



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica e Translacional**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL**

**IMPACTO PROGNÓSTICO DO PERFIL DE MARCAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA  
DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA, AO DIAGNÓSTICO,  
TRATADOS EM UMA UNIDADE DE ASSISTÊNCIA ONCOHEMATOLÓGICA NO  
ESTADO DA BAHIA**

**MARIANNA BATISTA VIEIRA LIMA**

**Salvador- Bahia**

**2022**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica e Translacional**

**IMPACTO PROGNOSTICO DO PERFIL DE MARCAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA  
DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA, AO DIAGNÓSTICO,  
TRATADOS EM UMA UNIDADE DE ASSISTÊNCIA ONCOHEMATOLÓGICA NO  
ESTADO DA BAHIA**

**MARIANNA BATISTA VIEIRA LIMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Pesquisa Clínica e Translacional para obtenção do  
grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Eugênia Terra Granado  
Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurelio Salvino

**Salvador – Bahia**

**2022**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**L732** Lima, Marianna Batista Viera

Impacto prognóstica do perfil de marcação imunofenotípica de pacientes com leucemia mieloide aguda, ao diagnóstico, tratados em uma unidade de assistência oncohematológica no Estado da Bahia/ Marianna Batista Viera Lima. \_ Salvador, 2022.

92 f.: il.: 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Eugênia Terra Granado.

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurelio Salvino.

Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica e Translacional) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Câncer de pulmão. 2. Fluxograma. 3. SARS-CoV-2. 4. Time multidisciplinar. I. Título.

CDU 616.155.392

**"AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DO PERFIL DE MARCAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE  
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA, AO DIAGNÓSTICO, TRATADOS EM UMA  
UNIDADE DE ASSISTÊNCIA ONCOHEMATOLÓGICA NO ESTADO DA BAHIA".**

**MARIANNA BATISTA VIEIRA LIMA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

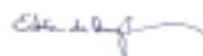
Salvador, 30 de novembro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr. Daniel Pereira Bezerra  
Pesquisador em Saúde Pública  
IGM/FIOCRUZ



---

Dr. Edvan de Queiroz Crusoe  
Médico Hematologista  
HUPES/UFBA



---

Dr<sup>a</sup>. Esgênia Terra Graciano Pina  
Tecnologista em Saúde Pública  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Universidade Aberta do Sistema Único de Saúde (UNASUS).

Dedico este trabalho de pesquisa aos meus pais, pilares da minha formação, pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado sempre.

Ao meu pai Mário Figueiredo Vieira Lima Filho, *in memoriam*, em quem tanto pensei durante a produção deste trabalho

## AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho algumas pessoas me ajudaram e sem as quais não teria sido fácil consegui-lo. A algumas delas pelo apoio especial que me prestaram ao longo deste trabalho gostaria de agradecer especialmente:

Aos meus queridos pais, Valdirene e Mário *in memoriam*, que sempre primaram pela minha educação, por sempre estarem presentes, me incentivando na busca do conhecimento e da investigação, sou muito feliz por isso! A eles dedico inteiramente este trabalho.

À minha orientadora Eugênia Terra Granado pela paciência, por ter lido inúmeras vezes a minha dissertação, pela pertinência das suas críticas e sugestões.

Ao meu coorientador Marco Aurélio Salvino pelo incentivo.

À Elda Pereira Noronha todo o meu carinho, pelo apoio e disponibilidade

Aos professores do mestrado por tornar possível a concretização dessa grande oportunidade de cursar o mestrado na Fiocruz - BA.

À secretária da pós-graduação Geiqa que sempre esteve pronta a ajudar com eficiência e disposição.

Ao Dr. Carlos Sampaio, meu eterno chefe, pela oportunidade e pelo estímulo em seguir no árduo e gratificante caminho do mestrado.

Aos colegas da hematologia da Clínica Multidisciplinar em Oncologia (AMO), pelo apoio e estímulo.

Aos colegas do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) e especialmente ao Dr. Herbert Henrique que contribuiu para que eu pensasse no tema do meu projeto de mestrado e a sua equipe tão comprometida, Alan e Mariane, pela disponibilidade

Aos queridos residentes do HUPES pela prontidão e ajuda sempre que solicitado

À Efigênia do arquivo médico do HUPES pela gentileza e ajuda

À Maria de Fátima Rocha, da Coordenação de Redes da Atenção Especializada, da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, pela compreensão e estímulo

Aos colegas do mestrado, pela convivência, coleguismo e incentivo e em especial a “minha dupla”, Dra. Vanessa Dyball pela preocupação e cuidado

Ao meu querido esposo Rick, pelo carinho, paciência, companheirismo e principalmente por ter conseguido me aturar, nos últimos tempos

À Lulu e Rapha, meus maiores tesouros e motivação para seguir como exemplo e ser melhor a cada momento

À funcionária e amiga Carmem que dispôs o seu tempo para cuidar dos meus tesouros

À minha família, minhas queridas tias, pelo apoio e suporte, sempre presente

À minha querida irmã Laryssa, que mesmo distante sempre me encorajou e aconselhou

Em especial aos pacientes e seus familiares que nos confiam e impulsionam na busca do conhecimento.



“A maior recompense para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”

**(John Ruskin)**

LIMA, Marianna Batista Viera. **Impacto prognostica do perfil de marcação imunofenotípica de pacientes com leucemia mieloide aguda, ao diagnóstico, tratados em uma unidade de assistência oncohematológica no Estado da Bahia.** 2022. 95 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica e Translacional) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A imunofenotipagem por citometria de fluxo desempenha um papel importante no diagnóstico, classificação e acompanhamento das Leucemias Mielóides Agudas (LMA). A sua utilização com finalidade prognóstica ainda é algo controverso, apesar de já ter sido identificado perfis imunofenotípicos específicos associados a alterações citogenéticas e moleculares subjacentes. **OBJETIVO:** Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a função prognóstica da citometria de fluxo, através da análise de associação das marcações imunofenotípicas com características clínico-demográficas; laboratoriais; taxas de resposta; sobrevida livre de doença e sobrevida global, de pacientes adultos com LMA. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram analisados retrospectivamente 102 casos de LMA diagnosticados, em um dos centros de referência para o tratamento das Leucemias Agudas, no Estado da Bahia, no período de 2015-2021. **RESULTADO:** Os pacientes submetidos a terapia quimioterápica intensiva, apresentaram taxas de resposta completa (70,6%) e taxa de sobrevida global (SG) em 5 anos (36,5%) semelhantes aos desfechos clínicos reportado na literatura. Foi observado uma frequência elevada de fenótipos aberrantes em torno de 71,6%. Dentre os antígenos anômalos expressos, o mais frequente foi o CD7 (52,6%), seguido pelo o CD19 (12,2%). Avaliando pacientes submetidos à quimioterapia intensiva, a expressão positiva do CD7 foi associada a uma probabilidade aumentada de recidiva e refratariedade, assim como redução significativa da sobrevida livre de doença. Por outro lado, a expressão positiva do MPO foi associada de forma significativa a uma maior taxa de resposta completa e maior sobrevida global. A co-expressão dos marcadores CD34<sup>pos</sup>/CD7<sup>pos</sup> foi associada com refratariedade/recidiva, enquanto CD7<sup>pos</sup>/CD56<sup>pos</sup> foi associada com baixa taxa de resposta completa. Enquanto, a co-expressão positiva dos 4 marcadores pan-mielóides CD13/CD33/CD117/MPO foi associada a uma maior frequência de resposta completa. **CONCLUSÕES:** Este estudo confirma a associação de alguns importantes marcadores imunofenotípicos com a resposta terapêutica e desfecho de pacientes com LMA, indicando a relevância da utilização da imunofenotipagem na definição de prognóstico. Além disso, foi observado taxas de resposta e sobrevida consistentes com as já reportadas na literatura. Para confirmar alguns achados e avaliar as correlações entre alterações citogenéticas ou moleculares com perfis imunofenotípicos e sua associação prognóstica, será necessário avaliar um número maior de pacientes

**Palavras-chaves:** Leucemia mieloide aguda. Fatores prognósticos. Citometria de fluxo. Imunofenotipagem. Marcadores antigênicos.

LIMA, Marianna Batista Viera. Prognostic impact of the immunophenotypic marker profile of patients with acute myeloid leukemia, at diagnosis, treated at an oncohematological care unit in the State of Bahia. 2022. 92 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica e Translacional) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Flow cytometry immunophenotyping plays an important role in the diagnosis, classification, and follow-up of Acute Myeloid Leukemias (AML). Its use for prognostic purposes is still somewhat controversial, although specific immunophenotypic profiles associated with underlying cytogenetic and molecular alterations have already been identified. **OBJECTIVE:** The main objective of this study was to evaluate the prognostic function of flow cytometry, by analyzing the association of immunophenotypic markers with clinical-demographic characteristics; laboratory; response rates; disease-free survival and overall survival of adult patients with AML. **MATERIALS AND METHODS:** We retrospectively analyzed 102 cases of AML diagnosed in one of the reference centers for the treatment of Acute Leukemias, in the State of Bahia, in the period 2015-2021. **RESULTS:** Patients undergoing intensive chemotherapy had complete response rates (70.6%) and 5-year overall survival (OS) rate (36.5%) similar to clinical outcomes reported in the literature. A high frequency of aberrant phenotypes around 71.6% was observed. Among the anomalous antigens expressed, the most frequent was CD7 (52.6%), followed by CD19 (12.2%). Evaluating patients undergoing intensive chemotherapy, positive expression of CD7 was associated with an increased probability of relapse and refractoriness, as well as a significant reduction in disease-free survival. On the other hand, positive expression of MPO was significantly associated with a higher complete response rate and higher overall survival. Co-expression of CD34<sup>pos</sup>/CD7<sup>pos</sup> markers was associated with refractoriness/relapse, while CD7<sup>pos</sup>/CD56<sup>pos</sup> was associated with a low rate of complete response. Meanwhile, positive co-expression of the 4 pan-myeloid markers CD13/CD33/CD117/MPO was associated with a higher frequency of complete response. **CONCLUSIONS:** This study confirms the association of some important immunophenotypic markers with the therapeutic response and outcome of patients with AML, indicating the relevance of the use of immunophenotyping in defining prognosis. In addition, response and survival rates consistent with those already reported in the literature were observed. To confirm some findings and evaluate the correlations between cytogenetic or molecular alterations with immunophenotypic profiles and their prognostic association, it will be necessary to evaluate a larger number of patients.

**Keywords:** Acute myeloid leukemia. Prognostic factors. Flow cytometry. Immunophenotyping. antigenic markers.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação clássica da diferenciação hematopoiética	22
<b>Figura 2</b>	Diferenciação da linhagem mieloide e perfil imunofenotípico conforme estágio maturativo	23
<b>Figura 3</b>	Novo modelo da diferenciação hematopoiética baseado na heterogeneidade da célula tronco	25
<b>Figura 4</b>	- Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para as LMA	32
<b>Figura 5</b>	Princípios de funcionamento de um citômetro de fluxo	36
<b>Figura 6</b>	Gráficos de sobrevivência de pacientes <60 anos de idade (A) e ≥60 anos de idade B) com LMA de novo, tratados no Instituto do MD Anderson	47
<b>Figura 7</b>	Gráfico da Sobrevida livre de recaída (SLR) para os pacientes submetidos a quimioterapia intensiva	60
<b>Figura 8</b>	- Gráfico das Sobrevida Global (SG) conforme terapia instituída	61
<b>Figura 9</b>	Gráficos de Sobrevida Livre de Doença (SLD) conforme expressão dos antígeno, nos	68
<b>Figura 10</b>	Gráfico de Sobrevida Global (SG) conforme expressão dos antígeno nos pacientes submetidos a quimioterapia intensiva: A – Expressão de MPO B - Expressão de CD36 e C- Expressão de CD7	69
<b>Figura 11</b>	Sobrevida Livre de Doença conforme expressão de CD13	70
<b>Figura 12</b>	Sobrevida Global conforme expressão de CD15 (A) e CD14 (B)	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação FAB da Leucemia Mieloide Aguda, 1985	31
<b>Tabela 2</b>	Estratificação de risco do grupo Europeu LeukemiaNet- 2017 para LMA, baseada	39
<b>Tabela 3</b>	Fluxograma padrão para diagnóstico de LMA por citometria de fluxo	55
<b>Tabela 4</b>	Características clínicas e biológicas dos pacientes com LMA	58
<b>Tabela 5</b>	Características dos pacientes conforme tratamento quimioterápico instituído	59
<b>Tabela 6</b>	Fatores Prognósticos avaliados quanto a resposta à quimioterapia intensiva	62
<b>Tabela 7</b>	Frequência dos marcadores testados	63
<b>Tabela 8</b>	Frequência da expressão dos antígenos conforme características prognósticas	65
<b>Tabela 9</b>	Expressões antigênicas conforme resposta a quimioterapia intensiva	66
<b>Tabela 10</b>	Associação da co-expressão antigênica com fatores de prognóstico	71
<b>Tabela 11</b>	Co Co-expressão antigênica e resposta a quimioterapia intensiva	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AGM</b>	Aorta-Gônadas-Mesonefrons
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>Ara-C</b>	Citarabina
<b>CBF</b>	<i>Core Binding Factor</i>
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CFM</b>	Citometria de Fluxo Multiparamétrica
<b>CHIP</b>	Hematopoiese clonal de potencial indeterminado
<b>CHUPES</b>	Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos
<b>Classificação FAB</b>	Classificação Franco-Americana-Britânica
<b>CTHs</b>	Células Tronco Hematopoiéticas
<b>CTHs-CP</b>	CTHs de Curto prazo
<b>CTHs-LP</b>	CTHs de Longo prazo
<b>DNR</b>	Daunorrubicina
<b>DRM</b>	Doença residual mensurável
<b>ELN-2017</b>	Grupo Europeu do LeukemiaNet -2017
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
<b>FSC</b>	Forward Scatter
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
<b>HMA</b> s	Agentes Hipometilantes
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>ITD</b>	duplicações in tandem internas
<b>LMA</b>	Leucemia Mieloide Aguda
<b>LMA-t</b>	Leucemia Mieloide aguda relacionadas à terapia
<b>LPA</b>	Leucemia Promielocítica Aguda
<b>mAbs</b>	Anticorpos monoclonais
<b>Meg</b>	Megacariócito
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>neg</b>	Negativas
<b>NGS</b>	<i>Next-Generation Sequencing</i>
<b>NM-t</b>	Neoplasias Mieloides relacionadas à terapia

<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PEM</b>	Progenitores Eritrocítico-Megacariocíticos
<b>PLC</b>	Progenitor Linfoide Comum
<b>PMC</b>	Progenitores Mieloides Comuns
<b>PMG</b>	Progenitores Monocíticos-Granulocíticos
<b>PMP</b>	Progenitores Multipotentes
<b>PMPL</b>	Progenitores Multipotentes Linfoide
<b>pos</b>	Positivas
<b>Pré GM</b>	Pré Granulócitos Monolíticos
<b>Pre MegE</b>	Pré Megacariócito -Eritrocítico
<b>Pre-UFC-E</b>	Pré Unidade Formadora de Colônia Eritrocítica
<b>QT</b>	Quimioterapia
<b>RC</b>	Remissão completa
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>RT-qPCR</b>	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
<b>SD</b>	Síndrome de Down
<b>SEER</b>	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
<b>SG</b>	Sobrevida Global
<b>SMD</b>	Síndrome Mielodisplásica
<b>SMD-t</b>	Síndrome Mielodisplásicas relacionadas á terapia
<b>SP</b>	Sangue Periférico
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i>
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i>
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TCTHs</b>	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
<b>TKD</b>	domínio tirosina quinase
<b>TMO</b>	Transplante de Medula Óssea
<b>UFC-E</b>	Unidade Formadora de Colônia Eritroide
<b>UFC-G</b>	Unidade Formadora de Colônia Granulocítica
<b>UFC-GM</b>	Unidade Formadora de Colônia Granulocítica-Monocítica
<b>UFC-M</b>	Unidade Formadora de Colônia Monocítica
<b>UFC-Meg</b>	Unidade Formadora de Colônia Megacariocítica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1 HEMATOPOIESE E DIFERENCIAÇÃO CELULAR .....	20
2.2 LEUCEMOGÊNESE.....	25
2.3 LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA.....	27
2.3.1 <b>Histórico</b> .....	27
2.3.2 <b>Definição</b> .....	27
2.3.3 <b>Epidemiologia</b> .....	28
2.3.4 <b>Manifestações clínicas</b> .....	29
2.3.5 <b>Fatores de risco</b> .....	29
2.4 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS .....	30
2.5 CLASSIFICAÇÃO .....	30
2.5.1 <b>Classificação Franco-Americana-Britânica (FAB)</b> .....	30
2.5.2 <b>Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)</b> .....	31
2.6 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS .....	33
2.6.1 <b>Laboratório básico</b> .....	33
2.6.2 <b>Citomorfolgia</b> .....	34
2.6.3 <b>Imunofenotipagem</b> .....	34
2.6.3.1 <b>Leitura e análise por citometria de fluxo</b> .....	35
2.6.3.2 <b>Fenótipos Aberrantes</b> .....	36
2.6.3.3 <b>O papel da imunofenotipagem na leucemia mieloide aguda</b> .....	36
2.6.4 <b>Aspecto de Citogenética e Genética Molecular</b> .....	37
2.7 FATORES PROGNÓSTICOS.....	38
2.7.1 <b>Estratificação de risco do grupo Europeu do LeukemiaNet – ELN 2017</b> .....	38
2.7.2 <b>Fatores prognósticos associados ao paciente</b> .....	40
2.7.3 <b>Fatores prognósticos associados à doença</b> .....	40
2.7.4 <b>Fatores prognósticos associados a resposta após tratamento</b> .....	42
2.7.4.1 <b>Doença residual mensurável</b> .....	43
2.7.5 <b>Avaliação prognostica de Expressões Antigênicas</b> .....	44
2.8 TRATAMENTO.....	46
2.8.1 <b>Novas terapias</b> .....	47
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	50



3.1 OBJETIVO GERAL .....	46
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>4 METOLOGIA</b> .....	<b>51</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO .....	51
4.2 PACIENTES.....	51
4.2.1 Critérios de inclusão .....	51
4.2.2 Critérios de exclusão .....	51
4.3 COLETA DE DADOS DO PRONTUÁRIO.....	52
4.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.....	52
4.5 AVALIAÇÃO DE RESPOSTA APÓS QUIMIOTERÁPIA INTENSIVA.....	53
4.5.1 Avaliação de sobrevida livre de doença e sobrevida global .....	53
4.6 ANÁLISE DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	53
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	55
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica, caracterizada pela expansão clonal de blastos mieloides, impedindo a formação, desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). A LMA caracteriza-se por diferentes espectros de apresentações clínicas, alterações morfológicas, imunofenotípicas e achados genéticos. Essa diversidade de apresentações faz a LMA ser reconhecida como um grupo de doenças biologicamente heterogêneas, com prognósticos e evolução clínica individualizada (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

O diagnóstico de LMA requer a identificação de 20% ou mais de blastos mieloides na medula óssea (MO) ou sangue periférico (SP), ou ainda a identificação de anormalidades citogenéticas específicas como:  $t(8;21)(q22;q22.1)$ ,  $inv(16)(p13.1q22)$ , ou  $t(15;17)(q24.1;q21.2)$ , independentemente do valor percentual de blastos presentes (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

A transformação clonal da célula leucêmica mieloide ocorre pela aquisição de uma série de anormalidades genéticas. O modelo da leucemogênese pressupõe a cooperação de dois tipos de mutações: mutações que resultam em proliferação celular desregular e mutações que resultam no bloqueio da diferenciação das células mieloides normais (CARTER et al., 2020).

A apresentação clínica da LMA retrata os sinais e sintomas decorrentes da supressão da hematopoiese normal. Desta forma, os pacientes podem se apresentar com infecções, decorrentes da neutropenia, cansaço e fadiga secundários à anemia e/ou sangramentos, secundários à trombocitopenia (KANTARJIAN et al., 2021a). Manifestações extramedulares incluindo hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, infiltração em tecidos moles e lesões ósseas também podem estar presentes (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

A classificação do European LeukemiaNet (ELN), é o sistema de categorização de risco mais utilizado na prática clínica, para a tomada de decisões e orientação terapêutica, para pacientes com LMA. Essa classificação utiliza-se de informações sobre alterações citogenéticas específicas e o estado mutacional de alguns genes, para estratificar os pacientes em três grupos de risco prognóstico: favorável, intermediário e desfavorável (DÖHNER et al., 2017).

Desde a introdução do regime quimioterápico padrão de indução, na década de 1970, a terapia do paciente com LMA consiste em uma infusão contínua de citarabina por sete dias, com a adição de uma antraciclina, normalmente daunorrubicina ou idarrubicina, administrada diariamente durante os primeiros três dias. Essa terapia quimioterápica, conhecida como 7+3, induz uma taxa de resposta completa que varia de acordo com características intrínsecas aos

pacientes. Aqueles com doença classificada com risco favorável apresentam em torno de 80% de resposta completa, aqueles com risco intermediário em torno de 50-60% e os pacientes com risco desfavorável em torno de 40% de resposta completa (PELCOVITS; NIROULA, 2020). Contudo, as recaídas são frequentes, diminuindo progressivamente a sobrevivência a longo prazo (AITKEN et al., 2021; DÖHNER et al., 2017).

A elegibilidade ao tratamento quimioterápico intensivo, leva em consideração a avaliação do estado funcional do paciente, a presença de comorbidades clínicas, idade, caracterização biológica da doença e o risco de mortalidade relacionada à terapia quimioterápica intensiva (DÖHNER et al., 2017; GILES et al., 2007; KOSCHMIEDER et al., 2010).

A terapia de consolidação é administrada para prevenir a recaída e erradicar o mínimo de doença residual que ainda possa existir após a indução. A citarabina em altas doses é o quimioterápico utilizado para consolidação, podendo ser administrado por até 4 ciclos ou assim que possível a realização do Transplante de Célula Tronco Hematopoiética (TCTHs). A indicação da realização do TCTHs é direcionada pela estratificação de risco prognóstico. O transplante constitui a melhor forma de prevenir a recorrência de doença, contudo em pacientes mais idosos, apresenta maior morbidade e mortalidade relacionadas ao tratamento. Em pacientes com LMA de risco favorável, o risco de recaída é baixo e a taxa de resposta alta, sendo o TCTHs indicado apenas para segunda remissão (MEDINGER; LENGKERKE; PASSWEG, 2016).

De acordo com Pelcovits, pacientes com < 55 anos apresentam taxa de sobrevida global em 5 anos de 44%, no entanto, quando estratificados usando o risco prognóstico do ELN, as taxas de sobrevida global foram de 64 %, 41% e 11% para o risco favorável, intermediário e desfavorável, respectivamente. A sobrevida global diminui quando os idosos são incluídos, mas a estratificação da sobrevida permanece constante (PELCOVITS; NIROULA, 2020).

A maioria dos pacientes com LMA que atinge uma remissão completa (RC) apresentará recaída, por meio da existência de subclones de células leucêmicas resistentes à quimioterapia padrão, que podem se expandir e manifestar a doença. Os avanços nos métodos diagnósticos permitiram: identificar diversas alterações citogenéticas e genético-moleculares envolvidas na evolução da LMA; compreender a função exercida por essas mutações na leucemogênese; entender os possíveis mecanismos de resistência das células tumorais e desenvolver terapias alvo específicas. Recentemente, houve aprovação de novos fármacos, para o tratamento da LMA, mudando a abordagem convencional de tratamento e reforçando a necessidade de serem

identificadas as anormalidades citogenéticas e as mutações moleculares envolvidas (TANG; SCHUH; YEE, 2021).

A estratificação dos pacientes com LMA em grupos de risco prognóstico tem alta relevância clínica na individualização da melhor estratégia terapêutica, para cada grupo de risco específico. Contudo, nem todos os serviços de assistência oncohematológica conseguem ofertar aos seus pacientes os exames de citogenética e avaliação molecular, o que dificulta a tomada de decisões terapêuticas baseada nos protocolos e consensos internacionais. Neste sentido, o método de imunofenotipagem por citometria de fluxo é um exame acessível na maioria dos hospitais que atendem pelo Sistema Único de Saúde, para realizar o diagnóstico, classificação e monitoramento de doenças clonais hematopoiéticas, particularmente as leucemias agudas. A alta sensibilidade e capacidade de análise simultânea de múltiplas características, tornou o método apropriado para a detecção de doença residual mensurável (DRM), parâmetro de fundamental importância prognóstica para a possibilidade de recidiva da doença (BROWN; WITTEW, 2000).

Diversos estudos se propuseram em avaliar o valor prognóstico de marcações imunofenotípicas na LMA. Contudo, os resultados dessa associação prognóstica, não foram reproduzidos uniformemente entre os grupos. Essa controvérsia pode ser atribuída ao número restrito de pacientes, diversidade dos painéis de anticorpos utilizados, falta de uniformidade entre os estudos e avaliação do valor prognóstico de marcadores individuais em vez de expressão de múltiplos antígenos (CHEN; CHERIAN, 2017; HENRIQUE et al., 2020a). Tais dificuldades fortalecem a necessidade de mais estudos que possam contribuir com a definição de marcadores imunofenotípicos como fatores prognósticos em LMA. Com o avanço tecnológico, foi possível a associação de alguns perfis imunofenotípicos em LMA, com anormalidades clínico-patológicas e alterações citogenéticas específicas, fazendo acreditar que a citometria de fluxo possa sugerir alterações genéticas subjacentes, tornando-se uma ferramenta útil para estratificação de risco e programação terapêutica (CHEN; CHERIAN, 2017; HENRIQUE et al., 2020a).

Considerando a maior acessibilidade ao método de citometria de fluxo na maioria dos serviços públicos, o estudo proposto tem intuito de contribuir para essa nova perspectiva de citometria alinhada com sistemas prognóstico e apoio para desenvolvimento de alvos terapêuticos futuros.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HEMATOPOIESE E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A hematopoiese consiste no processo biológico de diferenciação celular, coordenado pela interação entre fatores genéticos intrínsecos das células e seu microambiente, através de vias de sinalização para proliferação e maturação dos progenitores, até se tornarem células maduras especializadas (RIEGER; SCHROEDER, 2012b).

A diferenciação hematopoiética ocorre em diferentes órgãos e tecidos ao longo do desenvolvimento humano. A hematopoiese inicia-se trinta dias após a formação do embrião, de forma ainda primitiva, com as Células Tronco Hematopoiéticas (CTHs) localizadas no saco vitelínico e capazes de dar origem apenas a eritrócitos. A capacidade de gerar todas as linhagens hematopoiéticas e de autorrenovação das CTHs emerge na quarta semana de gestação, quando a produção passa a localizar-se na mesoderme, mais especificamente, nas regiões da Aorta-Gônadas-Mesonefrons (AGM). Em torno da 5ª semana, a hematopoiese migra da AGM para a placenta e fígado fetal, que são os principais locais de sua expansão. Posteriormente, em torno da 12ª semana de gestação, a MO passa a produzir as células do sangue. Após o nascimento, a MO é a única responsável pela produção das células hematopoiéticas, salvo em algumas situações patológicas, quando pode ocorrer expansão de tecido hematopoiético para regiões extramedulares, como baço e fígado. Nos primeiros anos da infância, a atividade hematopoiética pode ser detectada na MO de todos os ossos. Próximo da puberdade, há a substituição gradual da medula hematopoiética ativa (vermelha), por um tecido gorduroso (amarelo). Esse processo ocorre principalmente nos ossos longos e inicia-se nas diáfases, restringindo gradualmente o tecido hematopoiético ativo às epífises, além de ossos chatos como pélvis, crânio, vértebras, costelas e esterno (HENRIQUE PAIVA; MAGALHÃES REGO, 2013; RIEGER; SCHROEDER, 2012a).

De forma hierárquica e esquematizada (Figura 1), a diferenciação hematopoiética é representada, historicamente, por uma estrutura piramidal, na qual as CTHs estão localizadas no topo dessa estrutura e se diferenciam de células progenitoras pluripotentes, para progenitores multipotentes, que por sua vez, geram progenitores oligopotentes, comprometidos com a formação de células sanguíneas maduras (BRENDDEL; NEUBAUER, 2000; CHENG; ZHENG; CHENG, 2020a; NOTTA et al., 2016a).

A diferenciação celular ocorre de forma equilibrada, através da ativação e bloqueio de genes específicos para cada linhagem, permitindo uma adequada produção de células maduras,

tanto quantitativamente, como qualitativamente. A regulação dessa expressão gênica envolve a ativação de uma complexa rede de fatores de transcrição, citocinas e do microambiente da MO, que compreende a interação de vários outros tipos de células, incluindo, células mesenquimais, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, células reticulares, células de gordura que também influenciarão os destinos hematopoiéticos (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020; RIEGER; SCHROEDER, 2012).

A diferenciação e maturação do tecido hematopoiético normal pode ser avaliada pela morfologia celular. Contudo, foi a citometria de fluxo que forneceu informações relevantes sobre a hematopoiese celular através do reconhecimento de padrões fisiológicos de expressões antigênicas, assim como o reconhecimento de padrões patológicos, que alteram a hematopoiese normal, como é o caso das leucemias agudas (BRENDEL; NEUBAUER, 2000; VAN LOCHEM et al., 2004).

A identificação de moléculas na superfície celular e o reconhecimento da sua função, foi possível, através do uso de anticorpos monoclonais (mAbs), marcados com fluorocromos e analisados por citometria de fluxo multiparamétrica. Os antígenos celulares específicos ou “*cluster of differentiation*” são reconhecidos pela nomenclatura “CD” acrescida do número utilizado para definir os mAbs específicos (KALINA et al., 2019; MCKINNON, 2018). Essas moléculas incluem receptores, moléculas de adesão, enzimas ligadas à membrana e glicanos que desempenham vários papéis no desenvolvimento, ativação e diferenciação de leucócitos. Essas moléculas são expressas de forma diferenciada, sendo marcadores essenciais para a identificação e isolamento de diversos tipos celulares, sendo também possível traçar um perfil de expressão dinâmica de marcadores durante a diferenciação celular (KALINA et al., 2019).

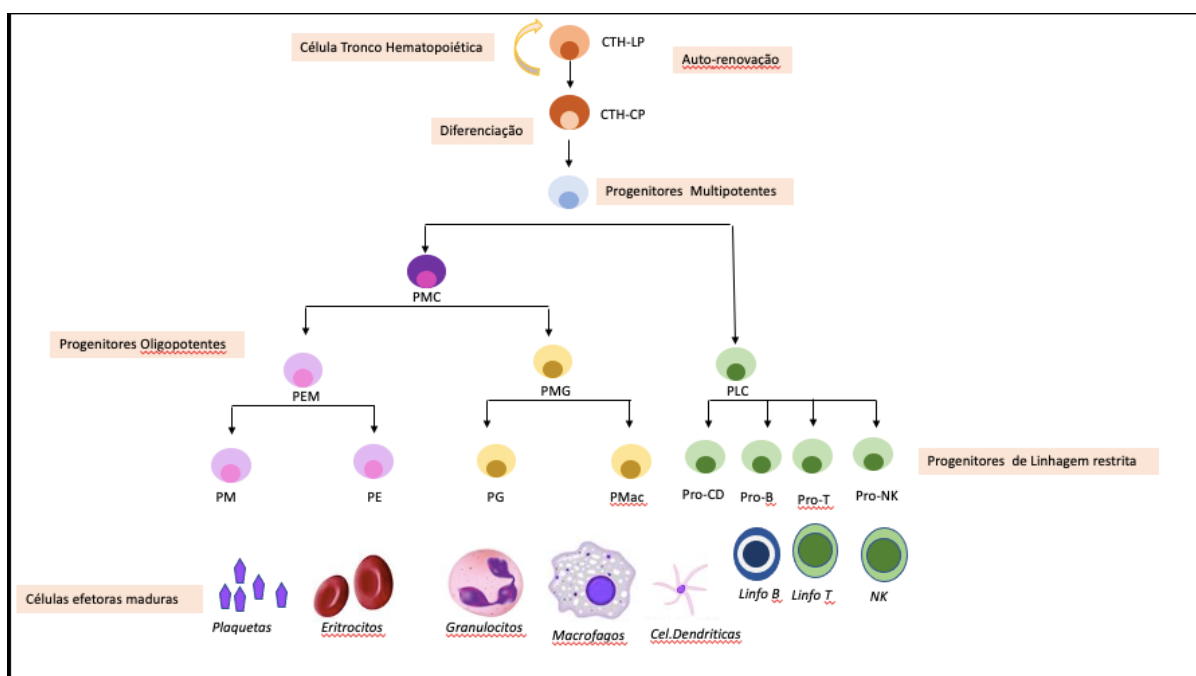
As CTHs foram descritas pela primeira vez por Till e McCulloch em 1961. As células-tronco caracterizam-se por seu potencial de autorrenovação e capacidade de proliferar e diferenciar-se em diversos tipos de células. As CTHs compreendem uma subpopulação muito pequena, menos de 0,01% das células da MO (MISAGHIAN et al., 2009). Elas podem ser reconhecidas pelo padrão de expressão dos antígenos de superfície CD34 e CD38, sendo caracterizadas como CD34 positivas (pós)/CD38 negativas (neg.). O antígeno CD34 é um marcador expresso no estágio precursor de várias linhagens celulares (BRENDEL; NEUBAUER, 2000).

Utilizando marcadores complementares para sua identificação, as CTHs podem ainda ser divididas em duas subpopulações de acordo com a expressão de CD34: CD34<sup>neg</sup> são as CTHs de longo prazo (CTHs-LP) e CD34<sup>pos</sup> são as CTHs de curto prazo (CTHs-CP). As CTHs-LP são responsáveis pela manutenção do *pool* hematopoético imaturo e indiferenciado,

geralmente estão na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular, de forma que se mantêm relativamente constantes e presentes ao longo de toda a vida, sofrendo poucos ciclos de divisões mitóticas. As CTHs-CP são quiescentes, como as anteriores, entretanto se originam de divisões celulares assimétricas das CTHs-LP, resultando em uma célula-filha CTHs-LP e outra CTHs-CP, que por sua vez, gera progenitores multipotentes, que vão dar origem aos progenitores comuns das linhagens linfóide e mielóide, dando seguimento a linfopoiese e mielopoiese, respectivamente (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020a; HENRIQUE PAIVA; MAGALHÃES REGO, 2013).

O progenitor linfóide comum (PLC), derivado diretamente do progenitor multipotente, se diferenciara em células T, B, NK e dendríticas (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020a; NOTTA et al., 2016a).

A diferenciação da linhagem mielóide ocorrerá a partir dos progenitores mielóides comuns (PMC) oligopotentes, que sofrerão restrição adicional em progenitores bivalentes monocíticos-granulocíticos (PMG) que passam a produzir granulócitos e monócitos, e progenitores eritroides-megacariocíticos (PEM) que passam a produzir glóbulos vermelhos e plaquetas, conforme representado na Figura 1 (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020a; NOTTA et al., 2016a).

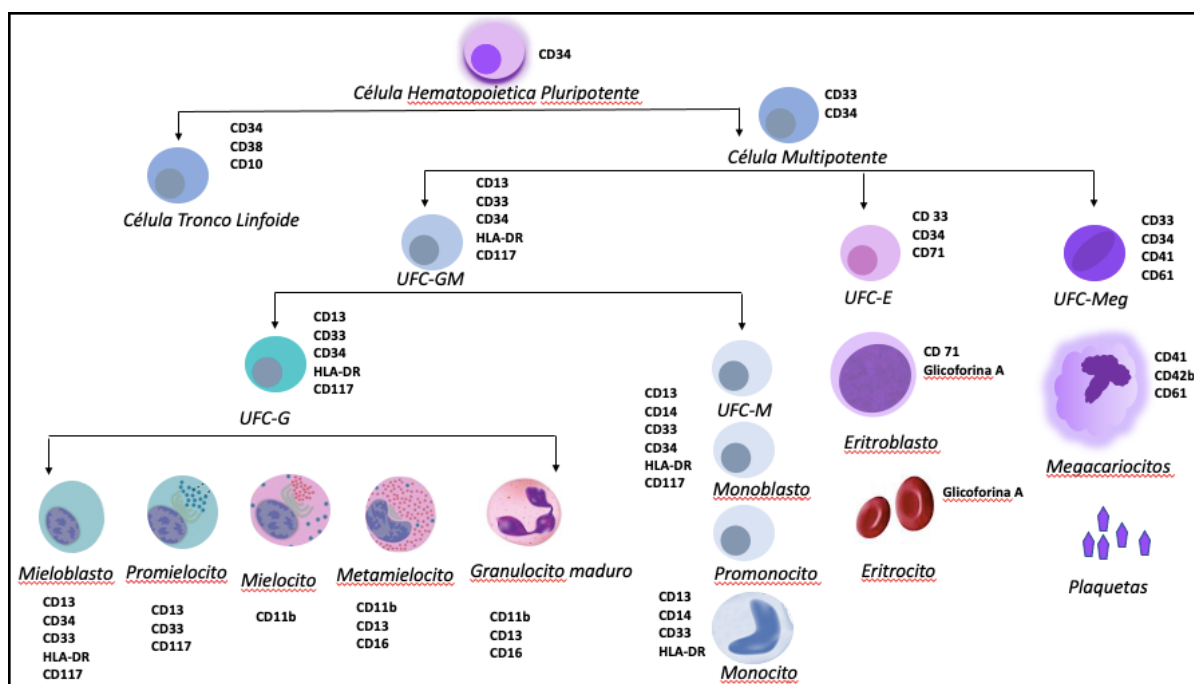


**Figura 1** - Representação clássica da diferenciação hematopoiética

CTH-LP: Célula Tronco Hematopoiética de Longo Prazo; CTH-CP: Célula Tronco Hematopoiética de Curto Prazo; PMC: Progenitores Mielóides Comuns; PLC: Progenitores Linfóides Comuns; PEM: Progenitores Eritroides-Megacariocíticos; PMG: Progenitores Monocíticos-Granulocíticos; PM: Progenitor Megacariocítico; PE: Progenitor Eritrocítico; PG: Progenitor Granulocítico; PM: Progenitor Macrofágico; Pro-CD: Progenitor Células Dendríticas; Pro-B: Progenitor B; Pro-T: Progenitor T; Pro-NK: Progenitor NK

**Fonte:** (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020).

Ao longo da diferenciação granulocítica, a célula apresentará um perfil imunofenotípico específico, conforme o seu estágio maturativo, como representado na Figura 2. As células precursoras granulocíticas mais imaturas, **os mieloblastos**, são representados pelo imunofenótipo:  $CD34^{pos}CD117^{pos}HLA-DR^{pos}$ ,  $CD45^{int}$ ,  $CD13^{pos}$  e  $CD33^{pos}$ ; **os promielócitos** caracterizam-se por serem células  $CD117^{pos}CD34^{int}$ ,  $CD13^{pos}$  e  $CD33^{pos\ alto}$  e perdem HLA-DR; **os mielócitos** não expressam CD117, expressão baixa ou negativa de CD13 e adquirem o receptor de integrina/complemento CD11b; **os metamielócitos** re-expressam o CD13 e expressam o CD16. Na diferenciação granulocítica, o CD13 é um marcador dinâmico, expresso de forma elevada em mieloblastos e promielócitos, baixo ou não expresso em mielócitos, voltando a se expressar à medida que as células granulocíticas se desenvolvem em neutrófilos segmentados. Os neutrófilos maduros que circulam no sangue periférico, apresentam o imunofenótipo  $CD11b^{pos\ alto}CD16^{pos\ alto}CD13^{pos\ alto}$  (ORFAO et al., 2019a; VAN LOCHEM et al., 2004).



**Figura 2** - Diferenciação da linhagem mielóide e perfil imunofenotípico conforme estágio maturativo  
 UFC-GM: Unidade Formadora de Colônia Granulocítica-Monocítica; UFC-G: Unidade Formadora de Colônia Granulocítica; UFC-M: Unidade Formadora de Colônia Monocítica; UFC-E: Unidade Formadora de Colônia Eritroide; UFC-Meg: Unidade Formadora de Colônia Megacariocítica  
**Fonte:** Elaborado pela autora

Os precursores monocíticos  $CD34^{pos}$  precoces representam cerca de 20-25% de todas as células  $CD34^{pos}$ , na MO. A co-expressão de CD34 e CD64 define o comprometimento da célula tronco hematopoiética com a linhagem monocítica na MO. Os precursores monocíticos, os



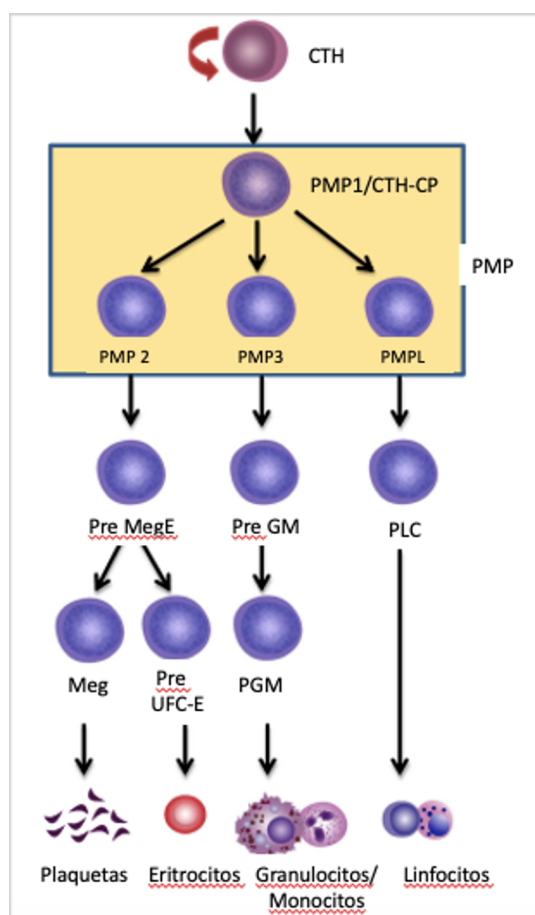
monoblastos, mantem a expressão de CD13 e CD33, este último com expressivo aumento de expressão, observado em toda a linhagem monocítica (CD33<sup>alto</sup>) e apresentam um fenótipo CD34<sup>pos</sup>HLA-DR<sup>pos</sup>CD117<sup>pos</sup>CD45<sup>pos</sup>, associado à reatividade heterogênea para CD64<sup>pos/alto</sup>. Progressivamente os monoblastos vão perder os marcadores associados à célula tronco hematopoiética, como o CD34 e CD117 e seguindo o processo de diferenciação, os precursores monocíticos apresentarão níveis positivos sequencialmente maiores de CD11b e CD14 (de monoblastos a promonócitos e monócitos maduros) e de CD300e e CD312 (de promonócitos a monócitos maduros). A expressão de CD14 marca o estágio de monócitos. Em contraste com os neutrófilos, as células monocíticas retêm HLA-DR durante sua maturação (ORFAO et al., 2019a; VAN LOCHEM et al., 2004).

A maturação da linhagem megacariocítica está associada à perda da expressão de CD34, CD117 e HLA-DR, juntamente com a coexpressão de CD61, CD41 e CD42 (ORFAO et al., 2019a; VAN LOCHEM et al., 2004).

A linhagem eritroide está associada a aumento na expressão do receptor de transferrina (CD71) e glicoforina A (CD235a). Os precursores eritroides precoces correspondendo principalmente a pró-eritroblastos, caracterizados por CD34<sup>pos</sup> CD105<sup>pos</sup> e CD36<sup>pos</sup>. Em seguida, definindo a transição de eritroblastos policromatófilos para eritroblastos ortocromáticos observamos a regulação positiva da glicoforina A (CD235a<sup>pos</sup>). Posteriormente, durante a enucleação celular, os precursores eritroides retêm CD235a e perdem a expressão de CD36 e CD71, dando origem a reticulócitos e eritrócitos maduros. As células da linhagem eritroide são geralmente identificadas pela perda gradual de CD45. Apenas os precursores eritroides e pró-eritroblastos expressam CD45 fraco (ORFAO et al., 2019a; VAN LOCHEM et al., 2004).

O modelo hierárquico de diferenciação hematopoiética, separada por estágios, é apenas uma representação simplificada da complexidade da célula tronco hematopoiética progenitora (RIEGER; SCHROEDER, 2012). A diferenciação hematopoiética é um processo contínuo, onde as CTHs gradualmente adquirem tendências de linhagem ao longo de várias direções, não havendo dessa forma fronteira definida entre células-tronco e progenitores, diferente do modelo hierárquico tradicionalmente postulado em forma de árvore seguindo dos progenitores oligo, aos bi- e onipotentes (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020c). Com o conhecimento mais detalhado da CTHs e o melhor entendimento da hematopoiese, foi postulado um novo modelo de diferenciação hematopoiética, baseado na heterogeneidade da célula tronco hematopoiética (Figura 3). Esse modelo sugere que os progenitores Eritroides-Megacariocíticos podem ser derivados diretamente de CTHs, sem progredir através dos progenitores diferenciados

multipotentes (MPPs) ou dos progenitores mielóides comuns convencionais (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020c; NOTTA et al., 2016b). Com o avanço nas tecnologias e a possibilidade de novas descobertas, espera-se que mais subtipos de células-tronco e progenitoras sejam descobertos, ampliando ainda mais o conhecimento atual sobre hematopoiese (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020a).



**Figura 3** - Novo modelo da diferenciação hematopoiética baseado na heterogeneidade da célula tronco. Os progenitores Eritroides-Megacariocíticos podem ser derivados diretamente de CTHs, sem progredir através dos progenitores diferenciados multipotentes ou dos progenitores mielóides comuns convencionais. CTHs: Células Tronco Hematopoiéticas; PMP: Progenitores Multipotentes; CTHs-CP: CTHs de Curto Prazo; PMPL: Progenitores Multipotentes Linfocítico; Pre MegE: Pré Megacariocítico-Eritrocítico; Pre GM: Pré Granulocíticos Monocíticos; Pre-UFC-E: Pré Unidade Formadora de Colônia Eritrocítica; PLC: Progenitor Linfoide Comum; Meg: Megacariócito.

**Fonte:** (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020).

## 2.2 LEUCEMOGÊNESE

A Leucemogênese é consequência do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, nas CTHs pré-leucêmicas (YAMASHITA et al., 2020).

Em 1994, Dick e colaboradores identificaram que tanto as células tronco hematopoiéticas, como as células tronco leucêmicas eram encontradas dentro da fração imatura

de células CD34<sup>pos</sup>CD38<sup>neg</sup>, contudo a subpopulação de células tronco leucêmicas representa apenas uma pequena fração do total de blastos leucêmicos. Essas frações de células imaturas podem ser identificadas, através de marcadores celulares distintos (MISAGHIAN et al., 2009).

As células tronco leucêmicas geralmente não expressam CD90, CD117, CD71 e HLA-DR, por outro lado expressam CD123, CD33, CLL-1 e CD96. O CD33 é expresso na superfície celular de algumas CTHs normais, mas a CLL-1 é detectada exclusivamente em células CD34<sup>pos</sup> e CD38<sup>neg</sup> malignas (MISAGHIAN et al., 2009).

O fenótipo das células tronco leucêmicas, CD34<sup>pos</sup>/CD38<sup>neg</sup>/HLA-DR<sup>neg</sup>, sugere que os eventos genéticos associados à transformação e progressão da leucemia ocorrem em células primitivas e não em progenitores comprometidos com outras linhagens celulares (KANTARJIAN et al., 2021a). A progressão e manifestação do fenótipo leucêmico requer a aquisição de eventos mutacionais adicionais nas célula-tronco “pré-leucêmicas”. Essas mutações leucemogênicas podem ocorrer após quimioterapia, radiação ionizante, exposição química e infecção por retrovírus. Além disso, certas mutações deletérias típicas de síndromes de predisposição ao câncer familiar estão associadas a um aumento da incidência de LMA (KANTARJIAN et al., 2021a).

De acordo com o modelo proposto da leucemogênese de “2 hits”, a evolução para LMA é consequência de dois tipos de mutações: mutações classe I que conferem uma vantagem proliferativa (ex. FLT3-ITD, K-RAS, KIT) e mutações classe II que prejudicam a diferenciação hematopoiética e aumentam propriedades de autorrenovação (ex. CEBPA). De acordo com este modelo, essas mutações atuam em conjunto para iniciar e conduzir a progressão da LMA. Os primeiros eventos de seleção mutacional que conferem aptidão competitiva as CTHs pré-leucêmicas ocorrem em enzimas que regulam a metilação do DNA, um dos principais mecanismos epigenéticos que controlam a diferenciação hematopoiética (YAMASHITA et al., 2020). Alterações no nicho da medula óssea, juntamente com o aumento da sinalização inflamatória crônica, contribuem para o estabelecimento de um microambiente medular favorável à expansão clonal das células pré-leucêmicas, seja por desfavorecimento da hematopoiese normal, promovendo diretamente a mutagênese ou aumentando o potencial oncogênico de clones mutantes (YAMASHITA et al., 2020). A desregulação gênica da maquinaria pós-transcricional, incluindo metilação e *splicing* de RNA, além de mutações em reguladores epigenéticos cooperam na leucemogênese. Cada enzima epigenética pode apresentar propriedades supressoras de tumor e oncogênicas (GUERRA A VERONICA; DINARDO COURTNEY; KONOPLEVA MARINA, 2019; YAMASHITA et al., 2020). O gene da proteína BCL-2 que codifica uma proteína envolvida na regulação do apoptose

encontra-se superexpresso nas células tronco leucêmicas, causando inativação das proteínas pró-apoptóticas, aumentando a sobrevivência das células tumorais e sua quimiorresistência (BACHAS et al., 2010; YAMASHITA et al., 2020).

## 2.3 LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

### 2.3.1 Histórico

Os primeiros relatos de leucemia foram feitos no início do século XIX, por patologistas que reconheceram pacientes que apresentavam níveis inesperadamente elevados de glóbulos brancos. O relato mais antigo da doença foi feito por Velpeau, em 1827. Contudo, foi em 1845 que John Hughes Bennett, publicou o primeiro caso de leucemia no “Edinburgh Medical and Surgical Journal”, passando a caracterizá-la como uma entidade clínica e como uma doença relacionada ao sangue (THOMAS, 2013).

O termo leucemia, surgiu apenas em 1856, quando o patologista alemão Rudolf Ludwig Karl Virchow, descreveu o excesso de glóbulos brancos nos doentes com a síndrome clínica relatada por Velpeau e Bennett como "leucemia", do grego "glóbulos brancos", para referir-se a condição analisada. Em 1877, Paul Ehrlich desenvolveu uma técnica de coloração que permitiu a classificação da leucemia no grupo mieloide e no grupo linfóide (THOMAS, 2013).

Em 1889, foi introduzido o termo “leucemia aguda” por Wilhelm Ebstein para diferenciar os casos de progressão rápida dos casos de leucemia crônica, contudo, foi somente em 1913, que a leucemia foi classificada em quatro tipos: leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica aguda e leucemia mieloide aguda (THOMAS, 2013).

### 2.3.2 Definição

A LMA compreende um grupo de doenças biologicamente heterogêneas, que se desenvolvem a partir de uma série de alterações genéticas na célula precursora hematopoiética, responsáveis pelas variedades de apresentações clínicas, características morfológicas e imunofenotípicas. É uma patologia complexa e dinâmica, caracterizada por diversas mutações e coexistência de clones concorrentes ao longo da evolução da doença (DÖHNER et al., 2017; NARAYANAN; WEINBERG, 2020). Essas alterações modificam o crescimento e a diferenciação do tecido hematopoiético normal, resultando em um acúmulo de grande número

de células mieloides anormais e imaturas na MO e no SP que são capazes de se dividir e proliferar, mas incapazes de se diferenciar em células maduras (KANTARJIAN et al., 2021a).

Geralmente, os pacientes apresentam um curso clínico agressivo, atingindo remissão completa (RC) após terapia quimioterápica de indução, em torno 60-80% dos adultos jovens e em 40-60% dos adultos mais velhos ( $\geq 60$  anos). Contudo, as recaídas são frequentes, ocorrendo em torno de 30-40% e reduz progressivamente a sobrevivência a longo prazo (AITKEN et al., 2021; DÖHNER et al., 2017; HORIBATA et al., 2019).

### 2.3.3 Epidemiologia

A leucemia mieloide aguda é a segunda leucemia mais comum em adultos, representando aproximadamente 1% de todos os cânceres em adultos, nos Estados Unidos. O registro de câncer de base populacional dos EUA, o *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)*, fonte autorizada para estatística de câncer nos Estados Unidos, estimou que 20.050 pessoas seriam diagnosticadas com LMA em 2022 e 11.540 morreriam da doença (“SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia. National Cancer Institute. Bethesda, MD”, [s.d.]). De acordo com a SEER, a idade média ao diagnóstico é de 68 anos, mais frequentemente diagnosticado entre 65 e 74 anos (CARTER et al., 2020; POLLYEA et al., 2021; SHALLIS et al., 2019). É uma doença de idosos, com uma incidência ajustada para idade de 20,1 por 100.000 pessoas-ano, para pacientes com  $\geq 65$  anos e de 2,0 por 100.000 pessoas-ano para aqueles com idade  $<65$  anos (CARTER et al., 2020). Além disso, a incidência é modestamente aumentada em homens em comparação com mulheres e em caucasianos em comparação com outros grupos étnicos (CARTER et al., 2020).

Segundo dados projetados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), para cada ano do triênio 2020-2022, o número de casos novos de leucemia esperados para o Brasil, foi de 5.920 casos em homens e de 4.890 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,67 casos novos a cada 100mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres. Especificamente para a Região Nordeste, sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia em homens é a sétima neoplasia mais frequente, com uma incidência de 5,02/100 mil, e em mulheres ocupa a décima posição com uma incidência de 4,06/100mil (“Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - Rio de Janeiro: INCA”, [s.d.]). A menor incidência de casos de LMA no Brasil, quando comparado aos países desenvolvidos, pode se justificar tanto pelo subdiagnóstico, como também pela

menor expectativa de vida e reduzido pico de incidência em idosos, nos países em desenvolvimento (REGO et al., 2003).

#### 2.3.4 Manifestações clínicas

A apresentação clínica, ao diagnóstico, varia desde alterações nos exames laboratoriais em paciente assintomático, até presença de sinais e sintomas clínicos decorrentes da falência medular. As manifestações clínicas podem variar desde fadiga, dispneia, febre, infecção e sangramento, decorrentes da anemia, leucopenia e/ou plaquetopenia. Outras manifestações envolvendo sinais e sintomas do acometimento do sistema nervoso central e pulmonar podem ocorrer secundários a síndrome de hiperviscosidade pela leucostase ou até mesmo pela infiltração direta das células blásticas no sistema nervoso central. A apresentação extramedular, caracteriza-se pela infiltração de precursores neoplásicos granulocíticos ou monocíticos, os Sarcomas Mieloides, em qualquer órgão, sendo os mais frequentes acometidos os tecidos moles, periósteo e gânglios linfáticos. Quando o envolvimento extramedular se dá na pele, envolvendo a epiderme, derme ou tecido subcutâneo, esta patologia é denominada *Leukemia Cutis* (CARTER et al., 2020; NARAYANAN; WEINBERG, 2020; PELCOVITS; NIROULA, 2020).

#### 2.3.5 Fatores de risco

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento da LMA ainda não estão muito bem estabelecidos, haja vista a etiologia da maioria dos casos ser desconhecida. Diferente de outras neoplasias que identificamos os fatores de risco associados ao surgimento do câncer, sendo possível atuar preventivamente, na LMA não é possível atuar de modo preventivo. Contudo, algumas situações estão associadas a um aumento na incidência de LMA: idade avançada; sexo masculino; tabagismo; exposição a produtos químicos (benzeno, formaldeído); história prévia de neoplasias mieloproliferativas crônicas (policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose idiopática); SMD; exposição a quimioterápicos (agentes alquilantes, inibidores da topoisomerase II); exposição à radiação; síndromes genéticas (Síndrome de Down) e história familiar de LMA (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

## 2.4 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico de LMA é confirmado na identificação morfológica de  $\geq 20\%$  de mieloblastos ou equivalentes de blastos (promielócitos, monoblasto e promonócito), no aspirado de MO ou SP conforme os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) ou, menos que esta porcentagem de blastos, em casos de detecção de translocações cromossômicas recorrentes:  $t(15;17)(q22;q12)$ ;  $t(8;21)(q22;q22)$ ;  $inv(16(p13q22))$ . Portanto, para fins de diagnóstico de LMA deve-se examinar morfológicamente as células blásticas da medula óssea, proceder à imunofenotipagem para confirmação da linhagem blástica e à análise citogenética e genético-molecular. O estudo citogenético e molecular torna-se fundamental para o reconhecimento das LMA com  $< 20\%$  de infiltração blástica em medula óssea e com translocação cromossômica recorrentes. (DÖHNER et al., 2017; NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

## 2.5 CLASSIFICAÇÃO

A leucemia mielóide aguda é um grupo heterogêneo de doenças hematológicas, todavia, os sistemas de classificação da LMA, visam agrupar os pacientes conforme características e perfis biológicos mais precisos e de comportamento clínico mais semelhante. Com a evolução de métodos diagnósticos por citometria de fluxo, citogenética e avaliação molecular, novos conhecimentos sobre LMA foram descobertos e essas informações eram incorporadas por outros sistemas de classificação. Os sistemas de classificação fornecem informações valiosas, acerca do comportamento biológico do tumor, do prognóstico e até mesmo de possíveis alvos terapêuticos (DÖHNER et al., 2017; NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

### 2.5.1 Classificação Franco-Americana-Britânica (FAB)

Na década de 1970, um grupo de especialistas em leucemia, composto por franceses, americanos e britânicos classificou a LMA em subtipos, M0 a M7, com base na maturidade e no tipo de célula leucêmica precursora, conforme evidenciado na tabela 1 (BENNETT et al., 1985).

A classificação FAB utiliza-se de características morfológicas do blasto, complementada por coloração histoquímica, para distinguir as oito categorias de LMA. Apesar de amplamente utilizada por décadas, a classificação FAB não fornece dados prognósticos,

carece de informações citogenéticas e moleculares importantes, além de pouco impacto no manejo da LMA (BENNETT et al., 1985; DÖHNER et al., 2017).

**Tabela 1** - Classificação FAB da Leucemia Mielóide Aguda, 1985

<b>Subtipo FAB</b>	<b>Nome</b>
M0	Leucemia Aguda não classificada (mAbs anti MPO+)
M1	Leucemia mielóide de blastos indiferenciados
M2	Leucemia mielóide típica de blastos diferenciados
M3	Leucemia promielocítica hipergranular
M3v	Leucemia promielocítica hipogranular
M4	Leucemia mielo-monocítica
M4eos	Leucemia mielo-monocítica com eosinofilia
M5a	Leucemia monoblástica
M5b	Leucemia monocítica (pro monócito e monoblasto)
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia megacarioblástica

Classificação FAB: Classificação Franco-Americana-Britânica; mAbs antiMPO: anticorpo monoclonal anti-mieloperoxidase.

**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 2.5.2 Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)

A classificação da OMS de 2016 é baseada na integração de características clínicas, morfológicas, imunofenóticas, citogenéticas e moleculares das células leucêmicas. Essa classificação distingue seis entidades biológicas de LMA: 1- LMA com anormalidades genéticas recorrentes; 2- LMA com características relacionadas à mielodisplasia, 3- LMA relacionada à terapia, 4- LMA sem outra especificação (SOE), 5- Sarcoma mielóide e 6- Proliferações mieloides relacionadas à síndrome de Down (SD), conforme visto na figura 4 (DÖHNER et al., 2017)

Apesar da classificação da OMS incorporar um número maior de informações na categorização das LMA, a classificação FAB ainda é utilizada na descrição das LMA sem outras especificações (SOE). Embora algumas categorias de LMA da OMS estejam associadas a desfechos clínicos específicos, essa classificação não destina-se a estratificação prognóstica. (DÖHNER et al., 2017).



<b>Leucemia Mielóide Aguda e neoplasias precursoras relacionadas - OMS 2016</b>
<b>LMA com anormalidades genéticas recorrentes</b>
Leucemia mieloide aguda com translocação/inversão balanceada
* LMA com t (8;21) (q22; q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
* LMA com inv (16) (p13.1q22) ou t(16;16) (p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
* Leucemia promielocítica aguda com <i>PML-RARA</i>
* LMA com t (9;11) (p21.3; q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
* LMA com t (6;9) (p23; q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
* LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EV11)</i>
* LMA (megacarioblástico) com t (1;22) (p13.3; q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
* LMA com <i>BCR-ABLI</i> - entidade provisória
LMA com mutação genética
* LMA com mutação em <i>NPM1</i>
* LMA com mutações bialélicas de <i>CEBPA</i>
*LMA com mutação do <i>RUNX1</i> - entidade provisória
<b>LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia</b>
<b>Neoplasias mieloides relacionadas à terapia</b>
<b>LMA, sem outras especificações (SOE)</b>
*LMA com diferenciação mínima
*LMA sem maturação
* LMA com maturação
*Leucemia mielomonocítica aguda
* Leucemia monoblástica/monocítica aguda
* Leucemia eritroide pura
*Leucemia megacarioblástica aguda
* Leucemia basofílica aguda
* Panmielose aguda com mielofibrose
<b>Sarcoma mieloide</b>
<b>Proliferações mieloides relacionadas à síndrome de Down</b>
* Mielopoiese anormal transitória associada com à Síndrome de Down
* Leucemia mieloide associada à síndrome de Down

**Figura 4** - Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para as LMA SOE: *Sem outras especificações*  
**Fonte:** (DÖHNER et al., 2017).

As neoplasias mieloides relacionadas à terapia (NM-t) são uma categoria distinta dentro da classificação da OMS, incluindo os casos de síndrome mielodisplásicas relacionadas à terapia (SMD-t) e leucemia mieloide aguda relacionadas à terapia (LMA-t). A LMA-t é uma complicação tardia, consequência direta de eventos mutacionais induzidos após terapia citotóxica, para uma neoplasia primária ou para uma patologia não neoplásica. Atualmente a incidência de LMA-t compreende ~7% de todas as LMA recém-diagnosticadas, o que justifica-se pelo aumento da sobrevida dos pacientes oncológicos e por sucessivas exposições a terapias quimioterápicas. O subtipo mais comum, observado em ~75% dos pacientes, geralmente ocorre 5-7 anos após a primeira exposição a agentes alquilantes ou radiação. Geralmente, a LMA-t é precedido por um Síndrome Mielodisplásica (SMD), podendo apresentar anormalidades nos cromossomos 5 e/ou 7, cariótipo complexo e mutação no TP53 (DÖHNER et al., 2017).

A história clínica e/ou o exame físico podem apontar para tipos específicos de LMA. Características físicas relacionadas à síndrome de Down em um paciente com LMA devem levantar a suspeita de neoplasias mieloides associadas à Síndrome de Down; assim como história familiar de LMA, deve levantar a suspeita de predisposição hereditária e a exposição prévia à quimioterapia citotóxica e/ou radioterapia, à possibilidade de LMA-t (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

## 2.6 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

### 2.6.1 Laboratório básico

A identificação laboratorial de anemia, leucocitose ou leucopenia e/ou trombocitopenia, ao exame do hemograma, é consequência da proliferação das células blásticas clonais na MO que substitui a hematopoiese normal, impedindo a diferenciação e maturação das células constituintes do sangue. Outros exames laboratoriais que auxiliam na condução da LMA são: avaliação bioquímica geral, para acessar o grau de comprometimento de outras funções orgânicas ou comprometimento prévio, por outras comorbidades de base; perfil sorológico; marcadores prognósticos (lactato desidrogenase (LDH) e ácido úrico), além da avaliação do perfil de coagulação e tipagem do Antígeno Leucocitário Humano do inglês *Human Leukocyte Antigens* (HLA) do paciente (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

### 2.6.2 Citomorfologia

A avaliação morfológica inclui a análise citomorfológica do blasto, a identificação da proporção de células não blásticas e o grau de displasia. Além disso, colorações citoquímicas podem ser realizadas no aspirado para auxiliar na identificação da linhagem (NARAYANAN; WEINBERG, 2020). Recomenda-se que sejam contados pelo menos 200 leucócitos nos esfregaços de SP e 500 células nucleadas na MO. Em caso de inadequação da amostra do mielograma ou difícil obtenção de material pelo aspirado, outros métodos laboratoriais como a imunofenotipagem de MO e a biópsia de MO com imunohistoquímica, podem ser úteis para quantificar os blastos. Contudo, deve ser considerado que essas técnicas podem subestimar a contagem de blastos na MO (DÖHNER et al., 2017; NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

A anatomia patológica da MO detecta anormalidades arquitetônicas que auxiliam na identificação do subtipo de LMA, como por exemplo: a presença de necrose pode estar associada à leucemia eritroide aguda e a presença de fibrose pode estar associado à diferenciação megacariocítica e à panmielose com mielofibrose. Em casos de apresentação extra medular e sem envolvimento aparente de MO ou SP, a biópsia do tecido acometido deve ser usado para acessar o diagnóstico (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

### 2.6.3 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) é um método objetivo, capaz de analisar quantitativamente e qualitativamente, múltiplas características de centenas a milhões de células individuais, de forma simultânea, em um curto intervalo de tempo (ADAN et al., 2017; MCKINNON, 2018; ORFAO et al., 2019).

O exame consiste no reconhecimento de antígenos celulares específicos para uma determinada linhagem, seja ele de superfície celular ou intracelulares, através da marcação da célula por anticorpos direcionados contra esses antígenos e que são conjugados a fluorocromos (MCKINNON, 2018; ORFAO et al., 2019).

A técnica de citometria de fluxo além de fazer o reconhecimento de linhagens celulares, permite avaliar células ou partículas em suspensão como: microrganismos, citocinas, hormônios, fatores de crescimento ou componentes celulares como organelas, núcleos, DNA e RNA. Deste modo, características intrínsecas e extrínsecas das células tais como: tamanho; granulosidade; pigmentação; autofluorescência; viabilidade; conteúdo de DNA; estrutura de membrana celular; citoesqueleto; receptores internos e externos; avaliação de atividade

enzimática; metabolização de drogas ou compostos; ativação celular; apoptose; ciclo celular; eficiência de transfecção ou transdução; além de avaliação de resposta terapêutica, pode ser investigado, utilizando-se dessa metodologia diagnóstica. Devido a extensa possibilidade de aplicações, o exame de citometria de fluxo tem aplicabilidade em várias disciplinas, como hematologia, imunologia, virologia, biologia molecular, biologia do câncer e monitoramento de doenças infecciosas (ADAN et al., 2017; MCKINNON, 2018; ORFAO et al., 2019a).

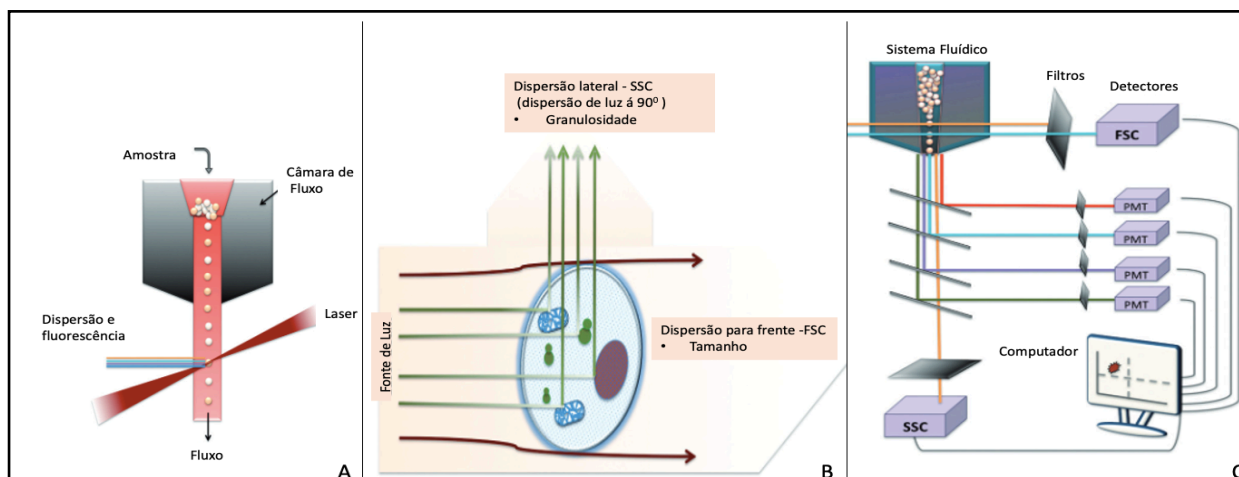
O exame de citometria de fluxo, anteriormente disponível apenas em grandes centros acadêmicos, foi evoluindo em tecnologia, através da ampliação do potencial analítico dos instrumentos, com o desenvolvimento de novos fluorocromos e com a evolução dos aparelhos que tornaram-se menores e mais acessíveis, possibilitando a sua utilização tanto em instituições públicas como privadas (BROWN; WITTEWER, 2000; ORFAO et al., 2019a).

#### 2.6.3.1 Leitura e análise por citometria de fluxo

As células ou partículas de interesse para análise, são colocadas em suspensão, sendo conduzidas de forma linear no interior do aparelho até a câmara de fluxo. Neste local, a amostra será analisada pela interceptação do laser, conforme representado na Figura 5 A. (ADAN et al., 2017; BROWN; WITTEWER, 2000; MCKINNON, 2018).

A incidência do laser resultará no espalhamento da luz que será captada por detectores compostos por um conjunto de filtros, lentes e espelhos (Figura 5B). A intensidade do espalhamento da luz é proporcionada por características morfológicas das células, sendo detectadas pelos parâmetros *Forward Scatter* ou FSC, dispersão para a frente, e *Side Scatter* ou SSC, dispersão lateral, que traduzem tamanho celular e complexidade celular, respectivamente.

Além de características morfológicas, antígenos de interesse podem ser identificados por marcações com fluoróforos que serão excitados pelo laser e a fluorescência emitida será captada pelo conjunto de espelhos e filtros ópticos. Através dos programas de análise é possível selecionar subpopulações específicas de interesse para realizar subanálises. Todas as informações captadas podem ser representadas por gráficos do tipo de histograma, dot plot ou contour plots, dependendo da análise e informação desejada, figura 5 C. (ADAN et al., 2017; BROWN; WITTEWER, 2000; MCKINNON, 2018; ORFAO et al., 2019).



**Figura 5** - Princípios de funcionamento de um citômetro de fluxo A-Foco hidrodinâmico na câmara de fluxo e interceptação do laser; B- Dispersão de luz. O FSC é proporcional ao tamanho, enquanto o SSC é proporcional à granulidade da célula ou à complexidade interna. C-Processamento e detecção de sinal e componentes de um citômetro de fluxo. FSC: *Forward Scatter* ou, dispersão para a frente, e SSC: *Side Scatter* ou dispersão lateral. **Fonte:** (ADAM et al., 2017).

### 2.6.3.2 Fenótipos Aberrantes

As células hematopoiéticas tumorais imitam as características fenotípicas de suas correspondentes normais, de forma que os padrões dos fenótipos aberrantes podem ser classificados, conforme a alteração apresentada em: 1- Expressão assíncrona de antígeno, ou seja, ausência ou expressão de marcadores em estágios distintos da maturação hematopoiética; 2- Intensidade de expressão do marcador numa dada população de células, podendo estar diminuída (subexpressão) ou aumentada (superexpressão); 3- Presença de fenótipos mistos de linhagem, definidos pela co-expressão de dois ou mais marcadores de linhagens diferentes, na mesma célula tumoral (ORFAO et al., 2019a).

O fenótipo aberrante mais frequente observado nas células hematopoiéticas clonais é a expressão assíncrona do antígeno. Por outro lado, o fenótipo misto de linhagem representa o padrão aberrante mais confiável para identificar as células tumorais clonais e monitorar DRM, mesmo em concentrações muito reduzidas (ORFAO et al., 2019a).

### 2.6.3.3 O papel da imunofenotipagem na leucemia mieloide aguda

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é essencial para o diagnóstico, classificação e monitoramento das doenças hematopoiéticas clonais, particularmente na diferenciação das leucemias agudas (BROWN; WITTEWER, 2000). Ao diagnóstico de leucemia aguda, o principal objetivo da imunofenotipagem é confirmar a imaturidade da população

suspeita de blasto e definir a linhagem específica, se linfóide ou mieloide, pois a avaliação morfológica fornece apenas uma caracterização parcial da linhagem envolvida (BÉNÉ, 2005).

Os painéis de anticorpos monoclonais da citometria de fluxo auxiliam na subclassificação da LMA, conforme linhagem hematopoiética envolvida e na identificação do padrão individual de expressão antigênica, para monitoramento (BÉNÉ, 2005; CHEN; CHERIAN, 2017). Dessa forma, é possível avaliar a profundidade de resposta, através da pesquisa de DRM, monitorar a evolução da doença e prever o risco de recaída, auxiliando na tomada de decisões, na prática clínica (HEUSER et al., 2021).

A alta sensibilidade e capacidade de análise simultânea de múltiplas características tornam o método apropriado para a detecção de DRM, especialmente se houver padrões anormais de expressão antigênica. A leitura das marcações celulares por citometria de fluxo e a sua interpretação diagnóstica, depende da combinação dos antigênicos, da sua frequência e da intensidade de fluorescência apresentada (BROWN; WITTEW, 2000; ORFAO et al., 2019).

#### 2.6.4 Aspecto de citogenética e genética molecular

A avaliação citogenética e molecular na LMA, pode fornecer informações relevantes acerca do diagnóstico, da classificação, do prognóstico e influencia diretamente na tomada de decisões terapêuticas. Desta maneira, a detecção de translocações cromossômicas recorrentes: t(15;17) (q22;q12); t(8;21)(q22;q22); inv(16(p13q22) é suficiente para o diagnóstico de LMA, mesmo com percentual de blastos inferior a 20% (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

O exame de avaliação citogenética pode ser realizado utilizando-se a metodologia de cariótipo convencional ou por *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH). O cariótipo convencional é capaz de detectar alterações que afetam regiões relativamente grandes dos cromossomos, como translocações, deleções e aneuploidias. Já o FISH, utiliza-se de sequências de DNA marcadas com fluorescência que hibridizam com sequências complementares de cromossomos específicos e são visualizadas por microscopia de fluorescência. O FISH é uma técnica mais sensível que a bandagem cromossômica, mas detecta apenas achados que correspondem à região cromossômica da sonda (KANTARJIAN et al., 2021a). O diagnóstico molecular baseia-se em técnicas da biologia molecular como a reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e suas variações, visando a investigação de alvos de interesse a partir da análise do material genético, o DNA e o RNA. A

RT-PCR está sendo utilizado para analisar expressões gênicas, quando as translocações resultam em proteínas de fusão (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

O advento das técnicas de sequenciamento de última geração, do inglês *Next-Generation Sequencing* (NGS), permitiu ampliar a identificação de mutações gênicas que podem ser agrupadas em nove categorias: metilação do DNA, supressores de tumor (TP53), fusões de fatores de transcrição (PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11, CEBPA), nucleofosmina (NPM1), moléculas sinalizadoras, modificação da cromatina (ASXL1, STAG2, BCOR, KMT2A/PTD, EZH2), fatores de transcrição mieloides (RUNX1), o complexo coesina e o complexo spliceossomo (SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2). Os genes mais frequentemente mutados são: FLT3, NPM1, DNMT3A, IDH1 ou IDH2, NRAS ou KRAS, RUNX1, TET2, TP53, CEBPA e WT1. Normalmente, as LMA apresentam mais de uma mutação (DÖHNER et al., 2017; KANTARJIAN et al., 2021a; NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

## 2.7 FATORES PROGNÓSTICOS

### 2.7.1 Estratificação de risco do grupo Europeu do LeukemiaNet – ELN 2017

O grupo Europeu do LeukemiaNet- 2017 (ELN-2017) estratificou os pacientes com LMA conforme as anormalidades citogenéticas e moleculares apresentadas, em três grupos de risco prognóstico: “favorável”, “intermediário” e “desfavorável”, conforme visto na tabela 2, que diferem conforme resposta a terapia padrão e sobrevida (DÖHNER et al., 2017).

**Tabela 2** - Estratificação de risco do grupo Europeu LeukemiaNet- 2017 para LMA, baseada em alterações gênicas

<b>Categoria de Risco</b>	<b>Anormalidade Genética</b>
<b>Favorável</b>	t(8;21) (q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
	inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
	Mutação do NPM1 sem FLT3-ITD ou com FLT3-ITD com carga alélica < 0,5
	Mutação bialélica do CEBPA
<b>Intermediário</b>	Mutação do NPM1 com FLT3-ITD alto
	NPM1 selvagem sem FLT3-ITD ou com FLT3-ITD com carga alélica baixa <0,5 (sem alterações genéticas de alto risco)
	t(9;11) (p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
	Anormalidade citogenética não classificada como favorável ou desfavorável
<b>Desfavorável</b>	t (6;9) (p23; q34.1); DEK-NUP214
	t(v;11q23.3); rearranjo KMT2A
	t(9;22) (q34.1;q11.12);BCR-ABL1
	Inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EVI1)-5 ou del(5q);-7;-17/abn(17p)
	Cariótipo complexo, cariótipo monossômico
	NPM1 selvagem com FLT3-ITD alto
	Mutação RUNX1
	Mutação ASXL1
	Mutação TP53

Fonte: (DÖHNER et al., 2017).

O grupo de risco favorável ou baixo risco, engloba um conjunto de alterações citogenéticas e moleculares de bom prognóstico, com taxa de resposta completa em torno de 80% e taxas de sobrevida global em 5 anos, em torno de 64%. Já o grupo de risco intermediário, constituído por alterações citogenéticas e moleculares não contempladas no risco favorável e nem no desfavorável, apresenta taxas de resposta completa de 50-60% e sobrevida em 5 anos, em torno de 41%. O grupo de risco desfavorável, também designado de alto risco, inclui alterações associadas a mau prognóstico, com taxas de resposta completa de 40% e sobrevida global em 5 anos de 11% (PELCOVITS; NIROULA, 2020).



### 2.7.2 Fatores prognósticos associados ao paciente

A idade avançada é um marcador prognóstico desfavorável, pacientes mais velhos (>65 anos) com LMA têm um prognóstico pior em comparação com seus pares mais jovens. A associação da idade avançada com o prognóstico, parece justificar pela maior frequência de LMA-t ou secundária, presença de cariótipo complexo e maior prevalência de características genéticas de alto risco que promovem resistência aos tratamentos quimioterápicos convencionais. Em pacientes idosos, a quimioterapia intensiva convencional (“3+7”), está associada a menores taxas de RC, toxicidade aumentada, altas taxas de mortalidade precoce e taxas de sobrevivência sombrias, a longo prazo, na ausência de transplante. A idade avançada é um marcador prognóstico desfavorável independente, para baixa taxa de RC e baixa taxa de sobrevida global (SG), respectivamente de 50% e 10%(CARTER et al., 2020; KOSCHMIEDER et al., 2010) .

Os principais preditores de morte precoce são idade avançada e status performance ruim (KANTARJIAN et al., 2021b).

A história clínica do paciente quanto a exposição prévia a agentes citotóxicos ou radioterapia e história de mielodisplasia prévia ou outros distúrbios hematológicos, como neoplasias mieloproliferativas são preditores de recidiva precoce e resistência de doença. O prognóstico da LMA *de novo* é superior ao da LMA secundária que evoluiu de SMD, LMMC ou NMP e ao da LMA-t que evoluiu após exposição à quimioterapia ou irradiação, como tratamento prévio de outras malignidades (NARAYANAN; WEINBERG, 2020) .

Outras características clínico-laboratoriais, ao diagnóstico, como leucocitose no sangue periférico e elevação do ácido úrico e/ou do nível sérico de LDH, foram associados a pior prognóstico e menor sobrevida livre de doença, respectivamente (FERRARA; MIRTO, 1996; YAMAUCHI et al., 2013).

### 2.7.3 Fatores prognósticos associados à doença

Os fatores prognósticos associados à doença preveem diferentes apresentações clínicas e comportamento biológico da LMA, que são determinados por alterações citogenéticas e moleculares. O impacto prognóstico das alterações citogenéticas e mutações moleculares, dependem de vários fatores como o tipo de mutação específica; o grupo de risco citogenético (se favorável, normal, desfavorável ou outro); a carga da mutação ou frequência alélica e a presença de mutações concomitantes (KANTARJIAN et al., 2021).

Com base na prática atual, a classificação do cariótipo na LMA pode ser estratificada em: (1) favorável – *Core Binding Factor* (CBF) definida citogeneticamente pela presença de  $t(8;21)(q22;q22)$  ou  $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$  e  $t(15;17)(q24.1;q21.2)$  na Leucemia promielocítica aguda; (2) intermediário - cariótipo normal; (3) desfavorável - 3 ou mais anormalidades cromossômicas, monossomia  $5/5q^-$ , monossomia  $7/7q^-$ , translocação  $t(6;9)$ , translocação  $t(9;22)$ , todas as translocações envolvendo  $11q23$  e translocações envolvendo o cromossomo  $3q26$  e (4) todos os outros. Alguns estudos consideram certas anormalidades citogenéticas, por exemplo, trissomia 8 única ou translocação única  $t(9;11)$ , como risco intermediário (KANTARJIAN et al., 2021b; NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

As mutações somáticas recorrentes, são identificadas em mais de 90% dos pacientes com LMA, sendo as mais frequentes: FLT3, NPM1, DNMT3A, NRAS, TET2, IDH2, CEBPA, RUNX1, PTPN11, IDH1, TP53 e SRSF2 (KANTARJIAN et al., 2021). Em torno de 96% dos pacientes com LMA *de novo* apresentam pelo menos uma mutação direcionadora, enquanto 86% apresentam duas ou mais mutações direcionadoras (AITKEN et al., 2021). O impacto prognóstico de uma mutação gênica pode diferir conforme a co-expressão de outra mutação. Essa situação pode ser exemplificada pelo prognóstico atribuído ao NPM1 mutado, que difere conforme a presença da mutação FLT3-ITD. O NPM1 mutado transmite um prognóstico “favorável” apenas na ausência de FLT3-ITD ou FLT3-ITD com uma razão alélica baixa  $\leq 0,5$ , contudo quando apresenta FLT3-ITD, com uma razão alélica  $> 0,5$ , indica prognóstico “desfavorável”. Também desta forma, mutações em ASXL1 e RUNX1 conferem um prognóstico particularmente ruim (DÖHNER et al., 2017). A LMA com mutações bialélicas de CEBPA está associada a prognóstico favorável. A mutação do TP53 é um fator de risco desfavorável isolado (NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

Algumas mutações gênicas quando identificadas na LMA, podem prever evolução secundária, uma vez que essas mutações são encontradas na SMD de alto risco e na NMP, tais como: SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2, ASXL1, EZH2, BCOR ou STAG2. Quanto maior o número de mutações adversas em um paciente com LMA, pior o prognóstico. Em contraste, mutações nos genes NPM1 e rearranjos CBF e KMT2A são altamente específicos para LMA de novo (DÖHNER et al., 2017; KANTARJIAN et al., 2021a). Na LMA de cariótipo normal, uma mutação bialélica do CEBPA ou uma mutação do NPM1 estão associadas a melhores prognósticos, desde que não estejam presentes outras mutações concomitantes adversas (KANTARJIAN et al., 2021a).

Considerando a importância da avaliação citogenética e molecular para definição prognóstica na LMA, as recomendações atuais indicam incluir na investigação diagnóstica de

LMA: 1 - pesquisa mutacional para os genes NPM1, CEBPA e RUNX1, uma vez que definem categorias de doenças ; 2- pesquisa mutacional para FLT3 para duplicações *in tandem* internas [ITD] juntamente com dados sobre a razão alélica do tipo mutante para selvagem, e para o domínio tirosina quinase [TKD]; 3- mutações em TP53 e ASXL1, uma vez que têm sido consistentemente associadas a mau prognóstico (DÖHNER et al., 2017; KANTARJIAN et al., 2021a).

#### 2.7.4 Fatores prognósticos associados a resposta após tratamento

As anormalidades citogenéticas e moleculares são os indicadores prognósticos mais significativos, no entanto, a falha em atingir a remissão completa após o primeiro ciclo de terapia de indução ou presença de doença residual positiva, ao final do tratamento, são fatores prognósticos associados ao risco de recidiva e uma menor sobrevida (KANTARJIAN et al., 2021).

Portanto, pacientes com LMA devem ser avaliados quanto a resposta terapêutica após quimioterapia de indução, assim como monitorados ao longo das consolidações e posteriormente, em intervalos regulares, no seguimento clínico, para detectar recidiva morfológica iminente (DÖHNER et al., 2017).

Dentro de ensaios clínicos controlados, recomenda-se que os aspirados de medula sejam realizados a cada 3 meses nos primeiros 2 anos e a cada 6 meses para os seguintes 2 a 3 anos. Contudo, na prática, o aspirados de MO é realizado se forem detectadas alterações ao exame do hemograma, que deverá ser monitorizado a cada 1 a 3 meses nos primeiros 2 anos, depois a cada 3 a 6 meses até 5 anos. A maioria das recaídas ocorrem dentro de 1 a 3 anos, após o término da terapia (DÖHNER et al., 2010).

Os pacientes que atingiram RC, pela avaliação morfológica, ainda podem abrigar células leucêmicas residuais que estão abaixo do limiar de detecção por essa metodologia. Provavelmente, representam subpopulações neoplásicas resistentes à quimioterapia, que estavam abaixo dos níveis de detecção no momento do diagnóstico inicial. A expansão de tais clones aumenta o risco de recaída e, portanto, a análise do perfil mutacional genético, ao diagnóstico, deve ser considerada para identificar possíveis vias de escape gênico (KANTARJIAN et al., 2021b; NARAYANAN; WEINBERG, 2020).

A identificação dessas células leucêmicas remanescentes, denominada doença residual, é um importante indicador prognóstico para desfechos clínicos e pode ter implicações terapêuticas, no manejo da LMA. Após o tratamento quimioterápico, a pesquisa de DRM

fornece informações adicionais à avaliação de resposta morfológica tradicional, de forma que as recomendações do ELN-2017 definiram a RC sem DRM, como o mais novo e ideal critério de resposta após tratamento para LMA(AITKEN et al., 2021).

#### 2.7.4.1 Mensuração da doença residual

A pesquisa da DRM busca detectar as células leucêmicas, mesmo quando estão presentes em níveis bem baixos de  $1:10^4$  a  $1:10^6$  leucócitos, em comparação com 1:20 nas avaliações baseadas em morfologia(SCHUURHUIS et al., 2018). É considerado um indicador prognóstico independente, podendo ser utilizada para: (1) estabelecer um estado de remissão mais profundo após quimioterapia padrão; (2) Re-estratificar o risco prognóstico dinâmico, após pelo menos 2 ciclos de quimioterapia intensiva e orienta o tratamento pós-remissão; (3) identificar recaídas iminentes e permitir a intervenção precoce; (4) permitir uma vigilância pós-transplante mais robusta (DÖHNER et al., 2022; HEUSER et al., 2021; SCHUURHUIS et al., 2018). A quantificação da doença residual pode ser realizada através de diversas metodologias, variando em sua sensibilidade e aplicabilidade, podendo ser detectada por: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), CFM ou NGS. O resultado de DRM “positivo” ou “negativo” refere-se à presença ou ausência da doença mensurável, com base em valores de referência específicos, que podem variar por ensaio e por laboratório(HEUSER et al., 2021; SCHUURHUIS et al., 2018). Devido à natureza heterogênea e oligoclonal da LMA, pode ser necessário utilizar mais de um método de avaliação para detectar, de forma mais precisa, a presença de DRM (AITKEN et al., 2021).

A pesquisa de DRM por RT-qPCR requer que a mutação gênica detectada seja estável ao longo da doença, o que limita o uso dessa metodologia, para todas as leucemias (KANTARJIAN et al., 2021a). A pesquisa de DRM por RT-qPCR para a mutação NPM1 tem forte valor preditivo positivo para recaída e diminuição da sobrevida, devido a sua especificidade para LMA e estabilidade ao longo da doença (AITKEN et al., 2021).

A pesquisa de DRM por citometria de fluxo é um método útil, em quase todos os casos de LMA, uma vez que vai avaliar marcadores anômalos, imunofenótipos associados à leucemia ou uma combinação dos mesmos, de forma bastante rápida quando comparado com as outras técnicas (HEUSER et al., 2021). A importância da DRM na LMA é reforçada pelas recomendações do ELN- 2017, que incluem a DRM como um novo critério de resposta (RC com/sem DRM). O monitoramento da DRM deve ser considerado no acompanhamento de pacientes com LMA. Como recomendação, a DRM molecular, deve ser utilizada para

Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), CBF -LMA e LMA com mutação do NPM1, para os outros pacientes com LMA, a DRM deve ser avaliada usando CFM (DÖHNER et al., 2017) .

Na atualização das recomendações do ELN- 2022, a DRM segue mantendo importância prognóstica em termos de desfechos clínicos, de forma que na atual recomendação, o status da DRM após terapia pode modificar a estratificação de risco prognóstico dinâmico do paciente. A falha em atingir a RC com DRM negativa ou níveis crescentes de DRM durante ou após a terapia estão associados a recidiva da doença e resultados inferiores(DÖHNER et al., 2022).

O NGS avalia simultânea a presença de vários genes, contudo em utilizando essa técnica para avaliar DRM, deve-se buscar as mutações encontradas nas células leucêmicas clonais, ao diagnóstico. É possível, através da pesquisa de DRM por NGS, identificar várias mutações ( p.ex DNMT3A, TET2, ASXL1) que não representar o clone leucêmico e sim mutações associadas à hematopoiese clonal de potencial indeterminado (CHIP) . O uso da metodologia de NGS para pesquisa de DRM, provavelmente, será uma ferramenta útil para a grande maioria dos pacientes, particularmente à medida que o número de genes avaliados em painéis direcionados aumenta, além de poder detectar qualquer mutação em uma porção sequenciada de um gene (AITKEN et al., 2021)

A evolução clonal genômica pode acontecer tanto pela expansão de subclones resistentes, como pelo surgimento de novos clones, devido à pressão seletiva do tratamento. Esse potencial de evolução clonal e/ou mudanças de imunofenótipo, faz necessário utilizar mais de uma metodologia, para monitorizar a DRM. Quando utilizado apenas um ensaio, é possível que a DRM, clinicamente significativa, não seja identificada. (AITKEN et al., 2021; KANTARJIAN et al., 2021a). Foi observado que a pesquisa de DRM utilizando a combinação de CFM e NGS, em pacientes com RC, aumentou a sensibilidade de prever recidivas (KANTARJIAN et al., 2021a).

### **2.7.5 Avaliação prognostica de expressões antigênicas**

A avaliação prognostica de marcações imunofenotípicas na LMA foi objetivo de diversas pesquisas. Contudo, os resultados dessa associação prognóstica não foram reproduzidos uniformemente entre os estudos, não sendo ainda possível estabelecer um consenso acerca do impacto prognóstico dessas marcações. Provavelmente, essa controvérsia se deve ao número restrito de pacientes, diversidade dos painéis de anticorpos utilizados, falta de uniformidade entre os estudos e avaliação de expressões individuais em vez de expressões de múltiplos antígenos (CHEN; CHERIAN, 2017; HENRIQUE et al., 2020). Quanto as

expressões, mais frequentemente estudadas, marcação positiva para CD34, CD13, CD14, CD11b, CD7 e HLA-DR foram associadas a reduzidas taxas de resposta completa; superexpressão de CD117 ou CD123 com alta incidência de recaída e expressão de CD56 com diminuição da sobrevida global. Enquanto a expressão positiva de CD15, CD19 e MPO com melhores taxas de resposta completa e bom prognóstico (HENRIQUE et al., 2020b; LI et al., 2011; MASON; JUNEJA; SZER, 2006).

As co-expressões antigênicas para CD34<sup>neg</sup>/CD33<sup>neg</sup>; CD34<sup>pos</sup>/CD33<sup>pos</sup>; CD34<sup>pos</sup>/HLA-DR<sup>pos</sup>; CD7<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup>; CD7<sup>pos</sup>/CD56<sup>pos</sup> foram associadas a resultados desfavorável e reduzidas taxas de resposta completa, enquanto CD11b<sup>pos</sup>/CD14<sup>pos</sup>, fenótipo CD117<sup>pos</sup> /CD15<sup>pos</sup> e fenótipo pan-mieloide (CD13<sup>pos</sup>, CD33<sup>pos</sup>, CD117<sup>pos</sup> e MPO<sup>pos</sup>) foram relacionados a prognóstico favorável e resposta completa (HENRIQUE et al., 2020<sup>a</sup>; LEGRAND et al., 2000; MASON; JUNEJA; SZER, 2006; OSSENKOPPELE; MONTESINOS, 2019; PLESA et al., 2008; WEBBER; CUSHING; LI, 2008).

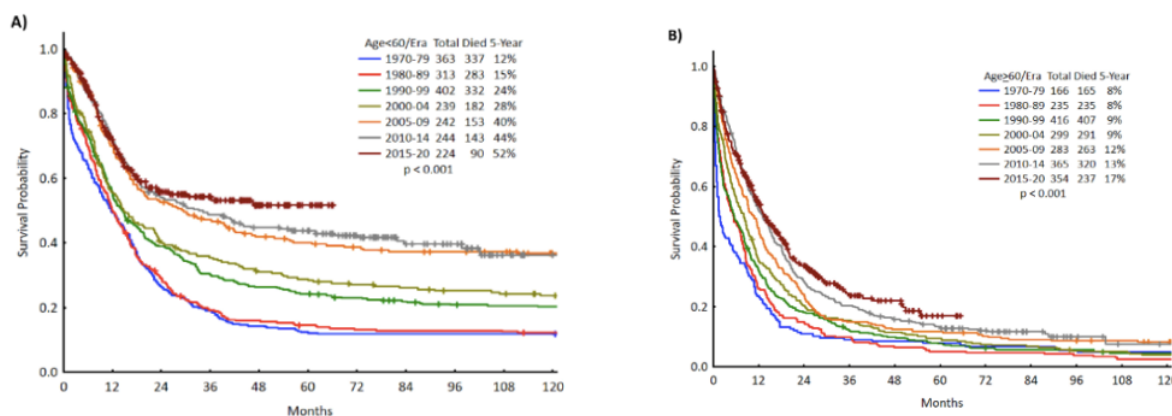
A caracterização imunofenotípica de alguns subtipos de LMA, com anormalidades clínico-patológicas e alterações citogenéticas específicas, faz pressupor que a citometria de fluxo possa sugerir alterações genéticas subjacentes. Portanto a citometria de fluxo pode ser uma ferramenta útil para estratificação de risco e programação terapêutica em alguns casos que a avaliação citogenética e molecular encontram-se indisponíveis ou nos casos de cariótipo normal, em que outros parâmetros prognósticos devem ser utilizados para melhor estratificar esse perfil de pacientes. Essa caracterização imunofenotípica foi relatada para a LMA com t(8;21); RUNX1-RUNX1T1 na qual os blastos apresentam expressão elevada de CD34, HLA-DR e MPO, com expressão fraca de CD13 e CD33, coexpressão de marcadores de células B – CD19, PAX5 e/ou CD79a citoplasmático e CD56 expresso em 60% a 80%; na LMA com mutação do NPM1 comumente expressa antígenos mieloides e marcadores monolíticos, incluindo CD13, CD14, CD33 e MPO, mas não tem expressão de CD34; na LMA com inv(16)(p13;q22), a LMA mielomonocítica variante eosinofílica que, além dos marcadores mielomonocíticos habituais CD13+, CD33+, MPO+, CD14+, CD4+, CD11b+, na LMA subtipo “cup-like” expressa CD123 sem CD34 ou HLA-DR significativo e está altamente associado à duplicação in tandem interna de FLT3 e mutações NPM1 (CHEN; CHERIAN, 2017; HENRIQUE et al., 2020).

## 2.8 TRATAMENTO

A decisão do planejamento terapêutico a ser instituído considera a idade do paciente; o status de desempenho e comorbidades apresentadas; anormalidades citogenéticas e moleculares; além de projetar taxa de mortalidade precoce, taxa de RC e resultado a longo prazo com as terapias propostas. Desde a década de 1970 estabeleceu-se o regime “3+7” como regime padrão de tratamento quimioterápico intensivo, consistindo em daunorrubicina 50 a 60 mg/m<sup>2</sup> ou idarrubicina 12 mg/m<sup>2</sup> IV intravenosa diariamente, por 3 dias e citarabina 100 a 200 mg/m<sup>2</sup> por infusão IV contínua diariamente, por 7 dias. Posteriormente, os regimes de consolidação pós remissão, incluem terapia com alta dose de citarabina (3 g/m<sup>2</sup> IV durante 2-3 horas a cada 12 horas nos dias 1, 3 e 5) repetidos até 4 ciclos, seguida por TCTHs alogênico em casos selecionados, conforme estratificação de risco, comorbidades clínicas, tolerabilidade e toxicidade a terapias anteriores (KANTARJIAN et al., 2021a, 2021b).

Em geral, a quimioterapia intensiva “3+7” é indicada se estiver associada a uma taxa de RC de 60% a 70%, uma taxa de mortalidade precoce de 10% ou menos e uma taxa de sobrevida de 3 a 5 anos de 40% a 50%. Contudo, estratégias de tratamento de baixa intensidade com citarabina em baixas doses ou hipometilantes devem ser considerados se a taxa de RC esperada for < 40%, a taxa de mortalidade precoce em 4 semanas estiver entre 15% e 20% e uma sobrevida mediana ≤ 6 meses ou taxa de sobrevida de 3 anos < 20%. A citarabina em baixas doses é bem tolerada e produz taxas de RC na ordem de 15-25%, porém com SG mediana de 5-6 meses. Já os hipometilantes estão associados a uma taxa de RC de aproximadamente 17,8 e 27,8% para decitabina e azacitidina, respectivamente, com uma duração de remissão de 10,4 meses para a azacitidina e uma SG de 7,7 e 10,4 meses para decitabina e azacitidina, respectivamente (DÖHNER et al., 2017; KANTARJIAN et al., 2021b).

No decorrer dos anos, as taxas de mortalidade relacionadas ao tratamento vem diminuindo, como consequência do aperfeiçoamento dos cuidados de suporte e do desenvolvimento de abordagens terapêuticas personalizadas, as quais só foram possíveis através do entendimento da leucemogênese e dos diferentes mecanismos de sinalização e ativação da célula (DÖHNER et al., 2017; KANTARJIAN et al., 2021b). Conforme visto na figura 6, houve uma melhora na sobrevida de 1970 a 2020, tanto para pacientes jovens como idosos com LMA (KANTARJIAN et al., 2021b).



**Figura 6** - Gráficos de sobrevivência de pacientes <60 anos de idade (A) e ≥60 anos de idade (B) com LMA de novo, tratados no Instituto do MD Anderson  
**Fonte:** (KANTARJIAN et al., 2021).

### 2.8.1 Novas terapias

O reconhecimento de potenciais alvos terapêuticos e o desenvolvimento de drogas alvo direcionadas, só foi possível, com a melhor compreensão da leucemogênese, assim como da função de mutações genéticas, epigenéticas, moleculares e do microambiente medular na evolução da leucemia mieloide aguda (KANTARJIAN et al., 2021b; YAMASHITA et al., 2020).

Historicamente o tratamento para LMA baseia-se na inibição do ciclo celular das células tronco leucêmicas, através de terapias quimioterápicas citotóxicas, que por sua vez também provocam toxicidade a célula tronco hematopoiética. Essa terapia não é curativa pois não age nas células tronco leucêmicas em estado quiescente, sendo assim o *pool* de célula tronco leucêmica latente pode impulsionar a recorrência da leucemia. Por isso, a erradicação dos menores resquícios da doença, provavelmente será um requisito para a cura da LMA (AITKEN et al., 2021; MISAGHIAN et al., 2009; YAMASHITA et al., 2020). As células troncos leucêmicas apresentam a capacidade de se duplicar e de se autorrenovar, o que ocorrerá na área rica em osteoblastos da medula óssea, onde as células leucêmicas são protegidas da apoptose induzida pela quimioterapia. A quiescência das células tronco leucêmica pode ser um mecanismo subjacente à resistência à terapia citotóxica, dependente do ciclo celular. No entanto, estudos vem analisando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas as células troncos leucêmicas, objetivando prevenir a recaída da doença (ISHIKAWA et al., 2007). Contudo, o tratamento ideal é aquele com maior potencial para erradicar a DRM, tendo como alvo específico as células tronco leucêmicas, com potencial de atingi-la também em seu



estado quiescente e não afetando as células tronco hematopoiéticas normais (MISAGHIAN et al., 2009; YAMASHITA et al., 2020).

Nos últimos anos, houve o desenvolvimento e aprovação para uso clínico de diversas terapias direcionadas a alvos moleculares no tratamento da LMA, são elas: midostaurina, gemtuzumab ozogamicina, CPX-351, enasidenib, ivosidenib, gilteritinib, venetoclax e glasdegib (ALFAYEZ et al., 2020; DAVER et al., 2019; GUERRA A VERONICA; DINARDO COURTNEY; KONOPLEVA MARINA, 2019; KANTARJIAN et al., 2021b; POLLYEA et al., 2022) Dessas terapias, os seguintes medicamentos estão aprovados no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Mylotarg®, Rydapt®, Xospata® e Venclexta® .

O gentuzumab Ozogamicina (Mylotarg®) é um anticorpo anti-CD33 humanizado quimicamente ligado ao agente citotóxico caliqueamicina que inibe a síntese de DNA e induz apoptose (DÖHNER et al., 2010). Foi aprovado pela ANVISA em fevereiro/2021, no cenário da LMA recém diagnosticado CD33<sup>POS</sup> em combinação com daunorrubicina (DNR) e citarabina (AraC).

O Midostaurin (Rydapt®) é um inibidor de multiquinases, de administração oral, que tem como alvo múltiplos receptores de tirosina quinases, incluindo FLT3 (DAVER et al., 2019). Foi aprovado pela ANVISA em abril/2018, no cenário da LMA com mutações de *FLT3* recém diagnosticada, em combinação com a quimioterapia padrão de indução com daunorrubicina e citarabina e de consolidação com citarabina em altas doses, e para pacientes em resposta completa seguida por monoterapia de manutenção

O Gilteritinibe (Xospata®) é um inibidor oral, potente e seletivo da FLT3. Foi aprovado pela ANVISA em março/2020, no cenário da LMA recidivada ou refratária e com mutação no gene *FLT3*(DÖHNER et al., 2022).

O Venetoclax (Venclexta®) é um inibidor oral, altamente seletivo de BCL-2 que demonstrou atividade em malignidades hematológicas dependentes de BCL-2 (GUERRA A VERONICA; DINARDO COURTNEY; KONOPLEVA MARINA, 2019). Foi aprovado pela ANVISA em janeiro/2019, no cenário da LMA recém diagnosticada, em pacientes inelegíveis para quimioterapia intensiva, em combinação com os agentes hipometilantes ,azacitidina ou decitabina, ou em combinação com citarabina em baixa dose .

Outras drogas também bastante promissoras como Magrolimabe, um anticorpo anti-CD46, Ivosidenib um inibidor de IDH, e o CPX-351 droga quimioterápica oral associando citarabina e daunorrubicina, seguem aguardando aprovação local. Diversas outras drogas e mecanismos de ação seguem em estudo clínico (ALFAYEZ et al., 2020).

O conhecimento de que a LMA resulta de múltiplas lesões genéticas/epigenéticas atuando simultaneamente e afetando diferentes vias de sinalização para a diferenciação, proliferação e apoptose, faz compreender que o tratamento direcionado a uma única proteína aberrante, seja incapaz de erradicar o clone leucêmico. Desta forma, há necessidade de combinar as terapias alvo molecular, com a terapia citotóxica convencional (DÖHNER et al., 2010). Além disso, o surgimento de novas terapias desperta uma série de oportunidades para estudar a melhor abordagem terapêutica, nos mais diversos cenários clínicos.

O reconhecimento de novos fenótipos e sua associação prognóstica, poderá ampliar a identificação de novos alvos terapêuticos, em potencial, na LMA.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação da expressão de marcadores imunofenotípicos com o prognóstico

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a associação de marcações imunofenotípicas com características clínico-demográficas e laboratoriais dos pacientes;
- Avaliar associação de marcações imunofenotípicas específicas e a resposta ao tratamento quimioterápico de indução;
- Avaliar associação de marcações imunofenotípicas específicas e sobrevida livre de doença;
- Avaliar associação de marcações imunofenotípicas específicas e sobrevida global.

## 4 METOLOGIA

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo realizado no departamento de hematologia, do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (CHUPES), da Universidade Federal da Bahia, um dos centros de referência de atendimento as Leucemias Agudas do Estado.

### 4.2 PACIENTES

Um total de 102 pacientes, com idade entre 16 e 81 anos, foram admitidos e diagnosticados com Leucemia Mielóide Aguda, no período de janeiro de 2015 à dezembro de 2021, excluindo pacientes com Leucemia Promielocítica Aguda.

O diagnóstico de LMA foi confirmado por amostra, através de aspirado de medula óssea (MO) e/ou de sangue periférico (SP), com base na morfologia e imunofenotipagem, considerando o quantitativo  $\geq 20\%$  de blastos em SP ou MO, conforme critérios da OMS 2016, ou menos que esta porcentagem de blastos, desde que identificadas alterações genéticas definidoras de LMA.

#### 4.2.1 Critérios de inclusão

Todos os pacientes que atendessem aos critérios da OMS para diagnóstico de LMA, no período de janeiro de 2015 à dezembro de 2021, com idade acima de 16 anos, com resultados de imunofenotipagem disponíveis.

#### 4.2.2 Critério de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com diagnóstico de leucemia promielocítica aguda e pacientes em que o laudo da imunofenotipagem não estivesse disponível para consulta.

### 4.3 COLETA DE DADOS DO PRONTUÁRIO

Os dados clínico-demográficos e laboratoriais foram coletados através da revisão de prontuário e arquivos médicos dos pacientes. Os dados demográficos e clínicos avaliados foram: gênero, idade, etiologia da LMA se “de novo” ou secundária e resposta terapêutica. Foram coletados ainda dados laboratoriais como nível de leucometria. Considerou-se para definição de LMA secundária aquele paciente com histórico e acompanhamento por outra neoplasia hematológica. Quando disponíveis, os resultados da avaliação citogenética e o perfil mutacional para o gene FLT3-ITD e NPM1 foram coletados e registrados juntamente com os outros dados coletados em prontuário.

Os pacientes foram distribuídos segundo as faixas etárias  $< 60$  anos e  $\geq 60$  anos; conforme nível de leucometria  $< 50$  mil e  $\geq 50$ mil; conforme estratificação de risco de ELN – 2017 e conforme natureza da LMA.

### 4.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

O protocolo de tratamento a ser utilizado e a decisão da melhor estratégia terapêutica foi definida pela equipe assistencial, considerando a idade do paciente, as comorbidades clínicas, as características da doença e elegibilidade ao transplante alogênico de medula óssea. Considerado elegível para receber quimioterapia em altas doses, os pacientes receberam regime de indução de primeira linha composto por esquema de 3 dias de antraciclina e 7 dias de citarabina (7+3). Após quimioterapia de indução, alcançando RC os pacientes receberam tratamento de consolidação, com doses elevadas de citarabina, por no máximo 4 ciclos, seguido ou não de transplante alogênico. Os pacientes que não obtiveram RC após 1<sup>o</sup> ciclo de quimioterapia, conforme determinado pela avaliação da persistência de blastos em aspirados de medula óssea, receberam terapia de resgate, sendo o protocolo de escolha Fludarabina, Citarabina, Filgastrim e Idarrubicina (FLAG-IDA). Já os pacientes mais velhos, ilegíveis a quimioterapia em altas doses, receberam cuidado de suporte e/ou quimioterapia de baixa dose com protocolos diferentes sendo utilizado Citarabina em baixas doses, citarabina em baixas doses e Tioguanina, Citarabina em baixas doses e Venetoclax, Hidroxiureia ou Azacitidina, de acordo com o período de estudo.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DE RESPOSTA APÓS QUIMIOTERÁPIA INTENSIVA

Os pacientes foram estratificados, conforme resposta ao final da quimioterapia de indução, em três grupos: resposta completa, refratário ou recidivado. Utilizou-se as recomendações do ELN-2017 de quantificação de células blásticas na MO, ao final do tratamento, como parâmetro para definição de resposta. Portanto, foi considerado resposta completa a presença de < 5% de blastos, doença refratária a persistência de  $\geq 5\%$  de blastos e recidiva para os pacientes que atingiram resposta completa, porém voltaram a apresentar níveis  $\geq 5\%$  de blastos, na medula óssea .

O critério de resposta parcial (RP) definido como persistência de 5% a 25% de blastos no aspirado de MO, desde que redução de pelo menos 50% na porcentagem de blastos, não foi utilizado neste estudo, considerando as recomendações de diretrizes terapêuticas da utilidade desse parâmetro de RP para avaliação de novos agentes terapêuticos , em investigação de ensaios de fase I.

##### 4.5.1 Avaliação de sobrevida livre de doença e sobrevida global

A sobrevida livre de doença (SLD) corresponde ao tempo desde a documentação de remissão de doença até a progressão de doença, morte ou perda de seguimento. Já o tempo de sobrevida global (SG) foi considerado o tempo decorrido entre o diagnóstico da LMA até óbito ou perda de seguimento.

#### 4.6 ANÁLISE DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Como parte da avaliação diagnóstica, todos os pacientes acompanhados no serviço de hematologia do HUPES, foram submetidos ao exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparâmetros, para confirmação diagnóstica e distinção da linhagem blástica da Leucemia Aguda.

Os exames foram realizados pelo Instituto de Ciência e Saúde (ICS), utilizando amostras de MO ou SP. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II da Becton Dickinson Biosciences (BD, Califórnia, EUA) munido com laser azul (488nm), laser vermelho (633nm) e laser violeta (405nm), sendo utilizado o programa Diva para aquisição dos dados. Para análises posteriores foi utilizado o programa de computador Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Espanha). O painel de imunofenotipagem de leucemia aguda utilizado pelo ICS

baseia-se no Protocolo Euroflow, que utiliza uma combinação de análises de imunofenótipo de oito cores, usando um citômetro de fluxo FACS Canto II (BD).

Para a realização do exame de Imunofenotipagem foi utilizado um fluxograma padrão para todos os laudos diagnósticos de LMA. Na suspeita clínica e morfológica de Leucemia Aguda foi utilizado inicialmente um painel de triagem único (ALOT, do inglês Acute Leukemia Orientation Tube) contendo 8 anticorpos específicos como mostrado na Tabela 4, posteriormente identificando tratar-se de amostra contendo células blásticas e definida a linhagem celular mieloide, é utilizado um painel secundário complementar desenvolvido para a caracterização completa da malignidade (Tabela 3). Os exames de imunofenotipagem de cada paciente foram avaliados individualmente, quanto a expressão antigênica de cada marcador utilizado na citometria de fluxo. As amostras foram coradas com anticorpos monoclonais para os seguintes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD25, CD33, CD34, CD36, CD38, CD45, CD56 CD123, CD117 e HLA DR. Os pacientes foram considerado como positivo, para um marcador de membrana, se expresso em mais de 20% e para um marcador citoplasmático, se expresso em mais de 10% das células blásticas. A expressão de cada marcador foi caracterizada pelo percentual de células que expressaram o marcador e com o seu nível de fluorescência. Os resultados foram expressos com o percentual de células positivas para os antígenos individualmente. Com base em resultado de estudos anteriores, também foram avaliados a associação prognostica de antígenos co-expressos, com as seguintes expressões: CD34<sup>pos</sup> e HLA-DR<sup>pos</sup>; CD117<sup>pos</sup> e CD15<sup>pos</sup>; CD13<sup>pos</sup>, CD33<sup>pos</sup>, CD117<sup>pos</sup> e MPO<sup>pos</sup>; CD34<sup>pos</sup> e CD7<sup>pos</sup>; CD7<sup>pos</sup> e CD56<sup>pos</sup>; CD33<sup>pos</sup> e CD34<sup>pos</sup>; CD33<sup>pos</sup> e CD34<sup>neg</sup>; CD117<sup>pos</sup> e MPO<sup>pos</sup>. Posteriormente, o perfil de expressão de cada paciente foi correlacionado com os seus dados clínico-demográficos, laboratoriais e resposta terapêutica. Foram analisados a associação do perfil imunofenotípico dos blastos mieloides com os subgrupo prognostico de idade, leucometria, estratificação de risco pelo ELN-2017, resposta terapêutica após indução, SLD e SG.

**Tabela 3** - Fluxograma padrão para diagnóstico de LMA por citometria de fluxo

PAINEL DE TRIAGEM - ALOT								
TUBO	FITC	PE	PERCP CY5.5	APC	V500	V450	APC-H7	PE-CY7
1	MPO	CD79a	CD34	CD7	CD45	CD3cy	CD3m	CD19
PAINEL LMA								
TUBO	FITC	PE	PERCP CY5.5	APC	V500	V450	APC-H7	PE-CY7
1	CD35	CD64	CD34	CD300e	CD45	HLA-DR	CD14	CD117
2	CD16	CD13	CD34	CD11b	CD45	HLA-DR	CD10	CD117
3	CD38	CD56	CD34	CD33	CD45	CD15	CD19	CD117
4	CD2	CD123	CD34	-	D45	HLA-DR	-	CD117
5	CD36	CD105	CD34	CD7	CD45	HLA-DR	CD71	CD117

Abreviações: MPO - Mieloperoxidase; Cy - citoplasmático; m - membrana.

Fonte: EuroFlow

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para elaboração do banco de dados e análise descritiva foi utilizado o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), versão 14.0. Os resultados foram apresentados por meio de tabelas e gráficos. As variáveis categóricas expressas em frequências e percentuais -n (%). As variáveis contínuas com distribuição normal foram expressas em média e desvio padrão; e aquelas com distribuição não-normal, em mediana e intervalo interquartil. A normalidade das variáveis numéricas foi verificada através da estatística descritiva, análise gráfica e do teste Shapiro-wilk.

Conforme a modalidade do tratamento quimioterápico instituído, terapia intensiva com intenção curativa ou terapia paliativa com intenção de controle da doença, foram feitas comparações das variáveis categóricas pelo teste qui-quadrado, e para aquelas com um n menor do que 5 indivíduos em qualquer categoria foi utilizado o teste exato de Fischer. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos se  $p < 0,05$ .

As mesmas variáveis categóricas e contínuas pré-tratamento também foram avaliadas após terapia quimioterápica intensiva, quanto aos desfechos da resposta terapêutica (3 grupos): taxa de resposta completa, refratariedade e recidiva, utilizado o teste qui-quadrado.

A sobrevida livre de doença (SLD) foi calculada a partir da data da resposta completa até a recorrência, a data do óbito ou a data do último acompanhamento. A sobrevida global (SG) foi medida desde o diagnóstico até a morte por qualquer causa ou perda de seguimento. SLD e SG foram estimados pelo método de Kaplan-Meier com seus respectivos intervalos de confiança ICs de 95%, e comparados pelo teste de log-rank.



Foram comparadas as características clínicas (grupo categórico de idade, leucometria e estratificação de risco) e a resposta terapêutica (resposta completa, refratariedade e recidiva) entre os grupos de expressão positiva e negativa do antígeno e entre as combinações dos marcadores pelo teste qui- quadrado ou exato de Fisher.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

No presente estudo, foram incluídos um total de 102 pacientes, recém diagnosticados com LMA, com exceção dos pacientes diagnosticados com Leucemia Promielocítica Aguda, acompanhados no Hospital Universitário Professor Edgar Santos. As características clínicas e biológicas dos pacientes estão apresentadas na Tabela 4. Dos 102 casos, 62 (60,8%) eram do sexo feminino e 40 (39,2%) eram do sexo masculino, com razão entre F:M de 1,5:1. A faixa etária dos pacientes variou entre 16 e 81 anos, com média de (45,3 +/- 17,0) e com 77,5% apresentando < 60 anos, ao diagnóstico. A análise do hemograma mostrou que 80,4% dos pacientes apresentaram uma leucometria < 50 mil, enquanto 19,6% dos pacientes apresentaram leucometria  $\geq$  50. Dados de avaliação citogenética estavam disponíveis em 46 (45,0%) do total de pacientes envolvidos no estudo. Desses, 26 (56,5%) apresentaram cariótipo normal; 03 (6,52%) cariótipo favorável; 01 (2,17%) cariótipo monossômico; 02 (4,34%) cariótipo complexo; 01 (2,17%) cariótipo hiperdiploide e 13 (28,2%) outras alterações cariotípicas. O teste para detecção das mutações nos genes FLT3-ITD e NPM1 foi realizado em 54 e 42 pacientes, respectivamente, com frequência de positividade de 11 (20,4%) e 11 (26%) dos pacientes respectivamente. Com base nos dados de citogenética e alterações moleculares disponíveis, foi possível aplicar a estratificação de risco do ELN-2017 em 53 pacientes. Os pacientes, também foram categorizados em LMA primária ou LMA secundária, baseado na existência de diagnóstico prévio de outra neoplasia hematológico e achados ao mielograma e biópsia de medula corroborando o diagnóstico de transformação em LMA secundária. Os exames de rastreio para alterações citogenéticas específicas e moleculares típicas de LMA secundária, não estavam disponíveis.

**Tabela 4** - Características clínicas e biológicas dos pacientes com LMA

<b>Características</b>	<b>Nº de pacientes (%)</b>
<b>Faixa Etária (anos)</b>	
<60	79 (77,5)
≥60	23 (22,5)
<b>Sexo</b>	
Feminino	62 (60,8)
Masculino	40 (39,2)
<b>Leucometria (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	
≥50	20 (19,6)
<50	82 (80,4)
<b>Cariótipo*</b>	
Cariótipo normal	26 (56,5)
Cariótipo Favorável	03 (6,52)
Cariótipo Monossômico	01 (2,17)
Cariótipo Complexo	02 (4,34)
Cariótipo hiperdiploide	01 (2,17)
Outras alterações cariotípicas	13 (28,2)
<b>Molecular FLT3-ITD*</b>	
FLT3-ITD positivo	11 (20,4)
FLT3-ITD negativo	43 (79,6)
<b>Molecular NPM1*</b>	
NPM1 positivo	11 (26)
NPM1 negativo	31 (74)
<b>Estratificação de Risco (ELN-2017) *</b>	
Desfavorável	13 (24,5)
Intermediário	31 (58,4)
Favorável	09 (16,9)
<b>Tipo de LMA</b>	
LMA primária	86 (84,3)
LMA secundária	16 (15,7)
<b>Total</b>	<b>102 (100)</b>

\* Apenas uma parte dos pacientes foi avaliada quanto ao cariótipo (n=46), mutações em FLT3-ITD (n=54) ou mutações em NPM1 (n=42). Dessa forma, só foi possível classificar uma parte dos pacientes (n=53) quanto à estratificação de risco ELN 2017.

ELN – *European LeukemiaNet*; ITD- *internal tandem duplication*; NPM1- *Nucleophosmin 1*

**Fonte:** Elaboração da autora

Dos 102 pacientes incluídos no estudo, 3 pacientes não chegaram a iniciar qualquer tratamento quimioterápico; 84 foram submetidos a quimioterapia (QT) intensiva e 15 foram submetidos a quimioterapia em baixas doses ou paliativa. Conforme modalidade terapêutica instituída, QT intensiva ou paliativa, as características clínicas entre os dois grupos, foram apresentadas na tabela 5. Analisando as características entre os dois grupos, observou-se diferença estatística quanto a faixa etária, na qual 88% dos pacientes submetidos a QT intensiva e 13,3% dos pacientes em QT paliativa apresentavam idade < 60 anos e quanto a classificação da LMA, observou-se que 66,7% dos pacientes no grupo de QT paliativa e 7,1% no grupo de QT intensiva foram classificados em LMA secundária.

**Tabela 5** - Características dos pacientes conforme tratamento quimioterápico instituído

<b>Características</b>	<b>Total n (%)</b>	<b>Paliativo n (%)</b>	<b>Intensivo n (%)</b>	<b>p</b>
<b>Sexo</b>				
Masculino	38 (38,4)	8 (53,3)	30 (35,7)	0,157
Feminino	61 (61,6)	7 (46,7)	54 (64,3)	
<b>Idade</b>				
<60	76 (76,8)	2 (13,3)	74 (88,1)	<b>0,001</b>
≥ 60	23 (23,2)	13 (86,7)	10 (11,9)	
<b>Leucometria (x10<sup>3</sup>/μL)</b>				
≥ 50	20 (20,2)	2 (13,3)	18 (21,4)	0,472
<50	79 (79,8)	13 (86,7)	66 (78,6)	
<b>LMA</b>				
Primária	83 (83,8)	05 (33,3)	78 (92,9)	<b>&lt;0,001</b>
Secundária	16 (16,2)	10 (66,7)	06 (7,1)	
<b>Total</b>	<b>99 (100)</b>	<b>15 (15,2)</b>	<b>84 (84,8)</b>	

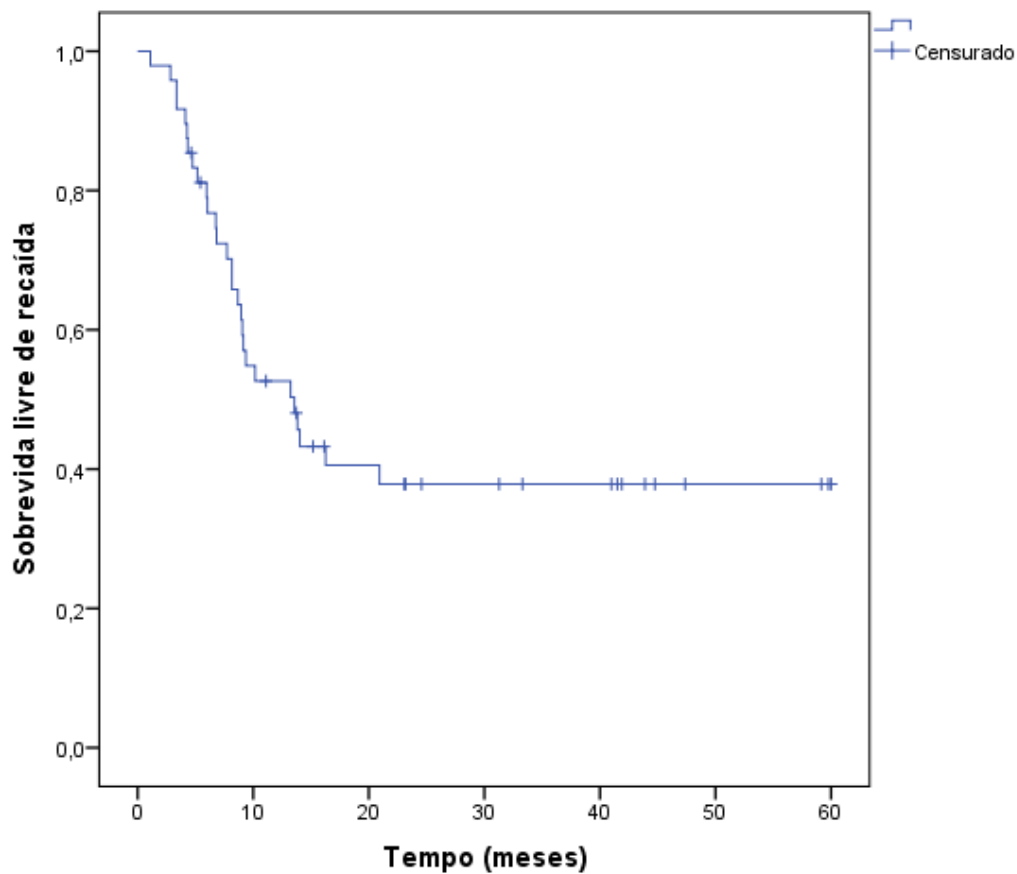
**Fonte:** Elaboração da autora

## 5.2 RESPOSTA TERAPÊUTICA

Dos 84 pacientes submetidos a quimioterapia intensiva, 16 pacientes foram a óbito sem ser avaliada a resposta terapêutica e 68 pacientes foram avaliados quanto a resposta quimioterápica após tratamento de indução. Foi observado remissão completa (RC) em 48/68 (70,6%) dos pacientes e refratariedade em 20/68 (29,4%). Dos 48 pacientes em RC, 24/48 (50%) apresentaram recaída. A mediana de tempo para a 1<sup>o</sup> recaída foi de 8,1 (4,9-13,65) meses

e para a 2<sup>o</sup> recaída foi de 3,7 (1,8-7,2) meses. Entre os 20 pacientes refratários, todos foram submetidos a quimioterapia de resgate, sendo que um paciente foi a óbito sem ser avaliado resposta, 10/20 (50%) atingiram RC e 9/20 (45%) mantiveram-se refratários.

A probabilidade estimada de sobrevida livre de recaída em 5 anos, para os pacientes submetidos a terapia quimioterápica intensiva, foi de 37,8%, com tempo médio de sobrevida livre de recaída de 27,9 meses com IC 95% (20,54-35,45), figura 7.



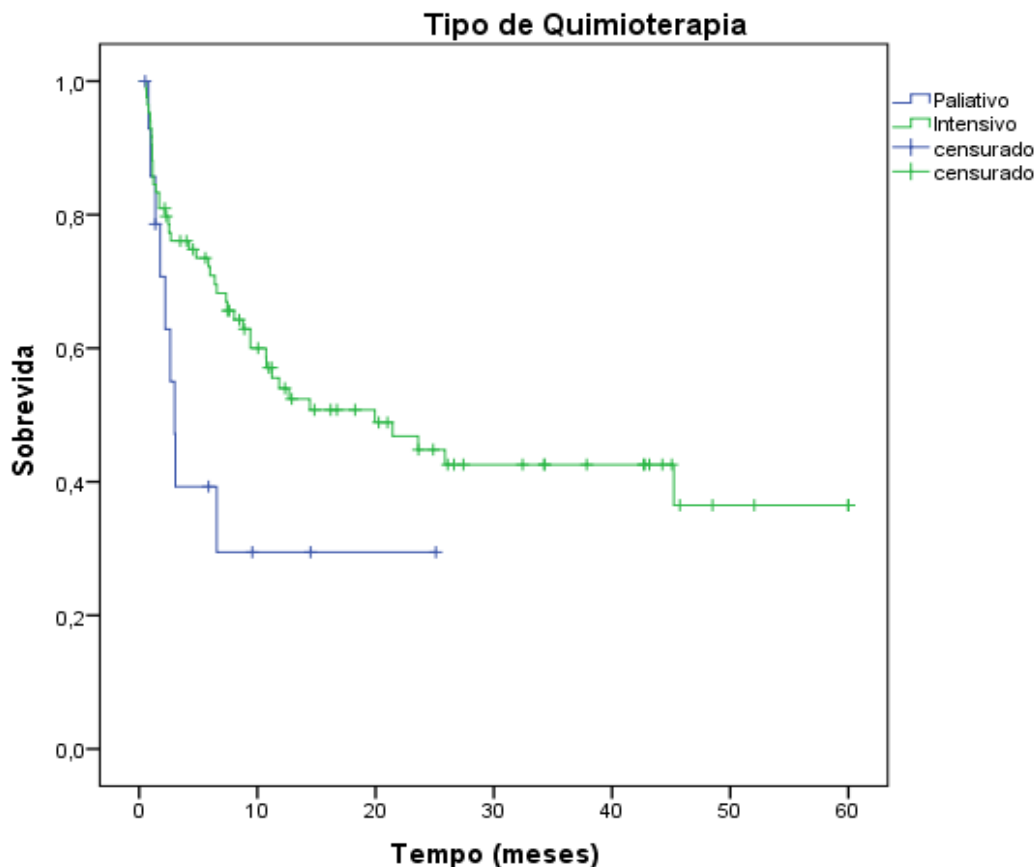
**Figura 7-** Gráfico da Sobrevida livre de recaída (SLR) para os pacientes submetidos a quimioterapia intensiva  
**Fonte:** Elaboração da autora

A consolidação com Transplante de Medula Óssea (TMO), alogênico foi realizado em 18/84 (21,4%) dos pacientes submetidos a quimioterapia intensiva, sendo 13 (72,2%) transplantes aparentados e 5 (27,7%) não aparentados. Os pacientes foram encaminhados para transplante como terapia de consolidação na 1<sup>o</sup> remissão em 61,1% dos casos, em 2<sup>o</sup> remissão em 11,11% e após remissão nos refratários primários em 27,7%. A mediana de tempo do último tratamento quimioterápico até o transplante foi de 3,2 meses (1,85-6,3), sendo de 2,55 meses (1,57-4,78) para o aparentado e de 6,6 meses (4,85-11,65) para o não aparentado. A recaída após TMO-alogênico foi evidenciada em 5/18 (27,77%) pacientes, 04 deles transplantados em

1º remissão e 01 refratário primário, submetido a transplante após atingir remissão. Um segundo transplante alôgenico foi realizado em 02 pacientes.

Ao final do estudo, foi observado que dos 84 pacientes submetidos a quimioterapia intensiva, 23 seguiam em acompanhamento, 21 (25%) em remissão de doença e 02 (2,3%) com doença em atividade; 43(51,1%) foram a óbito e 18 (21,4%) perderam o seguimento. O óbito precoce, <30 dias após início do tratamento quimioterápico, correspondeu a 16/43 (37,2%) do total de óbitos, nos pacientes submetidos a quimioterapia intensiva.

A probabilidade estimada de sobrevida global em 5 anos, para os pacientes submetidos a QT intensiva, foi de 36,5% +/- 0,077, com tempo médio de sobrevida de 29 meses com IC 95% (22,93- 35,2) e para os 15 pacientes submetidos a QT paliativa foi de 29,5% +/- 0,133, com tempo médio de sobrevida de 9,26 meses com IC 95% (3,45-15,06). A comparação das taxas de sobrevida global dos pacientes submetidos a quimioterapia intensiva e paliativa foi estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ), Figura 8.



**Figura 8** - Gráfico das Sobrevida Global (SG) conforme terapia instituída  
**Fonte:** Elaboração da autora

### 5.3 FATORES PROGNÓSTICOS ASSOCIADOS A RESPOSTA TERAPÊUTICA

Os pacientes submetidos a quimioterapia intensiva, foram avaliados quanto a associação dos principais fatores prognósticos e a manutenção de resposta, no decorrer do acompanhamento. Dos 68 pacientes submetidos a QT intensiva, 24 (35,3%) mantiveram-se em remissão completa, 24(35,3%) recidivaram e 20 (29,4%) foram refratários. O impacto dos principais fatores prognósticos na resposta terapêutica, está demonstrado na Tabela 6. Observa-se que apenas a variável idade teve significância estatística, os pacientes mais jovens remitem mais a doença quando comparados aos pacientes mais velhos do estudo. Não foi observada diferença estatística entre a taxa de resposta completa, refratariedade ou recidiva quando analisados os valores da leucometria, a estratificação de risco e a natureza da LMA se de novo ou secundária.

**Tabela 6-** Fatores Prognósticos avaliados quanto a resposta à quimioterapia intensiva

<b>Fatores Prognósticos</b>	<b>Total</b>	<b>Resposta Completa n (%)</b>	<b>Refratária n (%)</b>	<b>Recidiva n (%)</b>	<b>p</b>
<b>Idade</b>					<b>0,036</b>
<60	61	23 (95,8)	15 (75,0)	23 (95,8)	
≥60	7	1 (4,2)	5 (25,0)	1 (4,2)	
<b>Leucometria (x10<sup>3</sup>/μL)</b>					0,801
≥ 50 mil	17	5 (20,8)	5 (25,0)	7 (29,2)	
<50 mil	51	19 (79,2)	15 (75,0)	17 (70,8)	
<b>Estratificação de Risco*</b>					0,158
Desfavorável	10	3 (23,1)	5 (33,3)	2 (11,8)	
Intermediário	26	5 (38,5)	9 (60,0)	12 (70,6)	
Favorável	9	5 (38,5)	1 (6,7)	3 (17,6)	
<b>LMA</b>					0,161
Primária	63	22 (91,7)	17 (85,0)	24 (100,0)	
Secundária	5	2 (8,3)	3 (15,0)	0	
<b>Total</b>	<b>68(100)</b>	<b>24 (35,3)</b>	<b>20 (29,4)</b>	<b>24(35,3)</b>	

\* Apenas em 45 pacientes submetidos a QT intensiva foi possível aplicar a estratificação de risco ELN 2017.

**Fonte:** Elaboração da autora

## 5.4 IMUNOFENOTIPAGEM

### 5.4.1 Frequência das expressões antigênicas

Os pacientes foram avaliados quanto às características imunofenotípicas pela citometria de fluxo, ao diagnóstico. A frequência dos antígenos, nas respectivas quantidades de amostras testadas, foram apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7-** Frequência dos marcadores testados

<b>Marcador</b>	<b>Frequência</b>
<b>Antígeno Leucocitário Comum</b>	<b>n/N (%)</b>
CD45 <sup>pos</sup>	102/102(100)
<b>Antígenos de Células Progenitoras</b>	
CD117 <sup>pos</sup>	100/101 (99)
HLA-DR <sup>pos</sup>	98/102(96,1)
CD34 <sup>pos</sup>	75/102 (73,5)
<b>Antígenos Mieloides</b>	
CD33 <sup>pos</sup>	96/100 (96)
CD13 <sup>pos</sup>	97/102(95,1)
MPO <sup>pos</sup>	75/96(78,1)
CD11b <sup>pos</sup>	28/90 (31,1)
CD15 <sup>pos</sup>	16/89(18)
<b>Antígenos Monocíticos</b>	
CD64 <sup>pos</sup>	54/97(55,7)
CD4 <sup>pos</sup>	7/13(53,8)
CD300e <sup>pos</sup>	19/80(23,8)
CD14 <sup>pos</sup>	22/97(22,7)
<b>Antígenos Linfoides Aberrante</b>	
Linfoide Aberrante T	
CD7 <sup>pos</sup>	51/97 (52,6)
CD2 <sup>pos</sup>	11/91(12,1)
Linfoide Aberrante B	
CD19 <sup>pos</sup>	12/98(12,2)
CD79a <sup>pos</sup>	8/94(8,5)
CD22 <sup>pos</sup>	2/38(5,3)
CD10 <sup>pos</sup>	1/51(2)
Co-expressão Antígeno Aberrante	
CD2 <sup>pos</sup> /CD7 <sup>pos</sup>	7/90 (7,8)
CD19 <sup>pos</sup> / CD79a <sup>pos</sup>	5/88 (5,7)

n/N – Número de pacientes positivos/ número total de pacientes testados para cada marcador

**Fonte:** Elaboração da autora



A presença de um antígeno linfoide no blasto mieloide é considerada uma expressão aberrante. No geral, foram evidenciados, um total de 85 marcações anômalas, sendo que em 12 casos, haviam co-expressão anômala de 2 antígenos linfoides, contabilizando 73 casos (71,6%) de LMA com pelo menos um fenótipo anômalo na amostra. Dentre as marcações anômalas de antígenos presentes da linhagem T, o CD7 foi a mais comumente expressa 52,6%, seguido pelo CD2 com 12,1%. Já as marcações anômalas de antígenos presentes da linhagem B o mais frequentemente expresso foi o CD19 com 12,2%, seguido pelo CD79a com 8,5%. As co-expressões anômalas observadas foram CD2<sup>pos</sup>/CD7<sup>pos</sup> em 7 casos e CD19<sup>pos</sup>/CD79<sup>pos</sup> em 5 casos.

#### 5.4.2 Associação da expressão antigênica com fatores prognósticos

A frequência de expressão dos antígenos foi associada com os subgrupos prognósticos de idade, leucometria e estratificação de risco. Apresentado na tabela 8, apenas os resultados dos antígenos com diferença estatística entre os grupos analisados. Avaliando o fator idade, nota-se um percentual maior de pacientes expressando CD34 entre os pacientes com idade  $\geq 60$  anos (91,3%), do que entre aqueles  $< 60$  anos (68,4%) e maior expressão de MPO entre pacientes  $< 60$  anos (83,1%), do que entre aqueles  $\geq 60$  anos (57,9%). Em relação a categoria leucometria, observa-se maior associação da expressão negativa do CD11b entre os pacientes com leucometria  $< 50 \times 10^3/\mu\text{l}$  (76,1%), do que aqueles com leuco  $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$  de (42,1%) e maior associação da expressão negativa do CD15 entre os pacientes com leucometria  $< 50 \times 10^3/\mu\text{l}$  (87,6%), do que aqueles com leucometria  $\geq 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ , (56,2%).

**Tabela 8-** Frequência da expressão dos antígenos conforme características prognósticas

Marcadores	Total n (%)	Idade		Valor de p	Leucometria		Valor de p	Estratificação de Risco			Valor de p
		< 60	≥60		≥50 mil	<50 mil		Adverso	Intermediário	Favorável	
<b>CD34</b>				0,032			0,779				0,082
Positivo	75 (73,5)	54 (68,4)	21 (91,3)		14 (70)	61 (74,4)		19 (82,6)	25 (75,8)	4 (44,5)	
Negativo	27 (26,5)	25 (31,6)	2 (8,7)		6 (30)	21 (25,6)		4 (17,4)	8 (24,2)	5 (55,5)	
<b>CD11b</b>				0,802			0,010				0,424
Positivo	28 (31,1)	21 (30)	7 (33)		11 (58)	17 (23,9)		8 (42,1)	8 (25)	3 (37,5)	
Negativo	62 (68,9)	48 (70)	14 (67)		8 (42)	54 (76,1)		11 (57,9)	24 (75)	5 (62,5)	
<b>CD13</b>				0,585			0,050				0,368
Positivo	97 (95,1)	74 (93,7)	23 (100)		17 (85)	80 (97,6)		23 (100)	31 (93,9)	9 (100)	
Negativo	5 (4,9)	5 (6,3)	-		3 (15)	2 (2,4)		0	2 (6)	0	
<b>CD15</b>				0,871			0,007				0,703
Positivo	16 (18)	13 (18,3)	3 (17)		7 (43,8)	9 (12,3)		2 (13,3)	7 (21,9)	1 (12,5)	
Negativo	73 (82)	58 (81,7)	15 (83)		9 (56,3)	64 (87,6)		13 (86,7)	25 (78,1)	7 (87,5)	
<b>MPO</b>				0,017			0,597				0,247
Positivo	75 (78,1)	64 (83,3)	11 (57,9)		15 (79)	60 (78)		14 (74)	25 (78,1)	9 (100)	
Negativo	21 (21,9)	13 (16,9)	8 (42,1)		4 (21)	17 (22)		5 (26)	7 (21,9)	0	
<b>CD38</b>				0,108			0,611				0,043
Positivo	64 (95,5)	52 (98,1)	12 (85,7)		10 (100)	54 (94,7)		9 (81,8)	27 (100)	6 (100)	
Negativo	03 (4,5)	1 (1,19)	2 (14,3)		0	3 (5,3)		2 (18,2)	0	0	

Fonte: Elaboração da autora

### 5.4.3 Associação da expressão antigênica com a resposta terapêutica

A resposta terapêutica, após terapia quimioterápica intensiva, foi avaliada quanto a expressão dos antígenos. Dos 68 pacientes avaliados após quimioterápica intensiva 24 (35,3%) mantiveram resposta completa, 20 (29,4%) foram refratários primários e 24 (35,3%) recidivaram. Dos marcadores antigênicos testados, apenas a expressão positiva de CD7, MPO e CD36 apresentaram significância estatística quanto a resposta terapêutica, conforme demonstrado na tabela 10. A análise dos marcadores individuais demonstrou probabilidade significativamente aumentada de recidiva e refratariedade nos casos com expressão positiva para CD7 ( $p= 0,031$ ). Alternativamente, MPO e CD36 apresentaram maior associação com remissão completa, após quimioterapia de indução

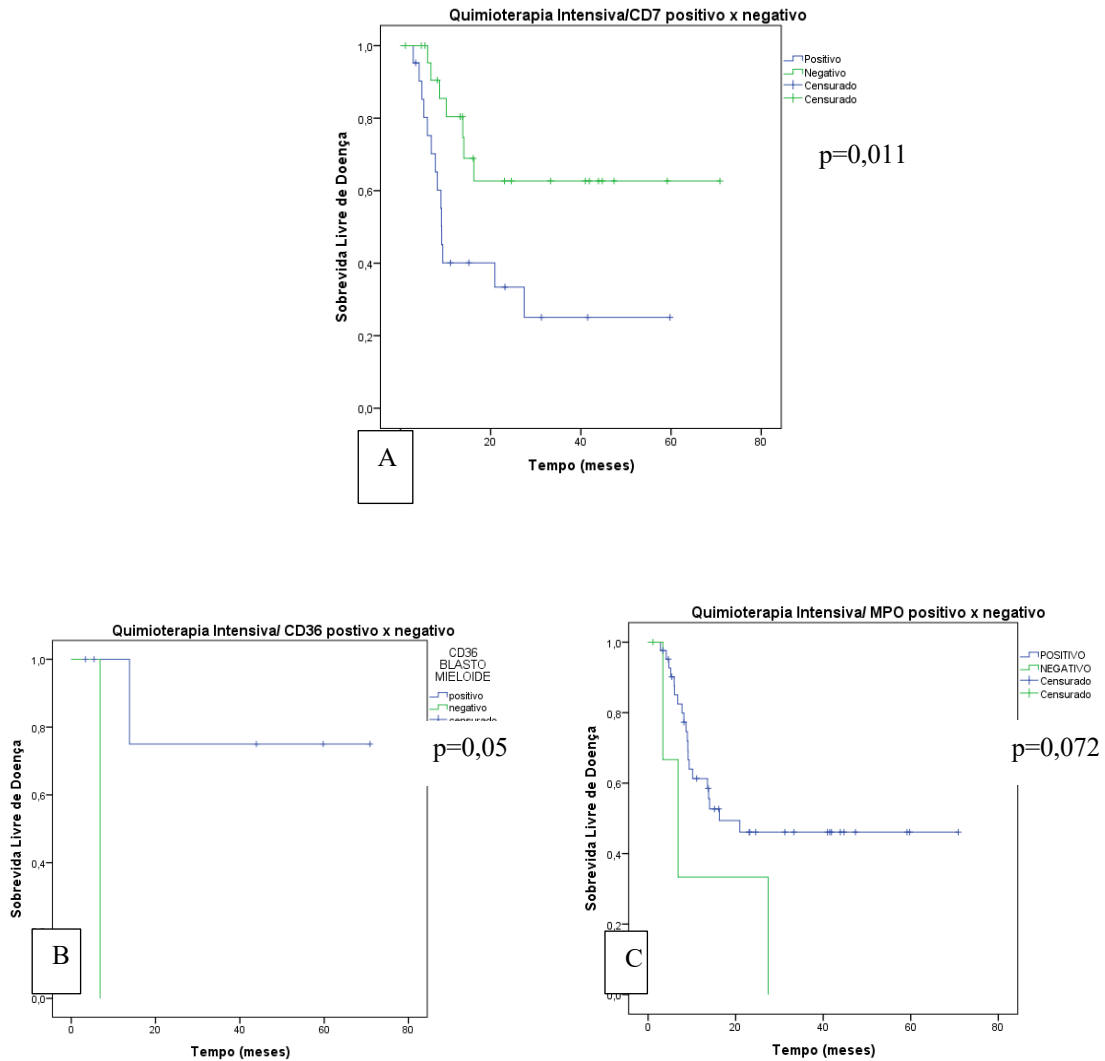
**Tabela 9-** Expressões antigênicas conforme resposta a quimioterapia intensiva

<b>Marcadores</b>	<b>Total n (%)</b>	<b>Remissão Completa n (%)</b>	<b>Refratária n (%)</b>	<b>Recidivado n (%)</b>	<b>p</b>
<b>CD34</b>					0,67
Positivo	46 (67,6)	15 (62,5)	15 (75)	16 (66,7)	
Negativo	22 (32,4)	09 (37,5)	05 (25)	08 (33,3)	
<b>CD7</b>					<b>0,031</b>
Positivo	32 (50)	7 (29,2)	11 (57,9)	14 (66,7)	
Negativo	32 (50)	17 (70,8)	8 (42,1)	7 (33,3)	
<b>CD13</b>					0,19
Positivo	64 (94,1)	23 (95,8)	20 (100)	21 (87,5)	
Negativo	4 (5,9)	1 (4,2)	0	3 (12,5)	
<b>CD33</b>					0,61
Positivo	63 (94)	23 (95,8)	17 (89,5)	23 (95,8)	
Negativo	04 (6)	01 (4,2)	02 (10,5)	01 (4,2)	
<b>MPO</b>					<b>0,017</b>
Positivo	54 (83)	22 (95,7)	12 (63,2)	20 (87)	
Negativo	11 (17)	01 (4,3)	07 (36,8)	03 (13)	
<b>CD56</b>					0,43
Positivo	18 (34,6)	4 (25)	5 (31,3)	9 (45)	
Negativo	34 (65,4)	12 (75)	11 (68,7)	11 (55)	
<b>HLA-DR</b>					0,36
Positivo	65 (95,6)	22 (91,7)	19 (95)	24 (100)	
Negativo	03 (4,4)	02 (8,3)	01 (5)	00	
<b>CD36</b>					0,019
Positivo	07 (63,6)	05 (100)	01 (25)	01 (50)	
Negativo	04 (36,4)	00 (0)	03 (75)	01 (50)	
<b>CD19</b>					0,61
Positivo	10 (15)	3 (12,5)	2 (11,1)	5 (21)	
Negativo	56 (85)	21(87,5)	16 (88,9)	19 (79)	
<b>CD11b</b>					0,6
Positivo	24 (40,7)	6 (31,6)	8 (47)	10 (43,5)	
Negativo	35 (59,3)	13 (68,4)	9 (53)	13 (56,5)	
<b>CD15</b>					0,5
Positivo	15 (24,6)	5 (26,3)	3 (15,8)	7 (30,4)	
Negativo	46 (75,4)	14 (73,7)	16 (84,2)	16 (69,6)	
<b>CD14</b>					0,76
Positivo	19 (28)	6 (25)	5 (25)	8 (33,3)	
Negativo	49 (72)	18 (75)	15 (75)	16 (66,7)	
<b>CD123</b>					0,75
Positivo	24 (92,3)	8 (89)	5 (100)	11 (92)	
Negativo	2 (7,7)	1 (11)	0	1 (8)	

**Fonte:** Elaboração da autora

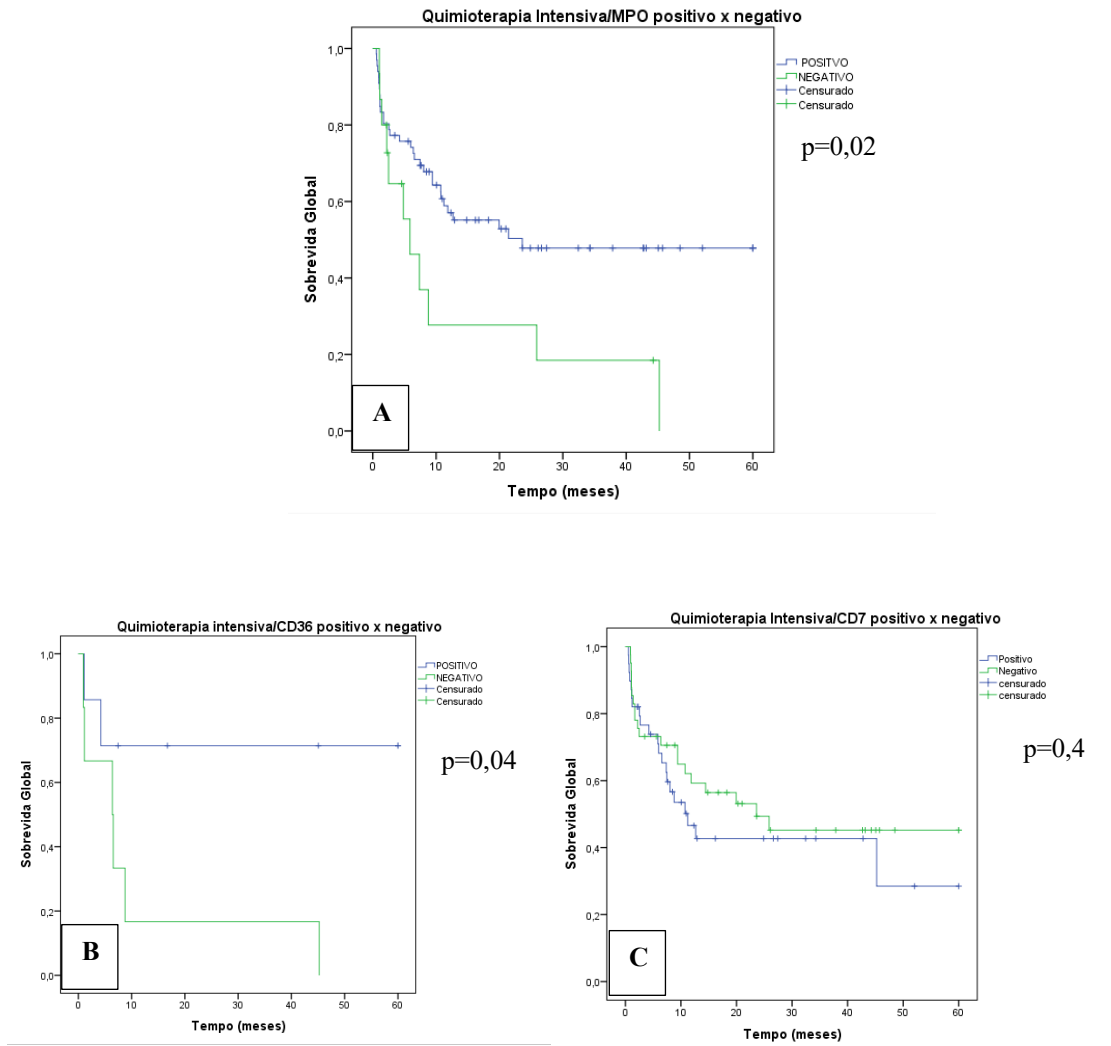
#### 5.4.4 Associação da expressão antigênica com Sobrevida Livre de Doença (SLD) e Sobrevida Global (SG) após quimioterapia intensiva

As expressões antigênicas que demonstraram diferença estatística quanto a resposta terapêutica foram associada a SLD e SG, representadas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. A SLD, para pacientes CD7 positivo foi de 25,1 %  $\pm$  0,11, com média de SLD de 22,7 meses IC 95% (12,39 – 33,16) e para os pacientes CD7 negativo foi de 62,7%  $\pm$  0,114; com média de SLD de 48,58 meses IC 95% (6,75 – 35,34),  $p=0,011$  (figura 9 A). A SLD entre os pacientes com expressão positiva e negativa para o CD36 não foi estatisticamente significativa,  $p=0,05$  (figura 9 B), não sendo também observado significância para a expressão do MPO,  $p=0,07$  (Figura 9 C). A SG em cinco anos, para pacientes MPO positivo foi de 47,8 %  $\pm$  0,06, com média de SG 32,5 meses, IC 95% (25,6 – 39,4), ao passo que entre os pacientes com MPO negativo, nenhum permaneceu vivo em 5 anos, apresentando uma média de SG 13,8 meses, IC 95% (3,9-23,6),  $p=0,02$ , como mostrado na Figura 10. A associação da SG entre os pacientes com expressão positiva e negativa para o CD36 foi estatisticamente significativa,  $p=0,04$  (figura 10 B), não sendo observado significância para a expressão do CD7,  $p=0,4$  (figura 10 C).



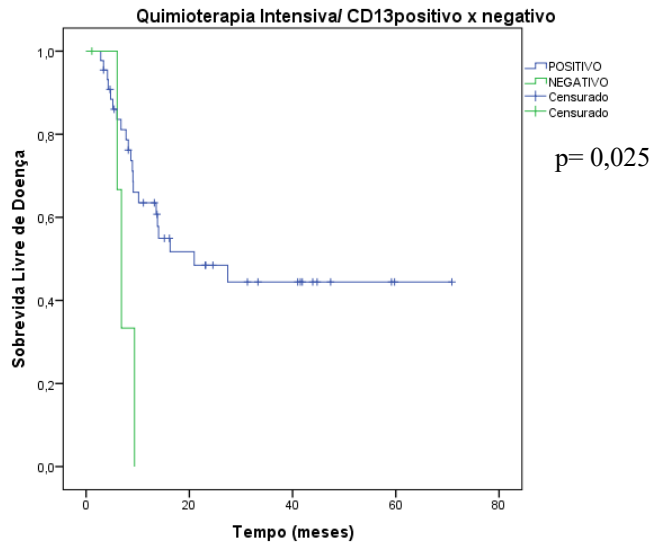
**Figura 9** - Gráficos de Sobrevida Livre de Doença (SLD) conforme expressão dos antígeno, nos pacientes submetidos a quimioterapia intensiva: A – Expressão de CD7 B- Expressão de CD36 e C- Expressão de MPO.

**Fonte:** Elaboração da autora

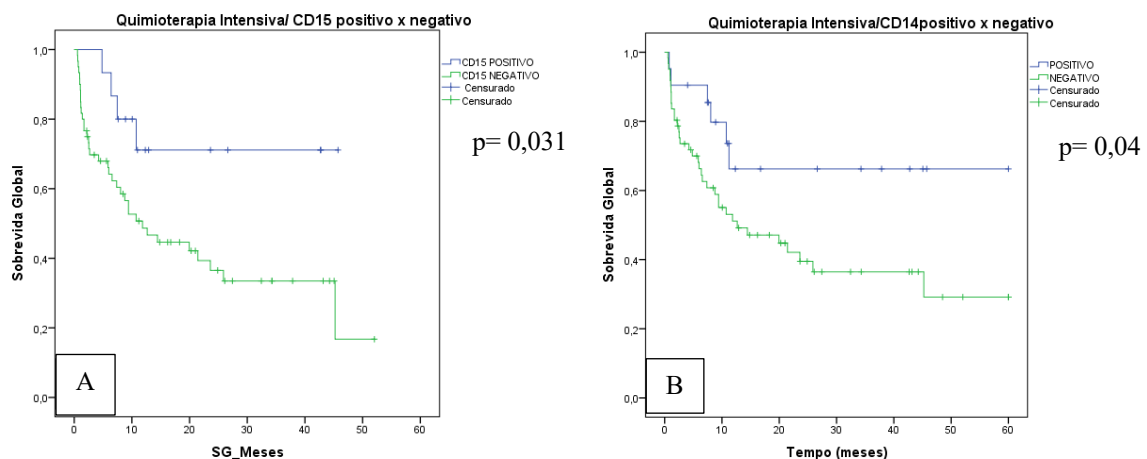


**Figura 10** - Gráfico de Sobrevida Global (SG) conforme expressão dos antígeno nos pacientes submetidos a quimioterapia intensiva: A – Expressão de MPO B- Expressão de CD36 e C- Expressão de CD7  
**Fonte:** Elaboração da autora

As outras expressões antigênicas, que não apresentaram significância para a resposta terapêutica, também foram avaliadas quanto a SLD e SG, sendo evidenciado maior SLD para a expressão positiva de CD13,  $p=0,025$  (Fig. 11) e maior SG para a expressão positiva de CD15,  $p=0,031$  (Fig. 12 A) e positiva de CD14,  $p=0,04$  (Fig. 12 B)



**Figura 11** - Sobrevida Livre de Doença conforme expressão de CD13  
 Fonte: Elaboração da autora



**Figura 12** - Sobrevida Global conforme expressão de CD15 (A) e CD14 (B).  
 Fonte: Elaboração da autora

#### 5.4.6 Associação da co-expressão antigênica com fatores de prognóstico

Conforme resultados de estudos prévios, foram selecionadas as seguintes combinações de marcações antigênicas para análise: CD34<sup>pos</sup>/HLA-DR<sup>pos</sup>; CD117<sup>pos</sup>/ CD15<sup>pos</sup>; CD13<sup>pos</sup>/CD33<sup>pos</sup>/CD117<sup>pos</sup>/MPO<sup>pos</sup>; CD34<sup>pos</sup>/ CD7<sup>pos</sup>; CD7<sup>pos</sup>/CD56<sup>pos</sup>; CD33<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup>; CD33<sup>pos</sup>/CD34<sup>neg</sup>; CD117<sup>pos</sup>/MPO<sup>pos</sup>. As co-expressões antigênicas foram avaliadas em relação aos fatores prognóstico quanto a idade, leucometria e estratificação de risco prognosticodo ELN-2017, encontram-se representadas na tabela 10 .

Foi observado uma associação significativa da co-expressão CD33<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup> com o grupo de risco desfavorável e intermediário (p=0,05). Os resultados observados entre a

associação das marcações combinado CD117<sup>pos</sup>/CD15<sup>pos</sup> e CD117<sup>pos</sup>/MPO<sup>pos</sup>; CD33<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup>; CD33<sup>pos</sup>/CD34<sup>neg</sup> com os fatores prognósticos leucometria e idade não representaram a associação da co-expressão uma vez a frequência de CD117<sup>pos</sup> foi de 100/101 (99%) e de CD33<sup>pos</sup> foi de de 96/100(96%).

**Tabela 10** - Associação da co-expressão antigênica com fatores de prognóstico

<b>Fatores prognósticos</b>	<b>Total</b>	<b>CD34 + e HLADR+</b>	<b>Outras Combinações</b>	<b>p</b>
	<b>102 (100)</b>	<b>73 (71,6)</b>	<b>29 (28,4)</b>	
Idade (anos)				0,071
<60	79 (77,5)	53 (67)	26 (33)	
≥60	23 (22,5)	20 (87)	3 (13)	
Leucometria				0,862
≥ 50 mil	20 (19,6)	14 (70)	6 (30)	
<50 mil	82 (80,4)	59 (72)	23 (28)	
Estratificação de risco				0,15
Desfavorável	23 (35,4)	18 (78,3)	5 (21,7)	
Intermediário	33 (50,8)	24 (72,7)	9 (27,3)	
Favorável	9 (13,8)	4 (44,4)	5 (55,6)	
<b>Fatores prognósticos</b>	<b>Total</b>	<b>CD117 + e CD15+</b>	<b>Outras Combinações</b>	<b>p</b>
	<b>102 (100)</b>	<b>15 (14,7)</b>	<b>87 (85,3)</b>	
Idade				0,942
<60	69 (79,3)	12 (17,4)	57 (82,6)	
≥60	18 (20,7)	3 (16,7)	15 (83,3)	
Leucometria				0,010
≥ 50 mil	15 (17,2)	6 (40)	9 (60)	
<50 mil	72 (82,8)	9 (12,5)	63 (87,5)	
Estratificação de risco				0,703
Desfavorável	15	2 (13,3)	13 (86,7)	
Intermediário	32	7 (21,9)	25 (78,1)	
Favorável	8	1 (12,5)	7 (87,5)	



**Tabela 10** - Associação da co-expressão antigênica com fatores de prognóstico (Continuação)

<b>Fatores Prognosticos</b>	<b>Total</b>	<b>CD13+ e CD33+ e CD117+ e MPO+</b>	<b>Outras Combinações</b>	<b>p</b>
	<b>95 (100)</b>	<b>68 (71,6)</b>	<b>27(28,4)</b>	
Idade				0,139
<60	76 (80)	57(75)	19 (25)	
≥60	19 (20)	11 (57,9)	8 (42,1)	
Leucometria				0,608
≥ 50 mil	18 (18,9)	12 (66,7)	6 (33,3)	
<50 mil	77 (81)	56 (72,7)	21 (27,3)	
Estratificação de risco				0,482
Desfavorável	19 (31,7)	14 (73,7)	5 (26,3)	
Intermediário	32 (53,3)	22 (68,7)	10 (31,3) n	
Favorável	9 (15)	8 (88,9)	1 (11,1)	
<b>Fatores Prognosticos</b>	<b>Total</b>	<b>CD34+ e CD7+</b>	<b>Outras Combinações</b>	<b>p</b>
	<b>97 (100)</b>	<b>40(41,2)</b>	<b>57 (58,8)</b>	
Idade				0,701
<60	77 (79,4)	31 (40,3)	46 (59,7)	
≥60	20 (20,6)	9 (45)	11 (55)	
Leucometria				0,261
≥ 50 mil	19 (19,6)	10 (52,6)	9 (47,4)	
<50 mil	78 (80,4)	30 (38,5)	48 (61,5)	
Estratificação de risco				0,133
Desfavorável	21 (33,9)	11 (52,4)	10 (47,6)	
Intermediário	33 (53,2)	16 (48,5)	17 (51,5)	
Favorável	08 (12,9)	1 (12,5)	7 (87,5)	

**Tabela 10-** Associação da co-expressão antigênica com fatores de prognóstico (**Continuação**)

<b>Fatores Prognosticos</b>	<b>Total</b>	<b>CD7 + e CD56+</b>	<b>Outras Combinações</b>	<b>p</b>
	<b>79 (100)</b>	<b>18(22,8)</b>	<b>61(77,2)</b>	
Idade				0,948
<60	61(77,2)	14(22)	47 (77)	
≥60	18(22,8)	4 (22,2)	14 (77,8)	
Leucometria				0,775
≥ 50 mil	15 (19)	3 (20)	12 (80)	
<50 mil	64 (81)	15 (23,4)	49(76,6)	
Estratificação de risco				0,290
Desfavorável	16(30,2)	4 (25)	12 (75)	
Intermediário	29 (54,7)	7 (24,2)	22 (75,9)	
Favorável	08 (15,1)	0(0)	8 (100)	
<b>Fatores Prognosticos</b>	<b>Total</b>	<b>CD33+ e CD34 +</b>	<b>Outras Combinações</b>	<b>p</b>
	<b>100 (100)</b>	<b>69(69)</b>	<b>(31(31))</b>	
Idade				0,017
<60	79 (79)	50 (63,3)	29 (36,7)	
≥60	21(21)	19 (90,5)	2 (9,5)	
Leucometria				0,914
≥50 mil	20 (20)	14 (70)	6 (30)	
<50 mil	80 (80)	55 (68,8)	25 (31,2)	
Estratificação de risco				<b>0,050</b>
Desfavorável	21(33,3)	16 (76,2)	5 (23,8)	
Intermediário	33(52,4)	24 (72,7)	9 (27,3)	
Favorável	9 (14,3)	3 (33,3 )	6 (66,7)	

**Tabela 10** - Associação da co-expressão antigênica com fatores de prognóstico (Continuação)

<b>Fatores Prognósticos</b>	<b>Total</b>	<b>CD33 + e CD34 –</b>	<b>Outras Combinações</b>	<b>p</b>
	<b>100 (100)</b>	<b>27(27)</b>	<b>73(73)</b>	
Idade				<b>0,042</b>
<60	79 (79)	25 (31,6)	54 (68,4)	
≥60	21(21)	2 (9,5)	19 (90,5)	
Leucometria				0,735
≥50 mil	20 (20)	6 (30)	14 (70)	
<50 mil	80 (80)	21 (26,2)	59 (73,8)	
Estratificação de risco				0,104
Desfavorável	21(33,3)	4 (19)	17 (81)	
Intermediário	33(52,4)	8 (24,2)	25 (75,8)	
Favorável	9 (14,3)	5 (55,6)	4 (44,4)	
<b>Fatores prognósticos</b>	<b>Total</b>	<b>CD 13 + e CD33 +</b>	<b>Outras Combinações</b>	<b>p</b>
	<b>100 (100)</b>	<b>91(91)</b>	<b>9(9)</b>	
Idade				0,198
<60	79 (79)	70 (88,6)	9 (11,4)	
≥60	21(21)	21 (100)	0 (0)	
Leucometria				0,295
≥ 50 mil	20 (20)	17 (85)	3 (15)	
<50 mil	80 (80)	74 (92,5)	6 (7,5)	
Estratificação de risco				0,789
Desfavorável	21(33,3)	20 (95,2)	1 (4,8)	
Intermediário	33(52,4)	30 (91)	3 (9)	
Favorável	9 (14,3)	8 (88,9)	1 (11,1)	

**Tabela 10-** Associação da co-expressão antigênica com fatores de prognóstico (Conclusão)

Fatores Prognosticos	Total	CD 117+MPO+	Outras Combinações	p
	<b>95 (100)</b>	<b>74 (77,9)</b>	<b>21 (22,1)</b>	
Idade				<b>0,019</b>
<60	76 (80)	63 (82,9)	13 (17,1)	
≥ 60	19 (20)	11 (57,9)	8 (42,1)	
Leucometria				0,537
≥ 50 mil	18 (18,9)	15 (83,3)	3 (16,7)	
<50 mil	77 (81)	59 (76,6)	18 (23,4)	
Estratificação de risco				
Desfavorável	19 (31,7)	14 (73,7)	5 (26,3)	<b>0,247</b>
Intermediário	32 (53,3)	25 (78,1)	7 (21,9)	
Favorável	9 (15)	9 (100)	0 (0)	

Fonte: Elaboração da autora

#### 5.4.7 Associação da co-expressão antigênica e resposta terapêutica

Avaliado a associação entre a resposta terapêutica e a co-expressão dos antígenos, foi observado que a co-expressão dos 4 marcadores pan-mielóides CD13<sup>pos</sup>/ CD33<sup>pos</sup> / CD117<sup>pos</sup> /MPO<sup>pos</sup> teve associação com uma frequência aumentada de resposta completa, enquanto a combinações CD34<sup>pos</sup>/CD7<sup>pos</sup> e CD7<sup>pos</sup>/ CD56<sup>pos</sup> foram associadas com refratariedade/recidiva e baixa taxa de resposta completa (Tabela 11) . O resultado observado entre a associação da marcação combinada CD117<sup>pos</sup>/MPO<sup>pos</sup> com resposta completa sustentada não representa a associação da co-expressão uma vez a frequência de CD117<sup>pos</sup> foi de 100/101 ( 99%) .

**Tabela 11** - Co-expressão antigênica e resposta a quimioterapia intensiva

<b>Marcadores</b>	<b>Total n (%)</b>	<b>Resposta Completa n (%)</b>	<b>Refratariedade n (%)</b>	<b>Recidiva n (%)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>CD34<sup>pos</sup> e HLADR<sup>pos</sup> (n=45)</b>	45(66,2)	15 (33,3)	14 (31,1)	16 (35,6)	0,870
Outras Combinações (n=23)	23(33,8)	9 (39,1)	6 (26,1)	8 (34,8)	
<b>CD117<sup>pos</sup> e CD15<sup>pos</sup> (n=14)</b>	14(23,3)	5 (35,7)	3(21,4)	6 (42,9)	0,641
Outras Combinações (n=46)	46(76,7)	14 (30,4)	16 (34,8)	16 (34,8)	
<b>CD13<sup>pos</sup> e CD33<sup>pos</sup> e CD117<sup>pos</sup> e MPO<sup>pos</sup> (n=49)</b>	49(76,6)	21(42,9)	11 (22,4)	17 (34,7)	<b>0,039</b>
Outras Combinações (n=15)	15(23,4)	2 (13,3)	8 (53,3)	5 (33,3)	
<b>CD34<sup>pos</sup> e CD7<sup>pos</sup> (n=22)</b>	22(34,4)	3 (13,6)	9 (41)	10 (45,4)	<b>0,017</b>
Outras Combinações (n=42)	42(65,6)	21 (50)	10 (23,8)	11 (26,2)	
<b>CD7<sup>pos</sup> e CD56<sup>pos</sup> (n=11)</b>	11(21,5)	0 (0)	5 (45,5)	6 (54,5)	<b>0,041</b>
Outras Combinações (n=40)	40(78,4)	16 (40)	11 (27,5)	13 (32,5)	
<b>CD33<sup>pos</sup> e CD 34<sup>pos</sup> (n=41)</b>	41(61,2)	14 (34,1)	12 (29,3)	15 (36,6)	0,937
Outras Combinações (n=26)	26(38,8)	10 (38)	7 (27)	9 (35)	
<b>CD33<sup>pos</sup> e CD 34<sup>neg</sup> (n=22)</b>	22(32,8)	9 (41)	5 (23)	8 (36)	0,739
Outras Combinações (n=45)	45(67,2)	15 (33,3)	14 (31,1)	16 (35,6)	
<b>CD 13<sup>pos</sup> e CD33<sup>pos</sup> (n=59)</b>	59 (88)	22 (37,3)	17 (28,8)	20 (33,9)	0,656
Outras Combinações (n=8)	8 (12)	2 (25)	2 (25)	4 (50)	
<b>CD 117<sup>pos</sup> MPO<sup>pos</sup> (n=54)</b>	54(84,4)	22 (41)	12 (22)	20 (37)	0,009
Outras Combinações (n=10)	10(15,6)	1(10)	7 (70)	2 (20)	

**Fonte:** Elaboração da autora

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo retrospectivo representa a realidade e resultados de uma única instituição, todavia o serviço de assistência oncohematológica nele prestado é referência para o atendimento de pacientes com Leucemia Aguda, de todo o estado da Bahia. Dos 102 pacientes, diagnosticados com LMA, no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2021, 45% foram procedentes da capital, sendo o restante procedente de diferentes municípios, das nove macrorregiões de saúde do Estado.

Conforme características clínicas da população do estudo, a idade média foi de 45 anos, inferior a idade média de 68 anos, observado nos Estados Unidos (“SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia. National Cancer Institute. Bethesda, MD”, [s.d.]; SHALLIS et al., 2019). Contudo, outros centros brasileiros, também reportaram uma idade média mais jovem, de 32 anos, em Campinas-São Paulo; 34 anos, em Teresina-Piauí e 42 anos, no Rio Grande do Sul (CAPRA et al., 2007; PAGNANO et al., 2000; REGO et al., 2003). No Brasil, essa diferença observada na idade média dos pacientes com LMA, pode ser atribuída as características populacionais brasileira. A população brasileira é mais jovem e apresenta menor expectativa de vida, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, enquanto as populações americanas e europeias são mais maduras, com maior expectativa de vida e conseqüentemente maior exposição ambiental a agentes cancerígenos (REGO et al., 2003). O acometimento de pacientes mais jovens, comparado com a média americana e europeia, foi observado em outras regiões como Índia e Argélia que reportaram idade média de 40 e 45 anos respectivamente (SHALLIS et al., 2019).

A discreta predominância de LMA detectada no sexo feminino 1,5:1,0, apesar de estatística insignificante, também foi observado em estudo realizado na região Sul do Brasil, que demonstrou uma leve tendência para o sexo feminino de 1:0,7 (CAPRA et al., 2007). Contudo, dados da literatura internacional, revelam que a proporção de homens para mulheres é igual a 1,5:1,0, com leve predominância no sexo masculino (JAHEDI et al., 2014; SHALLIS et al., 2019). A frequência levemente aumentada para sexo feminino também pode ter exercido alguma influência sob a idade média de 45 anos, uma vez que para o sexo masculino, o risco de desenvolver LMA parece aumentar progressivamente após os 50 anos de idade (SHALLIS et al., 2019).

As informações referente a avaliação de cariótipo e a pesquisa de mutações para o FLT3 e para o NPM1, por PCR não estavam disponíveis para todos os pacientes, pois a ausência de financiamento para sua cobertura pelo Sistema Único de Saúde, foi fator limitante. Alguns pacientes realizaram através de recursos próprios ou por meio de financiamento de um outro estudo, em andamento na instituição. A indisponibilidade desses exames pelo SUS restringiu a sua realização, de forma que a estratificação em grupos de risco prognóstico, baseado na classificação do ELN-2017, foi possível aplicar em 53/83 (63%) dos pacientes elegíveis a quimioterapia intensiva.

Desta forma, a estratificação em grupos de risco prognóstico, não pôde ser utilizada, de forma ampla, nas decisões terapêuticas. A falta de acesso aos exames de citogenética e molecular impossibilitou estratificar todos os pacientes conforme risco prognóstico, o que pode ter subestimado o quantitativo de pacientes no grupo de risco intermediário e desfavorável, que se beneficiariam do transplante alogênico de medula óssea, como terapia consolidativa, após a 1<sup>o</sup> remissão completa. As frequências observadas, neste trabalho, 56,5 % de pacientes com cariótipo normal; 20,4% com a presença da mutação do FLT3-ITD e 26% com mutação do NPM1, são frequências próximas aos valores reportado na literatura, 40-50% de cariótipo normal, 25% de mutação do FLT3-ITD e 30% de mutação do NPM1 (DAVER et al., 2019; FALINI et al., 2020; ZAIDI et al., 2008). O que reforça a importância do acesso a esses exames no SUS.

A categorização entre LMA primária e secundária, baseou-se no diagnóstico prévio de outras neoplasias hematológicas, corroborado com achados ao mielograma ou biópsia de medula óssea, sugestivos de transformação. A ausência de um rastreio para alterações citogenéticas específicas e moleculares típicas de LMA secundária, foi um fator limitante desse estudo, que pode ter subestimado o quantitativo de LMA secundária. Conforme dados da literatura, estima-se uma incidência de LMA secundária, em torno de 10-30% (OSSENKOPPELE; MONTESINOS, 2019). A frequência observada de pacientes com LMA secundária, ao diagnóstico, neste estudo, foi de 15,7%.

O planejamento terapêutico do paciente com LMA difere quanto a modalidade quimioterápica indicada, se intensiva ou de baixa intensidade. A indicação da modalidade terapêutica, levará em consideração a idade do paciente; o seu desempenho funcional; a presença de comorbidades; infecções associadas; anormalidades citogenéticas e moleculares; além do risco de mortalidade precoce associada ao tratamento; estimativas de taxas de resposta e resultados a longo prazo com as terapias propostas (KANTARJIAN et al., 2021a; NARAYANAN; WEINBERG, 2020). Avaliando a modalidade quimioterápica com base nas

características clínicas dos pacientes, foi observado neste trabalho que a idade < 60 anos, como esperado e evidenciado em outros estudos, é um fator preponderante na indicação de terapia quimioterápica intensiva, enquanto a idade  $\geq$  60 anos teve maior associação com quimioterapia de baixa intensidade.

Quanto ao tipo de LMA, quando primária ou de novo os pacientes tenderam a receber quimioterapia intensiva e quando secundária receberam quimioterapia de baixa intensidade, o que pode estar diretamente associado a idade, já que a LMA secundária é mais incidente em pacientes mais velhos. Conforme reportado em estudos prévios, pacientes com LMA secundário tendem a ser mais velhos, têm maior probabilidade de apresentar citogenética adversa e são menos comumente tratados com quimioterapia intensiva (OSSENKOPPELE; MONTESINOS, 2019)

Quanto a leucometria os pacientes foram categorizados em dois grupos: < 50 mil ou  $\geq$  50 mil/ $\mu$ L. Utilizou-se esse ponto de corte para a leucometria com base em estudos anteriores, em especial de Ganzel et al. No entanto, a definição do nível da leucometria que deve ser considerado elevado para a LMA, diverge bastante entre os estudos, sendo sugeridos pontos de corte em valores de 20.000 células/ $\mu$ L; 30.000 células/ $\mu$ L; 50.000 células/ $\mu$ L e 100.000 células/ $\mu$ L (GANZEL; ROWE, 2011). A definição de hiperleucocitose, é aplicada para valores de leucócitos  $\geq$  100.000 células/ $\mu$ L, nos quais, frequentemente, associa-se a risco aumentado de desenvolver lise tumoral e sintomas clínicos secundário a leucostase, estando esse parâmetro laboratorial associado com alta taxa de mortalidade precoce (GANZEL; ROWE, 2011; SHALLIS et al., 2020). Apesar das manifestações clínicas secundárias à leucostase serem melhor documentadas quando leucócitos > 100.000, foi observado evidências de leucostase em cerca de 85% e 75% de exames de autopsias que originalmente apresentavam leucócitos  $>50 \times 10^9$  células/L e  $>100 \times 10^9$  células/L, respectivamente (GANZEL; ROWE, 2011).

Historicamente, a leucometria é considerada um importante fator de mau prognóstico, seja pela alta carga tumoral ou pela possível associação com mutações moleculares de alto risco, como a mutação do FLT3-ITD (GANZEL; ROWE, 2011). Contudo, na amostra estudada, as categorias de leucometria < 50 mil ou  $\geq$  50 mil/ $\mu$ L, não apresentaram diferença quanto a modalidade terapêutica instituída ou resposta após tratamento.

A terapia quimioterápica intensiva foi administrada em 84/99 (84,8%) pacientes, sendo que 16 (19%) pacientes foram a óbito em  $\leq$ 30 dias do início do tratamento quimioterápico, restando 68 pacientes que foram avaliados quanto a resposta terapêutica. A mortalidade precoce, após quimioterapia intensiva, correspondeu a 16/43 (37,2 %), do total de óbito. O *Southwestern Oncology Group* (SWOG), uma grande organização de ensaios clínicos de câncer



em adulto, compreendendo instituições americanas e canadenses, demonstraram uma taxa de mortalidade de 12%, em 30 dias, enquanto outro estudo, retrospectivo reportou taxas de mortalidade de 19%, em 60 dias (APPELBAUM et al., 2006; LI et al., 2021). Esses dados apontam para um percentual bastante elevado de mortalidade precoce, nesse estudo.

Dos 68 pacientes avaliados após terapia quimioterápica intensiva, 48/68 (70,6%) apresentaram remissão completa e 20/68 (29,4%) foram refratários. Conforme dados da literatura, a taxa de resposta completa variou de acordo com a idade, de 60-85% para adultos  $\leq 60$  anos e de 40-60% para adultos  $>60$  % (AITKEN et al., 2021; DÖHNER et al., 2017; NEWELL; COOK, 2021). Considerando na amostra de pacientes submetidos a QT intensiva que 88% apresentavam  $< 60$  anos, os dados são semelhantes ao descrito na literatura. Enquanto a taxa de quimiorrefratariedade reportada por estudos anteriores foi de 30-40% (HORIBATA et al., 2019), a amostra analisada apresentou taxa de refratariedade de 29,4% .

Foi observado que a taxa de SG em 5 anos, para os pacientes submetidos a terapia intensiva foi de 36,5%, com tempo médio de sobrevida de 29 meses, enquanto para os pacientes submetidos a terapia paliativa foi de 29,5%, com tempo médio de sobrevida de 9,26 meses. Conforme dados da literatura, a LMA tem um curso clínico agressivo, com taxa de SG em cinco anos, em torno de  $\sim 20\%$  (KOSCHMIEDER et al., 2010; NEWELL; COOK, 2021; SAITO et al., 2010). Os estudos que avaliaram pacientes jovens  $< 60$  anos, encontraram uma taxa de SG de 40-50% e para os pacientes com idade entre 60-65anos, a estimativa de SG em 5 anos foi de 30-40%. (AITKEN et al., 2021; KANTARJIAN et al., 2021b; PELCOVITS; NIROULA, 2020; TANG; SCHUH; YEE, 2021). Dessa forma, considerando a idade média de (45,3 +/- 17,0) para os pacientes deste estudo, a taxa de SG em 5 anos, para quem fez QT intensiva foi próximo a taxa de SG reportada na literatura, o mesmo foi observado ao comparar o tempo médio de SG dos pacientes em QT paliativa (9,26 meses) quando comparado aos dados reportados na literatura de 6-9 meses, dependendo do tratamento paliativo instituído .

A heterogeneidade dos desfechos clínicos observados na LMA, impulsionou a pesquisa de variáveis clínicas, laboratoriais, citogenéticas e moleculares, como marcadores prognósticos de resposta terapêutica, sobrevida global e risco de recaída (LIERSCH et al., 2014). Desta forma, a estratificação de risco prognóstico proposta pela ELN- 2017 é importante e de grande utilidade na prática clínica, porque através das características biológicas da doença, consegue agrupar os pacientes conforme comportamento semelhante da doença e prever taxas de resposta completa e sobrevida global, para cada categoria de risco. Na prática clínica, essas informações são extremamente relevantes e podem ser utilizadas na tomada de decisões terapêutica (DÖHNER et al., 2017; PELCOVITS; NIROULA, 2020) .

Neste trabalho, alguns indicadores, reconhecidamente associadas a mau prognóstico, como idade avançada, leucometria elevada, estratificação de risco prognóstico e histórico de neoplasia hematológica prévia, foram avaliados quanto a resposta após quimioterapia intensiva. Das variáveis avaliadas, apenas a idade, demonstrou significância na manutenção de resposta completa. No entanto, leucometria elevada, estratificação em grupos de risco prognóstico e natureza da LMA (primária ou secundária), ao contrário do que foi reportado em outros artigos, não demonstraram associações relevantes em termo de resposta após quimioterapia intensiva (CHANG et al., 2004a; DANG et al., 2013). Conforme previamente mencionado, o acesso limitado aos exames de citogenética e avaliação molecular, provavelmente justifique a não reprodutibilidade da significância estatística entre as taxas de resposta, dos grupos de risco prognóstico.

Neste cenário de acesso restrito aos exames considerados padrão ouro para avaliação prognóstica, a citometria de fluxo multiparamétrica, método acessível e bastante difundido, entre os serviços de saúde, passa a ser avaliado quanto a sua função prognóstica na LMA. Além de ser essencial para o diagnóstico e classificação da leucemia aguda, têm sido associada com prognóstico, devido ao reconhecimento de perfis imunofenotípicos característicos para algumas anormalidades citogenéticas e moleculares. Adicionalmente, a detecção de DRM por citometria de fluxo provou ser útil para prever recidiva e resultado desfavorável, em pacientes com LMA (DÖHNER et al., 2017; SHANG et al., 2019).

A função prognóstica das marcações antigênicas da citometria de fluxo, na LMA, foi explorada por uma série de estudos. Contudo, devido as discordâncias de resultados, ainda não foi possível estabelecer um consenso sobre quais marcadores, teriam significado prognóstico (CHANG et al., 2004b; COSTA et al., 2017; DANG et al., 2013; HENRIQUE et al., 2020; JAHEDI et al., 2014; LI et al., 2011; MASON; JUNEJA; SZER, 2006; OSSENKOPPELE; VAN DE LOOSDRECHT; SCHUURHUIS, 2011; PLESA et al., 2008; VAN SOLINGE et al., 2018; WEBBER; CUSHING; LI, 2008).

O presente estudo analisou de forma abrangente a imunofenotipagem de 102 pacientes com LMA, quanto à expressão isolada dos antígenos, assim como a co-expressão dos mesmos, em relação a sua frequência, associações para subgrupos prognósticos de idade, contagem de leucócitos, estratificação de risco pelo ELN-2017 e resposta a quimioterapia intensiva. No que se refere a frequência dos antígenos, observados na população do estudo, os marcadores mielóides mais expressos nas células blásticas leucêmicas foram CD117, CD33 e CD13, em concordância com os dados de literatura (SARMA et al., 2015). Foram encontradas 85 marcações anômalas nas amostras testadas, sendo que 12 apresentaram dupla marcação

anômala. Apesar de nem todos os pacientes terem sido avaliados para todas as marcações anômalas, a presença do fenótipo aberrante mostrou-se positivo em 71,6% dos casos. Conforme relatos na literatura, a expressão do fenótipo aberrante variou entre 30% e 88% (SHARMA et al., 2020). Essa ampla variação na incidência de fenótipos aberrantes, pode ser atribuída a diferenças nos critérios usados para aberrância, o valor do ponto de corte, número de antígenos estudados, tamanho da amostra e diferenças nos reagentes e clones de anticorpos monoclonais (JAHEDI et al., 2014; SARMA et al., 2015; SHARMA et al., 2020).

Dentre os fenótipos aberrantes, o antígeno linfoide mais frequentemente expresso pelo blasto mieloide foi o CD7 (52,6%), seguido pelo CD19 (12,2%), achados consistentes com os dados da literatura, que registram em ordem de prevalência o CD7 como o antígeno linfoide T aberrante, mais frequentemente expresso na LMA, seguido pelo CD19 antígeno linfoide B (SARMA et al., 2015; SHARMA et al., 2020).

A presença das marcações antigênicas isoladas, foram avaliadas quanto a idade, nível de leucometria e estratificação de risco prognóstico. Quando avaliado o indicador prognóstico idade, a positividade para CD34 foi mais frequentemente observada em pacientes com idade  $\geq$  60 anos, ao passo que pacientes  $<60$  anos tiveram uma frequência maior de positividade de MPO quando comparado com pacientes  $\geq$  60 anos. Esses resultados são diferentes dos encontrados em outro estudo, que avaliou 808 pacientes com LMA, quanto a frequência dos antígenos conforme grupo etário. Além disso, esse mesmo estudo reportou uma associação, não evidenciada nessa pesquisa, de uma maior expressão de HLA-DR e menor expressão de CD19 em idosos ( $> 60$  anos), do que a observada em crianças ( $<16$  anos) e adultos (16-60 anos) (LI et al., 2011).

Quanto ao nível da leucometria, houve uma associação positiva para o CD11b com níveis mais elevados de leucócitos, o que também foi observado em estudos anteriores que associou essa expressão a um subgrupo de maior contagem de leucócitos  $\geq 100.000/\mu\text{L}$ . Pesquisas anteriores, demonstraram associações significantes de aumento dos níveis de leucócitos com a expressão de HLA-DR, CD4 ou CD14, assim como a associação de baixo nível de leucometria com a expressão CD117, MPO, Gly-A, CD13 ou CD15. Contudo, esses resultados não foram reproduzidos neste estudo (LI et al., 2011). Outra associação descrita na literatura, não observada neste estudo, foi a relação entre a positividade para antígeno linfoide aberrante ou positividade do CD56 com nível aumentado de leucócitos (SHARMA et al., 2020; HENRIQUE et al., 2020;)

A frequência da expressão antigênica foi avaliada entre os grupos de risco prognóstico da classificação do ELN-2017 e como esperado, devido ao reduzido tamanho da amostra que foi

possível classificar, não foi observado associação significativa de nenhum dos marcadores estudados, com os grupos de risco prognóstico. De acordo com os conhecimentos atuais, a presença da co-expressão de alguns marcadores, consegue delinear melhor um perfil imunofenotípico característico para algumas anormalidades citogenéticas e moleculares. Algumas alterações citogenética se correlacionam com um perfil imunofenotípico característico:  $t(15;17)(q24.1;q21.2)$ PML-RARA expressa fortemente MPO<sup>pos</sup> e CD117<sup>pos</sup>, CD13<sup>pos</sup>, CD33<sup>pos</sup>, CD34<sup>neg</sup>, HLA-DR<sup>neg</sup>, CD15<sup>neg</sup> e CD16<sup>neg</sup>; a  $t(8;21)(q22;q22.1)$  RUNX1-RUNX1T1 apresenta HLA-DR<sup>pos</sup>, MPO<sup>pos</sup>, CD13<sup>pos</sup>, CD33<sup>neg</sup>, CD19<sup>pos</sup>, CD56<sup>pos</sup> ou CD79a<sup>pos</sup> e a  $Inv(16)(p13.1q22)$  CD4<sup>pos</sup>, CD36<sup>pos</sup> ou CD38<sup>pos</sup>, CD11b<sup>pos</sup>, CD2 pode expressar CD15<sup>pos</sup> e/ou CD65<sup>pos</sup> (BAIN; BÉNÉ, 2019). Algumas mutações gênicas também foram associadas a um perfil imunofenotípico: mutação do FLT3-ITD expressa CD33<sup>pos</sup> e CD13<sup>pos</sup> com expressão variável de CD34 ou CD117 e co-expressão aberrante de CD7<sup>pos</sup> e a mutação do NPM1 na ausência do FLT3-ITD, apresenta CD34<sup>neg</sup>, forte expressão de CD33<sup>pos</sup> e CD13<sup>pos</sup>, CD117<sup>pos</sup>, CD123<sup>pos</sup> com HLA-DR<sup>neg</sup> em 50% dos casos (OSSENKOPPELE; MONTESINOS, 2019; RAUSEI-MILLS et al., 2008). O rastreo e diagnóstico precoce de alterações citogenéticas e moleculares específicas são essenciais para prever o prognóstico, orientar o tratamento e monitorar a DRM (SHANG et al., 2019). Nesse sentido, o rastreo de possíveis alterações citogenéticas e moleculares através da citometria de fluxo e morfologia, permitiria a rápida suspeita da associação com uma categoria citogenética/genética específicas, orientando investigações confirmatórias apropriadas (BAIN; BÉNÉ, 2019).

Conforme avaliação de resposta, após quimioterápica intensiva, a expressão positiva para CD7 apresentou probabilidade significativamente aumentada de recidiva e refratariedade. Esses dados substanciam a associação da expressão positiva de CD7 com menor SLD quando comparado com pacientes que não expressam a molécula, nesse estudo. Contudo, não foi observado associação significativa quando avaliado SG, nos pacientes com expressão CD7<sup>pos</sup>. Os dados da literatura corroboram a associação prognostica da marcação CD7 com uma doença de curso clínico mais agressivo, com baixas taxas de resposta completa e sobrevida global (HENRIQUE et al., 2020; MASON; JUNEJA; SZER, 2006; SHARMA et al., 2020). Em contrapartida, a expressão positiva de MPO correlacionou-se com maior associação com resposta completa e maior SG quando comparado com pacientes negativos. A relação prognostica da expressão positiva de MPO é consistente na literatura. Acredita-se haver uma relação direta entre o quantitativo de expressão de MPO, na célula leucêmica e a citotoxicidade induzida por drogas e mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produzido na mitocôndria, citosol e peroxissomos das células neoplásicas. A existência de MPO dentro das células leucêmicas parece ser uma

desvantagem a célula neoplásica, pois através de reações de oxidação, conduzirá a mesma à apoptose quando a quimioterapia é administrada. Outros dados apontam que o grau de expressão de MPO tenha uma relação direta com a taxa de resposta completa, sobrevida global e sobrevida livre de progressão (MATSUO et al., 2003).

Ao contrário do que foi reportado em estudos prévios, não houve nenhuma associação significativa entre a expressão positiva de CD34, CD13, CD14, CD11b, HLA-DR com reduzidas taxa de resposta completa ou a expressão positiva de CD15 e CD19 com melhores taxas de resposta completa (HENRIQUE et al., 2020b; LI et al., 2011; MASON; JUNEJA; SZER, 2006). Contudo, a expressão positiva de CD15 e CD14 demonstraram associação significativa com maior sobrevida global, quando comparado a sua expressão negativa. Outros dados reportados, nesse estudo, de associação significativa da expressão positiva de CD13 com maior SLD e expressão positiva de CD36 com maior SG e SLD, devem ser avaliados com cautela, devido ao reduzido número de pacientes testados para essas expressões. Por isso, ao interpretar os resultados, é necessário considerar as limitações do estudo devido ao reduzido tamanho da amostra que permite considerar os resultados encontrados apenas para a população em questão e gerar hipóteses; a ausência de uniformização de testagem de todo o painel na população estudada e aos dados limitados de alterações citogenéticas e moleculares, não sendo possível avaliar a interferência de associações imunofenotípicas e aberrações genéticas, no valor prognóstico dos marcadores antigênicos.

As co-expressões analisadas, neste trabalho, foram selecionadas baseadas em resultado de estudos anteriores . (BAIN; BÉNÉ, 2019; MASON; JUNEJA; SZER, 2006; PLESA et al., 2008). Avaliando a associação das características clínicas com a co-expressão de alguns marcadores, observamos que a associação observada entre a presença das marcações combinadas e a resposta após quimioterapia, apóia relatos anteriores que atribuem um bom prognóstico ao fenótipo panmieloide. Investigamos as implicações prognósticas da co-expressão dos marcadores mieloides presentes em nosso painel - ou seja, CD13, CD33, CD117 e MPO. Infelizmente, não conseguimos implementar os critérios panmieloides, compostos pelas 5 marcações antigênicas, devido a exclusão da marcação CD65w dos testes de rotina em nossa instituição (LEGRAND et al., 2000; MASON; JUNEJA; SZER, 2006). Contudo, mesmo com esse painel mieloide composto de 4 antígenos, foi possível observar uma relevância estatística em termos de maior taxa de resposta completa quando essa combinação mostrou-se positiva para os 4 antígenos.

Contudo, a presença da co-expressão CD34<sup>pos</sup>/CD7<sup>pos</sup> teve menor associação com manutenção de resposta completa, assim como a marcação CD56<sup>pos</sup> /CD7<sup>pos</sup> foi evidenciada

nos pacientes que foram refratários ou recidivados. Na análise das marcações isoladas, observou-se que nem o CD34<sup>pos</sup> ou o CD56<sup>pos</sup> demonstrou diferença significativa em termos de resposta terapêutica. Contudo, apesar da análise isolada da expressão CD7<sup>pos</sup> já ter demonstrado relevância quanto a taxa reduzida de resposta completa, a co-expressão com o CD34<sup>pos</sup> ou CD56<sup>pos</sup>, pareceu ter maior associação com taxas reduzidas de resposta completa. Estudos anteriores avaliando a co-expressão de CD7<sup>pos</sup>/CD56<sup>pos</sup> já reportavam esse fenótipo como “leucemia aguda precursora de células mieloides/NK”, que normalmente se apresenta com envolvimento extramedular e linfadenopatia com ou sem massa mediastinal e têm uma resposta extremamente pobre à terapia (OSSENKOPPELE; VAN DE LOOSDRECHT; SCHUURHUIS, 2011). Da mesma forma, a co-expressão CD34<sup>pos</sup>/CD7<sup>pos</sup> é relatada como associada a várias proteínas resistentes a medicamentos e a um pior prognóstico. Acredita-se que o CD7 seja expresso precocemente na ontogenia hematopoiética e geralmente seja co-expresso com antígenos precoces. Apoiando essa visão, a literatura descreve que o CD34 encontra-se expresso em 75% dos casos de LMA positivos para CD7 (MASON; JUNEJA; SZER, 2006; SHARMA et al., 2020). A análise da co-expressão de CD33<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup> apresentou associação significativa para o subgrupo de risco desfavorável e intermediário, a literatura reporta resultado muito ruim de populações de pacientes com dupla negatividade ou positividade de ambos os marcadores que até o momento não conseguiu ser explicada e certamente se beneficiaria de estudos moleculares adicionais (PLESA et al., 2008).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O antígeno anômalo mais comumente expresso foi o CD7 e sua marcação individual isolada está associada a uma probabilidade aumentada de recidiva e refratariedade, assim como significativa redução da sobrevida livre de doença. De tal maneira, também podemos verificar que quando co-expresso nas marcações CD34<sup>pos</sup>/CD7<sup>pos</sup> e CD7<sup>pos</sup>/CD56<sup>pos</sup> foi associado com refratariedade/recidiva e baixa taxa de resposta completa respectivamente. A marcação positiva para o MPO demonstrou menor associação com refratariedade e apresentou diferença significativa quanto a sobrevida global. Foi também demonstrado que a co-expressão dos 4 marcadores pan-mieloides CD13/CD33/CD117 /MPO está associada a uma maior frequência de resposta completa.

Considerando a maior acessibilidade aos exames de imunofenotipagem na maioria dos serviços de saúde e a rápida disponibilidade de seus resultados, é importante que estudos prospectivos multicêntricos com maior número de pacientes venham a ser realizados para confirmar os achados obtidos neste estudo e identificar se há alterações citogenéticas ou moleculares subjacentes aos perfis imunofenotípicos encontrados e de que forma elas estão relacionadas às propriedades prognósticas desses perfis. Neste sentido, a identificação da correlação fenótipo-genótipo, com perfis imunofenotípicos associados a alterações citogenéticas e moleculares, poderá direcionar melhor os recursos financeiros destinados ao diagnóstico, a medida que identifica o exame molecular confirmatório mais adequado. Assim, um maior número de pacientes poderá ser adequadamente estratificado conforme seu prognóstico de risco e essa informação utilizada no seu direcionamento terapêutico.

## REFERÊNCIAS

- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017.
- AITKEN, M. J. L. et al. Prognostic and therapeutic implications of measurable residual disease in acute myeloid leukemia. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 14, n. 137, p. 1–15, 2021.
- ALFAYEZ, M. et al. CPX-351 (vyxeos) in AML. **Leukemia and Lymphoma**, v. 61, n. 2, p. 288–297, 2020.
- BACHAS, C. et al. High-frequency type I/II mutational shifts between diagnosis and relapse are associated with outcome in pediatric AML: Implications for personalized medicine. **Blood**, v. 116, n. 15, p. 2752–2758, 14 out. 2010.
- BÉNÉ, M. C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunology Letters**, v. 98, n. 1, p. 9–21, 15 abr. 2005.
- BENNETT, J. M. et al. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia A Report of the French American-British Cooperative Group. **Annals of Internal Medicine**, v. 103, n. 4, p. 626–629, 1985.
- BRENDEL, C.; NEUBAUER, A. Characteristics and analysis of normal and leukemic stem cells: current concepts and future directions. **Leukemia**, v. 14, p. 1711–1717, 2000.
- BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1221–1229, 2000.
- CARTER, J. L. et al. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 288, p. 1–29, 2020.
- CHEN, X.; CHERIAN, S. Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 4, p. 753–769, 2017.
- CHENG, H.; ZHENG, Z.; CHENG, T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. **Protein Cell**, v. 11, n. 1, p. 34–44, 2020a.
- CHENG, H.; ZHENG, Z.; CHENG, T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. **Protein Cell**, v. 11, n. 1, p. 34–44, 2020b.
- CHENG, H.; ZHENG, Z.; CHENG, T. **New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. Protein and Cell** Higher Education Press, 1 jan. 2020c.
- DAVER, N. et al. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. **Leukemia**, v. 33, n. 2, p. 299–312, 2019.
- DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 115, n. 3, p. 453–474, 2010.



DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood**, v. 129, n. 4, p. 424–447, 2017.

DÖHNER, H. et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel. **Blood**, v. 140, n. 12, p. 1347–1377, 2022.

**Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - Rio de Janeiro: INCA.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2022.

FERRARA, F.; MIRTO, S. Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukaemia of the elderly. **British Journal of Haematology**, 1996.

GANZEL, C.; ROWE, J. M. **Prognostic Factors in Adult Acute Leukemia. Hematology/Oncology Clinics of North America**, dez. 2011.

GILES, F. J. et al. The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 136, n. 4, p. 624–627, fev. 2007.

GUERRA A VERONICA; DINARDO COURTNEY; KONOPLEVA MARINA. Venetoclax-based Therapies for Acute Myeloid Leukemia. **Best Practice e Research Clinical Haematology**, v. 32, n. 2, p. 145–153, 2019.

HENRIQUE, L. et al. Aberrant Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia and Its Relationship with Prognosis and Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 14, n. 4, p. 274–288, 2020a.

HENRIQUE, L. et al. Aberrant Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia and Its Relationship with Prognosis and Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 14, n. 4, p. 274–288, 2020b.

HENRIQUE PAIVA, H.; MAGALHÃES REGO, E. Hematopoese. Regulação e Microambiente. Em: **Tratado de Hematologia capítulo 2.1ª edição, Atheneu**. [s.l: s.n.].

HEUSER, M. et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. **Blood**, v. 138, n. 26, p. 2753–2767, 2021.

HORIBATA, S. et al. Heterogeneity in refractory acute myeloid leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 21, p. 10494–10503, 2019.

ISHIKAWA, F. et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1315–1321, nov. 2007.

KALINA, T. et al. CD maps—dynamic profiling of CD1–CD100 surface expression on human leukocyte and lymphocyte subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2434, p. 1–15, 2019.

KANTARJIAN, H. M. et al. Acute Myeloid Leukemia: Historical Perspective and Progress in Research and Therapy Over 5 Decades. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 21, n. 9, p. 580–597, 2021a.

KANTARJIAN, H. M. et al. Acute myeloid leukemia: Treatment and research outlook for 2021 and the MD Anderson approach. **Cancer**, v. 127, n. 8, p. 1186–1207, 2021b.

KOSCHMIEDER, A. et al. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. **Lancet**, v. 376, p. 2000–2008, 2010.

LEGRAND, O. et al. **The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score** Blood. [s.l: s.n.].

LI, X. et al. Relevance of immunophenotypes to prognostic subgroups of age, WBC, platelet count, and cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia. **APMIS**, v. 119, n. 1, p. 76–84, jan. 2011.

MASON, K. D.; JUNEJA, S. K.; SZER, J. The immunophenotype of acute myeloid leukemia: Is there a relationship with prognosis? **Blood Reviews**, v. 20, n. 2, p. 71–82, 2006.

MCKINNON, K. M. Flow cytometry: An overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 2018, p. 5.1.1-5.1.11, 2018.

MEDINGER, M.; LENGERKE, C.; PASSWEG, J. Novel Prognostic and Therapeutic Mutations in Acute Myeloid Leukemia. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 13, p. 317–330, 2016.

MISAGHIAN, N. et al. Targeting the leukemic stem cell: the holy grail of leukemia therapy. **Leukemia**, v. 23, n. 1, p. 25–42, 2009.

NARAYANAN, D.; WEINBERG, O. K. How I investigate acute myeloid leukemia. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 42, n. 1, p. 3–15, 2020.

NOTTA, F. et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. **Science**, v. 351, n. 6269, p. 139–149, 2016a.

NOTTA, F. et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. **Science**, v. 351, n. 6269, 8 jan. 2016b.

ORFAO, A. et al. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. **Journal of Immunological Methods**, v. 475, n. 112684, 2019a.

ORFAO, A. et al. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. **Journal of Immunological Methods**, v. 475, n. 112684, 2019b.

OSSENKOPPELE, G.; MONTESINOS, P. **Challenges in the diagnosis and treatment of secondary acute myeloid leukemia**. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** Elsevier Ireland Ltd, 1 jun. 2019.

PELCOVITS, A.; NIROULA, R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. **Rhode Island medical Journal**, v. 103, n. 3, p. 38–40, 2020.

PLESA, C. et al. Prognostic value of immunophenotyping in elderly patients with acute myeloid leukemia: A single-institution experience. **Cancer**, v. 112, n. 3, p. 572–580, 1 fev. 2008.

POLLYEA, D. A. et al. **NCCN Guidelines Version 2.2022**: acute myeloid leukemia. 2022.

RAUSEI-MILLS, V. 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, abr. 2008.

REGO, M. F. N. et al. **Geographical variation of acute leukemias in Brazil Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. [s.l]: s.n.].

RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. a008250, p. 1–17, 2012a.

RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 12, dez. 2012b.

SCHUURHUIS, G. J. et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. **Blood**, v. 131, n. 12, p. 1275–1291, 2018.

**SEER Cancer Stat Facts: Acute Myeloid Leukemia. National Cancer Institute. Bethesda, MD**, Disponível em: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>>. Acesso em: 15 out. 2022.

SHALLIS, R. M. et al. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. **Blood Reviews**, v. 36, p. 70–87, 1 jul. 2019.

SHALLIS, R. M. et al. **Leukocytapheresis for patients with acute myeloid leukemia presenting with hyperleukocytosis and leukostasis**: a contemporary appraisal of outcomes and benefits. Expert Review of Hematology Taylor and Francis Ltd, 3 maio 2020.

TANG, K.; SCHUH, A. C.; YEE, K. W. 3+7 Combined Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia: Is It Time to Say Goodbye? **Current Oncology Reports**, v. 23, n. 120, p. 1–13, 2021.

THOMAS, X. First contributors in the history of leukemia. **World Journal of Hematology**, v. 2, n. 3, p. 62–70, 2013.

VAN LOCHEM, E. G. et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 60, n. 1, p. 1–13, 2004.

WEBBER, B. A.; CUSHING, M. M.; LI, S. **Prognostic Significance of Flow Cytometric Immunophenotyping in Acute Myeloid Leukemia** *Int J Clin Exp Pathol*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.ijcep.com/IJCEP708010](http://www.ijcep.com/IJCEP708010)>.

YAMASHITA, M. et al. Dysregulated haematopoietic stem cell behaviour in myeloid leukaemogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 7, p. 365–382, 2020.

YAMAUCHI, T. et al. A high serum uric acid level is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. **Anticancer Research**, v. 33, n. 9, p. 3947–51, 2013.