será confidencial e os dados serão utilizados apenas pela equipe do estudo e autoridades regulatórias da área da saúde. A participação neste estudo é de caráter voluntário, sem custos, podendo o participante desistir do estudo a qualquer momento, sem quaisquer prejuízos agora e no futuro.

**Benefícios:**

Como benefícios, a realização deste estudo deve possibilitar novas ferramentas para diagnóstico/prognóstico das Neoplasias Mieloides, permitindo o desenvolvimento de protocolos de biologia molecular a serem implementados na rotina de atendimento aos pacientes da FHMOAM. Além de proporcionar o conhecimento quanto as características moleculares das NMs e investigando mutações genéticas consideradas como patogênicas ou relacionadas à resistência ao tratamento. Conforme descrito anteriormente, a falta de estudos genéticos na NM contribui para a falta de informação e aplicação de tratamentos mais pontuais, como indicado na "Medicina de Precisão". Os dados a serem obtidos na FHMOAM somados aos que serão adquiridos nas outras regiões brasileiras, proporcionarão um conhecimento e um entendimento mais fidedigno sobre a prevalência de mutações genéticas ligadas a NM e seus tipos na população desse estudo, servindo como base para a construção de novas hipóteses e realização de pesquisas futuras.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A emenda solicitada ao projeto diz respeito a:

1) Inclusão do material - amostra de medula óssea: A coleta de amostra medular é realizada durante procedimento de rotina, solicitada pela equipe médica especializada da FHMOAM para a triagem de mutações, imunofenotipagem, exames citogenéticos como exames complementares para conclusão no diagnóstico. O procedimento é adotado como rotina de atendimento ao paciente, tendo como demanda à realização de exames genéticos para diagnóstico da neoplasia realizado no Laboratório de Genômica da FHMOAM. Tendo em vista a total adequação do projeto com a rotina do hospital. Considerando que o procedimento requer condições específicas para retirada da medula óssea com limitação de material devido a necessidade de pelo menos 4 exames que utilizam o mesmo. E, considerando que existe a possibilidade de utilização do mesmo material para análise molecular e para o exame que estamos propondo e, pensando no bem-estar

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.816.468

do paciente que, ao adentrar ao hemoam precisa de agilidades nos processos para que o mesmo possa ser diagnosticado com a maior brevidade; foi solicitado que seja autorizado a utilização das amostras provenientes da rotina (a partir de 2022) para realização do exame proposto nesse projeto. Ressalto que existe uma possibilidade de morte elevada em virtude da própria gravidade da doença. O que comprometeria a aplicação do termo de consentimento nas amostras do referido ano.

**2) Modificação no TCLE:**

Atualmente está:PROCEDIMENTO DE COLETA DO SANGUE/ ANÁLISE LABORATORIAL: Será modificado para:Será coletada uma amostra de sangue ou medular (nova coleta de medula óssea NÃO será solicitada, uma vez que já foi coletada para exames de rotina do hospital). Para amostra de sangue periférico: limpando o sítio de punção com algodão e álcool, empregando agulhas e tubos plásticos novos e estéreis. A amostras do sangue serão coletadas em dois tubos (tampa roxa), utilizando um volume de sangue acorde às indicações do fabricante. Ao finalizar a punção, a amostra se armazenará em condições ótimas até sua análise laboratorial.

As razões para o pedido de emenda ao projeto original se baseiam em estudos publicados em revistas de alto impacto, que destacam divergências nos resultados entre amostras de sangue periférico e medula óssea na identificação de mutações em genes relacionados a neoplasia. É importante destacar que a atual pesquisa visa o desenvolvimento de metodologias a serem empregadas na rotina do hospital, após validação dos testes, resultando na aplicação de ferramentas que auxiliem no diagnóstico do paciente.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Resolveu todas as pendências e apresentou as alterações nos termos obrigatórios para autorização da emenda da pesquisa.

**Recomendações:**

Vide conclusões ou pendências ou lista de inadequações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto é executável e importante para caracterizar o perfil genético e molecular das Neoplasias Mieloides em pacientes atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. A emenda é viável do ponto de vista ético e esta de acordo com a Res. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Diante do exposto, esse CEP julga o projeto APROVADO. Salvo

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.816.468

melhor juízo é o parecer.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2023624_E1.pdf	07/11/2022 15:18:52		Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_Nilberto.pdf	07/11/2022 15:17:49	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de concordância	Carta_de_Anuencia_Andrea.pdf	07/11/2022 15:16:45	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Pesquisador_Nilberto.pdf	07/11/2022 15:15:22	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NM_CEP_adaptado_emenda.pdf	07/11/2022 15:13:57	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_CEP_071122.pdf	07/11/2022 15:13:42	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_NM_Emenda_Modificado.pdf	23/09/2022 21:32:00	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NM_HEMOAM_George_Modificado_23_09_22.pdf	23/09/2022 21:31:38	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_encaminhamento_emenda_Projeto_George_Hemoam.pdf	23/09/2022 21:31:02	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_Resposta_CEP_HEMOAM_210722.pdf	22/07/2022 11:12:37	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCUD_Projeto_NM_FHEMOAM_George.pdf	22/07/2022 11:11:18	George Allan Villarouco da Silva	Aceito

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.816.468

Justificativa de Ausência	TCUD_Projeto_NM_FHEMOAM_George.pdf	22/07/2022 11:11:18	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infraestrutura_Projeto_NM_HEMOAM.pdf	22/07/2022 11:10:53	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_NMs.docx	17/06/2022 14:22:31	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_Projeto.docx	17/06/2022 14:19:34	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_Projeto.docx	17/06/2022 14:19:25	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Completo_NM_FHEMOAM.pdf	17/06/2022 14:17:44	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anuencia_SAME.pdf	17/06/2022 14:14:23	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anuencia_Analises_Clinicas.pdf	17/06/2022 14:14:12	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anuencia_Adriana_Genomica.pdf	17/06/2022 14:14:03	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Termo_compromisso_investigador_George.pdf	17/06/2022 14:10:59	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	12_Pesquisador_Erycka.pdf	17/06/2022 14:10:36	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	11_Pesquisador_Debora.pdf	17/06/2022 14:10:19	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	10_Pesquisador_Jhemerson.pdf	17/06/2022 14:09:50	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	9_Pesquisador_MarluCIA.pdf	17/06/2022 14:09:38	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	8_Pesquisador_Suzana.pdf	17/06/2022 14:09:15	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	7_Pesquisador_Allyson.pdf	17/06/2022 14:09:05	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	6_Pesquisador_Leny.pdf	17/06/2022 14:08:56	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de	5_Pesquisador_Nelson.pdf	17/06/2022	George Allan	Aceito

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.816.468

Pesquisadores	5_Pesquisador_Nelson.pdf	14:08:47	Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	4Pesquisador_Adriana.pdf	17/06/2022 14:08:35	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3_Pesquisador_Lucivana.pdf	17/06/2022 14:05:38	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	2_Pesquisador_Andrea.pdf	17/06/2022 14:05:25	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_Anuencia_FHEMOAM.pdf	17/06/2022 14:04:50	George Allan Villarouco da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_FHEMOAM.pdf	17/06/2022 14:03:48	George Allan Villarouco da Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 14 de Dezembro de 2022

---

**Assinado por:**  
**SONIA REJANE DE SENNA FRANTZ**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

8.2 Resumos publicados em anais de eventos:

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.514>



Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Volume 45, Supplement 4, October 2023, Page S255



## FLT3 VARIANTS IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA FROM AMAZONAS STATE, BRAZIL

[MOD Santos](#)<sup>a</sup>, [TCD Santos](#)<sup>a</sup>, [GSP Braz](#)<sup>a</sup>, [LPS Mourão](#)<sup>a,b</sup>, [ROD Santos](#)<sup>c</sup>, [WO Azevedo](#)<sup>c</sup>,  
[AM Tarragô](#)<sup>a,c</sup>, [LNM Passos](#)<sup>a,c</sup>, [GAV Silva](#)<sup>a,c</sup>

Show more

Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.514>

[Get rights and content](#)

Under a Creative Commons license

open access

### Background

Acute Myeloid Leukemia a cancer of the blood and bone marrow (BM), characterized by accumulation of leukemic blasts in the BM and peripheral blood. Among the variants identified in the AML, mostly occurs in the gene FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*), occurring approximately 10-30% of the cases. *FLT3* variants, as in-frame duplications of 3 to >400 base pairs, known as internal tandem duplications (ITDs) and tyrosine kinase domain (TKD) are more prevalent, 25% and 7-10%, respectively.

### Objective

We investigated genetic variants in the *FLT3* in patients with AML, also evaluated possible association of the *FLT3* variants with clinical and laboratory data.

### Methods

The study population was composed of 18 AML patients. The nucleotide sequencing was performed in bone marrow samples, sequencing directed for ITD and TKD region (exon 9-24).

## Results

The patients included, ten (56%) are females and eight (44%) males, being twelve (67%) primary AML patients, three (16.5%) secondary AML and three patients (16.5%) with relapsed. The missense variants in the *FLT3* were identified in four patients: Y416N (exon 10), V557I (exon 13), A680V (exon 16), Y702S (exon 17) and *FLT3-ITD* (exon 14). The *FLT3*<sup>+</sup> variants were observed in two patients (50%) with secondary AML, one patient (25%) with secondary AML to myelodysplasia and one patient (25%) with relapsed. According to hematological data, the percentage of blasts was higher in *FLT3*<sup>+</sup> patients when compared to *FLT3*<sup>-</sup> patients, 40.25% ( $\pm 31.35$ ) and 35.23% ( $\pm 30.5$ ), respectively. The white blood cell count was high in *FLT3*<sup>-</sup> patients when compared to *FLT3*<sup>+</sup> patients [14,500 mm<sup>3</sup> (2,300-61,390) vs 10,225 mm<sup>3</sup> (5,210-10,808)], however low red blood cell count was observed in *FLT3*<sup>+</sup> patients 2.6 mm<sup>3</sup> ( $\pm 0.77$ ), 2.96 mm<sup>3</sup> ( $\pm 0.39$ ) in *FLT3*<sup>-</sup> patients. Moreover, hemoglobin was higher in *FLT3*<sup>+</sup> patients when compared to *FLT3*<sup>-</sup> patients [9,6 g/dL (5,9-10,8) vs 8,3 g/dL (7,0- 10,6)], as well, platelet count in *FLT3*<sup>+</sup> patients [48,500 mm<sup>3</sup> (25,500-65,500) vs 35,000 mm<sup>3</sup> (15,000-51,000)].

## Discussion

Previous studies have reported that the frequency *FLT3* variants occurs in approximately 10-30% of the AML cases, in this study was observed in 22% of the cases. Different studies highlight the *FLT3-ITD* as variant more prevalent of the *FLT3*, however, here related the TKD and extracellular domain variants as more prevalent with 50% and 30%, respectively. These found may be due to the features of the study population in our region from Amazonas.

## Conclusion

Variants different are identified in the *FLT3*, we highlight the importance to investigate other variants located in the *FLT3* exome in AML patients, as well as, to evaluate possible association with change hematological, as platelet and red blood cell count.

### 8.3 Divulgação científica e participação em eventos

#### 8.3.1 Banner apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, HEMO 2023

### **FLT3 variants in patients with Acute Myeloid Leukemia from Amazonas state, Brazil**

Marlúcia Oliveira dos Santos<sup>1</sup>, Talita Cruz dos Santos<sup>1</sup>, Gabrielle Souza Parente Braz<sup>1</sup>, Luciana Prata Souza Mourão<sup>1,2</sup>, Wagner Oliveira de Azevedo<sup>3</sup>, Rafaella Oliveira dos Santos<sup>3</sup>, Andréa Monteiro Tarragô<sup>1,3</sup>, Leny Nascimento da Motta Passos<sup>1,3</sup>, George Allan Villarouco Silva<sup>1,3</sup>

(1) Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia – Universidade do Estado do Amazonas (PPGH/UEA), Manaus, AM, Brasil  
 (2) Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Manaus, AM, Brasil  
 (3) Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM), Manaus, AM, Brasil

#### Introduction

The Acute Myeloid Leukemia (AML) an onco-hematological disease, have been described as genetic heterogeneity and low survival.<sup>1</sup> In AML, 30% of patients present variants in the *FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)* gene.<sup>2</sup>

Figure 1: Wild-type and mutated FLT3 and signaling pathways. Source: Adapted from Biorender, 2023.

The objective of this study was to investigate variants in the *FLT3* gene, evaluate a possible association with clinical and laboratory data in AML patients treated at Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM).

#### Results

60,87% 39,13%

42 years old 64 years old

Figure 3: Distribution of patients by gender, median age.

#### Variants in FLT3 identified

Figure 4: FLT3 variants identified by Sanger sequencing in 6 patients with AML. Source: Author, 2023.

	FLT3+ n= 6 (26,08%)	FLT3- n= 17 (73,92%)	p-Value
Erythrocytes (millions/mm <sup>3</sup> )	9,4 (7,9 - 9,9)	2,9 (2,5 - 3,3)	<0,0001
Hemoglobin (g/dL)	2,97 (2,5 - 3,2)	7,6 (7,0 - 8,8)	0,0004
Blasts in the bone marrow (%)	40 (29 - 73)	47 (20 - 75)	>0,9999
Total leukocyte count (mm <sup>3</sup> )	10.765 (8250 - 54095)	14.500 (2445 - 54705)	0,7592
Platelet count (mm <sup>3</sup> )	41.500 (17.500 - 54.500)	39.000 (16.000 - 77.000)	0,9326
LDH (U/L)	826 (482 - 2506)	684 (410 - 1593)	0,6576

\*\*p Value - Mann-Whitney test

Figure 5: FLT3-positive cytogenetic features for variants versus FLT3-negative. Source: Author, 2023

#### Materials and Methods

The population consisted of 23 patients with AML. The *FLT3* variants were identified by nucleotide sequencing of the *FLT3* gene (exon 9 to 24).

Inclusion

- ✓ Adults with AML (new, secondary, or relapse)
- ✓ Both genders (M/F)
- ✓ Age: 18 to 90 years

#### Sample Processing

- 1 Bone marrow sample (1 a 2 ml)
- 2 RNA Extraction (Protocol Trizol® Reagent Stored -80°C)
- 3 cDNA template (Retrotranscription reaction)
- 4 Conventional PCR (Obtaining viable fragments, two PCR/sample (exon 09 to 24))

5 Sequencing in Sanger

Individualized reactions  
Amplicons (F/R primers and internal primers)

6 Genetic analysis of FLT3

FLT3 Ref. Sequence (GenBank ID: NM\_004119.3)  
- Mutator analysis (Geneious Software)

Figure 2: Methodology for nucleotide sequencing of the AML patients. Source: Santos, MO (2023)

#### Conclusion

Different variants were identified in the *FLT3*, highlighting the importance of screening for missense variants throughout the *FLT3* exome. In addition, significantly elevated values in red blood cell and hemoglobin counts were observed in FLT3+ patients.

#### References

1. Przepiowski AC, Griffiths EA. FLT3-mutated acute myeloid leukaemia: a new opportunity. *Lancet*. 2023.
2. Toddie, Guido, e Ram Friedman. "Pattern and Dynamics of FLT3 Duplications". *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2020.

#### AGRADECIMENTOS:



8.3.2 Short-talk apresentado no *8th International Symposium on Immunology and Hematology 2024*

