



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



GABRIEL SALDANHA MÜLLER

***Descrição do Perfil Imunofenotípico de Indivíduos com
Leucemia Mieloide Aguda Associado a Mutações em NPM1
e FLT3-ITD em População da Bahia***

Salvador, BA

2025

GABRIEL SALDANHA MÜLLER

***Descrição do Perfil Imunofenotípico de Indivíduos com
Leucemia Mieloide Aguda Associado a Mutações em NPM1
e FLT3-ITD em População da Bahia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Songeli Menezes Freire

Coorientador: Prof. Dr. Bruno de Almeida Lopes

Salvador, BA

2025

M958 Müller, Gabriel Saldanha
Descrição do perfil imunofenotípico de indivíduos com leucemia
mieloide aguda associado a mutações em NPM1 e FLT3-ITD em população
da Bahia/ Gabriel Saldanha Müller. – Salvador, 2025.
64 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Songeli Menezes Freire. Coorientador:
Prof. Dr. Bruno de Almeida Lopes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2025.
Inclui referências.

1. Leucemia mieloide aguda. 2. Prognóstico. 3. Imunofenotipagem.
4. NPM1. 5. FLT3-ITD. I. Freire, Songeli Menezes. II. Lopes, Bruno de
Almeida. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 577.27:616-006.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

A DISSERTAÇÃO:

“Descrição do Perfil Imunofenotípico de Indivíduos com Leucemia Mieloide Aguda Associado a Mutações em *NPM1* e *FLT3*-ITD em População da Bahia”

Elaborada por:

GABRIEL SALDANHA MÜLLER

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia como requisito parcial à obtenção do título de **MESTRE**.

Salvador, Bahia, 11 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Songeli Menezes Freire (Orientadora)
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente



BRUNO DE ALMEIDA LOPES

Data: 11/07/2025 16:05:05-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Bruno de Almeida Lopes (Coorientador)
Instituto Nacional do Câncer – (INCA)

Documento assinado digitalmente



MARINHO MARQUES DA SILVA NETO

Data: 11/07/2025 19:58:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marinho Marques da Silva Neto
Universidade do Estado do Bahia – (UNEB)

Documento assinado digitalmente



EUGENIA TERRA GRANADO PINA

Data: 11/07/2025 18:12:02-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Eugênia Terra Granado Pina
FIOCRUZ/Bahia

RESUMO

Leucemia mieloide aguda (LMA) é causada por proliferação clonal de células precursoras da linhagem mieloide. O diagnóstico de LMA é realizado pela identificação de sinais clínicos e laboratoriais, incluindo porcentagem de blastos leucêmicos no sangue periférico ou medula óssea, imunofenotipagem e alterações moleculares. É descrito na literatura que alterações genéticas associadas à LMA podem influenciar no prognóstico, na celularidade e na expressão de marcadores celulares em blastos em diferentes populações. O objetivo deste estudo foi analisar na população atendida a celularidade, os marcadores celulares em mieloblastos e as mutações nos genes *NPM1* e *FLT3* (ITD) em pacientes com LMA na Bahia. Foi coletado sangue periférico e medula óssea de 114 indivíduos com LMA *de novo*, subtipo *não-LPA*, sem quimioterapia prévia, confirmados por imunofenotipagem entre 2019 e 2025. Os participantes do estudo foram classificados de acordo com o sexo e *status* mutacional *NPM1* e *FLT3*-ITD. Foi analisada a celularidade e a presença de marcadores celulares em mieloblastos (CD2, memCD3, citCD3, CD7, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD33, CD34, CD35, CD38, CD45, CD56, CD64, CD71, CD79a, CD117, CD123, CD300e, HLA-DR, MPO) por citometria de fluxo. Este estudo identificou que o perfil desta população de estudo possui menor idade média, maior predominância do sexo feminino, menor frequência de mutação em *NPM1* e *FLT3*-ITD, em comparação com os descritos em outros estudos. A população teve alta mortalidade em 90 dias, com efeito marcante da comutação *NPM1* e *FLT3*-ITD, diferente do descrito na literatura para este status de mutação. Há associação da menor frequência dos marcadores CD34 e HLA-DR em indivíduos com mutação em *NPM1* e maior frequência de CD2, CD7 e CD11b em indivíduos com mutação *FLT3*-ITD. A análise da sobrevivência global e imunofenotipagem demonstra parâmetros que não são comumente descritos na literatura e podem estar associados ao perfil desta população.

Palavras-chave: leucemia mieloide aguda; prognóstico; imunofenotipagem; *NPM1*; *FLT3*-ITD.

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is caused by the clonal proliferation of precursor cells of the myeloid lineage. The diagnosis of AML is made by identifying clinical and laboratory signs, including the percentage of leukemic blasts in peripheral blood or bone marrow, immunophenotyping, and molecular alterations. It is described in the literature that genetic alterations associated with AML may influence prognosis, cellularity, and the expression of cellular markers on blasts in different populations. The objective of this study was to analyze, in the treated population, the cellularity, cellular markers in myeloblasts, and mutations in the *NPM1* and *FLT3* (ITD) genes in patients with AML in Bahia. Peripheral blood and bone marrow were collected from 114 individuals with de novo AML, non-APL subtype, without prior chemotherapy, confirmed by immunophenotyping between 2019 and 2025. The study participants were classified according to sex and *NPM1* and *FLT3-ITD* mutational status. Cellularity and the presence of cellular markers in myeloblasts (CD2, memCD3, citCD3, CD7, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD33, CD34, CD35, CD38, CD45, CD56, CD64, CD71, CD79a, CD117, CD123, CD300e, HLA-DR, MPO) were analyzed by flow cytometry. This study identified that the profile of this study population shows a lower average age, a higher predominance of females, and a lower frequency of *NPM1* and *FLT3-ITD* mutations compared to those described in other studies. The population had high 90-day mortality, with a marked effect of *NPM1* and *FLT3-ITD* co-mutation, different from what is described in the literature for this mutation status. There is an association of lower frequency of the CD34 and HLA-DR markers in individuals with *NPM1* mutation and higher frequency of CD2, CD7, and CD11b in individuals with *FLT3-ITD* mutation. The analysis of overall survival and immunophenotyping demonstrates parameters that are not commonly described in the literature and may be associated with the profile of this population.

Keywords: acute myeloid leukemia; prognosis; immunophenotyping; *NPM1*; *FLT3-ITD*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resumo dos mecanismos de evasão imune mais conhecidos exercidos por blastos de LMA.	17
Figura 2	Algumas das funções biológicas associadas ao <i>NPM1</i> selvagem.	23
Figura 3	Estrutura do receptor <i>FLT3</i> na forma ativada e inativada, e associação com a sinalização intracelular.	25
Figura 4	Efeito da razão neutrófilo-linfócito (NLR) na celularidade	36
Figura 5	Diferença da celularidade de acordo com o status de mutação <i>NPM1</i> e <i>FLT3</i> -ITD	38
Figura 6	Curva de sobrevivência durante 90 dias.	40

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Classificação de risco genético no diagnóstico da LMA	21
Tabela 1	Sequência dos primers utilizados para a identificação do estado mutacional dos indivíduos diagnosticados LMA.	32
Tabela 2	Descrição do perfil laboratorial da população total adulta diagnosticada com LMA de novo (não-M3) neste estudo.	34
Tabela 3	Associação da expressão de marcadores celulares em mieloblastos em indivíduos mutados em NPM1 e FLT3-ITD.	41
Tabela Suplementar 1	Descrição do perfil laboratorial da população total adulta diagnosticada com LMA de novo (não-M3) neste estudo.	65
Tabela Suplementar 2	Descrição das características laboratoriais da população de estudo total.	67

LISTA DE ABREVIACÕES

ATRA – Ácido trans-retinoico
BH3 – Domínio 3 de Homologia BCL2
CD – *Cluster of Differentiation*
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
FAB – Grupo Francês, Americano e Britânico
FISH – Hibridização Fluorescente *in Situ*
FLT3 – Tirosina Quinase 3 Semelhante à FMS
FLT3mut – Tirosina Quinase 3 Semelhante à FMS mutado
FLT3wt – Tirosina Quinase 3 Semelhante à FMS selvagem
gDNA – DNA Genômico
HLA – Antígeno Leucocitário Humano
ICS – Instituto de Ciências da Saúde
ITD – Duplicação Interna em Tandem
LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC – Leucemia Linfocítica Crônica
LABIMUNO - Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular
LMA – Leucemia Mieloide Aguda
LMA – Leucemia Mieloide Crônica
M0 – LMA com Diferenciação Mínima
M1 – LMA sem Maturação
M2 – LMA com Maturação
M3 – Leucemia Promielocítica Aguda
M4 – Leucemia Mielomonocítica Aguda
M5 – Leucemia Monoblástica Aguda
M6 – Leucemia Eritroide Aguda
M7 – Leucemia Megacarioblástica aguda
MDSCs – Células Supressoras Derivadas de Mieloides
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
NES – Sinais de Exportação Nuclear
NGS – Sequenciamento de Nova Geração
NMP – Neoplasia Mieloproliferativa
NoLS – Sinal de Localização Nucleolar

NPM1 – Nucleofosmina 1

NPM1mut – Nucleofosmina 1 mutado

NPM1wt – Nucleofosmina 1 selvagem

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia Polimerase

SMD – Síndrome Mielodisplásica

SIM – Sistema de Informação sobre Mortalidade

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TKD – Domínio Tirosina Quinase

t-LMA – Leucemia Mieloide Aguda Relacionada a Terapia

UFBA – Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Leucemias	13
2.2 Leucemia Mieloide Aguda	14
2.3 Dados Epidemiológicos da LMA	17
2.4 Diagnóstico de LMA	18
2.5 Tratamento	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Considerações Éticas	30
4.2 Desenho e População do Estudo	30
4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão	30
4.6 Coleta de Amostras	30
4.7 Imunofenotipagem	31
4.8 Extração de DNA	31
4.9 Detecção de Mutações em NPM1 e FLT3	32
4.10 Análise Estatística	32
5 RESULTADOS	34
5.1 Descrição do Perfil Laboratorial da População de Estudo	34
5.2 Correlação da Razão NLR com a Celularidade	36
5.3 Diferença de Celularidade no Status Mutacional NPM1 e FLT3	36
5.4 Perfil de Sobrevida em 90 Dias	39
5.5 Perfil de Antígenos em Mieloblastos com Status mutacional NPM1 e FLT3-ITD	41
6 DISCUSSÃO	43
6.1 Análise do Perfil da População com LMA na Bahia	43
6.2 Análise do Status Mutacional NPM1 e FLT3-ITD	44
6.3 Análise de Sobrevida da População com LMA	46
6.4 Avaliação da Imunofenotipagem entre Indivíduos com Mutação em NPM1 e FLT3-ITD	47
7 CONCLUSÃO	52
8 REFERÊNCIAS	54
9 MATERIAL SUPLEMENTAR	64

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma neoplasia maligna do sistema hematopoiético, caracterizada pela proliferação descontrolada de células progenitoras imaturas da linhagem mieloide com bloqueio na diferenciação celular (Murphy Yee, 2017). Essa condição leva ao acúmulo de blastos na medula óssea, comprometendo a produção de células sanguíneas normais. Clinicamente, os indivíduos com LMA apresentam sinais e sintomas relacionados à falência medular, como infecções recorrentes, hemorragias, anemia, fraqueza e dor no corpo (Robbins, 2016). De forma simplificada, as leucemias podem ser classificadas com base na linhagem celular (mieloide ou linfoide) e na velocidade de progressão (aguda ou crônica). As formas mais comuns incluem: LMA, leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (INCA, 2022).

O diagnóstico da LMA geralmente é realizado pela identificação de mais de 20% de blastos no sangue ou medula óssea, em esfregaço, por análise de morfologia (exceto alguns subtipos que podem ser diagnosticadas com menor percentual de blastos), e acompanhado por técnicas de classificação do subtipo da doença, como imunofenotipagem para identificação de moléculas celulares associados à linhagem e maturação celulares, e análise de alterações genéticas por biologia molecular associadas à doença (Döhner et al., 2022). O sistema imunológico interfere na resposta clínica à quimioterapia e à progressão da doença e a resposta antitumoral bem-sucedida depende da capacidade das células imunológicas efetoras de reconhecer e atacar as células tumorais e de sinalizar outras células do sistema imune (Sariani et al., 2021; Park et al., 2023). Entretanto, a LMA é considerada uma doença maligna com disfunção imunológica. Os mieloblastos são capazes de criar um ambiente imunossupressor, onde as respostas imunes inatas e adaptativas são profundamente desreguladas e podem afetar o prognóstico dos pacientes (Park et al., 2018).

A identificação de algumas alterações genéticas também auxilia na determinação do prognóstico, auxiliando na definição do risco terapêutico e contribuindo para a

decisão do tratamento. Algumas alterações genéticas são recorrentes na LMA, como no gene da nucleofosmina 1 (*NPM1*) e do receptor de tirosina quinase 3 semelhante à FMS (*FLT3*), sendo alvos importantes para diagnósticos mais aprofundados (Döhner et al., 2022).

O *FLT3* é um receptor de membrana que, quando mutado, fica constantemente ativo nas células imaturas e leva à leucemogênese na LMA, afetando características funcionais dos blastos leucêmicos. A mutação neste receptor pode ocorrer mais frequentemente como duplicação interna em tandem (ITD), associado frequentemente a um prognóstico mais adverso. Não comumente também ocorrem mutações pontuais no domínio da tirosina quinase (TKD), sem impacto na sobrevida (Li et al., 2023; Padmakumar et al., 2021).

O *NPM1* é uma proteína encontrada em abundância no núcleo de células em proliferação e atua em diversas atividades como biogênese de ribossomo, reparo de DNA e regulação da apoptose, se movendo continuamente entre o núcleo e o citoplasma (Padmakumar et al., 2021). A mutação no gene responsável leva a formação de uma proteína com modificação conformacional que resulta em uma proteína alongada e promove uma localização aberrante da proteína no citosol, reduzindo sua atividade em células leucêmicas, promovendo um prognóstico mais favorável (Padmakumar et al., 2021).

Apesar dos benefícios na identificação de diversas alterações genéticas associadas a LMA, o custo envolvendo este diagnóstico pode ser oneroso para o sistema público de saúde do Brasil, e a identificação da associação de marcadores celulares associados pode sugerir a presença de alterações genéticas importantes pontuais para serem diagnosticadas. Há descrito na literatura que existem associações da expressão de alguns marcadores celulares em blastos com as mutações recorrentes *NPM1* e *FLT3*-ITD, entretanto os resultados divergentes ressaltam a importância da consideração do perfil populacional neste tipo de estudo (Pessoa et al., 2023).

Em população miscigenada como ocorre no estado da Bahia, a caracterização biológica pode fornecer informações relevantes sobre diferenças populacionais e determinação de estratégias de diagnóstico e tratamento mais adequadas a esta

população. Deste modo, o presente trabalho buscou-se analisar as mutações definidoras de risco terapêutico *NPM1* e *FLT3*-ITD, a celularidade da linhagem mieloide, e o perfil de marcadores celulares de mieloblastos em indivíduos diagnosticados com LMA em população atendida em um centro de referência da Bahia, assistidos pelo sistema único de saúde (SUS).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leucemias

O termo leucemia é uma palavra de origem grega da junção da palavra 'leukos', que significa branco, e 'haima', que significa sangue e se refere a uma doença altamente heterogênea (Jimenez-Morales et al., 2023). Não existe consenso sobre a descoberta da leucemia, mas a sua primeira descrição precisa foi publicada em 1825 por Alfred Velpeau, ao descrever os sintomas da leucemia em relação ao aumento de células brancas do sangue em um paciente *post mortem*. Todos os médicos que contribuíram para a descoberta da leucemia descreveram alterações de sangue como sangue leitoso, misturado com pus ou sangue purulento, referindo a alteração do sangue como uma característica da leucemia (Kampen, 2012).

A leucemia é caracterizada como doença que causa acúmulo de células imaturas no sangue ou medula, resultado da desregulação da hematopoiese normal e progressiva substituição de células sanguíneas normais. É um tecido hematopoiético anormal recém formado que foi iniciado por células-tronco alteradas e organogênese similar às células normais, e possui a autorrenovação desregulada característica de todos os cânceres. Alternativamente, em células mais diferenciadas podem surgir células leucêmicas de progenitores mais comprometidos, caracterizando outros subtipos da doença (Passequé et al., 2003).

Entre os cânceres, a leucemia (Classificação Internacional de Doenças – CID: C91–C95) é um dos tipos que mais atinge a população mundial, responsável por cerca de 437.033 (2,4%) dos casos globais e 309.006 (3,2%) das mortalidades por câncer (Bray et al., 2018). No Brasil, a leucemia ocupa a décima posição entre os tipos de câncer mais frequentes. É estimado que ocorram 11.540 novos casos a cada ano entre 2023 e 2025, valor correspondente a 6.250 casos em homens e 5.290 em mulheres, representando um risco estimado de 5,90 casos novos a cada 100 mil homens e 4,78 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).

De forma simplificada, a leucemia pode ser separada em quatro grandes subtipos de acordo com a linhagem celular e evolução clínica da doença: leucemia linfóide crônica (LLC), leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mieloide crônica (LMC) e

leucemia mieloide aguda (LMA). Além disso, dentro de cada grupo a leucemia pode ser distinguida baseada em diferenças morfológicas, linhagem de comprometimento e alterações genéticas. Enquanto a linhagem mieloide ou linfóide se refere ao tipo de diferenciação da célula leucêmica, a forma aguda de ambas apresentam perfil agressivo da doença em que as células afetadas se multiplicam rapidamente, enquanto a forma crônica se agrava mais lentamente e exige acompanhamento permanente (Kampen, 2012).

Não há causas definidas para o estabelecimento da leucemia, há uma variedade de fatores, tanto pré existentes quanto adquiridas, que afetam o material genético das células pré-leucêmicas e podem ter relação com o desenvolvimento da doença. É relatado na literatura variáveis como mutações genéticas germinativas, exposição à radiação ou agentes químicos durante a vida e a gravidez, agentes infecciosos, tratamento prévios e outros fatores que podem ter efeito genético nas células precursoras hematopoiéticas. Além disso, fatores como idade, raça e área geográfica, são relatados com efeito na incidência da doença (Deschler e Lübbert, 2006; Bispo et al., 2020; Tebbi, 2021).

2.2 Leucemia Mieloide Aguda

A LMA é um tipo de leucemia, promovida através da aquisição progressiva e sequencial de alterações genéticas e epigenéticas e acúmulo de precursores mielóides indiferenciados na medula óssea. Como consequência do acúmulo de mutações e a capacidade de autorrenovação, ocorre a expansão clonal descontrolada destes precursores mielóides no sangue periférico e medula óssea, levando a hematopoiese insuficiente das células precursoras, promovendo um bloqueio relativo ou absoluto na diferenciação de células mielóides morfolologicamente e funcionalmente normais (Nollmann et al., 2024).

Os indivíduos com LMA apresentam um conjunto de sinais associados a ausência das células diferenciadas saudáveis de linhagem mieloide, consequentemente levando a sintomas como imunossupressão e trombocitopenia. A ausência das células maduras leva a sintomas que induzem a suspeita desta doença hematológica, como a febre, fadiga, dispnéia, dor de cabeça, disfunção neurológica,

hiperplasia gengival, adenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia, sangramento mucocutâneo e menorragia (Dinardo et al., 2023).

Com base na etiologia, a LMA pode ser categorizada em LMA *de novo* ou LMA secundária, caracterizada pela evolução de um distúrbio hematológico antecedente, principalmente de uma síndrome mielodisplásica (SMD) ou neoplasia mieloproliferativa (NMP). Também pode ser uma LMA relacionada à terapia (t-LMA), após exposição a agentes quimioterápicos citotóxicos e/ou radioterapia. A LMA secundária e t-LMA apresentam características clínicas e biológicas distintas da LMA *de novo*, incidem predominantemente na população idosa e apresentam menor taxa de resposta às terapias convencionais, com índices mais elevados de recidiva devido à resistência à quimioterapia citotóxica (Goel et al., 2021).

Devido a LMA ser um grupo heterogêneo de doenças, com perfis diferentes tanto genéticos quanto morfológicos, é evidente a relevância clínica da identificação dos subtipos de LMA e determinação do prognóstico. Existem algumas organizações que estabelecem critérios para a classificação das LMAs, incluindo o Grupo Francês, Americano e Britânico (FAB) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Padmakumar et al., 2021).

Historicamente, o primeiro sistema de classificação da LMA foi o FAB, que tem como base os achados morfológicos e citoquímicos. Segundo a FAB, oito subtipos de LMA podem ser diagnosticados: LMA com diferenciação mínima (M0), LMA sem maturação (M1), LMA com maturação (M2), leucemia promielocítica aguda (M3), leucemia mielomonocítica aguda (M4), leucemia monoblástica aguda /leucemia monocítica (M5), leucemia eritroide aguda (M6), leucemia megacarioblástica aguda (M7).

Há também critérios de classificação da LMA pela OMS, que classifica com base da diferenciação: leucemia mieloide aguda com diferenciação mínima, leucemia mieloide aguda sem maturação, leucemia mieloide aguda com maturação, Leucemia basofílica aguda, Leucemia mielomonocítica aguda, Leucemia monocítica aguda, Leucemia eritroide aguda e leucemia megacarioblástica aguda. Adicionalmente a OMS considera anormalidades genéticas definidoras da doença como leucemia

pró-mielocítica aguda (LPA) com fusão *PML::RARA*; LMA com fusão *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *DEK::NUP214*, *RBM15::MRTFA*, *BCR::ABL1*; LMA com rearranjos em *KMT2A*, *MECOM*, *NUP98*; LMA com mutação em *NPM1* e *CEBPA*, LMA relacionado a SMD e LMA com outras anormalidades genéticas. Clinicamente, mesmo com a inclusão da classificação da OMS, a classificação FAB é a primeira a ser utilizada pois permite uma rápida qualificação preliminar do tipo de LMA (Khoury et al., 2022; Milman et al., 2023)

Além de ser capaz de se proliferar sem controle, as células leucêmicas da LMA possuem a capacidade de evitar o sistema de defesa imune através de cinco principais mecanismos: aumento de expressão de ligantes inibitórios ou moléculas solúveis inibitórias, aumento de subtipos celulares imunossupressores, manipulação moléculas no microambiente tumoral, e redução da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Khaldoyanidi et al., 2021).

Alguns dos exemplos de mecanismos de escape imune (Figura 1) são: a redução na expressão de antígeno leucocitário humano (HLA), para evitar o reconhecimento por linfócitos; aumento da expressão de ligantes inibitórios de células T (como PD-L1, Gal-9, CD155, CD112, CD86) e forma solúvel de NKG2DL, para evitar a ação de células T e natural killer; estimulam a expressão de células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), células Treg e alteram macrófagos, modificando o microambiente tumoral (Tettamanti et al., 2022). Deste modo as células leucêmicas da LMA possuem maior crescimento e expansão em relação a células normais devido a vantagens causadas por alterações genéticas.

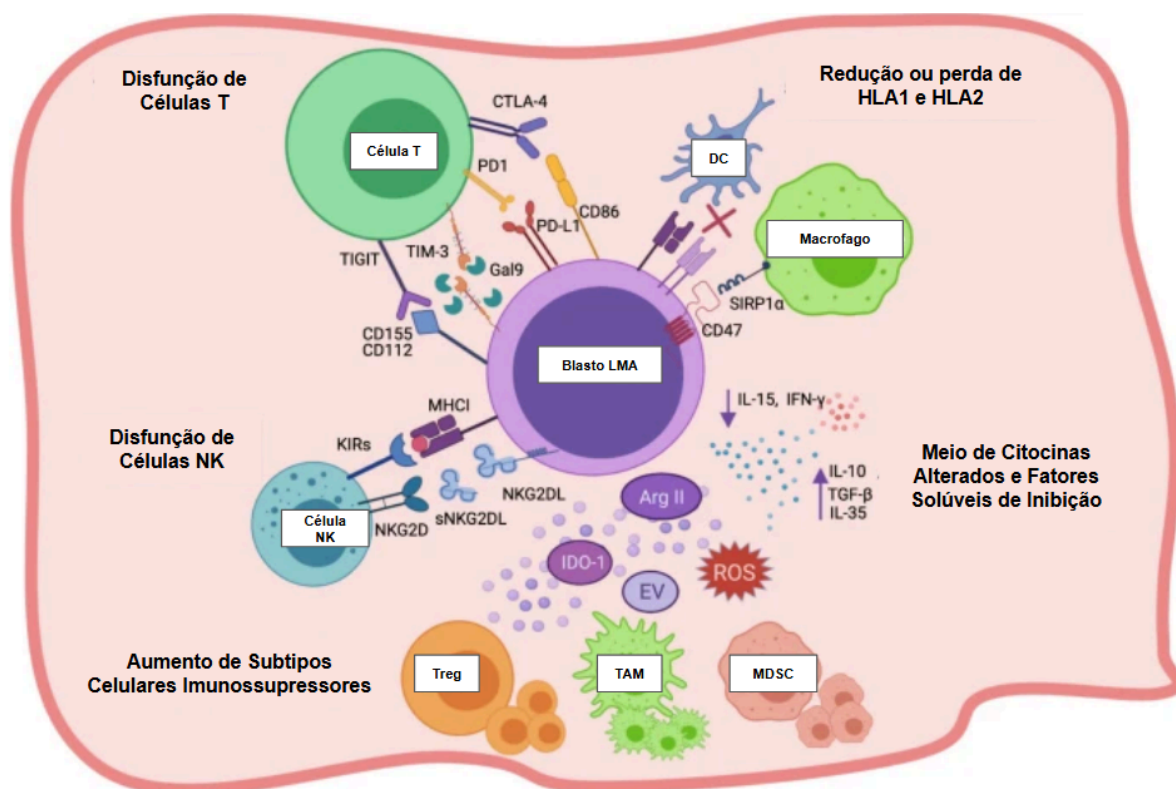


Figura 1. Resumo dos mecanismos de evasão imune mais conhecidos exercidos por blastos de LMA. Fonte: Adaptado de Tettamanti et al., 2022.

2.3 Dados Epidemiológicos da LMA

A LMA pode atingir adultos ou crianças, mas é um evento raro em pessoas com menos de 45 anos. A incidência anual ajustada por idade para pessoas com 65 anos ou mais é de 20,1/100.000 em comparação com 2,0/100.000 para aqueles com menos de 65 anos. Logo, é caracterizada como um dos tipos de leucemia mais comuns em adultos mais velhos, mas mesmo assim é relativamente rara, representando aproximadamente 1,1% dos diagnósticos de câncer, no entanto, é a segunda forma mais comum de leucemia globalmente (DONG et al., 2020; Juliusson et al., 2009). O risco médio de um indivíduo apresentar a doença durante a vida é de aproximadamente 1%. Os homens têm maior predominância em relação às mulheres, numa proporção de 5:3, ou seja, os homens têm 1,6 vezes mais probabilidade de serem diagnosticados com LMA do que as mulheres, com uma incidência anual ajustada à idade de 5,42 e 3,47 por 100.000 indivíduos em homens e mulheres, respectivamente (Juliusson et al., 2009).

De acordo com os dados do DATASUS, entre 2008 e 2017 houve registro de 63.452 mortes por leucemias no Brasil, sendo que 36% foram causadas por LMA, o subtipo mais frequente (22.704 óbitos). Com relação à taxa de mortalidade por faixa etária, na população de 0 a 19 anos houve redução, enquanto na população de 20 a 49 anos não houve alteração significativa e na faixa de 50 anos ou mais houve um crescimento significativo de em média 1,5% ao ano. Apesar da redução da mortalidade na faixa etária de 0 a 19 anos, a taxa de mortalidade por LMA ajustada por idade no Brasil, apresentou crescimento significativo de em média 0,8% ao ano. O número absoluto de óbitos por LMA no Brasil entre 2008 e 2017 cresceu aproximadamente 23%, variando de 1.996 óbitos ao ano em 2008 a 2.462 óbitos em 2017. A etnia dos indivíduos com óbitos registrados indicam que 62% foram pessoas de cor branca, 27% pardos e 5% pretos, sendo 50% do sexo feminino e 50% do sexo masculino. Entretanto, na Bahia, 57% dos óbitos foram de indivíduos pardos, 24% brancos e 12% pretos (Observatório de Oncologia, 2020).

2.4 Diagnóstico de LMA

O diagnóstico da LMA é realizado a partir da verificação da presença dos sinais clínicos e sintomas relacionados à doença, verificação do histórico familiar, realização do exame físico e análise de exames laboratoriais, tais como mielograma, imunofenotipagem, biologia molecular e citogenética. O diagnóstico definitivo da LMA se dá a partir do achado de mais de 20% de mieloblastos, exceto em alguns casos de alterações genéticas ou moleculares específicas, em aspirado de medula óssea ou sangue periférico, por análise da morfologia celular, após coloração (Döhner et al., 2022). Além disso, existem outras técnicas que podem complementar o diagnóstico, fornecendo informações confirmatórias ou auxiliando na classificação da doença e determinação do prognóstico, como a imunofenotipagem, identificação de alterações citogenéticas ou mutações.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo, é uma prática padrão no diagnóstico de LMA, capaz de identificar as células leucêmicas, quando comparadas aos precursores mieloides normais. Esta técnica utiliza diversos marcadores que são anticorpos monoclonais fluorescentes que se ligam a antígenos celulares de superfície, citoplasmáticos e nucleares (cluster of differentiation - CD), e permitem a

caracterização de uma população de acordo com o perfil expresso (Chen e Cherian, 2017).

O diagnóstico de LMA por imunofenotipagem deve conter marcadores para os precursores hematopoiéticos (CD34, CD117, HLA-DR), marcadores mieloides (citMPO, CD33, CD13), marcadores de maturação mieloides (CD11b, CD15, CD64, CD65), marcadores monocíticos (CD14, CD36, CD64, CD4, CD38, CD11c), marcadores megacariocíticos (CD41 (glicoproteína IIb/IIIa), CD61 (glicoproteína — IIIa), CD36 e marcadores eritroides (CD235a — glicoforina A), CD71, CD36), além de marcadores de linfócitos T (CD3) e linfócitos B (CD10, CD19, CD22 e CD79a) (Dohner et al., 2022). Os blastos de LMA expressam antígenos encontrados também em células mieloides imaturas saudáveis (incluindo CD13, CD33 e CD34) e outros marcadores celulares são expressos dependendo do subtipo morfológico da LMA e do estágio de diferenciação.

O diagnóstico molecular de LMA também pode ser realizado por análise citogenética com métodos que permitam identificar anormalidades nos cromossomos das células leucêmicas. A análise citogenética pode ser realizada com a identificação de alterações citogenéticas convencionais por microscópio e pelo teste de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), que utiliza sondas de DNA específicas e complementares à sequência alvo, permitindo detecção de alterações menores eventualmente invisíveis pela citogenética convencional, na confirmação de alterações complexas ou na determinação de quimera pós transplante (Pitel et al., 2023). Na LMA, cerca de 75% dos casos apresentam alterações de cariótipo sendo mais comuns a *PML::RARA/t(15;17)(q24.1;q21.2)*, *RUNX1::RUNX1T1/t(8;21)(q22;q22.1)*, *CBFB::MYH11/inv(16)(p13.1q22)* ou *t(16;16)(p13.1;q22)* e alterações envolvendo 11q23 (*KMT2A*) (Stone et al., 2023).

Os testes genéticos moleculares realizados por diagnósticos de painel genético ou plataformas que testam simultaneamente mutações e rearranjos são de fundamental importância para ajudar a definir a doença, classificar o risco do paciente e orientar quais as melhores terapias a serem empregadas em determinado caso. Os métodos de sequenciamento de nova geração (NGS) e reação em cadeia da polimerase

(PCR) são utilizados para avaliar a presença de alterações genéticas ou moleculares (Döhner et al., 2022).

A LMA é uma doença altamente heterogênea e podem ser categorizados três grupos de risco prognósticos com base nas translocações cromossômicas e mutações genéticas como risco favorável, intermediário ou adverso (Quadro 1). Os fatores prognósticos são relevantes na predição da mortalidade relacionada ao tratamento, e também preditivo da resistência à terapia convencional. Contudo é importante considerar a idade e a existência de comorbidades importantes (Döhner et al., 2022).

Quadro 1. Classificação de risco genético no diagnóstico da LMA.

Categoria de Risco	Anormalidade Genética
Favorável	<ul style="list-style-type: none"> • t(8;21)(q22;q22.1)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i>†,‡ • inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB::MYH11</i>†,‡ • Mutated <i>NPM1</i>†,§ without <i>FLT3</i>-ITD • bZIP in-frame mutated <i>CEBPA</i>
Intermediário	<ul style="list-style-type: none"> • Mutated <i>NPM1</i>†,§ with <i>FLT3</i>-ITD • Wild-type <i>NPM1</i> with <i>FLT3</i>-ITD (without adverse-risk genetic lesions) • t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLLT3::KMT2A</i>†,¶ • Cytogenetic and/or molecular abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverso	<ul style="list-style-type: none"> • t(6;9)(p23.3;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i> • t(v;11q23.3)/<i>KMT2A</i>-rearranged# • t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i> • t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A::CREBBP</i> • inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2</i>, <i>MECOM</i>(<i>EVI1</i>) • t(3q26.2;v)/<i>MECOM</i>(<i>EVI1</i>)-rearranged • -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) • Complex karyotype,** monosomal karyotype†† • Mutated <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i>, and/or <i>ZRSR2</i>‡‡ • Mutated <i>TP53</i>^a

Fonte: Adaptado de Döhner et al., 2022

Já foram descritas mais de 300 translocações cromossômicas e mutações gênicas associadas à LMA. Acredita-se que mais de um evento mutagênico seja necessário para a leucogênese, envolvendo mecanismos que resultem na ativação de vias de proliferação celular (mutações de classe I, como exemplos *BCR::ABL1*, *FLT3*, *RAS*, *c-Kit*, *PTPN11*, *NF1*, *TEL-PDGRβ*), comprometimento da diferenciação normal

(mutações de classe II, como exemplos *CBFB::MYH11*, *AML1::ETO*, *TEL::AML1*, *PML::RARA*, *MLL*, *NUP98::HOXA9*, *PU.1*, *C/CEPα*, *AML1*, *AML1-AMP19*, *CEBPA*, *NPM1*). Associado à terceira classe de mutações, de caráter epigenético, há mutações em genes relacionados à metilação do DNA, como *DNMT3A*, *TET2*, *IDH-1* e *IDH-2* (Khoury et al., 2022).

Aproximadamente 45% dos casos de LMA possuem cariótipo normal e apesar disto, quando se faz avaliação por biologia molecular, é observável que mesmo com cariótipo normal, ocorreram mutações genéticas associadas à doença. Dentre estas, as mutações dos genes *NPM1* e *FLT3* são as mais prevalentes, correspondendo, respectivamente, a 25-30% e a 30-40% dos casos. Dessa forma, estão diretamente relacionados com a promoção da leucemogênese (Kurzer e Weinberg, 2023). As mutações no gene *NPM1* sem *FLT3*-ITD, estão associadas a prognóstico favorável e melhor sobrevida (Tarlock et al., 2021). A *NPM1* tipo selvagem ou mutado com *FLT3*-ITD, independentemente da razão alélica, está associada a prognóstico intermediário (Döhner et al., 2022). É importante destacar que a mudança do prognóstico adverso da presença da mutação *FLT3*-ITD para prognóstico intermediário está relacionado com o desenvolvimento de medicamentos que bloqueiam a atividade dos receptores de tirosina quinase (Döhner et al., 2017; Döhner et al., 2022).

O gene *NPM1*, localizado no cromossomo 5q35, codifica a fosfoproteína nucleofosmina, que está em constante movimentação entre o núcleo e o citoplasma, e está diretamente relacionada com a codificação, transcrição, manutenção, reparo do DNA e entre outras funções (Patel, 2023). A mais frequente mutação consiste na duplicação de quatro pares de bases no éxon 12 (85% dos casos), mas também podem ocorrer outros tipos de inserção de quatro pares de bases na mesma região. Essa mutação causa a localização aberrante da proteína *NPM1* no citoplasma. O *NPM1* é reconhecido pela OMS e pela Classificação de Consenso Internacional (ICC), como uma mutação definidora de LMA, devido à raridade das mutações do *NPM1* na SMD e à rápida progressão observada na maioria dos indivíduos previamente definidos como SMD com mutação *NPM1* (Forghieri et al., 2020).

O *NPM1* selvagem possui diversas funções descritas, como a inibição da duplicação do centrôssomo, liberado durante a duplicação celular e permitir a formação do fuso mitótico; a localização nucleolar e a capacidade de ligar rRNA e proteínas ribossômicas, permitindo a cooperação na biogênese do ribossomo; possui capacidade de ligar as histonas centrais e de ligação, regulando a formação de heterocromatina; também está envolvida no reparo de DNA, ao se ligar ao *TP53*, aumentando sua estabilidade e atividade transcricional, e ao *APE1*, regulando sua atividade de endonuclease; e outras funções descritas como metilação de RNA e rRNA (5) e separação de fases líquido-líquido no núcleo (Figura 2).

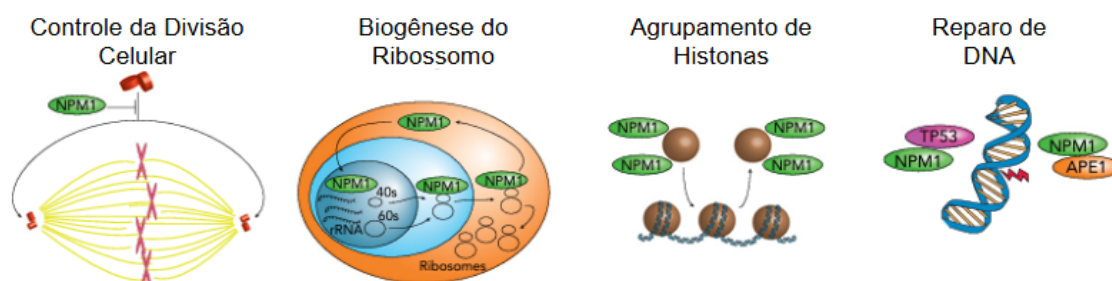


Figura 2. Algumas das funções biológicas associadas ao *NPM1* selvagem. Fonte: Adaptado de Falini et al., 2020.

O *NPM1* possui 3 domínios: a região do amino-terminal (N-terminal), similar a membros da família das nucleofosfina, região com dois sinais de exportação nuclear (NES), que promovem o transporte de *NPM1* do núcleo para o citoplasma pela interação com o exportador nuclear XPO1; uma região central, envolvida na ligação com histonas; e uma região carboxi-terminal (C-terminal), exclusiva para a proteína *NPM1*, com um feixe de três hélices que contém o sinal de localização nucleolar (NoLS). Mutações nos triptofanos da região C-terminal causam a perda NoLS e promovem a inserção de um novo NES, causando a localização aberrante do *NPM1* de indivíduos com LMA e redução de sua atividade em células mutadas (Ranieri et al., 2022)

O gene *FLT3*, codifica uma proteína monomérica, o receptor com atividade tirosina-quinase, relacionado à ativação de vias de sinalização celular responsáveis pela sobrevivência, proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas, sendo este

normalmente muito expresso em estágios iniciais de células precursoras mieloides. Estruturalmente, o receptor *FLT3* contém uma parte extracelular com 5 domínios semelhantes à imunoglobulina, um domínio transmembrana e uma região citoplasmática que consiste em um domínio justamembrana seguido por dois domínios de tirosina quinase (Rosnet e Birnbaum, 1993).

Mutações do tipo ITD, *FLT3*-ITD, consistem em inserções de comprimento variável na região que codifica o domínio justamembrana do receptor. Já a mutação em TKD (*FLT3*-TKD), é do tipo pontual. Ambas as mutações resultam na permanente atividade tirosina-quinase, então promovem a proliferação descontrolada de células mieloides anormais, acarretando leucocitose grave em indivíduos com LMA (Figura 3). A primeira mutação possui frequência de 35 a 45% dos casos de LMA com cariótipo normal, já a segunda apresenta frequência inferior a 5% (Kazi e Rönstrand, 2019).

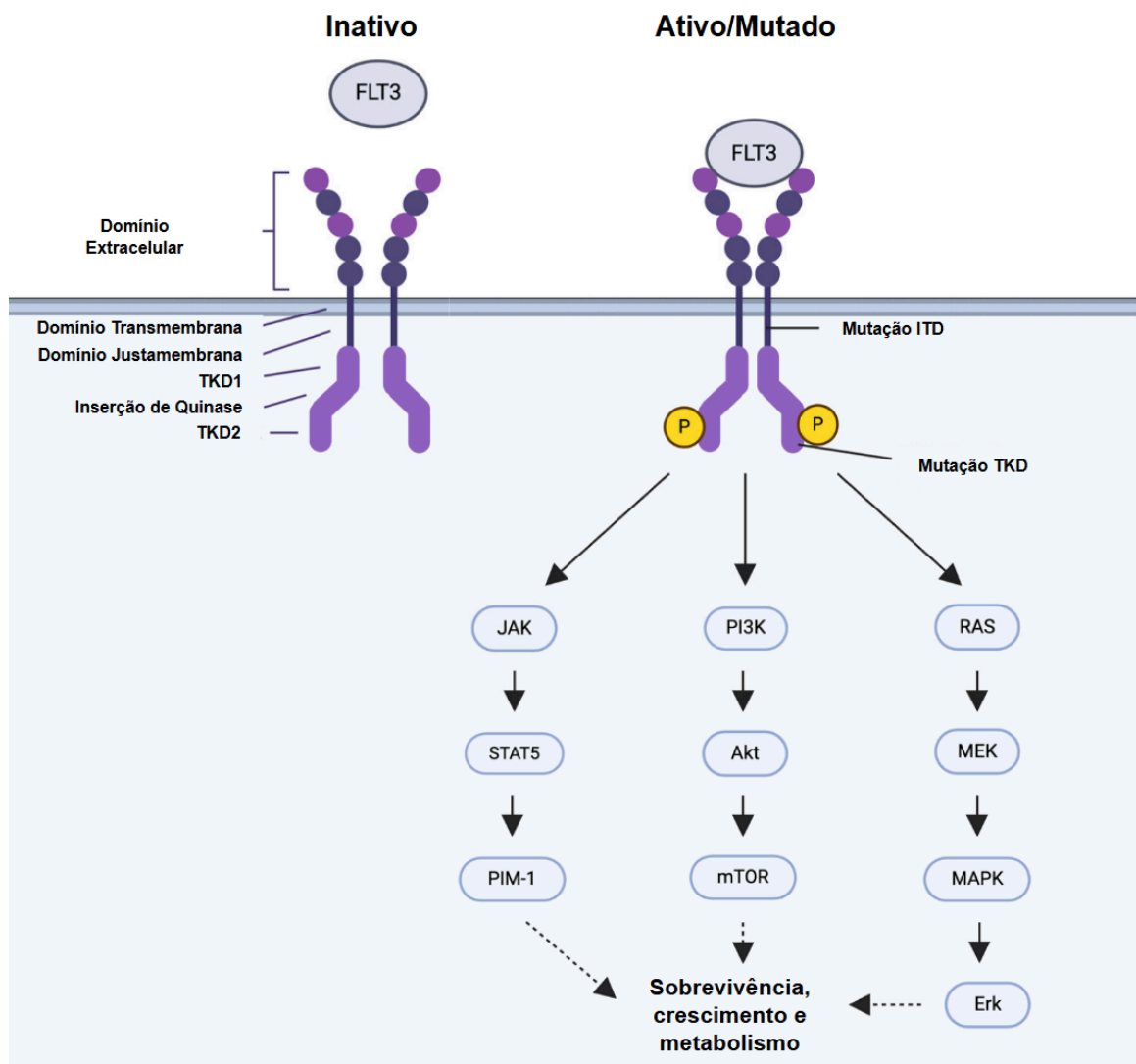


Figura 3. Estrutura do receptor *FLT3* na forma ativada e inativada, e associação com a sinalização intracelular. Fonte: Leifheit et al., 2024.

O diagnóstico por imunofenotipagem e identificação de alterações genéticas permitem o diagnóstico mais completo dos indivíduos com LMA, dados importantes para a determinação do grupo de risco, predição de prognóstico e adequação de terapias individualizadas. É descrito na literatura diferentes perfis imunofenotípicos que estão presentes em indivíduos com algumas das principais alterações moleculares associadas a LMA, como mutações em *NPM1* e *FLT3*, em relação aos que não possuem alteração (Pessoa et al., 2023).

2.5 Tratamento

A LMA é uma leucemia bastante agressiva e deve o tratamento deve ser iniciado assim que feito o diagnóstico. Os principais tratamentos disponíveis dependem da idade do paciente e fatores de risco citogenético e molecular. Apesar de muitos avanços, a base da terapia continua sendo uma combinação de regimes baseados em citarabina e antraciclinas, medicamentos que atuam nas células leucêmicas, mas com efeito também em células saudáveis. A quimioterapia normalmente ocorre em duas fases: indução e consolidação, e para candidatos elegíveis, o transplante alogênico de células-tronco deve ser considerado (Shimony et al., 2023).

Na indução, fase inicial da quimioterapia, o objetivo é eliminar completamente a doença e alcançar o período de remissão completa, definida quando o paciente com LMA tem menos de 5% de blastos na medula óssea normocelular, ausência de leucemia extramedular, contagem de neutrófilos acima de $1.000/\text{mm}^3$ e contagem de plaquetas acima de $100.000/\text{mm}^3$, com ausência de sintomas da doença. Entretanto, ainda é necessário a administração da terapia pós-remissão ou consolidação, com acompanhamento dos parâmetros hematológicos do paciente (Sharvit et al., 2022).

Em adultos jovens, idosos com baixo risco de mortalidade relacionada ao tratamento e aqueles com fatores de risco favoráveis e intermediários, o regime mais comumente adotado é o esquema “7+3”, que consiste na infusão contínua de Citarabina 100 ou 200 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$ por sete dias juntamente com Antraciclina (Daunorrubicina 45 a 90 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$ ou Idarrubicina 12 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$) por três dias. Essa combinação resulta em remissão completa em 50 a 75% dos indivíduos (Sharvit et al., 2022). As opções alternativas para pacientes recidivados ou refratários são fludarabina, citarabina, fator estimulador de colônias de granulócitos e regimes de idarrubicina e citarabina à base de mitoxantrona (Döhner et al., 2022).

A terapia de indução é altamente tóxica para a medula óssea, causando pancitopenias e complicações hemorrágicas, problemas no sistema gastrointestinal, insuficiência renal devido à síndrome de lise tumoral e distúrbios eletrolíticos. Pode levar até 1 mês para a contagem de células se recuperar, e esses indivíduos podem

ficar internados por algumas semanas para receber o devido suporte no intuito de controlar quaisquer complicações médicas (Sharvit et al., 2022).

A terapia alvo, a partir do uso de medicamentos que atacam especificamente as células leucêmicas e que causam menos danos às células saudáveis podem ser empregadas isoladamente ou junto com a quimioterapia, como Midostaurina ou Gilteritinib, que são inibidores de *FLT3*; Gemtuzumab ozogamicina, um anticorpo monoclonal CD33 conjugado com caliqueamicina; CPX351, uma formulação lipossomal de daunorrubicina e citarabina, para t-LMA ou LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia; Venetoclax, um mimético do domínio 3 de homologia BCL2 (BH3), têm como alvo seletivo as células-tronco leucêmicas, atua inibindo a proteína pró-apoptótica BCL2 e induz a apoptose; Ivosidenib e Enasidenib, que foram aprovados como monoterapia para indivíduos com LMA com mutação IDH (Döhner et al., 2022).

Após atingir a remissão completa com terapia de indução, inicia-se a terapia de consolidação com citarabina em altas doses, com o objetivo de eliminar as células leucêmicas residuais que persistem após a terapia de indução e maximizar a duração da resposta. A produção de células saudáveis deve voltar ao normal depois da indução. No entanto, pode haver um número pequeno de células doentes que não alteram o desenvolvimento das células do sangue, mas que podem crescer e gerar uma recaída da leucemia mieloide aguda. Portanto, a consolidação tem como objetivo destruir qualquer residual de células doentes no corpo. Se isso não for feito, a doença pode retornar em poucos meses (De Lima et al., 2021).

A fase de consolidação, além de ser feita pela quimioterapia, pode ser realizada por meio de um transplante de medula óssea a partir da infusão de células-tronco para repor as células destruídas pela quimioterapia. Estas novas células-tronco regeneram a medula óssea e permitem a formação de novas células saudáveis. O transplante de medula óssea é preferido em indivíduos com menos de 60 anos de idade com prognóstico intermediário ou desfavorável (Nabha et al., 2019).

Existem três tipos de transplante de medula óssea: alogênico, quando as células-tronco hematopoiéticas é de um doador compatível, como irmão ou do banco

de doadores, ou parente que seja metade compatível; autólogo, quando a medula é do próprio indivíduo (se um doador estiver disponível, o transplante alogênico é preferível ao autólogo) e singênico, quando a medula é doada por um irmão gêmeo. Em um transplante alogênico a resposta imunomediada é reconhecida como enxerto versus leucemia. O reconhecimento das células do hospedeiro como estranhas, é importante para o efeito terapêutico do transplante, mas precisa ser controlado pelos efeitos colaterais e risco de morte. As células T do doador reconhecem as células cancerígenas através da ligação dos receptores das células T às moléculas de MHC, conhecido HLA, presentes na superfície das células cancerígenas, reconhecendo antígenos tumorais e células com HLA diferentes. Por esse motivo, o doador é escolhido com base na correspondência dos alelos HLA, reduzindo a rejeição do enxerto. Por outro lado, a resposta aloimune do doador pode atingir os tecidos saudáveis dos indivíduos com LMA, causando a doença do enxerto contra o hospedeiro, distúrbio multissistêmico que geralmente afeta inicialmente a pele, depois o trato gastrointestinal, o fígado e os pulmões e, em um estágio posterior, pode afetar quase todos os órgãos (Baron et al., 2020).

A definição do tratamento da LMA considera múltiplos fatores prognósticos e o risco terapêutico, visando aumentar a sobrevida e preservar a qualidade de vida dos pacientes. O manejo dos pacientes é individualizado com base na idade, status funcional e nas características citogenéticas e moleculares do clone leucêmico. Esses parâmetros são essenciais para a estratificação de risco e para a seleção da terapia mais adequada, incluindo o uso de tratamentos molecularmente direcionados, como ácido trans-retinoico (ATRA) e trióxido de arsênio para LMA-M3, e inibidores de *FLT3* para indivíduos com mutação no gene *FLT3* (Grimwade e Hills, 2009). A caracterização laboratorial detalhada é especialmente importante em populações miscigenadas, como a atendida na Bahia, para otimizar estratégias diagnósticas e terapêuticas individualizadas que atendam a demanda da população.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil da celularidade e imunofenotipagem de indivíduos com leucemia mieloide aguda e mutação em *NPM1* e *FLT3*-ITD em população da Bahia.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever o perfil laboratorial de indivíduos com LMA na diagnosticados na Bahia;
- Analisar a correlação da razão neutrófilo-linfócito com a celularidade da população;
- Analisar a diferença de celularidade de indivíduos com LMA de acordo com o status mutacional em *NPM1* e *FLT3*-ITD;
- Analisar a sobrevida dos indivíduos com LMA de acordo com o status mutacional em *NPM1* e *FLT3*-ITD;
- Analisar a associação de marcadores celulares em mieloblastos de indivíduos de acordo com o status mutacional em *NPM1* e *FLT3*-ITD.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA) sob CAAE: 93328318.7.0000.5662. Após assinatura do Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos indivíduos elegíveis diagnosticados com LMA, os dados foram registrados e armazenados com codificação, e tratados com eticidade e sigilo por profissionais treinados e estudantes capacitados para esta atividade.

4.2 Desenho e População do Estudo

O presente estudo é descritivo do tipo transversal, a população avaliada no presente estudo é composta por indivíduos atendidos na Bahia em um único centro, diagnosticados no laboratório de imunologia e biologia molecular (Labimuno) com LMA entre 2019 e 2025 pela observação de sinais clínicos e hematológicos característicos da doença e confirmação do diagnóstico por imunofenotipagem em citometria de fluxo. Após confirmação da doença, os indivíduos foram analisados em relação à presença de mutação em *NPM1* e *FLT3*-ITD. O registro no sistema de informações sobre mortalidade (SIM – DATASUS) dos indivíduos participantes foi avaliado por 90 dias para identificação de estado de óbito.

4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram cadastrados e incluídos indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos, com primeiro diagnóstico (*de novo*) confirmado de LMA, atendidos pelo SUS. Não foram incluídos no estudo, indivíduos que fizeram quimioterapia antes do diagnóstico de LMA, indivíduos com leucemia promielocítica aguda (LPA, também referido como LMA-M3) ou qualquer outra alteração mieloproliferativa prévia.

4.6 Coleta de Amostras

A coleta de amostras biológicas (sangue periférico e/ou aspirado de medula óssea) dos indivíduos foi realizada em tubos com EDTA (*vacuette*) e encaminhadas para o diagnóstico de serviço do Labimuno. O diagnóstico das amostras coletadas foi submetido a imunofenotipagem por citometria de fluxo e armazenado para testes moleculares por PCR. Conforme recomendado, todas as amostras foram coletadas

antes da realização de tratamento por quimioterapia ou transplante de medula óssea. Amostras de sangue e medula óssea foram processadas à fresco para o diagnóstico de rotina por imunofenotipagem e armazenadas em freezer a -20° para as análises de mutação genética por PCR.

4.7 Imunofenotipagem

Foi realizada a contagem de leucócitos no analisador hematológico CELL-DYN Emerald. Posteriormente, realizou-se a incubação de 500.000 células por 15 minutos em temperatura ambiente sob abrigo de luz, com anticorpos conjugados para identificação de moléculas de superfície e citoplasmática. Posteriormente as hemácias foram lisadas com 1mL da solução de lise (BD FACSLyse™) e submetida a lavagem com 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) seguida por 5 min de centrifugação a 500G, e as células homogeneizadas em 300µL de PBS. A aquisição dos dados das amostras foi obtida em citometria de fluxo no BD FACSCanto™ II, com o Software FACSDiva v6.0. Foi avaliada a porcentagem das diferentes populações de leucócitos: mieloblastos, monócitos, granulócitos, basófilos e eosinófilos das amostras dos participantes e os marcadores celulares em mieloblastos: CD2, memCD3, citCD3, CD7, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD33, CD34, CD35, CD38, CD45, CD56, CD64, CD71, CD79a, CD117, CD123, CD300e, HLA-DR e MPO presentes na população de mieloblastos. A expressão do marcador celular foi classificada como positiva se pelo menos 5% das células tivessem intensidade captada registrada. Os dados gerados foram analisados utilizando o programa Kaluza - Beckman Coulter. Os dados de celularidade foram analisadas em grupos diferentes de acordo com a origem do material, sangue periférico ou medula óssea.

4.8 Extração de DNA

A extração do DNA genômico (gDNA) do sangue periférico e/ou aspirado de medula óssea, foi realizada com os kits PureLink® Genomic DNA Mini (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e ReliaPrep Blood gDNA Miniprep (Promega), seguindo as recomendações dos fabricantes. A pureza e concentração do DNA extraído é avaliada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) sob

comprimento de ondas 260 nm e 280 nm, e considerado com uma boa qualidade quando a razão estava entre de 1,7–2,0, e as amostras foram armazenadas a -20°C.

4.9 Detecção de Mutações em *NPM1* e *FLT3*

Para detecção das mutações nos genes *NPM1* e *FLT3*, foram realizadas reações em PCR convencional com os *primers* específicos (Tabela 1), conforme protocolo descrito por Noguera e colaboradores (2005). A extremidade 5' dos primers senso foi modificada com os fluoróforos HEX e FAM, respectivamente.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados para a identificação do estado mutacional dos indivíduos diagnosticados LMA.

<i>Gene</i>	Sequência de iniciadores (5'3')		Número de Acesso (NCBI)
<i>NPM1</i> (349 pb)	<i>NPM-Rev6</i>	5'-accatttccatgtctgagcacc-3'	NM_002520
	<i>NM-F2</i>	5'-atcaattatgtgaagaattgcttac-3'	
<i>FLT3-ITD</i> (366 pb)	<i>ITD-R6</i>	5'-atcctagtagcctcccaaactc-3'	NM_004119.3
	<i>R5-ITD</i>	5'-tgtcgagcagtagtactctaaaca-3'	

Fonte: Noguera et al., 2005.

O produto do PCR foi preparado com padrão molecular LIZ P500™ e Formamida HiDi™, para serem submetidos à análise de fragmentos em sequenciador automático SeqStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) para identificação do tamanho molecular do produto da PCR por eletroforese capilar. Os arquivos gerados foram analisados com o software GeneMapper® e analisando o tamanho dos fragmentos amplificados.

4.10 Análise Estatística

A escolha das análises estatísticas foi baseada na verificação da independência dos dados, na normalidade (testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) e na homogeneidade de variâncias (teste de Levene). As análises foram realizadas no

software IBM SPSS Statistics (versão 26.0) e os gráficos foram construídos no GraphPad Prism (versão 8.4.2).

Foi realizada a análise descritiva da celularidade dos participantes e da frequência de marcadores celulares em mieloblastos utilizados no diagnóstico da LMA. Para a comparação da celularidade entre os sexos e com apenas uma mutação, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. A análise da diferença de celularidade entre os grupos de acordo com o status de comutação foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis e o teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a significância da associação entre a presença de mutações e a expressão de marcadores celulares. O valor de p foi considerado significativo quando menor 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição do Perfil Laboratorial da População de Estudo

Em análise de distribuição dos dados foi identificado que na população total, apenas a variável idade apresentou distribuição normal. Em estratificação por sexo, nas amostras de medula óssea as variáveis idade e porcentagem de granulócitos apresentaram distribuição normal. Já nas amostras de sangue periférico, apenas a idade apresentou distribuição normal.

O presente estudo incluiu 114 indivíduos com idade média de 50 anos (± 18), sendo 50 (43,9%) do sexo masculino e 64 (56,1%) do sexo feminino. Entre os indivíduos avaliados, 62,28% (71/113) não tiveram mutação em *NPM1* ou *FLT3*-ITD, 14,04% (16/113) apresentaram mutação *NPM1* sem *FLT3*-ITD, 12,28% (14/113) apresentaram *NPM1* selvagem e mutação *FLT3*-ITD e 10,53% (12/113) ambas mutações. Na análise não houve dados do status mutacional *FLT3*-ITD de 1 indivíduo e não houve dados de linfócitos (% e células/mm³) de 22 indivíduos, sendo desconsiderados em análises envolvendo estas variáveis. Nas análises, foi avaliado diferença de celularidade entre os sexos masculino e feminino em amostras de medula óssea e sangue periférico, entretanto não foi identificada diferença com significância estatística nas variáveis descritas neste trabalho. Os dados laboratoriais da população estudada total estão descritos na tabela 2, os dados estratificados em sexo masculino e feminino estão descritos na tabela suplementar 1.

Tabela 2. Descrição do perfil laboratorial da população total adulta diagnosticada com LMA de novo (não-M3) neste estudo.

Perfil Populacional	População Total (n=113)
Idade, média (desvio padrão)	50 (± 18)
<i>NPM1</i> wt e <i>FLT3</i> -ITD- n (%)	71 (62,28)
<i>NPM1</i> mut e <i>FLT3</i> -ITD-, n (%)	16 (14,04)

<i>NPM1</i> wt e <i>FLT3</i> -ITD+, n (%)	14 (12,28)
<i>NPM1</i> mut e <i>FLT3</i> -ITD+, n (%)	12 (10,53)

Subtipo celular, mediana (IQR)	Sangue Periférico (n=66)	Medula Óssea (n=48)
Leucócitos (células/mm ³)	35900 (14200–73600)	47250 (14350–103350)
Mieloblastos (%)	42,79 (24,11–79,43)	33,82 (20,13–64,62)
Mieloblastos (células/mm ³)	16217 (4328–37318)	11038 (3774–42155)
Monócitos (%)	9,00 (0,46–36,89)	5,40 (0,30–21,47)
Monócitos (células/mm ³)	2025 (156,15–12355)	1168 (28–8891)
Neutrófilos (%)	6,15 (1,45–16,50)	16,85 (5,59–35,98)
Neutrófilos (células/mm ³)	1136 (425–6038)	6631 (1066–16456)
Basófilos (%)	0,02 (0,00–0,61)	0,00 (0,00–0,44)
Basófilos (células/mm ³)	3 (0–342)	0 (0–186)
Eosinófilos (%)	0,00 (0,00–0,10)	0,00 (0,00–0,17)
Eosinófilos (células/mm ³)	0 (0–26)	0 (0–51)
Subtipo celular, mediana (IQR)	Sangue Periférico (n=50)	Medula Óssea (n=42)
Linfócitos (%)	7,11 (4,59–14,18)	8,06 (5,35–16,79)
Linfócitos (células/mm ³)	2951 (2236–4240)	3923 (2272–5637)
NLR	0,98 (0,21–2,18)	1,82 (0,82–4,24)

Caracterização de 114 indivíduos com LMA avaliados neste estudo. Foram analisados 114 indivíduos para mutação em *NPM1* e 113 para mutação em *FLT3*-ITD. Os dados referentes aos subtipos celulares são apresentados em valores de mediana, com o intervalo interquartil (IQR) indicado entre parênteses.

*NPM1*wt (sem mutação *NPM1*); *NPM1*mut, com mutação em *NPM1*; *FLT3*-ITD-, sem mutação em *FLT3*-ITD; *FLT3*-ITD+, com mutação *FLT3*-ITD; NLR, razão neutrófilo-linfócito.

5.2 Correlação da Razão NLR com a Celularidade

Para avaliar o efeito da razão neutrófilo-linfócito (NLR) na celularidade em amostras de sangue periférico e medula óssea da população de estudo, foi realizado o teste correlação de Spearman com a idade, leucócitos e mieloblastos (%). Apenas foi identificado correlação negativa e moderada entre o NLR com os mieloblastos em medula óssea ($\rho = -0,549$; $p < 0,001$) e em em sangue periférico ($\rho = -0,402$; $p < 0,001$) (Figura 4a).

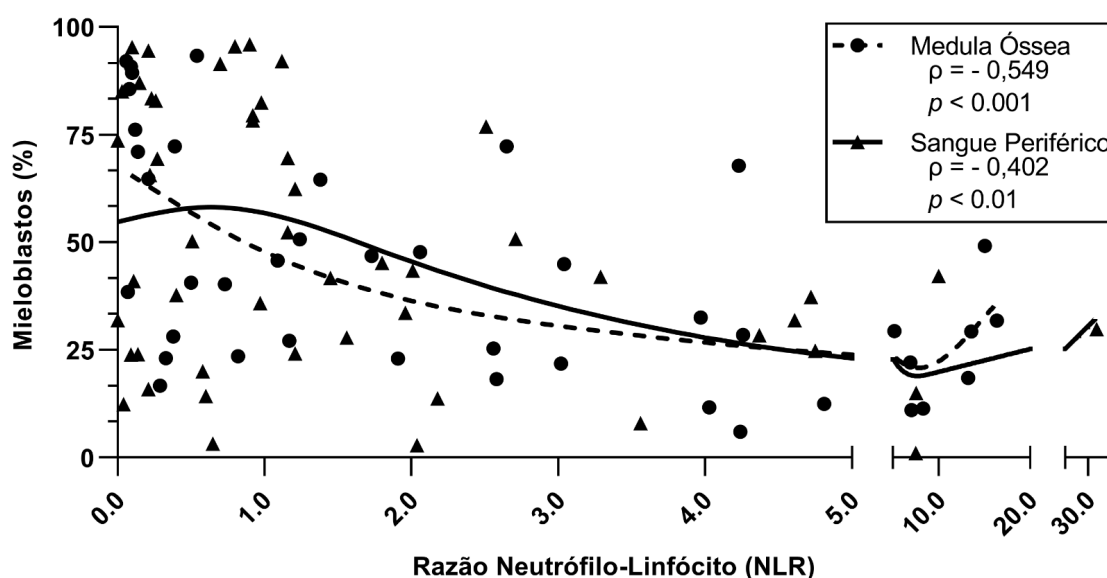


Figura 4. Efeito da razão neutrófilo-linfócito (NLR) na celularidade. (a) Gráfico de dispersão de dados com a análise de correlação de mieloblastos (%) e razão NLR (rho de Spearman) em amostras de medula óssea (n=42) e sangue periférico (n=50). A linha é uma curva spline com 4 nós que representa a dispersão dos dados.

5.3 Diferença de Celularidade no Status Mutacional *NPM1* e *FLT3*

Foi realizada a análise da diferença da celularidade de leucócitos totais, mieloblastos monócitos, linfócitos, neutrófilos e razão NLR entre indivíduos com status mutacional *NPM1* e *FLT3* em sangue periférico e medula óssea. A análise estatística indica que há diferença entre a quantidade de mieloblastos entre os grupos com e sem

mutação em *NPM1* em sangue periférico ($U=324,000$; $p=0.03$), mas essa diferença não foi identificada em medula óssea. Houve diferença entre grupos com e sem mutação *FLT3*-ITD ($U=238,000$; $p=0,004$) em sangue periférico e entre grupos com e sem mutação *FLT3*-ITD ($U=67,000$; $p=0,24$) em medula óssea. De forma similar, houve diferença de leucócitos entre os grupos com e sem mutação em *NPM1* em sangue periférico ($U=299,000$; $p=0.012$), entre grupos com e sem mutação *FLT3*-ITD ($U= 235,000$; $p=0,004$) em sangue periférico e entre grupos com e sem mutação *FLT3*-ITD ($U=75,000$; $p=0,45$) em medula óssea (Figura 5a).

A análise da população estratificada por comutação (*NPM1* selvagem e *FLT3*-ITD-, *NPM1* mutado e *FLT3*-ITD-, *NPM1* selvagem e *FLT3*-ITD+, e *NPM1* mutado e *FLT3*-ITD+) em amostras de sangue periférico, indica, pela análise de Kruskal-wallis, que houve diferença na quantidade de mieloblastos ($H(3)=11,114$; $p=0,011$), leucócitos ($H(3)=12,583$; $p=0,011$) e linfócitos ($H(3)=11,062$; $p=0,011$). O teste de post-hoc ajustado de *bonferroni* indica que a diferença foi observada entre os grupos sem ambas mutações (*NPM1* selvagem e *FLT3*-ITD) e com ambas mutações (*NPM1* mutado e *FLT3*-ITD+) (Figura 5b).

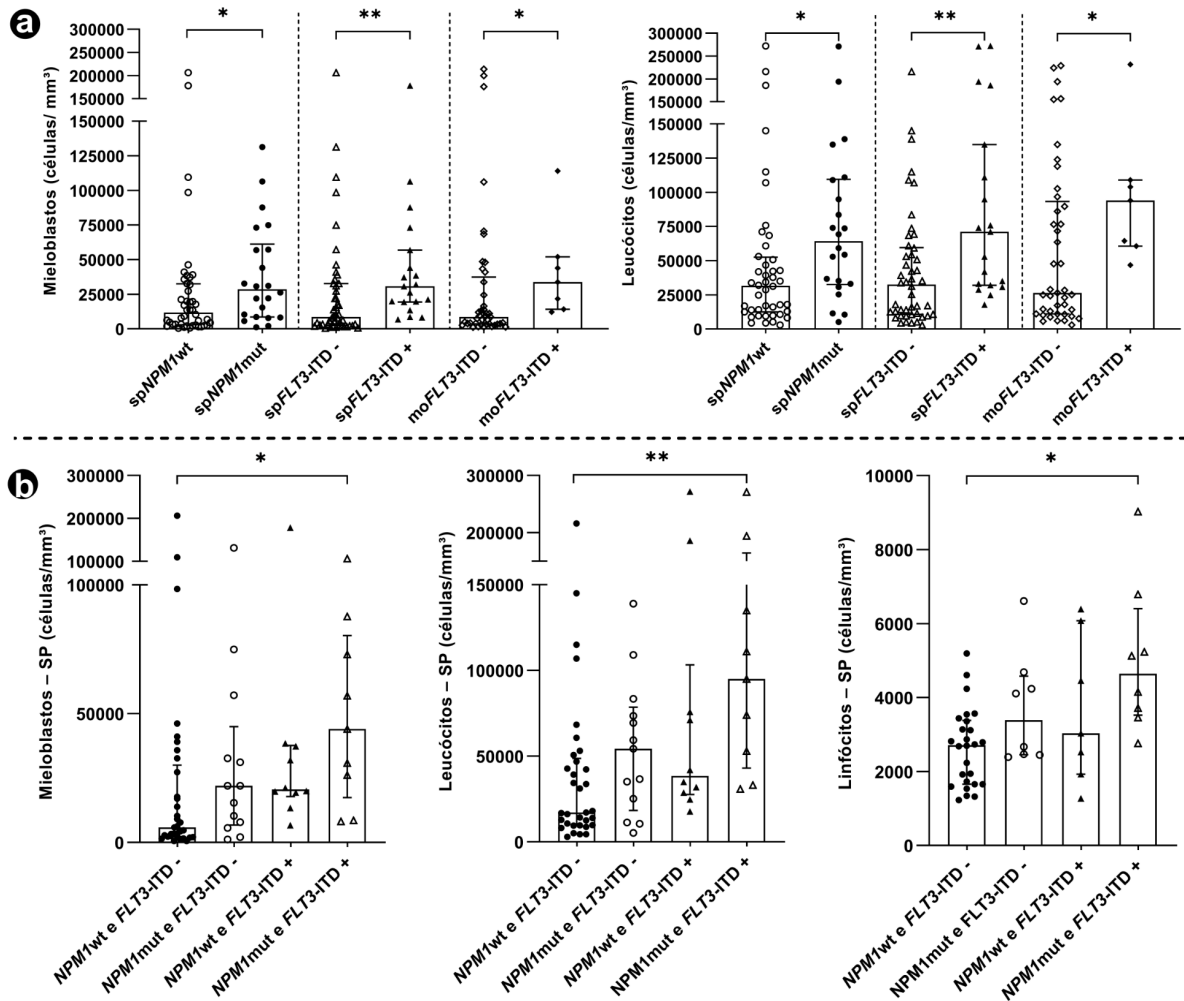


Figura 5. Diferença da celularidade de acordo com o status de mutação *NPM1* e *FLT3*-ITD. (a) Teste de Mann-Whitney do perfil de mieloblastos (esquerda) e leucócitos (direita) entre indivíduos com status *NPM1*wt (n=44) e *NPM1*mut (n=22) em sangue periférico; entre indivíduos com status *FLT3*-ITD- (n=46) e *FLT3*-ITD+ (n=19) em sangue periférico; e com status *FLT3*-ITD- (n=41) e *FLT3*-ITD+ (n=7) em medula óssea. (b) Teste de Kruskal-wallis em amostra de sangue periférico de indivíduos estratificados em *NPM1*wt e *FLT3*-ITD- (n=33), *NPM1*mut e *FLT3*-ITD- (n=13), *NPM1*wt e *FLT3*-ITD+ (n=10), e *NPM1*mut e *FLT3*-ITD+ (n=9). Na análise de linfócitos em sangue periférico a população foi estratificados em: *NPM1*wt e *FLT3*-ITD- (n=26), *NPM1*mut e *FLT3*-ITD- (n=8), *NPM1*wt e *FLT3*-ITD- (n=7), e *NPM1*mut e *FLT3*-ITD+ (n=8). Não houve diferença com significância estatística em amostras de medula óssea. Os dados são representados pelo topo da barra (mediana), e linhas superiores e inferiores (intervalo interquartil). As linhas

conectadas com asterisco representam as diferenças com significância estatística (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). *NPM1*wt (sem mutação *NPM1*); *NPM1*mut, com mutação em *NPM1*; *FLT3*-ITD-, sem mutação em *FLT3*-ITD; *FLT3*-ITD+, com mutação *FLT3*-ITD; sp, sangue periférico; mo, medula óssea.

5.4 Perfil de Sobrevivência em 90 Dias

Para avaliar o perfil do tempo de sobrevivência dos indivíduos com LMA em 90 dias, a população total do estudo foi estratificada entre os sexos masculino e feminino e presença de mutação em *NPM1* e *FLT3*-ITD. Ao final de 90 dias apenas 58 de 114 (50,9%) da população total sobreviveu e, quando comparados indivíduos entre grupos com e sem mutação em *NPM1* ($\chi^2(1)=4.337$; $p=0.037$), e entre grupos com e sem mutação *FLT3*-ITD ($\chi^2(1)=13.30$; $p < 0.003$), é identificado menor sobrevivência em indivíduos com a mutação, tanto em *NPM1* (39,3% vs 54,7%), quanto *FLT3*-ITD+ (26,9% vs 58,6%) em relação ao grupo correspondente sem mutação (Figura 6a e Figura 6b, respectivamente). Na análise da influência da comutação na sobrevivência, ao comparar os indivíduos estratificados em: *NPM1*wt e *FLT3*-ITD-, *NPM1*mut e *FLT3*-ITD-, *NPM1*wt e *FLT3*-ITD+, e *NPM1*mut e *FLT3*-ITD+, foi identificado que houve diferença entre os grupos ($\chi^2(3)=40.672$; $p > 0.001$) demonstrando efeito sinérgico da mutação *NPM1* e *FLT3*-ITD na sobrevida (Figura 6c). Nos grupos de sexo, a taxa de sobrevivência foi de 42,0% (21/50) entre os homens e 57,8% (37/64) entre as mulheres, porém sem significancia estatística pelo teste de log-rank ($\chi^2(1)=2.725$; $p=0.098$) (Figura 6d).

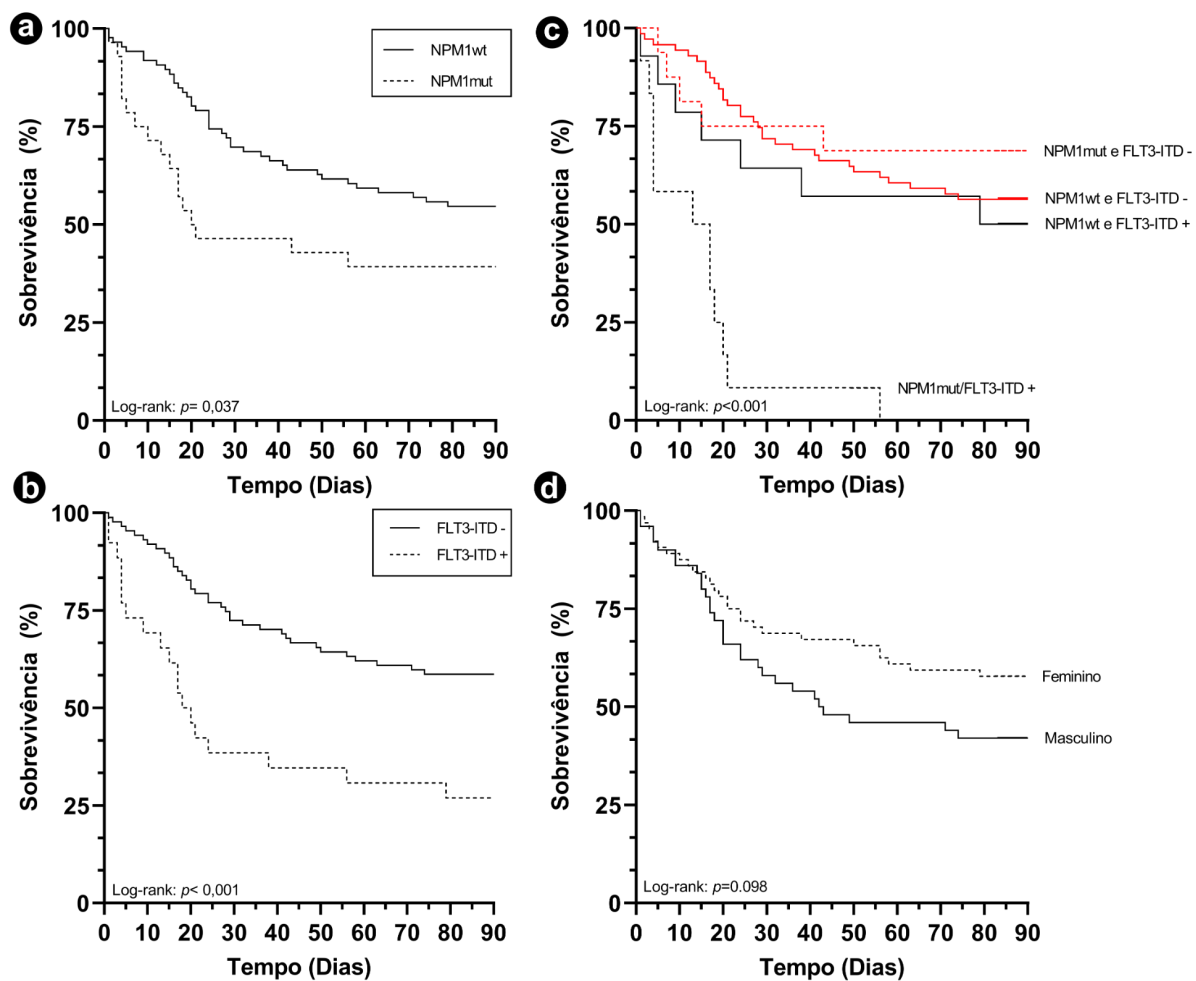


Figura 6. Curva de sobrevivência durante 90 dias. (a) Porcentagem de sobrevivência de indivíduos com *NPM1*wt (linha preta, n= 86) e *NPM1*mut (traços pretos, n=28). (b) Porcentagem de sobrevivência de indivíduos com *FLT3*-ITD- (linha preta, n= 85) e *FLT3*-ITD+ (traços pretos, n=26). (c) Porcentagem de sobrevivência da população de estudo com *NPM1*wt e *FLT3*-ITD- (linha vermelha, n=71), *NPM1*mut e *FLT3*-ITD- (traços vermelhos, n=16), *NPM1*wt e *FLT3*-ITD+ (linha preta – n=14) e *NPM1*mut e *FLT3*-ITD+ (traços pretos, n=12). (d) Porcentagem de sobrevivência da população de estudo estratificada entre indivíduos do sexo feminino (traços pretos, n=64) e masculino (linha preta, n=50). Cada queda em uma linha indica o óbito de um indivíduo em seu respectivo grupo. *NPM1*wt (sem mutação *NPM1*); *NPM1*mut, com mutação em *NPM1*; *FLT3*-ITD-, sem mutação em *FLT3*-ITD; *FLT3*-ITD+, com mutação *FLT3*-ITD.

5.5 Perfil de Antígenos em Mieloblastos com Status mutacional *NPM1* e *FLT3-ITD*

O perfil de marcadores celulares em mieloblastos de indivíduos com ou sem mutação em *NPM1* ou *FLT3-ITD* está descrito na tabela 3. O teste exato de Fisher mostrou que há associação entre a presença de mutação em *NPM1* com o marcador CD34 ($X^2(1)=22,398$; $p<0.001$) e HLA-DR ($X^2(1)=19,236$; $p<0.001$), e associação entre a mutação *FLT3-ITD* com o marcador CD2 ($X^2(1)=11,181$; $p<0.003$), CD7 ($X^2(1)=4,716$; $p<0.025$) e CD11b ($X^2(1)=3,990$; $p<0.046$). Os dados da imunofenotipagem da população total, sem estratificação por presença de mutação, estão descritos no material suplementar 2.

Tabela 3. Associação da expressão de marcadores celulares em mieloblastos em indivíduos mutados em *NPM1* e *FLT3-ITD*.

	<i>NPM1</i> wt	<i>NPM1</i> mut	valor <i>p</i>	<i>FLT3-ITD</i> -	<i>FLT3-ITD</i> +	valor <i>p</i>
	Positivo/Total (%)	Positivo/Total (%)		Positivo/Total (%)	Positivo/Total (%)	
CD2	9/76 (10,6)	2/28 (7,1)	0,455	4/86 (4,7)	7/26 (26,9)	0,003
memCD3	0/78 (0,0)	0/28 (0,0)	–	0/82 (0,0)	0/23 (0,0)	–
citCD3	0/86 (0,0)	0/28 (0,0)	–	0/87 (0,0)	0/26 (0,0)	–
CD7	47/84 (56,0)	14/27 (51,9)	0,439	41/84 (48,8)	19/26 (73,1)	0,025
CD10	3/71 (4,1)	2/20 (10,0)	0,287	3/72 (4,2)	2/21 (9,5)	0,315
CD11b	3/74 (18,8)	2/20 (29,6)	0,117	14/85 (16,5)	9/26 (34,6)	0,046
CD13	79/85 (92,9)	25/26 (96,2)	0,480	80/86 (93,0)	23/24 (95,8)	0,523
CD14	1/86 (1,2)	0/28 (0,0)	0,754	1/87 (1,1)	0/26 (0,0)	0,770
CD15	19/86 (22,1)	5/26 (19,2)	0,496	18/86 (20,9)	5/25 (20,0)	0,583
CD16	0/84 (0,0)	0/27 (0,0)	–	0/84 (0,0)	0/26 (0,0)	–
CD19	11/86 (12,8)	1/27 (3,6)	0,152	8/87 (9,2)	4/26 (15,4)	0,284

CD33	83/85 (97,6)	28/28 (100,0)	0,564	84/86 (97,7)	26/26 (100,0)	0,588
CD34	79/85 (92,9)	14/26 (53,8)	<0,001	71/84 (84,5)	21/26 (80,8)	0,427
CD35	4/77 (5,2)	2/27 (7,4)	0,492	3/79 (3,8)	3/24 (12,5)	0,137
CD38	78/82 (95,1)	26/28 (92,9)	0,480	80/84 (95,2)	23/25 (92,0)	0,418
CD45	84/84 (100,0)	27/27 (100,0)	–	85/85 (100,0)	25/25 (100,0)	–
CD56	24/86 (27,9)	7/28 (25,0)	0,486	27/87 (31,0)	4/26 (15,4)	0,090
CD64	63/82 (76,8)	23/28 (82,1)	0,382	65/84 (77,4)	20/25 (80,0)	0,510
CD71	34/46 (73,9)	16/20 (80,0)	0,422	34/48 (70,8)	15/17 (88,2)	0,133
CD79a	8/85 (9,4)	0/28 (0,0)	0,094	8/86 (9,3)	0/26 (0,0)	0,112
CD117	84/85 (98,8)	27/27 (100,0)	0,759	84/85 (98,8)	26/26 (100,0)	0,766
CD123	65/75 (86,7)	26/27 (96,3)	0,153	68/78 (87,2)	23/23 (100,0)	0,065
CD300e	0/86 (0,00)	0/28 (0,0)	–	0/87 (0,0)	0/26 (0,0)	–
HLA-DR	85/85 (100,0)	22/28 (78,6)	<0,001	82/86 (95,3)	24/26 (92,3)	0,425
MPO	66/83 (73,5)	25/28 (89,3)	0,066	67/84 (79,8)	18/26 (69,2)	0,195

Frequência de antígenos positivos em mieloblastos na população de estudo, estratificado pela presença de mutação em *NPM1* ou *FLT3-ITD*. O valor de *p* representa a significância estatística da correlação no teste Fisher. O valor de *p* em negrito representa os marcadores que deram associação positiva com a mutação.

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise do Perfil da População com LMA na Bahia

A população deste estudo apresentou idade média de 50 anos e maior prevalência de mulheres, diferindo do relatado em países mais desenvolvidos, com média de 65 anos e maior predominância no sexo masculino (Shallis et al., 2024). A menor faixa etária provavelmente ocorre devido às piores condições socioeconômicas dos participantes e menor proporção de idosos em comparação aos países desenvolvidos. Além disso, a maior predominância do sexo feminino nesta população possivelmente é explicada pela região demográfica e cultural de maior busca por assistência médica e menor envolvimento em conflitos (Reichenheim et al., 2011).

A população deste estudo foi avaliada em relação à razão neutrófilo-linfócito (NLR), razão útil como marcador acessível e de baixo custo para avaliar a inflamação e o estado imunológico de pacientes, sendo sugerido na literatura como possível marcador de prognóstico em alguns tipos de cânceres (Heshmat-Ghahdarjani et al., 2023). Entretanto, na LMA não há muitos estudos que avaliem a associação do NLR como fator de impacto na doença. O trabalho de Mushtaq e colaboradores (2018) concluiu que a razão alta de NLR pode servir como um fator prognóstico de sobrevivência em indivíduos com LMA recidiva ou refratária. Zhang e colaboradores (2021) mostraram que em indivíduos com LMA não-M3 no diagnóstico, indivíduos que obtiveram $NLR < 2$ apresentaram maior sobrevida global (SG) em comparação com aqueles com $NLR \geq 2$, especialmente em indivíduos com blastos $> 50\%$, e que o NLR pode refletir sobre a resposta à terapia de indução em indivíduos com LMA. Entretanto, no presente trabalho, a sobrevida de indivíduos estratificados em grupos $NLR < 2$ e $NLR \geq 2$, não apresentou diferença no perfil de sobrevivência pelo teste log-rank (dados não mostrados).

Sabe-se que a LMA induz um estado inflamatório crônico nos indivíduos ao induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6, IL-8 e TNF) que induzem a proliferação celular e resposta imune, enquanto regula o MHC II, marcadores de checkpoints imunológicos, e induz a atividade de linfócitos Treg (NAJI et al., 2024;

Tettamanti et al., 2022). Neste trabalho, a análise de correlação do NLR com a celularidade indicou, com significância estatística, uma relação do menor número de blastos com maior razão NLR em sangue periférico e medula (Figura 4). Esta informação corresponde ao perfil da doença, em que a diferenciação de células granulocíticas são reduzidas no processo de proliferação de blastos, mas não reflete o estado inflamatório do indivíduo. Possivelmente os indivíduos com menor porcentagem de blastos ainda possuem viabilidade para proliferação de neutrófilos, induzidos pelo perfil inflamatório característico da doença, e em indivíduos com menor número de blastos o NLR esteve maior.

6.2 Análise do Status Mutacional *NPM1* e *FLT3*-ITD

Em relação ao status mutacional da população, houve frequência de 24,6% de mutação em *NPM1* e 23,0% de mutação *FLT3*-ITD (Tabela 2), valor menor ao descrito na literatura, que relatam frequência de aproximadamente 30% e 32% dos casos de LMA, respectivamente (Döhner et al., 2022; Padmakumar et al., 2021). Entretanto, comparado a coorte com indivíduos da África do Sul, as frequências foram ainda menores que a descrita neste estudo (Marshall et al., 2014). As frequências das mutações podem variar significativamente entre diferentes populações e regiões geográficas, provavelmente devido ao background genético (Wei H et al., 2018). Esta diferença pode ter ocorrido devido ao tamanho amostral deste estudo ou possivelmente faz parte do perfil epidemiológico característico da população.

Indivíduos com mutação em *NPM1* ou *FLT3*-ITD geralmente apresentam uma contagem de leucócitos e blastos mais elevada que os que não possuem mutação (Thiede et al., 2006). Apesar disso, indivíduos com mutação em *NPM1* possuem melhor prognóstico em relação aos que não possuem mutação (Su et al., 2013; Juliusson et al., 2020; Liu et al., 2019; Zhao et al., 2022).

Neste estudo, a avaliação de diferenças na celularidade entre indivíduos com e sem mutação *NPM1* ou *FLT3*-ITD, indica que amostras de sangue periférico e medula de indivíduos com mutação *FLT3*-ITD possuem maior quantidade de leucócitos e porcentagem de mieloblastos que aqueles sem a mutação. De forma similar, o

mesmo foi identificado entre indivíduos com e sem mutação em *NPM1*, no sangue periférico (Figura 5a), entretanto na medula óssea os leucócitos ($U=91,000$; $p=0,27$) e mieloblastos ($U=114,000$; $p=0,71$) não apresentaram diferença. Esta informação difere de trabalhos que há contagem maior de leucócitos e blastos em amostras de medula óssea na mutação *NPM1* (Dohner et al., 2005; HAFERLACH et al., 2012; Moassass et al., 2024).

As amostras foram estratificadas em grupos de comutação *NPM1* e *FLT3*-ITD para avaliar se há diferença quando estratificado em amostras de sangue e medula, entretanto em amostra de medula, um dos grupos (*NPM1mut* e *FLT3*-ITD+) teve apenas 3 indivíduos, inviabilizando a análise estatística. Nas amostras de sangue periférico foram identificadas diferenças com significância estatística na contagem de blastos, leucócitos e linfócitos, e o post hoc de *bonferroni* indicou que a diferença está entre os grupos *NPM1wt* e *FLT3*-ITD- vs *NPM1mut* e *FLT3*-ITD+ (Figura 5b). Apesar da diferença no grupo com comutação ser maior nessas variáveis, é possível que estudo com maior tamanho amostral seja possível identificar diferenças com significância estatística entre outros grupos.

Poucos estudos exploram o papel dos linfócitos na LMA. No presente estudo, foi identificado que há diferença na contagem de linfócitos totais em sangue periférico de indivíduos sem mutação *NPM1* e *FLT3*-ITD e indivíduos com ambas as mutações (*NPM1mut* e *FLT3*-ITD) (Figura 5b). A identificação da relação dos linfócitos com estas mutações é corroborada com trabalho anterior realizado por Reis e colaboradores (2025), em população da mesma região, que identificou que em entre indivíduos com e sem mutação *FLT3*-ITD há maior porcentagem de linfócitos B (CD19+) em indivíduos sem mutação *FLT3*-ITD e maior de linfócitos T (CD3+) em indivíduos com mutação *FLT3*-ITD em amostras de sangue periférico. Esta alteração talvez tenha sido influenciada devido à maior atividade de ambas as mutações em estimular a proliferação de linfócitos T reguladores, que estão associados ao escape imune da doença (Kuzelová et al., 2022). Entretanto, para obter esta informação é necessário que haja estudos que avaliem a influência destas mutações nesses subtipos de linfócitos. Os subtipos de linfócitos podem estar intimamente associados à progressão da doença e têm o potencial de servir como marcadores prognósticos

na LMA (Jiao et al., 2025). Entretanto o status mutacional pode influenciar neste parâmetro, sendo necessário avaliar o conjunto de parâmetros envolvidos na leucemogênese.

6.3 Análise de Sobrevida da População com LMA

A população deste estudo teve registro de evento óbito observado em 90 dias a partir da data do diagnóstico. Foi identificado que ao final deste período apenas 50,9% estava viva. Os indivíduos participantes deste estudo são atendidos pelo sistema único de saúde (SUS), e é possível que foram atendidos em estágio mais avançado da doença, provavelmente devido às menores condições financeiras que promove inviabilidade de atendimento por outras vias, devido às condições sociodemográficas envolvidas no nordeste do Brasil, localidade deste estudo (Palmeira et al., 2019). Adicionalmente, a falta de acesso a tratamentos individualizados para LMA, devido ao alto custo, deve contribuir para a mortalidade acentuada nesta população em relação ao descrito em outros estudos (Forsythe e Sandman, 2021).

No Brasil, o protocolo de tratamento é o “7 + 3” com infusão contínua de citarabina (100 ou 200 mg/m²/dia) por sete dias, juntamente com antraciclina (Daunorrubicina 45 a 90 mg/m²/dia ou Idarrubicina 12 mg/m²/dia) por três dias, o tratamento padrão da LMA por mais de 40 anos (Portugal e Nucci, 2020; Sharvit et al., 2022). Para indivíduos com mutação em FLT3, entre os medicamentos mais eficazes para o tratamento da LMA, está a midostaurina, um inibidor de quinases. Este medicamento é altamente eficaz na LMA e prolonga significativamente a sobrevida global e livre de eventos entre indivíduos com LMA e mutação FLT3 (Stone et al, 2017). Isto ressalta a importância da identificação da mutação FLT3, entretanto o alto custo deste medicamento no Brasil inviabiliza sua integração no tratamento.

Na análise de sobrevida dos indivíduos estratificados de acordo com o status mutacional, foi identificado que no período de 90 dias há uma maior mortalidade em indivíduos com mutação FLT3-ITD em relação aos que têm mutação não possuem a mutação (Figura 6b), e o mesmo é observado entre indivíduos com mutação em NPM1 em relação aos que não possuem a mutação. Estes dados corroboram com o

prognóstico adverso associado à presença da mutação *FLT3*-ITD, mas não em relação melhor prognóstico do status mutacional *NPM1* analisado isoladamente (Döhner et al., 2022; Chan et al., 2022; Garcia et al., 2024).

Quando a população foi estratificada em relação ao status de comutação em *NPM1* e *FLT3*-ITD, é observável que o grupo de indivíduos com a comutação em *NPM1* e *FLT3*-ITD+ causou efeito no aumento da mortalidade dos indivíduos com LMA (Figura 6c). Os indivíduos com comutação *NPM1* e *FLT3*-ITD provavelmente causaram viés na análise de sobrevida em indivíduos estratificados em apenas uma mutação (Figura 6a e 6b), este perfil é diferente do que é observado em outros estudos, que relatam melhor prognóstico de indivíduos com mutação *NPM1* e *FLT3*-ITD em relação aos indivíduos com mutação apenas em *FLT3*-ITD (Schnittger et al., 2011; Juliusson et al., 2020; Reville et al., 2022). Neste estudo apesar de haver diferença com significância estatística ($p < 0.001$), para confirmar estes dados é necessário estudos com maior população, com maior tempo de acompanhamento para confirmar se este é o perfil desta população.

Na análise de sobrevida dos indivíduos estratificados por sexo, é observável que há uma maior sobrevida dos indivíduos do sexo feminino, apesar de não haver significância estatística (Figura 6d). No estudo de Wiernik e colaboradores (2021), entre indivíduos não obesos, o sexo feminino teve maior sobrevivência, com significância estatística. Não é possível saber se essa diferença na sobrevida é devido a diferenças hormonais, genéticas ou farmacocinéticas entre os sexos. Além disso, como citado anteriormente, a região demográfica e cultural pode ter influenciado no perfil de sobrevida deste estudo (Reichenheim et al., 2011).

6.4 Avaliação da Imunofenotipagem entre Indivíduos com Mutação em *NPM1* e *FLT3*-ITD

Em análise da presença de marcadores celulares em mieloblastos de acordo com o status mutacional *NPM1* e *FLT3*-ITD foi observado que há associação, com significância estatística, de menor frequência na expressão de HLA-DR e CD34 nos mieloblastos de indivíduos com mutação em *NPM1*, e maior frequência de CD2, CD7 e CD11b em indivíduos com mutação em *FLT3*-ITD (Tabela 3).

Apesar da população baiana ser miscigenada e heterogênea geneticamente, a associação negativa de CD34 e HLA-DR não foi diferente do que é relatado na literatura em indivíduos com LMA e mutação *NPM1*, corroborando com a literatura em outras populações (Mason et al., 2018; Chauhan et al., 2013). O perfil de negatividade para CD34 e HLA-DR é frequentemente utilizado como um aspecto imunofenotípico da LPA (Gajendra et al., 2023).

Entretanto dificilmente ocorre confusão no diagnóstico pois a morfologia nuclear de LPA é altamente distinta da LMA, além de poder ser confirmado pela identificação da fusão *PML-RARA* (Papadopoulou et al., 2024). Em indivíduos já diagnosticados com LMA não-M3, esses marcadores podem sugerir a presença da mutação *NPM1*. Em blastos com mutações em *NPM1*, também é descrito blastos com invaginações nucleares proeminentes denominadas cup-like, associadas com o imunofenótipo distinto (CD34- e HLA-DR -), além de alta proporção de casos com a mutação *FLT3-ITD* (Bennett et al., 2010). Também é descrito parâmetros clínicos com alto número de blastos na medula óssea, alta contagem de leucócitos e níveis elevados de Dímero-D (SUN et al., 2022.)

O CD34 é uma fosfoglicoproteína transmembrana localizada na superfície de células, conhecida principalmente como um biomarcador para células-tronco hematopoiéticas (CTHs). O CD34 também pode mediar a ligação de diferentes células-tronco à matriz extracelular da medula óssea ou diretamente ao tecido. A função exata de CD34 não é completamente estabelecida, é proposto que entre as atividades desta molécula está a proliferação de progenitor, inibição de diferenciação de células-tronco e estímulo da migração e adesão celular (Radu et al., 2023). Este marcador é útil para diagnosticar a LMA e outras neoplasias, além de utilidade na identificação e isolamento de células-tronco para terapias (Sidney et al., 2014).

O marcador HLA-DR (isótipo DR do antígeno leucocitário humano de classe 2) tem como função primária ligar peptídeos e apresentá-los na superfície celular para estarem acessíveis ao sistema imune pelos receptores de células T (TCR), e levar a desfechos como aumento da inflamação, estimular a produção de anticorpos e promover a citotoxicidade celular. (Posch e Hurley, 2011). As células leucêmicas

possuem mecanismos de escape imune regulam negativamente moléculas de HLAs que impedem o reconhecimento dos blastos leucêmicos por linfócitos T, juntamente com a expressão positiva de marcadores de checkpoint imunológico (Tettamanti et al., 2022).

Apesar da recorrência de associação da frequência reduzida de CD34 e HLA-DR, há estudos que citam perfil diferente da mutação *NPM1* com outros marcadores em indivíduos com LMA. Em estudo realizado por Liu e colaboradores (2013), indivíduos com LMA e *NPM1* mutados tiveram menor frequência de expressão de CD2, CD7, CD10, CD34 e HLA-DR, em relação a sua versão selvagem. Su e colaboradores (2013), identificou associação de CD34- em indivíduos chineses com mutação *NPM1*, mas não relata em HLA-DR. Em estudo na Austrália é relatado que mieloblastos de indivíduos com *NPM1* podem apresentar redução de expressão ou ausência de CD13, CD34 e HLA-DR e aumento de CD33 e CD123 (ZHOU Yi et al., 2019). Em trabalho de Dalal e colaboradores (2012) no Canadá foi observado que indivíduos de cariótipo normal com mutação *NPM1* tem menor frequência na expressão de CD34, CD14 e CD2 e maior expressão de CD4 e CD19.

No presente estudo também foi identificado que há uma associação positiva da frequência do marcador CD7 em indivíduos com mutação *FLT3*-ITD, assim como relatado na literatura (Baqai e Crisan, 2015; Rausei-Mills et al., 2008; Chauhan et al., 2013). Esta informação pode ser relevante pois recentemente há trabalhos envolvendo a utilização de células CAR T direcionadas a CD7 devido a sua expressão em cerca de 30% em células leucêmicas de LMA e não em células mieloides normais, e a associação deste marcador com a mutação *FLT3*-ITD pode sugerir potencial tratamento alternativo, além de inibidores de quinases (Cao et al., 2022).

O marcador CD7 é uma glicoproteína transmembrana membro da superfamília das imunoglobulinas que desempenha um papel importante nas interações entre células T e células T/células B durante o desenvolvimento linfóide (Stillwell e Bierer, 2001). Essa molécula aparece mais precocemente em células-tronco e estágios pré-tímicos, e mantém sua expressão até às células T maduras, além de células

natural killer (NK). Além de ser altamente expresso em ALL, uma subpopulação de células de LMA pode expressar CD7, particularmente com diferenciação monocítica ou megacariocítica (Naeim et al., 2018).

Algumas cascatas de sinalização iniciam pelo sinal de reconhecimento de CD7 e possuem efeitos na secreção de IL-2, proliferação e regulação da adesão. É descrito na literatura que há uma associação física entre CD7 e do fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), e para que a ativação via CD7 leve ao aumento da adesão celular (via integrinas), a PI3K precisa estar ativa (Stillwell e Bierer, 2001). A ativação do *FLT3* inclui a cascata de sinalização por PI3K, que está ativo em cerca de 60% dos casos de LMA, levando a funções como proliferação e sobrevivência celular (Leifheit et al., 2024). Deste modo, é possível que a ativação constante de PI3K decorrente da mutação *FLT3* influencie na expressão de CD7.

No presente estudo, de forma incomum, foi identificada associação da mutação *FLT3*-ITD com maior frequência de CD2 em indivíduos com LMA não-LPA. Há estudos que relatam associação da mutação *FLT3*-ITD e CD2 em indivíduos com LPA, entretanto mesmo na LPA o papel do *FLT3*-ITD é controverso e não é possível estabelecer uma relação entre eles e o risco de recaída ou sobrevivência (Tekenokuchi et al., 2010; Melo et al., 2015).

O CD2 é uma molécula transmembranar membro da família da superfamília das imunoglobulinas que promove a adesão e tradução de sinais em células T e NK. Este marcador é expresso por células T periféricas, células NK, timócitos e um subconjunto de células B tímicas. O CD2 possui papel na ativação de células T, citólise mediada por células T ou NK e na produção de citocinas por células T (Naeim et al., 2018). Algumas neoplasias linfoides, podem perder a expressão de CD2 e, como observado por Lewis e colaboradores (2007) alguns casos de LMA podem expressar CD2 e CD7 de forma aberrante (Naeim et al., 2018).

No presente estudo foi observado associação de CD11b com a mutação *FLT3*-ITD, porém não foi identificado na literatura muitos dados desta associação em indivíduos com LMA não-LPA. Muñoz e colaboradores (2003) descreve a associação da maior frequência deste marcador (CD11b) e CD36, além da menor frequência de CD34 e

CD117. Adicionalmente, Angelini e colaboradores (2015) descrevem a expressão mais frequente de CD11b e CD7 em amostras com ambas mutações (FLT3-ITD e NPM1) em indivíduos com LMA *de novo*. O marcador CD11b é uma subunidade proteica da família de receptores de integrinas (Mac-1) e atua como uma molécula que reflete estágios de maturação e é importante na adesão celular, transdução de sinal, quimiotaxia, ligação ao complemento e sobrevivência celular. Na imunofenotipagem, o CD11b é um receptor específico de leucócitos e é considerado um marcador para monócitos/promonócitos/macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e células natural killer (Orfao et al., 2019). Alguns estudos relatam pior prognóstico da positividade CD11b em pacientes com LMA, mas esses dados são controversos (Xu et al., 2015).

Em relação a outros marcadores em indivíduos com mutação *FLT3*-ITD que não foram observados na população estudada, o trabalho de Dalal e colaboradores (2012) relataram associação negativa de *FLT3*-ITD com CD56. Além disso há alguns estudos relatam expressão aumentada do marcador CD123 em indivíduos com mutação em *FLT3*-ITD, associação não observada neste estudo ($p=0,065$) (Mariani et al., 2022; Angelini et al., 2015; Rollins-Raval M, et al., 2013; Safaei et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

O perfil da população de estudo difere da descrita na literatura encontrada, com menor idade média, predominância do sexo feminino, menor frequência de mutação em *NPM1* e *FLT3*-ITD e com baixa sobrevida global em 90 dias.

Nas análises envolvendo a razão neutrófilo-linfócito, foi identificado que há uma correlação negativa do número de mieloblastos, entretanto devido ao perfil da LMA, o NLR não deve refletir o perfil inflamatório e capacidade de resposta imune do indivíduo pois deve haver viés causado pela regulação de granulócitos e, indiretamente, linfócitos.

As mutações *NPM1* e *FLT3*-ITD causaram efeito na celularidade dos indivíduos com LMA, a presença das mutações simultaneamente apresentam maior número de mieloblastos, leucócitos e linfócitos com alta heterogeneidade, similar ao relatado na literatura.

Embora as mutações isoladas *NPM1* e *FLT3*-ITD apresentarem efeito na sobrevida de indivíduos com LMA nesta população, a presença simultânea de ambas as alterações genéticas demonstrou um efeito significativo de pior prognóstico, perfil diferente do descrito na literatura.

Há associação da menor frequência dos marcadores CD34 e HLA-DR em indivíduos com mutação *NPM1* e maior frequência de CD7 em indivíduos com mutação *FLT3*-ITD, dados correspondentes a informações recorrentemente descritas na literatura. Entretanto, a maior frequência de CD2 e CD11b em indivíduos com mutação *FLT3*-ITD não é muito relatada na literatura e pode estar associada com o perfil da população de estudo.

É importante destacar que no Brasil, há pouca literatura sobre LMA em adultos e, sendo uma doença relevante e de grande impacto social e econômico, é necessário que haja mais estudos, com um maior número de participantes, e considerando mais variáveis, como fatores genéticos, infecções, morbidades, que podem afetar o desfecho da doença, especialmente em populações com alta miscigenação, como a da Bahia. Potencialmente corroborando com este estudo e auxiliando na

caracterização do perfil de populações geneticamente distintas, permitindo o delineamento de estratégias de tratamento mais individualizadas.

8 REFERÊNCIAS

- ANGELINI, Daniela F. et al. A leukemia-associated CD34/CD123/CD25/CD99+ immunophenotype identifies FLT3-mutated clones in acute myeloid leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 17, p. 3977-3985, 2015.
- BALANDRÁN, Juan Carlos; LASRY, Audrey; AIFANTIS, Iannis. The role of inflammation in the initiation and progression of myeloid neoplasms. **Blood Cancer Discovery**, v. 4, n. 4, p. 254-266, 2023.
- BAQAI, Junaid; CRISAN, Domnita. Correlation of *FLT3* mutations with expression of CD7 in acute myeloid leukemia. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 23, n. 2, p. 104-108, 2015.
- BARON, Frédéric et al. Graft-versus-host disease and graft-versus-leukaemia effects in secondary acute myeloid leukaemia: a retrospective, multicentre registry analysis from the Acute Leukaemia Working Party of the EBMT. **British journal of haematology**, v. 188, n. 3, p. 428-437, 2020.
- BENNETT, John M. et al. Is the association of “cup-like” nuclei with mutation of the NPM1 gene in acute myeloid leukemia clinically useful?. **American journal of clinical pathology**, v. 134, n. 4, p. 648-652, 2010.
- BISPO, Jordan A. Baeker; PINHEIRO, Paulo S.; KOBETZ, Erin K. Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 10, n. 6, p. a034819, 2020.
- BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- CAO, Xuanqi et al. CD7-directed CAR T-cell therapy: a potential immunotherapy strategy for relapsed/refractory acute myeloid leukemia. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 67, 2022.

CHAN, Onyee et al. The prognostic impact of FLT3 in NPM1-mutated AML: Co-occurrence of FLT3-ITD and FLT3-TKD confers poor outcomes. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 3435-3437, 2022.

CHAUHAN, Pradeep Singh et al. Mutation of NPM1 and FLT3 genes in acute myeloid leukemia and their association with clinical and immunophenotypic features. **Disease markers**, v. 35, n. 5, p. 581-588, 2013.

CHEN, Xueyan; CHERIAN, Sindhu. Acute myeloid leukemia immunophenotyping by flow cytometric analysis. **Clinics in laboratory medicine**, v. 37, n. 4, p. 753-769, 2017.

DALAL, Bakul I. et al. Detection of CD34, TdT, CD56, CD2, CD4, and CD14 by flow cytometry is associated with *NPM1* and *FLT3* mutation status in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 12, n. 4, p. 274-279, 2012.

DE LIMA, Marcos et al. AML and the art of remission maintenance. **Blood Reviews**, v. 49, p. 100829, 2021.

DESCHLER, Barbara; LÜBBERT, Michael. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 107, n. 9, p. 2099-2107, 2006.

DINARDO, Courtney D. et al. Acute myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 401, n. 10393, p. 2073-2086, 2023.

DÖHNER, Hartmut et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 140, n. 12, p. 1345-1377, 2022.

DÖHNER, Hartmut et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 129, n. 4, p. 424-447, 2017.

DÖHNER, Konstanze et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3740-3746, 2005.

DONG, Ying et al. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. **Experimental hematology & oncology**, v. 9, p. 1-11, 2020.

FALINI, Brunangelo et al. *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 136, n. 15, p.1707-1721, 2020.

FORGHIERI, Fabio et al. *NPM1*-mutated myeloid neoplasms with< 20% blasts: a really distinct clinico-pathologic entity?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 8975, 2020.

FORSYTHE, Anna; SANDMAN, Karen. What does the economic burden of acute myeloid leukemia treatment look like for the next decade? An analysis of key findings, challenges and recommendations. **Journal of Blood Medicine**, p. 245-255, 2021.

GAJENDRA, Smeeta et al. CD34 negative HLA-DR negative acute myeloid leukaemia: A higher association with NPM1 and FLT3-ITD mutations. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 45, n. 2, p. 221-228, 2023.

GARCIAZ, Sylvain et al. Long-term survival of NPM1 AML treated with intensive chemotherapy with extensive molecular data available. **Leukemia & Lymphoma**, v. 65, n. 5, p. 700-703, 2024.

GOEL, Harsh et al. Molecular and genomic landscapes in secondary & therapy related acute myeloid leukemia. **American journal of blood research**, v. 11, n. 5, p. 472, 2021.

GRIMWADE, David; HILLS, Robert K. Independent prognostic factors for AML outcome. **ASH Education Program Book**, v. 2009, n. 1, p. 385-395, 2009.

HAFERLACH, Torsten et al. Amount of bone marrow blasts is strongly correlated to NPM1 and FLT3-ITD mutation rate in AML with normal karyotype. **Leukemia research**, v. 36, n. 1, p. 51-58, 2012.

HESHMAT-GHAHDARIJANI, Kian et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio as a new prognostic factor in cancers: a narrative review. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1228076, 2023.

INCA. Estimativas 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro, 2022.

JENTZSCH, Madlen et al. Clinical implications of the *FLT3*-ITD allelic ratio in acute myeloid leukemia in the context of an allogeneic stem cell transplantation. **Cancers**, v. 15, n. 4, p. 1312, 2023.

JIMENEZ-MORALES, Silvia et al. Understanding leukemia biology using genome editing techniques. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1323584, 2023.

JULIUSSON, Gunnar et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 113, n. 18, p. 4179-4187, 2009.

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**, v. 4, n. 6, p. 1094-1101, 2020.

KAMPEN, Kim R. The discovery and early understanding of leukemia. **Leukemia research**, v. 36, n. 1, p. 6-13, 2012.

KAZI, Julhash U.; RÖNNSTRAND, Lars. FMS-like tyrosine kinase 3/*FLT3*: from basic science to clinical implications. **Physiological reviews**, v. 99, n. 3, p. 1433-1466, 2019.

KHALDOYANIDI, Sophia et al. Immune biology of acute myeloid leukemia: implications for immunotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 5, p. 419, 2021.

KHOURY, Joseph D. et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703-1719, 2022.

KURZER, Jason H.; WEINBERG, Olga K. Atualizações em genética molecular da leucemia mieloide aguda. In: **Seminários em Patologia Diagnóstica**. WB Saunders, 2023.

LEIFHEIT, Malia E. et al. Enhancing Therapeutic Efficacy of *FLT3* Inhibitors with Combination Therapy for Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 17, p. 9448, 2024.

LEWIS, Robert E. et al. Aberrant expression of T-cell markers in acute myeloid leukemia. **Experimental and molecular pathology**, v. 83, n. 3, p. 462-463, 2007.

LI, Shuping et al. *FLT3*-TKD in the prognosis of patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1086846, 2023.

LIU, Song-Bai et al. Impact of FLT3-ITD length on prognosis of acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 104, n. 1, p. e9, 2019.

LIU, Yan-Rong et al. *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia of monocytic or myeloid origin exhibit distinct immunophenotypes. **Leukemia research**, v. 37, n. 7, p. 737-741, 2013.

MARANI, L. O. et al. A expressão diferencial de células progenitoras leucêmicas definidas por CD99/CD123 está associada à mutação FLT3-ITD e recaída na leucemia mieloide aguda. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, p. S153-S154, 2022.

MARSHALL, R. C. et al. Lower frequency of NPM 1 and FLT 3-ITD mutations in a South African adult de novo AML cohort. **International journal of laboratory hematology**, v. 36, n. 6, p. 656-664, 2014.

MASON, Emily F. et al. A distinct immunophenotype identifies a subset of *NPM1*-mutated AML with TET2 or IDH1/2 mutations and improved outcome. **American journal of hematology**, v. 93, n. 4, p. 504-510, 2018.

MELO, Carolina Pereira Souza et al. Correlation between FLT3–ITD status and clinical, cellular and molecular profiles in promyelocytic acute leukemias. **Leukemia Research**, v. 39, n. 2, p. 131-137, 2015.

MILMAN, Tatyana et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Tumours of the Eye and Orbit. **Ocular oncology and pathology**, v. 9, n. 3-4, p. 71-95, 2023.

MOASSASS, Faten et al. The Clinical Impact of NPM1 Mutations and the Effect of Concurrent Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Unraveling the Prognostic Significance. **Health Science Reports**, v. 7, n. 12, p. e70231, 2024.

MUÑOZ, Luz et al. Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with *FLT3* internal tandem duplication. **haematologica**, v. 88, n. 6, p. 637-645, 2003.

MURPHY, Tracy; YEE, Karen WL. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 18, n. 16, p. 1765-1780, 2017.

MUSHTAQ, Muhammad Umair et al. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in relapsed/refractory acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 132, p. 5246, 2018.

NABHAN, Chadi; KAMAT, Siddhesh; KARL KISH, Jonathan. Acute myeloid leukemia in the elderly: what constitutes treatment value?. **Leukemia & Lymphoma**, v. 60, n. 5, p. 1164-1170, 2019.

NAJI, Nour Sabiha; SATHISH, Mrudula; KARANTANOS, Theodoros. Inflammation and Related Signaling Pathways in Acute Myeloid Leukemia. **Cancers**, v. 16, n. 23, p. 3974, 2024.

NAEIM, Faramarz et al. Principles of immunophenotyping. **Atlas of hematopathology**, p. 29-56, 2018.

NOGUERA, N. I. et al. Simultaneous detection of *NPM1* and *FLT3*-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 19, n. 8, p. 1479-1482, 2005.

NOLLMANN, Cathrin et al. Characterization of CD34+ Cells from Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) and Myelodysplastic Syndromes (MDS) Using a t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) Protocol. **Cancers**, v. 16, n. 7, p. 1320, 2024.

OBSERVATÓRIO DE ONCOLOGIA. Tendências da Mortalidade por leucemia no Brasil. 2020. Disponível em: <https://public.tableau.com/app/profile/nelson.francisco.correa.netto5809/viz/shared/S-C7F84DN7>. Acesso em: 15 Jan. 2025.

ORFAO, Alberto et al. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. **Journal of Immunological Methods**, v. 475, p. 112684, 2019.

PADMAKUMAR, Devipriya et al. A concise review on the molecular genetics of acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 111, p. 106727, 2021.

PALMEIRA, Nathalia Campos et al. Análise do acesso a serviços de saúde no Brasil segundo perfil sociodemográfico: Pesquisa Nacional de Saúde, 2019. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 31, p. e2022966, 2022.

PAPADOPOULOU, Vasiliki et al. Characteristics and Prognosis of “Acute Promyelocytic Leukemia-like” Nucleophosmin-1-Mutated Acute Myeloid Leukemia in a Retrospective Patient Cohort. **Biomedicines**, v. 12, n. 10, p. 2282, 2024.

PARK, Yumi et al. The prognostic impact of lymphocyte subsets in newly diagnosed acute myeloid leukemia. **Blood research**, v. 53, n. 3, p. 198, 2018.

PARK, Sang Hyuk et al. Effect of changes in lymphocyte subsets at diagnosis in acute myeloid leukemia on prognosis: association with complete remission rates and relapse free survivals. **Journal of Hematopathology**, v. 16, n. 2, p. 73-84, 2023.

PASSEGUÉ, Emmanuelle et al. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. suppl_1, p. 11842-11849, 2003.

PESSOA, Flávia Melo Cunha de Pinho et al. Association between immunophenotypic parameters and molecular alterations in acute myeloid leukemia. **Biomedicines**, v. 11, n. 4, p. 1098, 2023.

PITEL, Beth A. et al. Prospective evaluation of genome sequencing to compare conventional cytogenetics in acute myeloid leukemia. **Blood cancer journal**, v. 13, n. 1, p. 138, 2023.

PORTUGAL, Rodrigo Doyle; NUCCI, Márcio Luiz Moore. Current treatment preferences in acute myeloid leukemia: a survey in Brazil. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 42, n. 3, p. 252-254, 2020.

POSCH, P. E.; HURLEY, C. K. Histocompatibility: HLA and other systems. In: **Blood and Bone Marrow Pathology**. Churchill Livingstone, 2011. p. 641-676.

RADU, Petru et al. CD34—Structure, functions and relationship with cancer stem cells. **Medicina**, v. 59, n. 5, p. 938, 2023.

RANIERI, Roberta et al. Current status and future perspectives in targeted therapy of *NPM1*-mutated AML. **Leukemia**, v. 36, n. 10, p. 2351-2367, 2022.

RAUSEI-MILLS, Veronica et al. Aberrant expression of CD7 in myeloblasts is highly associated with de novo acute myeloid leukemias with *FLT3*/ITD mutation. **American journal of clinical pathology**, v. 129, n. 4, p. 624-629, 2008.

REICHENHEIM, M. E. et al. Violência e lesões no Brasil: o efeito, os progressos realizados e os desafios à frente. **Lancet**, v. 377, p. 1962-75, 2011.

REIS, Rogério et al. Description of lymphocyte and cytokine profiles in individuals with acute myeloid leukemia associated with FLT3-ITD and NPM1 mutation status. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 34, n. 2, p. 115-123, 2025.

REVILLE, Patrick K. et al. Improved outcomes among newly diagnosed patients with FMS-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication mutated acute myeloid leukemia treated with contemporary therapy: revisiting the European LeukemiaNet adverse risk classification. **American journal of hematology**, v. 97, n. 3, p. 329-337, 2022.

ROBBINS, Stanley; COTRAN, Ramzi S. Patologia bases patológicas das doenças. In: **Patologia Bases patológicas das Doenças**. 2016.

ROLLINS-RAVAL, Marian et al. CD123 immunohistochemical expression in acute myeloid leukemia is associated with underlying FLT3-ITD and NPM1 mutations. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 21, n. 3, p. 212-217, 2013.

ROSNET, O.; BIRNBAUM, D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. **Critical reviews in oncogenesis**, v. 4, n. 6, p. 595-613, 1993.

SARIANI, Omid Karimdadi et al. Pathogenic and therapeutic roles of cytokines in acute myeloid leukemia. **Cytokine**, v. 142, p. 155508, 2021.

SCHNITTGER, S. et al. Prognostic impact of FLT3-ITD load in NPM1 mutated acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 25, n. 8, p. 1297-1304, 2011.

SHARVIT, Gal et al. Acute myeloid leukemia patients requiring two cycles of intensive induction for attainment of remission experience inferior survival compared with patients requiring a single course of induction chemotherapy. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 22, n. 2, p. e116-e123, 2022.

SHIMONY, Shai; STAHL, Maximilian; STONE, Richard M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 98, n. 3, p. 502-526, 2023.

STONE, Michael et al. Phenotypic clues that predict underlying cytogenetic/genetic abnormalities in myeloid malignancies: A contemporary review. **Cytopathology**, v. 34, n. 6, p. 530-541, 2023.

STONE, Richard M. et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, p. 454-464, 2017.

STILLWELL, Ross; BIERER, Barbara E. T cell signal transduction and the role of CD7 in costimulation. **Immunologic research**, v. 24, p. 31-52, 2001.

SU, Long et al. NPM1, FLT3-ITD, CEBPA, and c-kit mutations in 312 Chinese patients with de novo acute myeloid leukemia. **Hematology**, v. 19, n. 6, p. 324-328, 2014.

SUN, Jie et al. Acute myeloid leukemia with cup-like blasts and FLT3-ITD and NPM1 mutations mimics features of acute promyelocytic leukemia: a case of durable remission after sorafenib and low-dose cytarabine. **Anti-Cancer Drugs**, v. 33, n. 1, p. e813-e817, 2022.

SIDNEY, Laura E. et al. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. **Stem cells**, v. 32, n. 6, p. 1380-1389, 2014.

TAKENOKUCHI, Mariko et al. FLT3/ITD associated with an immature immunophenotype in PML-RAR α leukemia. **Hematology Reports**, v. 4, n. 4, p. e22, 2012.

TEBBI, Cameron K. Etiology of acute leukemia: A review. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2256, 2021.

TETTAMANTI, Sarah et al. Catch me if you can: how AML and its niche escape immunotherapy. **Leukemia**, v. 36, n. 1, p. 13-22, 2022.

THIEDE, Christian et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4011-4020, 2006.

WEI, Hui et al. Distinct genetic alteration profiles of acute myeloid leukemia between Caucasian and Eastern Asian population. **Journal of hematology & oncology**, v. 11, p. 1-4, 2018..

WIERNIK, Peter H. et al. Prognostic effect of gender on outcome of treatment for adults with acute myeloid leukaemia. **British journal of haematology**, v. 194, n. 2, p. 309-318, 2021.

XU, Shuangnian et al. Prognostic value of CD11b expression level for acute myeloid leukemia patients: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135981, 2015.

ZHANG, Qianying et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio correlates with prognosis and response to chemotherapy in patients with non-M3 de novo acute myeloid leukemia. **Translational cancer research**, v. 10, n. 2, p. 1013, 2021.

ZHAO, Jennifer C. et al. A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. **Blood reviews**, v. 52, p. 100905, 2022.

ZHOU, Yeming et al. Global, regional, and national burden of acute myeloid leukemia, 1990–2021: a systematic analysis for the global burden of disease study 2021. **Biomarker Research**, v. 12, n. 1, p. 101, 2024.

ZHOU, Yi et al. Pattern associated leukemia immunophenotypes and measurable disease detection in acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome with mutated *NPM1*. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 96, n. 1, p. 67-72, 2019.

9 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1. Descrição do perfil laboratorial da população total adulta diagnosticada com LMA *de novo* (não-M3) neste estudo.

	Masculino (n=50)	Feminino (n=64)
Idade, média (desvio padrão)	51 (17)	49 (19)
<i>NPM1</i> wt e <i>FLT3</i> -ITD-, n (%)	34 (69,39)	37 (57,81)
<i>NPM1</i> mut e <i>FLT3</i> -ITD-, n (%)	7 (14,29)	9 (14,06)
<i>NPM1</i> wt e <i>FLT3</i> -ITD+, n (%)	5 (10,20)	9 (14,06)
<i>NPM1</i> mut e <i>FLT3</i> -ITD+, n (%)	3 (6,12)	9 (14,06)

Subtipo celular, mediana (IQR)	Sangue Periférico (n=26)	Medula Óssea (n=24)	Sangue Periférico (n=40)	Medula Óssea (n=24)
Leucócitos (células/mm ³)	40050 (16200–83500)	23950 (11050–74100)	34050 (12150–64600)	91750 (25800–137000)
Mieloblastos (%)	39,64 (23,85–79,43)	37,68 (26,20–71,67)	44,32 (28,12–80,13)	34,48 (17,58–56,81)
Mieloblastos (células/mm ³)	18548 (3387–38506)	6917 (3580–34114)	11835 (4517–34236)	13597 (5025–42155)
Monócitos (%)	14,18 (1,85–37,97)	2,16 (0,30–13,38)	3,34 (0,30–35,44)	7,08 (0,85–30,01)

Monócitos (células/mm ³)	4657 (470–13577)	524 (28–4410)	519 (42–9368)	4845 (128–15859)
Neutrófilos (%)	7,81 (2,93–20,70)	19,53 (7,00–40,50)	6,00 (0,87–13,29)	15,07 (5,00–31,55)
Neutrófilos (células/mm ³)	3377 (591–9222)	4218 (806–13221)	825 (323–5788)	7155 (2044–24500)
Basófilos (%)	0,07 (0,00–0,34)	0,00 (0,00–0,58)	0,00 (0,00–0,75)	0,00 (0,00–0,33)
Basófilos (células/mm ³)	12 (0–231)	0 (0–152)	0 (0–346)	0 (0–291)
Eosinófilos (%)	0,00 (0,00–0,30)	0,00 (0,00–0,26)	0,00 (0,00–0,07)	0,00 (0,00–0,09)
Eosinófilos (células/mm ³)	0 (0–99)	0 (0–58)	0 (0–25)	0 (0–22)

Subtipo celular, mediana (IQR)	Sangue Periférico (n=19)	Medula Óssea (n=21)	Sangue Periférico (n=31)	Medula Óssea (n=21)
Linfócitos (%)	6,50 (3,33–12,61)	10,32 (6,18–16,79)	8,34 (4,91–17,46)	7,83 (4,57–11,80)
Linfócitos (células/mm ³)	3361,14 (1943–4767)	2834 (1774–4877)	2817 (2394–4234)	5258 (3076–7579)
Razão RLN	0,98 (0,51–3,29)	1,91 (0,50–4,23)	0,60 (0,15–2,01)	1,73 (0,38–4,24)

Caracterização de 114 indivíduos com LMA avaliados neste estudo. Foram realizados 114 foram analisados para mutação NPM1 e 113 para mutação em FLT3-ITD. A sigla 'wt' refere-se à versão selvagem dos genes, enquanto 'mut' indica sua forma mutada.

Tabela Suplementar 2. Descrição das características laboratoriais da população de estudo total.

Marcadores em Mieloblastos	Positivo/Total (%)
CD2	11/113 (9,7)
memCD3	0/106 (0,0)
citCD3	0/114 (0,0)
CD7	50/111 (55,0)
CD10	5/104 (5,3)
CD11b,	24/112 (21,4)
CD13	104/111 (93,7)
CD14	1/114 (0,9)
CD15	24/112 (21,4)
CD16	0/111 (0,0)
CD19	12/114 (10,5)
CD33	111/113 (98,2)
CD34	93/111 (83,8)
CD35	6/114 (5,8)
CD38	104/110 (94,5)
CD45	111/111 (100)
CD56	31/114 (27,2)
CD64	86/110 (78,2)
CD71	50/66 (75,8)
CD79a	8/113 (7,1)

CD117	111/112 (99,1)
CD123	91/102 (89,2)
CD300e	0/114 (0,0)
HLA-DR	107/113 (94,7)
MPO	86/111 (77,5)

Os dados foram expressos pela razão de indivíduos com marcador positivo pelo total de indivíduos que o marcador foi avaliado, com a porcentagem de positivos entre parênteses.