



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

CLARISSA BRENDA ALVES CAVALCANTE

**DETECÇÃO DA MUTAÇÃO *FLT3-ITD* POR PCR E SANGER EM PACIENTES COM
NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA E LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA: APLICAÇÃO
DIAGNÓSTICA E IMPLEMENTAÇÃO LABORATORIAL**

FORTALEZA

2025

CLARISSA BRENDA ALVES CAVALCANTE

**DETECÇÃO DA MUTAÇÃO *FLT3-ITD* POR PCR E SANGER EM PACIENTES COM
NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA E LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA: APLICAÇÃO
DIAGNÓSTICA E IMPLEMENTAÇÃO LABORATORIAL**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro
Co-Orientador: Dr. Carlos Leonardo de Aragão Araújo

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Roberta Taiane de Oliveira Germano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Nicholas Costa Barroso Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C364d Cavalcante, Clarissa Brenda Alves.

Detecção da mutação FLT3-ITD por PCR e Sanger em pacientes com neoplasia mielodisplásica e leucemia mieloide aguda : aplicação diagnóstica e implementação laboratorial / Clarissa Brenda Alves Cavalcante. – 2025.

48 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

Coorientação: Prof. Dr. Carlos Leonardo de Aragão Araújo.

1. Neoplasia mielodisplásica. 2. Leucemia Mieloide Aguda. 3. Eletroforese capilar. 4. Mutação em tandem. I. Título.

“Seja você quem for, seja qual a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá” – Ayrton Senna

AGRADECIMENTOS

Sinto-me profundamente abençoada pela oportunidade de dedicar-me aos estudos e por ter sido apoiado por tanta gente maravilhosa que transformaram desafios em degraus. Nessa jornada, aprendi tanta coisa que mal consigo mensurar em palavras. Encerro essa primeira etapa com uma bagagem extremamente rica e valiosa que ultrapassa o acadêmico. Como dizia um grande professor: “Ninguém faz nada sozinho. Ninguém chega a lugar nenhum sozinho”. Acredito que ser grata e reconhecer a importância de cada alma que nos guiam e tecem nosso caminho é uma das maiores virtudes que um ser humano pode ter. Com isso, agradeço a todos que contribuíram para a construção desse trabalho e para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, Lucivânia e José Carlos, pelo amor e apoio incondicional. Mesmo sem entender bem o que eu faço, sempre tiverem muito orgulho e respeito. Obrigada por todo suporte emocional e financeiro que me proporcionaram. Sem vocês, nada disso seria possível. Essa conquista é nossa! Pra vocês. Por vocês. Sempre.

Aos meus irmãos: Larissa e Emerson, e à minha sobrinha: Ianna: Vocês são as grandes paixões da minha vida. Crescer com vocês é uma dádiva e um privilégio.

Aos grandes amigos que o laboratório me deu: Alessandro, Ana Leya, Maria Amanda e Vanessa. Compartilhar essa jornada com vocês foi oscilar entre o surto coletivo e uma grande maravilha.

À toda equipe do Laboratório Citogenômica do Câncer, por serem profissionais e professores incríveis e por terem contribuído com a minha caminhada: João Vitor, Dra. Roberta, Letícia, Mayara, Dra. Dani Borges, Dyllan, Lucas Laurindo, Luri e todos os ICs que estão presentes. Obrigada por cada dúvida sanada e cafés no fim de tarde. Grande parte do meu amor pela ciência tem sido semeado por vocês.

Ao meu orientador técnico-científico, Dr. Leonardo Araujo: Sou muito grata por sua orientação nesse trabalho. Você é excepcional (tinha que ser Biotecnologista!). Obrigada por ser sempre tão solícito, gentil e por ensinar com tanta paciência e leveza. Você é exemplo!!!

Aos que estiveram comigo desde o começo: Meus amigos de graduação, agora amigos de profissão: Gabia, Jami, Cainho e Lewi. Amei compartilhar essa caminhada com vocês. Me sinto abençoada por ter pessoas tão incríveis na minha vida. Sou fã de cada um!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronald Feitosa, por ser exemplo de médico, professor e pesquisador. Obrigada por esses quatro anos de iniciação científica ricos no que há de mais valioso: conhecimento e paixão pela ciência.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a bolsa de iniciação científica.

RESUMO

A Neoplasia Mielodisplásica (SMD) é um grupo heterogêneo de doenças hematológicas clonais que afetam a medula óssea, predominante em idosos, caracterizada por hematopoiese ineficaz, citopenias periféricas e risco de progressão para Leucemia Mieloide Aguda (LMA). A mutação FLT3-ITD é um dos principais fatores associados a essa progressão, pois confere vantagens na proliferação descontrolada e um pior prognóstico, refletindo a complexidade da evolução clonal, sendo comumente mais encontrada em pacientes com o subtipo da doença “excesso de blastos 1 (EB1) e excesso de blastos 2 (EB2). A patogênese dessa doença envolve alterações genéticas somáticas, como mutações nos genes SF3B1, TP53, ASXL1 e FLT3, desregulação imunológica e inflamação crônica, associadas ao envelhecimento celular. A SMD é classificada em subtipos pela OMS, com prognóstico estratificado por sistemas como o IPSS-Revisado e o IPSS-Molecular, que incorporam dados morfológicos e moleculares. Estudos demonstram que, embora a FLT3-ITD ocorra em apenas 2-5% dos casos de SMD, sua presença está fortemente associada a maior carga de blastos, pior resposta terapêutica e sobrevida reduzida. Na LMA secundária à SMD, por sua vez, essa mutação é ainda mais prevalente (20-30% dos casos) e está ligada a alta taxa de recidiva e resistência a quimioterapia, reforçando seu papel como marcador prognóstico adverso. Este trabalho teve como objetivo investigar a presença da mutação FLT3-ITD em 45 pacientes diagnosticados com SMD e LMA, e como os mecanismos moleculares pelos quais essa mutação impulsiona a progressão da SMD para LMA e validar um protocolo de PCR para detecção de FLT3-ITD. Foi identificado a presença dessa mutação em uma paciente de 33 anos com LMA (de novo), confirmada por sequenciamento de Sanger (uma inserção de 27 pb, 94% de identidade no BLAST). Esses achados reforçam que, embora rara, a mutação FLT3-ITD pode estar presente em pacientes com LMA e, na SMD, pode ser um possível marcador de progressão e transformação para LMA.

Palavras-chave: Neoplasia Mielodisplásica; Leucemia Mieloide Aguda; Eletroforese Capilar

ABSTRACT

Myelodysplastic Neoplasms (MDS) are a heterogeneous group of clonal hematopoietic disorders affecting the bone marrow, predominantly in elderly patients, characterized by ineffective hematopoiesis, peripheral cytopenias, and a risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). The FLT3-ITD mutation is one of the key factors associated with this progression, as it confers a proliferative advantage and poorer prognosis, reflecting the complexity of clonal evolution. This mutation is more frequently found in patients with the "excess blasts" subtypes (EB1 and EB2). The pathogenesis of MDS involves somatic genetic alterations, such as mutations in SF3B1, TP53, ASXL1, and FLT3, as well as immune dysregulation and chronic inflammation, linked to cellular aging. MDS is classified into subtypes by the World Health Organization (WHO), with prognosis stratified by scoring systems such as the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) and the Molecular IPSS (IPSS-M), which incorporate morphological and molecular data. Studies show that although FLT3-ITD occurs in only 2-5% of MDS cases, its presence is strongly associated with higher blast counts, poorer therapeutic response, and reduced survival. In secondary AML (sAML) evolving from MDS, this mutation is even more prevalent (20-30% of cases) and is linked to high relapse rates and chemotherapy resistance, reinforcing its role as an adverse prognostic marker. This study aimed to investigate the presence of the FLT3-ITD mutation in 45 patients diagnosed with MDS and AML, as well as the molecular mechanisms by which this mutation drives MDS progression to AML, and to validate a PCR-based protocol for FLT3-ITD detection. The mutation was identified in a 33-year-old female patient with de novo AML, confirmed by Sanger sequencing (a 27-bp insertion, 94% BLAST identity). These findings reinforce that, although rare, the FLT3-ITD mutation may be present in AML patients and, in MDS, could serve as a potential marker for disease progression and leukemic transformation.

Keywords: Myelodysplastic Syndrome; Acute Myeloid Leukemia; Capillary Electrophoresis

LISTAS DE TABELA

Tabela 1: Evolução dos Sistemas de Classificação da SMD.....	5
Tabela 2: Categoria de Risco do IPSS-M na SMD.....	6
Tabela 3: Classificação de risco da SMD por alterações citogenéticas.....	8
Tabela 4: Dados clínicos e laboratoriais da caracterização dos pacientes portadores de SMD e LMA.....	22

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Modelo geral de crescimento e propagação da hematopoiese.....	2
Figura 2: Representação esquemática da proteína FLT3.....	13
Figura 3: Géis de eletroforese em gel de agarose dos pacientes com SMD e LMA.....	23
Figura 4: Cariótipo da paciente com translocação entre os cromossomos 2 e 11.....	24
Figura 5: Eletroferograma do sequenciamento Sanger confirmando a mutação <i>FLT3-ITD</i> no paciente 1.....	25
Figura 6: Visualização da sequência de interesse no BLAST.....	26
Figura 7: Região de 27 pb inserida (Amostra 1 – Paciente portadora de ITD); Amostra WT NICBI (Gene Referencia NCBI).)	27

LISTAS DE SIGLAS ABREVIATURAS

ARSA	Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
ANG 1	Angiopoietina – 1
DCs	Células Dendríticas
CHIP	Hematopoiese Clonal de Potencial Indeterminado
ELN	European LeukemiaNet
FAB	Franco-Americano-Britânico
(F)	Forward
FLT3	Tirosina Quinase 3
FLT3L	Ligante de Tirosina Quinase 3
HSCs	Células-tronco hematopoiéticas
IPSS-M	Sistema de Pontuação e Estratificação Prognóstica Molecular
IPSS-R	Sistema de Pontuação e Estratificação Prognóstica Revisado
ITD	Duplicações Internas em Tandem
KCL	Cloreto de Potássio
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMA-NOS	Leucemia Mieloide Aguda não especificada
LSC	Célula-tronco leucêmica
MO	Medula óssea
MSCs	Células mesenquimais
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
(R)	Reverse
SCF	Fator de célula tronco
SMD	Neoplasia Mielodisplásica
SMD-DM	Neoplasia Mielodisplásica de Multilinhagem
SMD-DU	Neoplasia Mielodisplásica de Unilinhagem
SMD-EB1	Neoplasia Mielodisplásica com Excesso de Blastos 1
SMD-EB2	Neoplasia Mielodisplásica com Excesso de Blastos 2
SMD – 5q	Neoplasia Mielodisplásica com deleção 5q
SMD-t	Neoplasia Mielodisplásica secundária à terapia
SMD-U	Neoplasia Mielodisplásica Não Classificável
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TKD	Domínio Tirosina Quinase

UV

Ultravioleta

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Etiopatogênese da SMD	2
1.2. Epidemiologia e grupos de risco	4
1.3. Classificação Clínica da SMD.....	5
1.4. Estratificação Prognóstica da SMD.....	6
1.5. Alterações moleculares e Importância da Citogenética Clássica	7
1.6. Evolução da Neoplasia Mielodisplásica para a Leucemia Mieloide Aguda	8
1.7. Leucemia Mieloide Aguda e seus tipos.....	9
1.8. FLT3 e sua importância na hematopoiese.....	11
1.9. Mutações no <i>FLT3</i> e impacto na evolução da doença.....	12
2. OBJETIVO	15
2.1. Gerais.....	15
2.2. Específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Aspectos Éticos	16
3.2. Obtenção das amostras	16
3.3. Extração de DNA genômico.....	16
3.4. Validação do protocolo da reação de PCR end-point do gene ITD	17
3.5. Eletroforese em Gel de Agarose.....	17
3.6. Cariótipo por bandeamento G	18
3.7. Sequenciamento pela técnica de Sanger.....	18
3.8. Purificação do sequenciamento Sanger	19
3.9. Análise <i>in silico</i> do sequenciamento Sanger do <i>FLT3</i>	19
4. RESULTADO	21
4.1. Caracterização das amostras.....	21
4.2. Validação da reação de PCR do gene <i>FLT3-ITD</i>	1
4.3. Detecção da mutação ITD por eletroforese em gel de agarose	1
4.4. Cariótipo dos pacientes portadores da SMD e LMA.	2
4.5. Confirmação da mutação <i>FLT3</i> por sequenciamento Sanger.....	4
4.6. Análise <i>in silico</i> da mutação do <i>FLT3</i> por sequenciamento Sanger.....	4
5. DISCUSSÃO	6
6. CONCLUSÃO	9
7. REFERÊNCIAS	10

1. INTRODUÇÃO

A Neoplasia Mielodisplásica (SMD) consiste em um grupo heterogêneo de doenças hematológicas clonais que comprometem a medula óssea (MO), que afeta principalmente indivíduos idosos. Caracteriza-se por uma hematopoiése ineficaz que leva a citopenias periféricas em uma ou mais linhagens, em decorrência de uma falha na produção de células progenitoras hematopoiéticas. Além de frequentemente está associado a risco de progressão para leucemia mieloide aguda (LMA) (Vassallo; Magalhães, 2009; Cazzola, 2020).

A progressão e o desenvolvimento da doença comumente se relacionam com alterações a nível celular e humoral, em que há falha na resposta imunológica devido à desregulação em mecanismos de checkpoints celulares e mecanismos de reparo ao dano no DNA, mecanismo esse que para de funcionar de forma eficiente com o aumento da idade (Dotson; Lebowicz, 2025). A etiologia da SMD pode ser classificada tanto como primária ou de novo, quando não se conhece a origem, ou seja, surge por razões idiopáticas, quanto secundária quando relacionada à exposição de agentes químicos, radiações e tratamento quimioterápicos, sendo esse subtipo ligado a casos mais complexos e mais graves (Dotson; Lebowicz, 2025).

Em decorrência de uma disfunção medular, indivíduos diagnosticados com SMD frequentemente apresentam mielopoiése clonal derivada de células-tronco com uma ineficiência medular que leva a falha da proliferação e diferenciação, conferindo uma vantagem proliferativa das células disfuncionais em decorrência de mutações e anormalidades genéticas em células-tronco hematopoiéticas (Teferri; Vardiman, 2009).

O diagnóstico da SMD exige uma abordagem integrada e multiparamétrica, combinando avaliação clínica, exames laboratoriais e estudos genéticos, além da história clínica do paciente, a fim de analisar exposições à tóxicos. Inicialmente, a avaliação se inicia com o hemograma do paciente, que frequentemente revela citopenias periféricas, seguida pelo aspirado e biópsia de medula óssea para avaliação morfológica. Esses exames permitem identificar as características displásicas típicas da SMD, como anomalias na maturação das linhagens mieloides, presença de sideroblastos em anel na série eritroide e megacariócitos displásicos, além da quantificação precisa de blastos, que deve permanecer abaixo de 20% para diferenciação da LMA (Tria et al., 2022).

A integração desses diversos parâmetros clínicos, morfológicos, citogenéticos e moleculares permite não apenas estabelecer o diagnóstico de SMD com maior precisão, mas também classificar os pacientes segundo sistemas prognósticos modernos, como o Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica Revisado (IPSS-R), orientando as decisões terapêuticas. Essa abordagem abrangente é especialmente relevante para diferenciar a SMD de outras condições que cursam com citopenias e displasia, como as anemias carenciais ou as

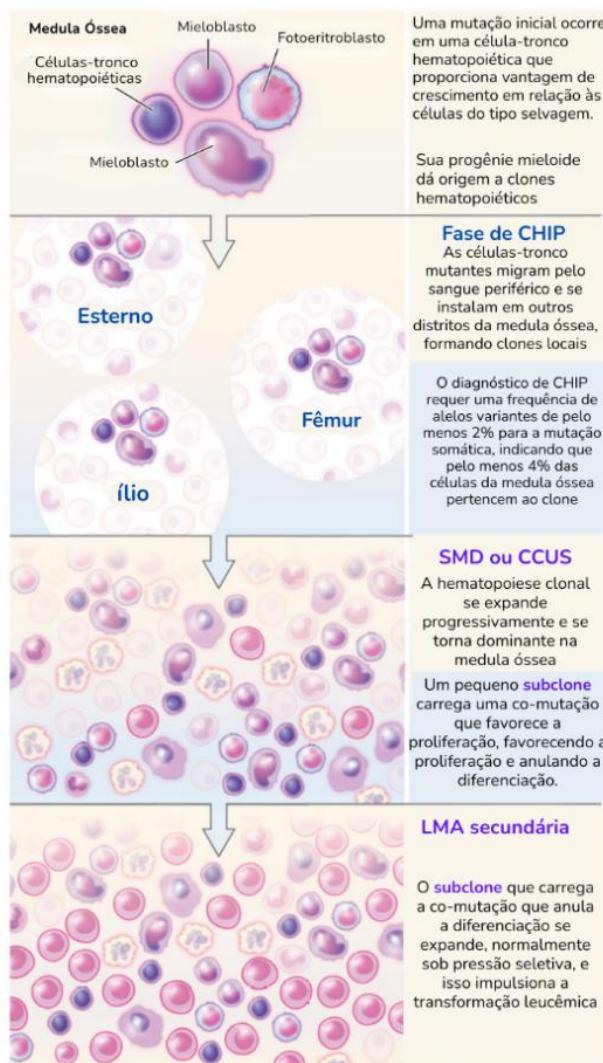
síndromes de insuficiência medular, garantindo assim a instituição precoce do tratamento mais adequado para cada caso (Greenberg et al., 2012).

1.1. Etiopatogênese da SMD

Por se tratar de um grupo de doenças heterogêneas, a SMD possui algumas etiopatogênese associadas e fatores que contribuem com o seu desenvolvimento, incluindo: alterações genéticas somáticas que se acumulam na medula óssea, decorrente de exposições ambientais e epigenéticos, fatores intrínsecos de envelhecimento e disfunções no microambiente medular (Cazzola, 2020).

A SMD dita como primária, ou de novo, por exemplo, apesar de não ser totalmente compreendida quanto a sua causa por se tratar de uma doença multifatorial, é associada a exposição crônica à agentes tóxicos e considerados carcinógenos, como inseticidas e agrotóxicos que são investigados pelo risco de desenvolvimento da doença. Além disso, fatores como obesidade, tabagismo e etilismo são investigados (Avgerinou et al., 2017).

Figura 1: Modelo geral de crescimento e propagação da hematopoiese.



Fonte: Adaptado Cazzola, 2020

Legenda Figura: Modelo de crescimento e como a hematopoiese se comporta em cada doença.

Processos oncogênicos resultantes de sucessivas mutações somáticas na medula óssea também são fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença. Nesse contexto, dentre os genes mais mutados na SMD, destacam-se *SF3B1*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *TP53* e *RUNX1*. Quando mutados, esses genes interrompem a hematopoiese normal ao desregular sua homeostase, podendo desencadear o desenvolvimento de uma doença (Calvete et al., 2023; Dotson; Lebowicz, 2025). A mutação no gene *TET2*, por exemplo, responsável por converter citosina metilada em 5-hidroximetilcitosina, marca epigenética na demetilação do DNA, tem efeito pró-malignidades hematológicas. As enzimas *IDH1/2*, quando mutadas, perdem sua função normal de produzir α -cetoglutarato (α -KG), essencial para a *TET2* e passam a inibir sua atividade, prejudicando a demetilação (Medeiros et. al., 2017).

Além disso, o fator inflamação, apontado como um dos pilares do envelhecimento, está constantemente associado com o desenvolvimento da SMD e malignidades hematológicas, principalmente observadas em indivíduos idosos (Villaume; Savona, 2025). As doenças inflamatórias procedem a SMD com aumento de citocinas inflamatórias, como o TNF-alfa, e associação à desregulação das vias de sinalização da imunidade inata que contribui para o envelhecimento das células hematopoiéticas (Sallman; List, 2019; Trowbridge; Starczynowski, 2021).

Também há outro tipo de SMD conhecida como SMD secundária à quimioterapia (SMD-t), caracterizada por ser o subtipo da doença na sua forma mais agressiva em que seu surgimento e incidência vem aumentando nos últimos anos (Dotson et al., 2022). De maneira geral, seu desenvolvimento está relacionado à constante exposição a radiações, tratamentos prévios com quimioterapias ou radioterapias (Pinheiro; Chauffailler, 2006; IARC, 2020). Esse subtipo de SMD corresponde a 10% dos casos, e está associado com a forma mais grave da doença com pior prognóstico em que comumente evolui para a LMA (Dotson et al., 2022).

De fato, exposições constantes à agentes carcinogênicos geram estresses no microambiente medular, desencadeando processos inflamatórios que contribuem para o envelhecimento celular e o favorecimento na proliferação de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) clonais, sobretudo de clones pré-leucêmicos (Abegunde et al., 2018; Trowbridge; Starczynowski, 2021). As células mesenquimais (MSCs) desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase das células HSCs por meio da secreção de fatores essenciais, como a quimiocina CXCL12, o fator de célula-tronco (SCF) e a angiopoietina-1 (Ang-1) (Méndez-Ferrer et al., 2010; Morrison; Scadden, 2014).

No contexto da SMD e de leucemias, observa-se uma disfunção das MSCs, caracterizada por uma redução na produção desses fatores e por alterações no microambiente medular (Geyh et al., 2016), falha essa que contribui para a depleção e mau funcionamento das HSCs, agravando a disfunção hematopoiética e favorecendo a progressão da doença (Medyouf et al., 2014).

Fatores como idade, recorrentes mutações genéticas somáticas, mutações germinativas, alterações epigenéticas e mutações de hematopoiese clonal de potencial indeterminado (CHIP), contribuem para a patogênese da SMD, uma vez que a probabilidade de desenvolvimento de neoplasias hematológicas cresce com o aumento da idade. Com o acúmulo de mutações na medula óssea, há uma falha no seu funcionamento normal e, consequentemente, essa hematopoiese clonal se torna uma “assinatura” do desenvolvimento de malignidades hematológicas (Villaume; Savona, 2025).

A exposição crônica ao longo da vida à agentes tóxicos e carcinogênicos propicia um ambiente medular com fenótipo pró-inflamatório, fator esse que contribui para o desenvolvimento de malignidades hematológicas. Nesse sentido, a desregulação das células imunes promove um estado de “inflamação pré-clonal”, que precede o desenvolvimento da SMD. Esse processo inflamatório persistente contribui para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento e, consequentemente, favorece a surgimento do fenótipo mielodisplásico (Rodriguez-Sevilla; Colla, 2024).

1.2. Epidemiologia e grupos de risco

Epidemiologicamente, a SMD é caracterizada como uma doença associada ao envelhecimento. Sua semelhança com outras anemias pode contribuir para a subnotificação de casos, especialmente em pacientes jovens com sintomas inespecíficos, embora a ocorrência nessa faixa etária seja rara. Além disso, o diagnóstico exige suspeita clínica para a realização de exames complementares ao hemograma, como mielograma e, como suporte adicional, análise citogenética (Tefferi e Vardiman, 2009).

A SMD possui uma maior prevalência em indivíduos idosos, com média de idade de 70 anos, com 3-5 casos a cada 100.000 pacientes-ano, e sua incidência cresce com o aumento da idade, consequentemente, com o envelhecimento da população (Galton 1998; Chanias et. al., 2021). Por se tratar de uma doença de idosos, nos últimos 20 anos vem sendo notificados diagnósticos em pacientes abaixo dos 50 anos, e acredita-se ser devido ao fato da expectativa de vida geral da população ter aumentado, além da exposição ocupacional a produtos tóxicos e carcinogênicos, como os solventes (Dansey, 2000).

Há maior prevalência de diagnósticos em indivíduos do sexo masculino, com incidência de aproximadamente 4,0 casos por 100.000 pessoas-ano na população geral. Em contrapartida, entre pacientes do sexo feminino, é frequentemente identificado o subtipo de SMD com deleção do cromossomo 5 (SMD-5q) (Chanias et al., 2021). No Brasil, registram-se em média 2.549 internações anuais e 14.331 procedimentos ambulatoriais relacionados à SMD, evidenciando a necessidade de serviços ambulatoriais especializados para garantir diagnóstico preciso, acompanhamento adequado e tratamento personalizado (BRASIL, 2021).

Por se tratar de um fenômeno incomum, a SMD em crianças e jovens, em idade de 1-14 ano, é uma entidade rara, englobando cerca de apenas 5% dos casos notificados, embora possa haver casos

subnotificados. Estima-se que 1/5 das crianças com SMD pode ser em decorrência a alguma anomalia genética que a predispõe a mielodisplasia, ou seja, em casos de mutação no tecido germinativo ou caso de SMD familiar (Chatterjee; Choudry, 2013; Chisholm; Bohling, 2023).

1.3. Classificação Clínica da SMD

Por se tratar de uma doença complexa e heterogênea, com múltiplos aspectos característicos, a SMD utiliza um sistema de classificação baseado em características clínicas, morfológicas e molecular. Desde sua criação, esse sistema passou por diversas atualizações em seus parâmetros de classificação. Inicialmente, o sistema Franco-American-Britânico (FAB) classificava a doença exclusivamente com base em diferenças clínicas, como porcentagem de blastos na medula óssea, presença de sideroblastos em anel e grau de displasia hematopoietica (Bennett et al., 1982).

Posteriormente, a OMS refinou a classificação (2001/2008), incorporando critérios morfológicos mais detalhados, classificando a SMD em subtipos mais específicos. Na classificação da OMS de 2008, os critérios são baseados em displasia hematopoietica, percentual de blastos, as categorias incluem: displasia de unilinhagem (SMD-DU) e SMD multilinhagem (SMD-DM), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) e SMD com deleção no cromossomo 5q isolada (SMD-del5q), além de introduzir a análise citogenética como critério diagnóstico (Nogueira Zerbini et al., 2011; Arber et al., 2016).

Em 2016, a SMD foi classificada em subtipos conforme a OMS, por se tratar de um grupo de doença heterogênea. Essa classificação inclui: SMD-DU, SMD-DM, com excesso de blastos-2 (SMD-EB 1), SMD com excesso de blastos-2 (SMD-EB 2), SMD com deleção 5q isolada (SMD-del5q) e SMD não classificável (SMD-DU). Esses subtipos refletem diferenças na morfologia, citogenética e risco de progressão para LMA, sendo essenciais para orientar o prognóstico e tratamento (Della porta et al., 2015).

Tabela 1: Evolução dos Sistemas de Classificação da SMD

Sistema/ano	Critérios Utilizados	Principais Avanços
Classificação FAB (1982)	<ul style="list-style-type: none"> - Morfologia - Citopenias - % de Blastos na MO/sangue periférico 	Primeiro sistema morfológico
Classificação OMS (2001/2008)	<ul style="list-style-type: none"> - Displasias - Citogenética - % de Blastos na MO/sangue periférico 	Refinamento morfológico e incorporação da citogenética clássica
Classificação da OMS (2016)	<ul style="list-style-type: none"> - Displasias - Citopenias definidas - % de Blastos na MO/sangue periférico - Mutações auxiliares 	Inclusão de critérios hematológico mais rigorosos e reconhecimento de mutações.
Classificação da OMS (2022)	<ul style="list-style-type: none"> - Integração de mutações - % de Blastos na MO/sangue periférico - Hipoplasia medular 	Integração de mutações (<i>FLT3</i> , <i>SF3B1</i> , <i>TP53</i> e etc.) para o prognóstico personalizado.

A classificação mais recente (2022), deu ênfase à integração de dados moleculares, criando novas entidades da SMD, como a SMD com mutação no *SF3B1* e SMD com mutação bialélica no

TP53, além de reclassificar a LMA com base nas alterações genéticas específicas (Li, 2022). Essas evoluções demonstram um caráter progressivo no que tange o refinamento diagnóstico, cujo objetivo é incorporar não somente a morfologia e a citogenética, como mostra a tabela 1, mas também marcadores moleculares para melhor estratificação e decisão da conduta terapêutica.

1.4. Estratificação Prognóstica da SMD

O primeiro sistema de prognóstico quantitativo para a SMD passou a estratificar pacientes em grupos de risco (baixo, intermediário 1, intermediário 2 e alto) com base na porcentagem de blastos na medula óssea, número de citopenias e alterações citogenética (Greenberg et al., 2012). Somente em 2022 foi incorporado o Sistema de Pontuação e Estratificação Prognóstica Molecular (IPSS-Molecular) que integrava dados moleculares de mutações, como *TP53*, *SF3B1*, *ASXL1*, *FLT3* e dentre outros principais genes associados a SMD, representando uma conduta clínica personalizada e trazendo previsão de sobrevida e resposta terapêutica aos pacientes (Bernard et al., 2022). Mostrando, dessa forma, a importância de analisar todos os parâmetros, sejam eles clínicos, morfológicos ou moleculares para um diagnóstico mais preciso e personalizado.

O IPSS-M representa um avanço significativo no que tange a estratificação prognóstica da doença, pois integra os dados clínicos com perfil mutacional para categorizar os pacientes em grupos de risco, a fim de predizer com maior precisão a sobrevida global e o risco de evolução para a LMA. É um sistema que classifica os pacientes em seis categorias distintas de risco: muito baixo, baixo, moderado-baixo, moderado-alto, alto e muito alto (Bernard et al., 2022).

Pacientes classificados como muito baixo risco geralmente apresentam mutações isoladas no gene *SF3B1*, que está envolvido no processamento do RNA e está associado a um prognóstico mais favorável e menor risco de progredir para a LMA. À medida que avançamos na escala de risco, encontramos mutações em genes reguladores epigenéticos, como *TET2* e *DNMT3A* na categoria de baixo risco, seguidos por alterações em *BCOR*, *BCORL1* e *EZH2* no grupo de moderado-baixo risco, genes cruciais na regulação da expressão gênica e manutenção da estabilidade genômica.

O moderado-alto risco inclui mutações em genes como *ASXL1*, *RUNX1*, *STAG2* e *SRSF2*. Já o alto risco é caracterizado por mutações em genes de sinalização celular (*RAS* e *JAK2*) e no fator de splicing *U2AF1*, que promovem proliferação celular descontrolada. Por fim, o grupo de muito alto risco concentra alterações mais agressivas, incluindo mutações bialélicas no gene supressor tumoral *TP53* e mutações *FLT3-ITD*, que levam à ativação constitutiva das vias proliferativas e estão associadas ao pior prognóstico e maior risco de progressão leucêmica (Bernard et al., 2022; Lee et al., 2022).

Tabela 2: Categoria de Risco do IPSS-M na SMD

Categoria de Risco (IPSS-M)	Genes/Marcadores	Implicações Clínicas
Muito Baixo	<i>SF3B1</i> mutado (isolado)	Baixo risco de progressão para a LMA
Baixo	<i>TET2</i> e <i>DNMT3A</i>	Sobrevida prolongada
Moderado-Baixo	<i>BCOR</i> , <i>BCORL1</i> e <i>EZH2</i>	Risco intermediário de progressão

Moderado-Alto	<i>ASXL1, RUNX1, STAG2 e SRSF2</i>	Maior risco de transformação leucêmica
Alto	<i>RAS, JAK2 e U2AF1</i>	Sobrevida reduzida
Muito Alto	<i>TP53, FLT3-ITD</i> e presença de cariótipo complexo (≥ 3 alterações citogenéticas)	Prognóstico muito desfavorável, alto risco de progressão para a LMA

Fonte: Bernard et al., 2022.

1.5. Alterações moleculares e Importância da Citogenética Clássica

Desde a incorporação do IPSS-M, as alterações moleculares receberam um papel central quanto ao estabelecimento de diagnóstico, estratificação de risco e estratégia para tratamento dos doentes com SMD, uma vez que o perfil genético do doente mostrou-se refletir no fenótipo clínico da doença e pareceu modular, inclusive, a resposta terapêutica (Ogawa, 2019).

Além das mutações somáticas, as mutações de cunho germinativo, aquelas presentes desde o nascimento, ou seja, as que os indivíduos herdam de seus progenitores, também estão envolvidas no que tange o desenvolvimento de doença hematológicas, sendo o *DDX41*, *TP53*, *RUNX1* e *GATA2* os mais relacionados com o risco de desenvolvimento de neoplasias hematológicas (Ogawa, 2019).

Já as mutações somáticas, o seu número pode variar conforme o subtipo da doença e se relaciona de forma intrínseca com anormalidades cromossômicas frequentemente encontradas nos doentes com SMD, sendo encontrado em cerca de 50% dos diagnosticados, em conjunto a pelo menos uma anormalidade genética (Solé et al., 2005; Ogawa, 2019).

A citogenética clássica representa uma ferramenta essencial do diagnóstico, revelando alterações cromossômicas específicas que auxiliam não apenas na confirmação diagnóstica, mas também na estratificação prognóstica e condução terapêutica. Entre as principais anomalias identificadas, destacam-se a deleção do braço longo do cromossomo 5 [del(5q)], considerada uma entidade distinta na classificação da OMS, as deleções dos cromossomos 7 e 20, e a trissomia do cromossomo 8, translocação entre os cromossomos 6 e 9 [t(6;9)] e inversão do cromossomo 3 [inv(3;3)].

Tais alterações, quando presentes, fornecem informações não somente sobre o comportamento clínico da doença, mas também acerca de seu potencial de progressão (França et al., 2019; Greenbert et al., 2012).

As alterações citogenéticas frequentemente coexistem com mutações somáticas, influenciando na patogênese e no prognóstico da doença. Por exemplo, a deleção do braço longo do cromossomo 5 del(5q), frequentemente encontrada nos indivíduos com SMD, sendo caracterizado como um tipo característico de SMD-del5q, está comumente associada à haploinsuficiência de genes como *RPS14* e *CSNK1A1*, levando a defeitos na eritropoiese e ativação de vias proliferativas, enquanto mutações somáticas concomitantes em *TP53* ou *TET2* agravam a instabilidade genômica e aumentam o risco de progressão para a LMA (Boulwood et al., 2012; Jerez et al., 2012).

Da mesma forma, anormalidades como a monossomia do cromossomo 7 (-7) ou deleção 7q del(7q) frequentemente coexistem com mutações em genes de sinalização, como o *RAS* e o *FLT3*, ou reguladores epigenéticos, como o *EZH2*, sugerindo uma interação entre alterações estruturais e mutações pontuais na clonagem maligna (Papaemmanuil et al., 2013).

Pacientes com SMD com anormalidades cromossômicas possuem um maior risco de progressão da doença e evolução para LMA, por exemplo, além de apresentar um prognóstico desfavorável (Jabbout et al., 2013), por exemplo, e essa relação destaca a importância da integração de análises citogenéticas e moleculares para estratificação de risco e terapia personalizada na SMD, uma vez que o número de mutações exerce influência de forma significativa a sobrevida global, tornando possível prever resultado clínico independente do fator de risco estabelecido pelo IPSS-R (Haferlach et al., 2014).

Tabela 3: Classificação de risco da SMD por alterações citogenéticas

Categoria Citogenética	Alterações Específicas	Média de sobrevida (anos)	Impacto Clínico
Muito Favorável	del(11q) isolada Nulissomia do Y (-Y)	5.4	Melhor prognóstico; possui terapia alvo para essa alteração
Favorável	Cariótipo normal Der(1;7) del(5q) isolada del(12p) del(20q) isolada	4.8	Progressão lenta; sobrevida prolongada.
Intermediário	del(7q) isolada + 8 (isolada) Iso(17q) +19	2.7	Risco moderado de progressão para a LMA
Desfavorável	Monossomia do 7 ou del(7q) Derivação do cromossomo 3 (q21) ou (q26) Cariótipo complexo (≥ 3 alterações)	1.5	Maior risco de transformação para a LMA.
Muito desfavorável	Cariótipo complexo	0.7	Prognóstico desfavorável; Resistência terapêutica

Fonte: Greenberg, 2012.

1.6. Evolução da Neoplasia Mielodisplásica para a Leucemia Mieloide Aguda

Desde as primeiras descrições da SMD, reconheceu-se seu caráter pré-leucêmico, com uma fração significativa dos casos evoluindo para LMA secundária, um fenômeno que reflete a instabilidade genômica progressiva e a seleção clonal de células mutadas (Cazzola, 2020). Essa transição não apenas impacta o prognóstico dos pacientes, mas também desafia as estratégias terapêuticas, dada a resistência frequente aos tratamentos convencionais.

Na primeira classificação da doença, de 1982, a SMD era considerada uma doença transitória para a LMA, dado seu alto risco de progressão e evolução, em que aproximadamente de 20-30% evoluem para a LMA, sobretudo devido a carga genética de frequência de mutação (Bennett et al., 1982). A LMA secundária a SMD representa até 35% do total de casos de LMA, classificada pela OMS como uma entidade distinta denominada “LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia”, cujos pacientes com esse quadro apresentam taxas inferiores de remissão completa e quadros de sobrevida global inferior (Granfeldt; Ostergard et al., 2015). Na classificação da OMS de 2022, por sua vez, a LMA secundária a mielodisplasia é definida por acréscimo de mais de 20% de blastos na medula óssea que expressam anormalidade citogenética complexa associada à SMD (Greenberg, 2019).

Na SMD, alguns fatores de risco para evolução são bem estabelecidos, o subtipo da doença com excesso de blastos (SMD-EB) é o grupo de risco que mais evolui para a LMA, chegando a 60% dos casos (Greenberg et al., 2012). Outros fatores de risco, como citopenias persistentes, anomalias citogenéticas complexas e mutações nos genes *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1* e *DNMT3A* são bem definidos no que tange a progressão para a LMA (Sallman et al., 2020).

Embora ambas as doenças sejam clinicamente semelhantes, como a maturação e diferenciação das células hematopoiéticas anormais, elas possuem características que as diferenciam no que tange o seu fenótipo. Na LMA, por exemplo, há um bloqueio da maturação de células hematopoiéticas, enquanto na SMD há uma presença reduzida em números e morfologia anormal dessas células (Greenberg, 2019).

Dentre essas características que distinguem ambas as doenças, a morte e proliferação das células são os aspectos mais distintos, uma vez que na SMD há um aumento da apoptose e dos processos de morte que gera um status pró-inflamatório no microambiente medular, enquanto na LMA há uma alta taxa de sobrevivência, proliferação celular, proporcionando um fenótipo de pró-sobrevivência dessas células, sobretudo durante a sua progressão (Bose; Sarma, 1975).

No contexto de evolução da SMD, as mutações genéticas costumam ser determinantes no processo de patogênese da doença, mesmo que previamente a progressão para LMA. A presença de múltiplos clones aberrantes e evolução clonal com aquisição de mutações parecem contribuir significativamente com essa transformação da doença (Dan; Chi; Wang, 2015). Mutações no gene de fator de *splicing*, por exemplo, comumente são encontradas previamente a essa evolução, visto que a instabilidade genômica, dando origem a uma mutação fundadora persiste na medula dos doentes com LMA que progrediram da SMD, mostrando a importância da evolução clonal e mutações genéticas na progressão da doença (Saez; Walter; Graubert, 2017).

1.7. Leucemia Mieloide Aguda e seus tipos

A LMA faz parte de um grupo de doença hematológica que surge a partir de percussores predominantemente mieloides, mas também de eritroides, megacariocíticos e monocíticos, cujo surgimento é resultado da aquisição de múltiplas mutações e rearranjos cromossômicos. A assinatura

da LMA consiste em expansão clonal desses percussores, com a presença de >20% de blastos na MO ou no sangue periférico, associada a um bloqueio na maturação das HSCs e células progenitoras (Saez, Walter e Graubert, 2017).

Assim como na SMD, a sua incidência aumenta com a idade, adultos com 60 anos, por exemplo, a incidência é de cerca de 3 a 5 casos a cada 100.000 pessoas por ano. Diferentemente, em jovens adultos, por sua vez, a incidência é relativamente baixa, e volta a aumentar em casos de LMA pediátrica, correspondendo a cerca de 20% dos casos, sendo mais comum na primeira infância (Grobner et al., 2018).

Inicialmente, o desenvolvimento de células-tronco leucêmicas (LSC) está relacionado a mutações que ocorrem primariamente nas HSCs. Essas alterações impactam na via de autorrenovação celular, conferindo às células mutante vantagem proliferativa e capacidade de gerar clones leucêmicos com propriedades multipotentes (Kelly e Gilliland, 2002). De fato, a predisposição genética é um dos pilares que contribuem para o desenvolvimento da doença, as mutações do tipo CHIP, por exemplo, aumentam o risco de clones leucêmico devido ao acúmulo progressivo de mutações em genes como: *DNMT3A*, *TET2*, *SRSF2* e *ASXL1* (Abelson et al., 2018).

Além da marca genética, deve-se considerar fatores de risco que incluem um microambiente medular permissivo para o desenvolvimento da LMA. Defeitos que levam à adesão celular aberrante, imunossupressão e alteração na sinalização de citocinas, resultam em um ambiente pró-inflamatório, característico do principal fator que contribui para o desenvolvimento da doença: o envelhecimento, uma vez que sinais inflamatórios intrínsecos podem conferir vantagem proliferativa a clones mieloides (Ellegast et al., 2022).

Embora a assinatura genética esteja presente tanto na LMA em indivíduos mais velhos quanto na LMA pediátrica, há uma diferença na carga mutacional nesses indivíduos. Em adultos, como mencionado anteriormente, a LMA é causada devido ao acúmulo de mutações nas HSCs, mas em pacientes pediátricos a LMA é decorrente de alterações citogenéticas, seja ela estrutural ou numérica (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013; Grobner et al., 2018).

O impacto das técnicas de sequenciamento, sobretudo o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) é um marco no diagnóstico molecular, tornando-se padrão ouro, e sua importância é refletida sobretudo na diferenciação das LMA. A classificação LMA evoluiu significativamente nas últimas décadas, incorporando critérios cada vez mais refinados que integram dados morfológicos, citogenéticos, moleculares e clínicos.

A LMA é classificada de acordo com os critérios OMS de 2022 em seis principais categorias (Arber et al., 2022). A primeira delas é a LMA com alterações genéticas definidas, que engloba casos com translocações específicas como t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1:RUNX1T1* e inv(16)(p13.1q22)/*CBF*B:*MYH11*, além de mutações nos genes *NPM1* ou *CEBPA* (especificamente mutações bZIP em *CEBPA*) (Dohner et al., 2022). O segundo grupo corresponde à LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia, caracterizada por mutações em genes como *ASXL1*, *SRSF2*

e *STAG2*, ou por anomalias citogenéticas típicas como cariótipo complexo, deleção 5q e monossomia 7 (Dohner et al., 2022).

A terceira categoria é a LMA secundária a terapia prévia, que surge como complicaçao tardia de tratamentos prévios com quimioterapia ou radioterapia. O quarto grupo compreende a LMA relacionada à síndrome de Down, que apresenta características biológicas e clínicas distintas. O quinto tipo é o sarcoma mieloide, definido pela proliferação de blastos mieloides em tecidos extramedulares. Por fim, a sexta categoria é a LMA não especificada (LMA-NOS), que inclui subtipos como a LMA minimamente diferenciada e outras variantes que não se enquadram nos grupos anteriores (Dohner et al., 2022).

Esta classificação da OMS se baseia em critérios morfológicos, imunofenotípicos e genômicos, proporcionando uma abordagem abrangente para o diagnóstico da LMA (Dohner et al., 2022). A estratificação incorpora achados citogenéticos e moleculares essenciais para a definição de entidades clinicamente relevantes.

A abordagem da OMS permite uma categorização precisa que orienta tanto o diagnóstico quanto o manejo terapêutico dos pacientes com LMA. Além das alterações genômicas estruturais, as mutações em vias de sinalização celular desempenham um papel central na patogênese da LMA, sendo crucial nos mecanismos regulatórios de proliferação, diferenciação e sobrevivência das células hematopoiéticas. A mutação no gene *FLT3* do tipo *ITD* é a mais prevalente e clinicamente relevante, presente em aproximadamente 25 a 30% dos casos (Nakao et al., 1996). Essa alteração molecular promove uma sinalização celular aberrante através das cascadas RAS/MAPK e PI3K/AKT, resultando em uma proliferação descontrolada e bloqueio da maturação mieloide, característicos da LMA (Levis e Small, 2003).

1.8. *FLT3* e sua importância na hematopoiese

A hematopoiese é o processo de formação de células sanguínea a partir de HSCs que se diferencia em eritrócitos, leucócitos e megacariócitos, processo esse fundamental para o funcionamento normal do sistema sanguíneo e imunológico (Bao; Cheng; Sankaran, 2019).

A tirosina quinase 3 (*FLT3*) é um receptor pertencente à família de tirosina quinase de classe 3 que desempenha papel fundamental na hematopoiese normal e maligna. É um gene localizado no cromossomo 13 (13q12.2), com 24 exons e 97 kilobases e sua estrutura é constituída por cinco domínios de imunoglobulinas, um domínio justamembrana, dois domínios quinases e um domínio C-terminal (Medina, 2022; Macečková et al., 2024).

Quando o *FLT3* se liga ao seu receptor FL, é induzida uma mudança conformacional que favorece a dimerização de dois receptores do *FLT3*, essencial para a ativação da quinase, pois permite que os dois receptores fosforilem mutualmente, iniciando a cascata de sinalização (Kiyo et al., 2002). Após a dimerização dos receptores de *FLT3* no dímero fosforilam resíduos de tirosina no domínio intracelular do outro receptor, criando sítios de ligação para proteínas adaptoras, como STAT5, RAS/MAPK, PI3K/AKT, mantendo o receptor em um estado de sinalizador (Stirewalt e Radich,

2003). Essas proteínas, por sua vez, são responsáveis pela proliferação celular e sobrevivência, diferenciação e crescimento, além da inibição da apoptose e promoção da divisão celular (Macečková et al., 2024).

O FLT3 é expresso predominantemente em HSCs, na medula óssea, timo e gânglios linfáticos, sendo expresso tanto em linhagens mieloides quanto na linhagem linfoide B, sobretudo em superfície de precursores hematopoiéticos, como granulócitos e macrófagos. *O FLT3L* solúvel quando ligado ao *FLT3* forma hemodímeros transdutores de sinais que induzem a proliferação de precursores hematopoiéticos, contribuindo para a proliferação celular (Momenilandi et al., 2024).

O FLT3 desempenha um papel importante também na resposta imune, pois atua promovendo a expansão de um progenitor de células *natural killer* (NK) CD34+, além de se mostrar crucial na diferenciação de células dendríticas (DCs) (Mckenna et al., 2000). Essa ativação favorece a imunidade inata e adaptativa e reforça a importância na atuação e manutenção no contexto da hematopoiese normal, uma vez que as células NK são essenciais na eliminação de células infectadas e tumorais. Além disso, a sinalização da via *FLT3/FLT3L* está envolvida na homeostase de outros progenitores hematopoiéticos, reforçando sua relevância tanto na hematopoiese normal quanto em contextos patológicos, sobretudo em malignidades hematológicas (Tsapongas et al., 2017).

1.9. Mutações no *FLT3* e impacto na evolução da doença

No contexto das neoplasias hematológicas, o gene *FLT3* desempenha um papel crucial na regulação da proliferação e diferenciação celular. Mutações ou alterações nesse gene podem levar à ativação de vias de sinalização intracelular, resultando em proliferação descontrolada e expansão de clones leucêmicos, com a inibição do processo de morte celular programada, apoptose, que contribui para a progressão da doença e piora do prognóstico (Meshinchi et al., 2001).

Existem dois tipos de mutações comumente encontradas no gene *FLT3*, sobretudo em malignidades hematológicas: mutações pontuais nos domínios da tirosina quinase (TKD) e duplicações internas em tandem do domínio justamembrana (ITD), sendo essa segunda caracterizada por replicação da cabeça-cauda de sequências que codificam a parte do domínio justamembrana do receptor, resultando em uma região mais alongada de um receptor truncado e hiperativo, ambas as mutações sendo representadas na figura 2 (Kiyo et al., 2002).

As mutações do tipo *ITD*, podem variar em tamanho, geralmente entre 3 a 400 pares de base (pb), embora a maioria ocorra entre 15 a 100 pb (Kiyo et al., 2002). Essas mutações conferem ativação autônoma do receptor *FLT3*, independente do ligante *FLT3L*, resultando na ativação do gene sem a necessidade do seu ligante por vias subsequentes, resultando em um fenótipo mais agressivo e com maior carga leucêmica. (Kiyo et al., 2002). Além disso, as mutações *ITDs* podem induzir uma instabilidade genômica e atuar em conjunto com outras mutações, como no gene *DNMT3A* que atua na metilação do DNA, sendo associado a transformação da SMD em LMA.

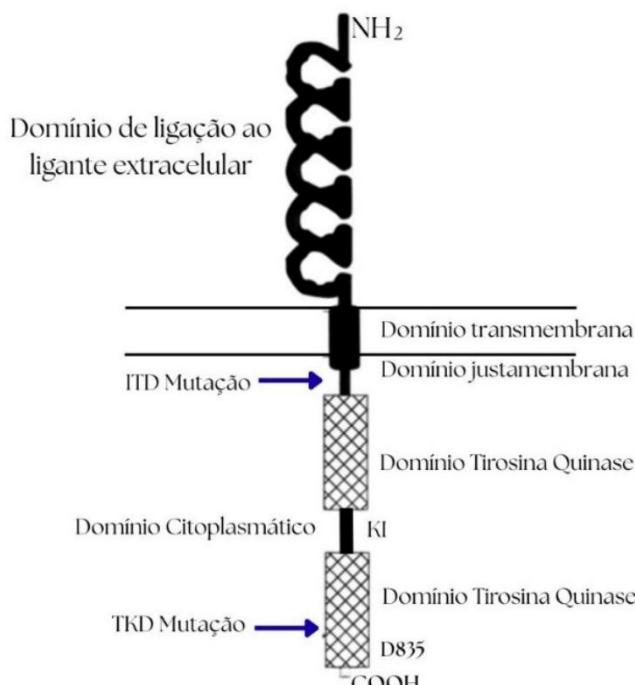
Alguns estudos ainda estacam que *ITDs* pequenas (3-30 pb) ocorra em exons específicos, enquanto que *ITDs* mais longas (até 400 pb) são associadas a um pior prognóstico (Stirewalt et al.,

2003). Essas inserções ou duplicações ocorrem principalmente no domínio justamembrana (JM) localizada nos exons 14 e 15, em uma região crítica no contexto da regulação negativa da tirosina quinase (Gilliland & Griffin, 2002).

Por se tratar de um gene que confere vantagem proliferativa de clones leucêmicos devido ao seu bloqueio à apoptose, é frequentemente associado a prognóstico ruim e resposta ineficiente ao tratamento, no contexto da LMA (Ambinder; Levis, 2021). Embora a mutação *ITD* seja mais frequente no contexto da LMA, sendo encontrada em cerca de 20-30% dos casos, as *ITDs* no *FLT3* ocorrem em cerca de 2-5% dos pacientes com SMD e uma sobrevida mais curta, em relação aos pacientes sem a mutação (Schlenk et al., 2013) mostrando, portanto, o papel da avaliação molecular para definição de prognóstico e predição clínica do curso da doença especialmente em casos dos subtipos com excesso de blastos ou em transformação para a LMA (Daver et al., 2013).

Clinicamente, a mutação *FLT3-ITD* desempenha um papel crítico na patogênese de neoplasias mieloides, conferindo um prognóstico desfavorável. Esse mecanismo oncogênico reforça a importância dessa alteração molecular para estratificação de risco e na progressão da doença (Jalte et al., 2023). Mas, apesar de ser frequente na LMA, a mutação *ITD* é rara em outras neoplasias mieloides, suspeitando-se que seja devido a seletividade clonal, pois na LMA requer mutação cooperativas, como em genes *NPM1* e *DNMT3A*, enquanto que outras neoplasias possuem vias alternativas, como *BCR-ABL*, por exemplo. Além disso, deve-se levar em consideração que na LMA há uma maior taxa de mutações de novo, enquanto que na SMD, por sua vez, têm mecanismos distintos, como a deleção do cromossomo 5q e mutação no gene *JAK2* (Daver et al., 2019).

Figura 2: Representação esquemática da proteína *FLT3*



Legenda Figura: Representação da proteína *FLT3* e mutações que ocorrem nos domínios justamembrana (ITD) e tirosina quinase (TKD)

Nesse contexto, considerando o caráter proliferativo e a desregulação hematopoiética intrínseca da SMD e LMA, é fundamental investigar alterações em genes críticos para a homeostase e sinalização celular. Dentre esses, destaca-se o *FLT3*, um receptor tirosina quinase amplamente reconhecido por seu papel na proliferação, sobrevivência e diferenciação de células hematopoiéticas (Gilliland e Griffin, 2002).

Mutações no *FLT3*, particularmente as do tipo ITD são frequentemente associadas a um perfil agressivo em neoplasias hematológicas, como LMA. No entanto, seu impacto no desenvolvimento e progressão da SMD ainda demanda investigação mais aprofundada, justificando a relevância deste estudo na caracterização de sua frequência e implicações clínicas na mielodisplasia (Kiyo et al., 2022).

2. OBJETIVO

2.1. Gerais

Avaliar a presença da mutação *ITD* no gene *FLT3* em pacientes portadores da SMD e LMA e seu impacto na progressão da doença.

2.2. Específicos

- Padronizar a reação de PCR e validar o *primer* da região *ITD* do gene *FLT3* para a implementação em rotina laboratorial.
- Determinar a presença e a frequência da mutação *ITD* no gene *FLT3* em pacientes com SMD e LMA.
- Caracterização clínica da presença da mutação *ITD* no gene em pacientes portadores de SMD e LMA

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (CEP/UFC) por meio do sistema da Plataforma Brasil, sob o protocolo de número 71573823.7.0000.5054. Antes da coleta de dados, foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no qual toda equipe responsável pelo estudo comprometeu-se a seguir as diretrizes e normas reguladoras estabelecidas na resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos. Dessa forma, garantiu-se o respeite e dignidade aos direitos dos participantes, assegurando sua proteção em todos os aspectos da condução da pesquisa.

3.2. Obtenção das amostras

A presente pesquisa foi realizada com 45 pacientes que foram diagnosticados com SMD com subtipo Excesso de blastos 1 e Excesso de blastos 2 e pacientes diagnosticados com LMA secundária e de novo. Para a análise genética, foram coletadas aspirado de medula óssea em tubos contendo EDTA.

3.3. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o kit comercial *PureLink®* da *Invitrogen*. O procedimento foi iniciado com a obtenção de um pool de células nucleadas a partir de amostras de medula óssea de pacientes. Para cada extração, utilizou-se um volume de 200 µL da amostra biológica, transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 20 µL de Proteinase K e RNase.

Em seguida, adicionou-se 200 µL do tampão de lise/ligação *PureLink®*, promovendo a homogeneização da mistura com auxílio de um vórtex. Esta solução foi então incubada a 55°C por 10 minutos em banho seco, permitindo a completa digestão das proteínas celulares. Após esta etapa de incubação, adicionou-se 200 µL de etanol absoluto (100%) à mistura, que foi posteriormente homogeneizada em vórtex por 30 segundos para obtenção de uma solução homogênea.

O material homogeneizado foi transferido integralmente para uma coluna de purificação *PureLink®* acoplada a um tubo coletor estéril. A primeira centrifugação foi realizada a 10.000 ×g por 1 minuto à temperatura ambiente, permitindo a retenção do material genético na membrana da coluna. O fluxo através foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor.

Para o processo de lavagem, foi realizado duas etapas: inicialmente com 500 µL do tampão de lavagem 1 *PureLink®* (centrifugação a 10.000 ×g por 1 minuto), seguido pela adição de 500 µL do tampão de lavagem 2 *PureLink®* (centrifugação à velocidade máxima por 3 minutos). Após a etapa final de lavagem, a coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL para eluição do DNA.

Para eluição do material genético purificado, adicionou-se 25 µL do tampão de eluição *PureLink®* diretamente na membrana da coluna, seguido por incubação à temperatura ambiente por

1 minuto e centrifugação à velocidade máxima. O DNA eluído foi então quantificado e avaliado quanto à pureza utilizando espectrofotômetro NanoDrop, considerando-se como parâmetros de qualidade aceitáveis as razões de absorbância A260/A280 entre 1,8 e 2,0, indicativas de DNA livre de contaminantes proteicos. Todas as etapas do protocolo foram realizadas em condições assépticas para garantir a integridade das amostras.

3.4. Validação do protocolo da reação de PCR end-point do gene ITD

A sequência dos Primers *forward* (F) 5'- GCAATTAGGTATGAAAGCCAGC-3' (Santos et al., 2017) e *reverse* (R) 5'-GCAGCCTCACATTGCCCC-3' (Kayser et al., 2014) para a amplificação da região *FLT3-ITD* foram baseados nas sequências descritas na literatura

Para a padronização e validação do protocolo de amplificação de PCR para a detecção do *ITD* no gene *FLT3*, foi necessário otimizar e validar às condições de PCR (tanto a concentração do primer para evitar sua dimerização, quanto as condições térmicas específicas do primer, para garantir a eficiência e especificidade na amplificação. Na preparação da Mistura de Reação (MasterMix), a reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 µL, contendo:

- 12 µL de MasterMix GoTaq G2 Colorless (contendo a Taq DNA polimerase, dNTPs e tampão de reação)
- 1 µL de cada primer (Forward e Reverse, concentração final de 0,2 µM cada)
- 9,5 µL de H₂O ultrapura (para ajuste do volume)
- 1 µL de DNA genômico (~50–100 ng/µL) Cuja reação final foi submetida sob as condições de amplificação no termociclador:

Etapa	Temperatura	Tempo	Finalidade	
Desnaturação Inicial	95°C	2 minutos	Ativação da DNA polimerase e desnaturação completa do molde de DNA	
Ciclos de amplificação (29 ciclos)	Desnaturação	95°C	30 segundos	Separação das fitas de DNA
	Anelamento	57°C	30 segundos	Hibridização específica dos primers ao DNA alvo
	Extensão	72°C	1 minuto	Síntese da nova fita de DNA pela polimerase
	Extensão final	72°C	15 minutos	Completo da síntese de todos os fragmentos amplificados

3.5. Eletroforese em Gel de Agarose

Após o fim dos ciclos da PCR, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 1% e 2% para verificar a qualidade dos *amplicons* gerados durante as ciclagens da PCR com base no tamanho do fragmento do DNA.

Para o preparo do gel de agarose a 1%, foi adicionado 25 mL de Tampão Tris-Aacetato-EDTA (TAE) 1X com 1g de agarose em um Erlenmeyer que foi aquecido no micro-ondas por aproximadamente 1 minuto ou até a solução estar translúcida. Em seguida, para corar o gel, foi utilizado 3 µL de GelRed (*Thermo Fisher Scientific*) e a solução de agarose foi despejada a uma cuba até a sua solidificação.

Em um parafilm, foi adicionado 8 μ L de H₂O livre de nucleases, 1 μ L de corante *BlueJuice* (*loading buffer*), 1 μ L de *ladder* que, após ser homogeneizado foi depositado no primeiro poço. Nos demais poços, foi adicionado 3 μ L de *BlueJuice* e 2 μ L de DNA. Após uma corrida de 100 V por 45 minutos, o gel foi analisado no transiluminador UV, no qual foi analisado a presença e o padrão de bandas.

3.6. Cariótipo por bandeamento G

O processamento das amostras de medula óssea para análise citogenética segue um protocolo padronizado baseado no método de Chauffaille com adaptações propostas por Pinheiro e colaboradores em 2009. Inicialmente, a coleta é realizada em tubos estéreis contendo heparina como anticoagulante. As amostras são então distribuídas em dois tubos Falcon de 15 mL, cada um contendo 4 mL de meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,0), 1 mL de soro fetal bovino a 38% e 50 μ L de uma solução antibiótica contendo estreptomicina e penicilina.

Após o preparo, as culturas são incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para permitir o crescimento e sincronização celular. Decorrido este período, adiciona-se 70 μ L de colchicina (Colcemid®) a cada tubo e as culturas retornam à estufa por mais 30 minutos para paralisar as células em metáfase. Em seguida, o material é centrifugado e o sedimento celular é ressuspensão em solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl) 0,075M (Fase do choque hipotônico), sendo novamente incubado a 37°C por 20 minutos para promover o inchaço celular.

O próximo passo consiste na adição de 0,5 mL de solução fixadora Carnoy (metanol:ácido acético na proporção 3:1), com homogeneização cuidadosa do material. O processo de fixação é completado com duas a três lavagens em solução Carnoy, garantindo a preservação da morfologia cromossômica. Para a preparação das lâminas, uma gota da suspensão celular é depositada sobre lâminas de vidro previamente envelhecidas, técnica que favorece a adequada dispersão cromossômica.

O bandeamento cromossômico é realizado através da técnica de tripsinização seguida de coloração com corante *Wright*, permitindo a visualização de um padrão característico de bandas em cada cromossomo. A análise citogenética é realizada por microscopia óptica, com o objetivo de avaliar pelo menos 20 metáfases bem bandeadas para garantir uma análise representativa. Todo o processo é conduzido em condições controladas de temperatura e umidade, seguindo rigorosos protocolos de qualidade para assegurar a confiabilidade dos resultados. Esta metodologia padronizada possibilita a identificação precisa de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, sendo fundamental para o diagnóstico e acompanhamento de doenças hematológicas.

3.7. Sequenciamento pela técnica de Sanger

Para o sequenciamento pela técnica de Sanger, utilizou-se o *ProDye 2.5X Master Mix* e o *ProDye 5X Sequencing Buffer* na preparação do mix da reação realizada em duplicata. utilizando os primers *Forward* e *Reverse*, além do DNA genômico. Como controle positivo, utilizou-se o plasmídeo (pGEM).

Após vortexar os componentes para a reação por 5 segundos, foram adicionados em strips os seguintes reagentes: 9 μ L de H₂O ultrapura, 1 μ L do *primer Forward* ou *Reverse*, 8 μ L do *MasterMix ProDye 2.5x* e 2 μ L de DNA. Em seguida, as strips foram homogeneizadas, seladas e transferidas para o termociclador para a execução do sequenciamento sob as seguintes condições: Inicialização a 96° C por 1 minuto, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, 5 segundos a 50°C para o anelamento dos primers, 60°C por 4 minutos para o ciclo de extensão da fita do DNA e finalizando com um hold a 4°C. Após a finalização da PCR, a reação é armazenada a -20°C para posterior etapa de purificação.

3.8. Purificação do sequenciamento Sanger

Para essa etapa, utilizou-se o kit da *Wizard® MagneSil® Sequencing Reaction Clean-Up System*.

Após homogeneizar as soluções de *beads* (MagneSil® Green), foi adicionado 180 μ L em cada poço de uma placa de 96 poços já contendo 20 μ L de *amplicon* e encubado à temperatura ambiente por 5 minutos, homogeneizando ao logo desse tempo para evitar a precipitação das *beads*. Em seguida, com o auxílio de uma rack magnética as *beads* foram capturadas tornando a solução incolor. Após a captura das *beads*, a solução foi cuidadosamente descartada.

Para a lavagem, as amostras foram retiradas da rack magnética utilizando 100 μ L de etanol a 90%, cuja solução após homogeneizado foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Ao finalizar esse tempo, a placa foi removida cuidadosamente evitando a remoção das *beads*. Após a lavagem, as *beads* foram deixadas secando à temperatura ambiente por 15 minutos até o etanol evaporar completamente.

Para a eluição, adicionou-se 10 μ L de Hi-Di™ *Formamide* às *beads* e homogeneizou-se por pipetagem. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 12 minutos. Em seguida, a placa foi novamente colocada na rack magnética, e o sobrenadante contendo o DNA purificado foi transferido para strips, garantindo que as *beads* permanecessem na placa. As strips foram vedadas com tampas de silicone (Septa) e montadas no cartucho, estando prontas para o sequenciamento. Caso não houvesse amostras suficientes para completar múltiplos de 4, os tubos restantes foram preenchidos com 10 μ L de Hi-Di™ *Formamide*, evitando a presença de tubos vazios durante a injeção no sequenciador.

3.9. Análise in sílico do sequenciamento Sanger do FLT3

Após a eletroforese capilar, os arquivos de extensão .ab1 foram inicialmente avaliados quanto à qualidade no *software BioEdit*. A análise foi realizada com base na inspeção visual dos eletroferogramas, considerando a presença de picos duplos, sobreposições ou sinal fraco, o que poderia indicar baixa qualidade de leitura ou presença de inserções características das mutações *ITD*.

As sequências com qualidade satisfatória foram submetidas a alinhamento múltiplo utilizando o algoritmo ClustalW integrado ao BioEdit, com o objetivo de comparar entre si as amostras analisadas e verificar variações na região de interesse.

Posteriormente, os arquivos foram importados para o *Geneious Prime*, onde as regiões-alvo foram analisadas em maior detalhe. As sequências obtidas foram alinhadas com a sequência de referência do gene *FLT3* (NCBI Reference Sequence: NG_007066.1), permitindo identificar a presença e leitura compatíveis com a mutação estudada. Por fim, as leituras compatíveis foram analisadas pelo algoritmo BLASTN (NCBI) para a comprovação da mutação.

4. RESULTADO

4.1. Caracterização das amostras

Para o presente estudo, foram incluídos 40 pacientes com predomínio de casos de LMA (57,5%), sendo 32,5% LMA de novo e 25% LMA secundária, seguidos por SMD com excesso de blastos (SMD-EB I e II), que representaram 45% dos casos. A média de idade foi de 70,6 anos (variando de 32 a 94 anos), com quatro pacientes sem informação de idade registrada.

Na análise hematológica, observou-se leucopenia em 22,5% dos casos (associada principalmente a SMD-EB), leucocitose em 17,5% (mais frequente em LMA, incluindo um caso extremo de 110.777/ μ L). Quanto às plaquetas, 40% dos pacientes apresentaram trombocitopenia (predominante em LMA secundária), 9,5% apresentavam trombocitose e 16,7% valores normais.

A análise citogenética revelou cariótipo normal em 47,5% dos casos, enquanto 22,5% apresentaram alterações, sendo 12,5% classificados como alterações não complexas e 10% dos casos apresentavam cariótipos complexos (≥ 3 alterações). Três pacientes (7,5%) não tiveram metáfases analisáveis, todos com diagnóstico de SMD-EB II.

Em relação a taxa de óbito dos pacientes analisados, apenas 18 dos 40 possuíam esse dado disponível para análise. Dentre esses, 14 pacientes evoluíram para o óbito, incluindo todos os quatro que apresentavam cariótipo complexo. Dos cinco pacientes com alterações citogenéticas não complexas, dois vieram a óbito, enquanto cinco dos que tinham cariótipo normal também faleceram.

É de importância destacar que muitos pacientes não tinham dados disponíveis, classificados como “Dados Não Disponíveis (DNI)”, o que pode limitar a análise dos achados.

Tabela 4: Dados clínicos e laboratoriais da caracterização dos pacientes portadores de SMD e LMA

ID	Diagnóstico	Sexo	Idade	Hemoglobina (hb)	Leucócitos	Plaquetas	% de blastos	Mutação <i>FLT3-ITD</i>	Cariótipo	Óbito
1	SMD - EB II	F	72	DNI	DNI	DNI	17%	Não	DNI	DNI
2	SMD EB II	F	64	8,5	DNI	DNI	7%	Não	46,XXadd(15)(q22),del(17)(q21)[10]/46,XX16]	DNI
3	SMD -EB I	M	67	10.2	4900	4900	5%	Não	77~158<4n>XY[9]/46,XY[18]	DNI
4	SMD -EB I	M	94	8.5	1900	1900	6%	Não	46,XY[5]	DNI
5	SMD - EB II	F	69	7.81	3464	3464	58%	Não	ausência de metáfase	DNI
6	SMD - EB I	M	58	9.9	0	DNI	6%	Não	46 XY [20]	DNI
7	SMD EB I	F	81	12,6	12790	54.680	13%	Não	46,XX[20]	DNI
8	LMA	F	32	8,1	12000	104.000	20%	Sim	46,XX,t(2;11)(q31;p15)[20]	Sim
9	SMD EB II	M	63	9,7	DNI	57.000	8%	Não	46,XY[20]	DNI
10	SMD EB II	M	DNI	7,8	DNI	32000	0%	Não	46,XY,t(15;17)(q24q21)[15]/46,XY[5]	DNI
11	LMA	M	72	6,9	DNI	119000	35%	Não	46,XY,add(17)(p13)[8]/46,XY,del(9)(q13),add(17)(p13)[10]/46,XY[2]	Sim
12	SMD -EB I	F	71	10	4600	174000	7%	Não	46,XX[20]	Não
13	SMD EB II	M	55	9.1	DNI	DNI	13%	Não	46,XY[20]	DNI
14	LMA secundária	F	81	10,7	2270	64000	22%	Não	46,XY[20]	DNI
15	SMD - EB II	F	86	8,8	1290	48000	18%	Não	46,XX,del(8)(q14)[5]/46,XX[15]	DNI
16	LMA secundária	M	75	7,3	DNI	69000	22%	Não	46,XY[20]	Sim
17	LMA	F	69	6.2	17700	49000	54%	Não	45,XX,-5,del(5)(q31)[3]/45,XX,-5,del(5)(q31),der(1)t(1;8)(p36.3;q24)[16]/46,XX[1]	Sim
18	LMA secundária	M	DNI	DNI	DNI	DNI	Não		46,XY[20]	DNI
19	LMA secundária	M	79	7.3	1300	34000	DNI	Não	46,XY[20]	Não
20	LMA	M	85	12,5	8000	69.850	22%	Não	46,XY[20]	DNI
21	LMA	F	71	9,8	900	49000	39%	Não	46,XX[6]	Sim
22	LMA	F	DNI		DNI	DNI	Não		47,XX+8[8]	DNI
23	SMD- EB II	M	75	5,4	DNI	35000	20%	Não	46,XY[20]	DNI
24	SMD - EB II	F	79	9.9	1296	30000	13%	Não	46,XX[12]	DNI
25	SMD - EB I	F	89	8,4	8900	92000	7%	Não	47,XX+8[15]	Sim
26	LMA	F	68	7,7	1400	23000	20%	Não	46,XX[20]	DNI
27	LMA secundária	F	69	12,4	1830	16000	27%	Não	46,XX[18]	Sim
28	LMA	M	72	6,8	110777	18000	46%	Não	46,XY[18]	Sim
29	LMA	F	63	4.1	46150	17000	20%	Não	46, XX [20]	Sim
30	LMA secundária	F	68	7.4	1830	107000	37%	Não	46, XX [20]	Sim
31	LMA secundária	M	74	7.0	2300	90000	33%	Não	46,XY[20]	Não
32	LMA	M	80	6.3	9400	11000	40%	Não	46,XY,-2,-3,-5,del7(q32),der(19)t(3;19)(p13;q25),t21,t22+mar/46,X Y[2]	Sim
33	LMA	F	75	7.4	4740	60.000	28%	Não	45,X,t(8;21)(q21.3;q22.1)[9]/46XX[4]	Sim
34	LMA	M	81	DNI	DNI	DNI	Não		46,X,-Y[20]	DNI
35	LMA	M	77	8.9	31000	34000	82%	Não	46,XY,del(7)(q22)[15]	Sim
36	LMA secundária	M	90	6.2	1400	67000	DNI	Não	46,XY[20]	Sim
37	SMD - EB I	M	75	8,1	1090	47000	6%	Não	46,XY[20]	Não
38	LMA	M	48	15,5	4900	217000	DNI	Não	46,XY[10]	DNI
39	SMD -EB II	F	67	DNI	DNI	DNI	Não		ausência metáfase	DNI
40	SMD EB II	F	90	8,5	DNI	DNI	15%	Não	ausência de metáfase	DNI

4.2. Validação da reação de PCR do gene *FLT3-ITD*

Os resultados demonstraram amplificação específica do fragmento alvo, sem a formação de dímeros de primers ou produtos inespecíficos, conforme verificado por eletroforese em gel de agarose a 1%. A concentração de 0,2 μ M para cada primer mostrou-se adequada, garantindo eficiência na amplificação sem favorecer interações indesejadas entre os primers. A temperatura de anelamento de 57°C assegurou a especificidade da reação, enquanto o tempo de extensão de 1 minuto foi suficiente para a síntese completa do fragmento.

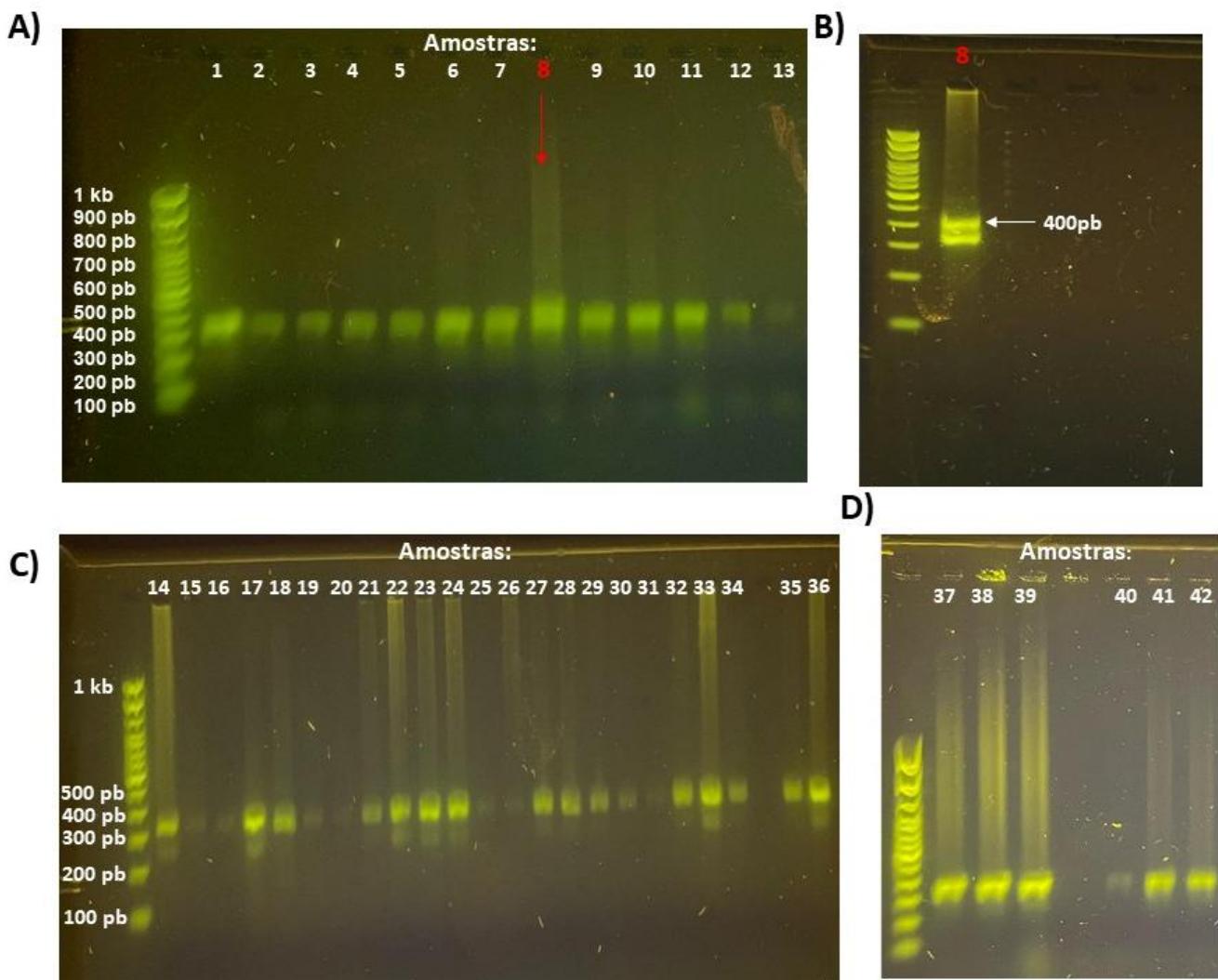
Por fim, o protocolo demonstrou reproduzibilidade e confiabilidade, sendo validado para a detecção de mutações *FLT3-ITD* em amostras clínicas, dessa forma, o método padronizado foi considerado adequado para aplicação nos experimentos subsequentes deste trabalho.

4.3. Detecção da mutação *ITD* por eletroforese em gel de agarose

A partir da eletroforese de gel de agarose, é possível visualizar o padrão de bandas dos amplicons da região *ITD* do gene *FLT3* amplificados por PCR. A mutação do gene *FLT3-ITD*, caracteriza-se por uma mutação em tandem, do inglês: internal tandem duplication, no qual um segmento do gene é duplicando gerando repetições de sequências de nucleotídeos. Essa alteração resulta em uma sequência de *FLT3* mais longa, que pode ser identificada no gel de agarose pela presença de duas bandas: uma correspondente ao alelo selvagem (aproximadamente 330 pares de bases) e a outra de maior tamanho (maior que 330 pares de bases), representando o alelo mutado com a inserção da *ITD*.

Inicialmente, foi realizado um gel de agarose a 1% para analisar os amplicons e os resultados levantaram a suspeita de que uma das amostras (amostra de número 8) apresentava a mutação *ITD*. Para confirmar, a amostra em questão foi isolada e submetida a uma nova eletroforese em gel de agarose, desta vez a 2%, o que permite uma melhor resolução para a detecção da mutação. Como mostra a Figura 3B, o resultado do segundo gel confirmou a presença da mutação *ITD* na amostra.

Figura 3: Géis de eletroforese em gel de agarose dos pacientes com SMD e LMA



Legenda Figura: análise por eletroforese em gel de agarose para detecção da mutação *ITD* no gene *FLT3*. No gel A (1%), as amostras 1 a 13 foram analisadas, utilizando um marcador de peso molecular (100 pb a 1 kb), sem evidência da mutação. O gel B (2%) destaca a amostra 8, onde se observa uma banda adicional de na altura próxima a 400 pb, semelhante ao padrão de banda da presença da *ITD*.

4.4. Cariótipo dos pacientes portadores da SMD e LMA.

A partir da citogenética clássica, o cariótipo nos forneceu alterações cromossômicas específicas, como translocações, deleções e aneuploidias, não apenas auxiliam na classificação dessas doenças, mas também fornecem informações críticas sobre o comportamento clínico e a resposta terapêutica.

A análise citogenética convencional realizada nos 40 pacientes com diagnóstico de SMD ou LMA demonstrou um perfil diversificado de alterações cromossômicas. Os resultados revelaram que 19 pacientes (47,5%) apresentaram cariótipo normal (46,XX ou 46,XY), enquanto 9 casos (22,5%) exibiram alterações citogenéticas. Dentre estes últimos, 5 pacientes (12,5%) mostraram alterações não complexas, incluindo deleções como del(8q14) e del(7q22), além de trissomias como a +8, enquanto 4 casos (10%) apresentaram cariótipos complexos, caracterizados por três ou mais alterações simultâneas. Em 12 pacientes (30%) os dados citogenéticos não foram informados (DNI) ou ausência de metáfases para análise.

Dentre os casos apresentados, destacou-se a amostra de número 8, cujo cariótipo é representado na figura 4, que corresponde a uma paciente do sexo feminino, 33 anos, com diagnóstico de LMA. A investigação molecular por eletroforese identificou a presença de uma banda dupla, um grande indicativo da presença da mutação *FLT3-ITD*. O perfil hematológico inicial revelou leucocitose (12.000/µL), associada a trombocitose (104.000/µL), com 20% de blastos no mielograma. A análise citogenética complementar identificou uma translocação entre os cromossomos 2 e 11 [t(2;11)(p21;q23)], conforme ilustrada na figura 4. Este caso apresentou evolução clínica desfavorável, culminando em óbito.

Figura 4: Cariótipo da paciente com translocação entre os cromossomos 2 e 11



Legenda da figura: Cariótipo da paciente de número 8, portadora da translocação entre os cromossomos 2 e 11. A região “p” (abaixo do centrômero) do cromossomo 2 transloucou para a região “q” (acima do centrômero) do cromossomo 11.

4.5. Confirmação da mutação *FLT3* por sequenciamento Sanger

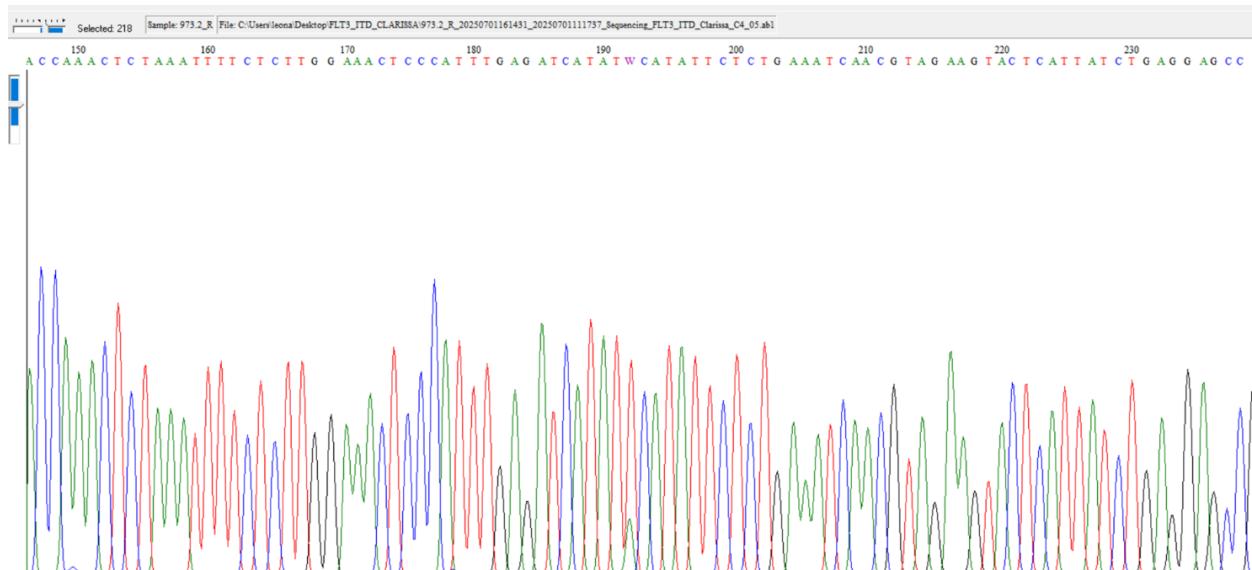
Embora a eletroforese em gel de agarose seja um método eficaz para a triagem inicial da mutação *ITD*, a confirmação definitiva requer abordagens mais precisas, como o sequenciamento de Sanger. Essa necessidade surge devido às limitações inerentes à técnica de gel de agarose, incluindo: resolução limitada para fragmentos de tamanhos similares, variabilidade na visualização das bandas em função da qualidade do gel, e até mesmo impossibilidade de determinar a sequência nucleotídica específica.

O sequenciamento de Sanger, por sua vez, é considerado padrão-ouro para validação de mutações, foi empregado neste estudo para confirmar de forma definitiva a presença da mutação *ITD* nas amostras previamente triadas por eletroforese.

4.6. Análise *in silico* da mutação do *FLT3* por sequenciamento Sanger

Os resultados da análise molecular demonstraram claramente a presença de uma inserção genômica na amostra analisada. O sequenciamento de Sanger (Figura 4) confirmou de forma definitiva a existência de uma inserção de bases, evidenciada pela detecção de uma sequência adicional que não está presente em nenhum dos controles selvagens analisados. Essa região inserida, com tamanho compatível com o observado no gel, apresenta características moleculares distintas das sequências de referência.

Figura 5: Eletroferograma do sequenciamento Sanger confirmando a mutação *FLT3-ITD* no paciente 1.



Legenda da figura 5: Eletroferograma do paciente portador da mutação *FLT3-ITD* com a inserção de 27 pb.

As sequências flanqueadoras mantiveram perfeita identidade com o padrão selvagem, confirmando que a alteração observada corresponde especificamente a uma inserção na região alvo, podendo ser visualizada a sequência de interesse no BLAST com 94% de identidade com a mutação *ITD*, mostrada na figura 5. Estes achados comprovam a existência da mutação, como suspeitada após observar a presença de inserção de 27 pb (figura 6), corroborando para a confirmação da mutação no diagnóstico molecular.

Figura 6: Visualização da sequência de interesse no BLAST.

Download ▾ GenBank Graphics Sort by: E value ▾

Homo sapiens FLT3-ITD gene, partial cds

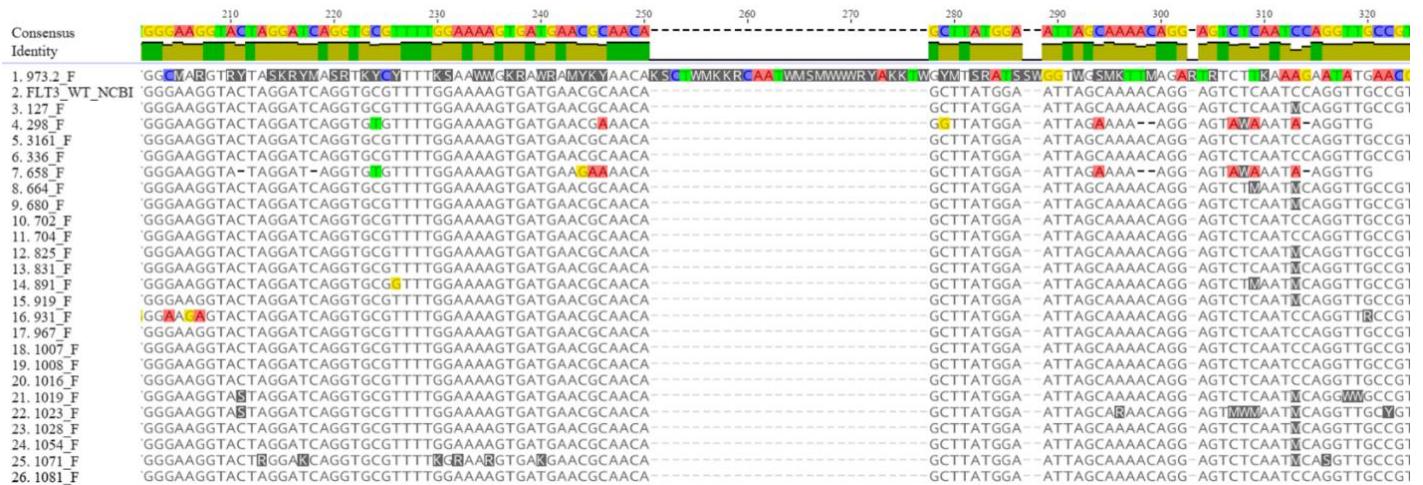
Sequence ID: [OP807466.1](#) Length: 329 Number of Matches: 2

Range 1: 37 to 269 GenBank Graphics ▾ Next Match ▾ Pre

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
361 bits(195)	5e-95	222/237(94%)	4/237(1%)	Plus/Plus
Query 113	GGYGACCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGA		172	
Sbjct 37	GGTGACCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTCAGAGAATATGAATATGA		96	
Query 173	TCTCAAATGGGAGTTCCAAGAGAAAATTAGAGTTGGTAAGAATGGAATGTGCCAAT		232	
Sbjct 97	TCTCAAATGGGAGTTCCAACAGAAAATTACAGTTGGTAAGAATGGAATGTGCCAAT		156	
Query 233	GTTTCTGCAGCATTCTTCKGCATTGGAAAATCTTAAATGCACGTACTCMTCTYWT		292	
Sbjct 157	GTTTCTGCAGCATTCTTTC-CATTGGAAAATCTTAAATGCACGTACTCACCA--TT		213	
Query 293	TGTNAGATGCAGGGAAAGGTACTAGGATCAGGTGCTTTGGAAAAGTGTGAACGMAA		349	
Sbjct 214	TGTCTT-TGCAGGGAAAGGTACTAGGATCAGGTGCTTTGGAAAAGTGTGAACGCAA		269	

Legenda da figura: Confirmação da região analisada pelo BLAST, mostrando 94% de identidade com a mutação do tipo *ITD*.

Figura 7: Região de 27 pb inserida (Amostra 1 – Paciente portadora de ITD); Amostra WT NICBI (Gene Referencia NCBI).



Legenda da figura: Comparação entre a região de 27 pb inserida na Amostra 1 (Paciente portadora de ITD) e a sequência de referência do gene (WT - NCBI). A inserção está indicada na Amostra 1, enquanto a Amostra 2 representa a sequência padrão de referência.

5. DISCUSSÃO

A SMD é uma doença multifatorial, cuja complexa patogênese envolve recorrentes alterações moleculares, status inflamatório, dano ao DNA e alterações epigenéticas que colaboram para a evolução da doença. A relevância de compreender o papel das mutações, as consideradas assinaturas genômicas da mielodisplasia, e o seu impacto singular no que tange a progressão e evolução clínica da doença é um dos fatores mais importantes para a predição de prognóstico, fisiopatologia da SMD e traçar estratégias terapêuticas direcionadas (Greenberg et al., 2022).

Embora o sequenciamento de NGS seja considerado o padrão-ouro para a detecção de mutações, sua aplicação para mutações do tipo *ITD*, como as que ocorrem no *FLT3*, apresentam limitações significativas. Isso ocorre devido ao fato dessas mutações serem caracterizadas por inserções grandes e variáveis, podendo ser entre 3 e 400 pares de bases que ultrapassam a capacidade de leitura ideal das plataformas de NGS, resultando em baixa sensibilidade e possíveis falsos negativos (Kiyoi et al., 2002; Kennedy e Smith, 2020).

Além disso, um *primer* mal desenhado pode amplificar regiões não-específicas ou, até mesmo, falhar na detecção de duplicações maiores. Nesse contexto, justifica-se o uso do sequenciamento Sanger como método mais adequado para a confirmação desse tipo de mutação, devido à sua capacidade de detectar inserções longas, como as do tipo *ITD* (Kelly et al., 2002).

As técnicas como PCR convencional seguida de eletroforese em gel de agarose à 2% são amplamente utilizadas na triagem inicial, pois permitem a distinção clara entre os alelos selvagens e os mutados com base no tamanho do fragmento (Fröhling et al., 2002), tal como realizado nesse estudo, portanto, a validação do primer é uma das etapas mais importantes, pois a padronização da etapa de PCR reduz tempo, tornando o protocolo mais otimizado, permitindo a implementação na rotina de diagnóstico, principalmente por se tratar de um gene que possui terapia-alvo, tornando o acompanhamento clínico personalizado.

O presente estudo se concentra em avaliar a mutação *ITD* no gene *FLT3*, um marcador já consolidado em leucemias agudas, mas cujo impacto na SMD ainda demanda investigação mais aprofundada. Por se tratar de uma doença de caráter heterogêneo, a dualidade da proliferação celular é um tanto paradoxal, uma vez que a SMD é marcada por uma hematopoiese ineficaz com uma proliferação de células sem uma diferenciação normal, acarretando em anemias, neutropenia e trombocitopenia (Corey et al., 2007).

No entanto, em alguns subtipos da doença, como em excesso de blastos (EB), a proliferação é exibida de forma hiperproliferativa, frequentemente impulsionada por mutações pró-proliferativas, como mutação *FLT3-ITD* (Kennedy e Ebert, 2017).

Apesar do *FLT3-ITD* não ser totalmente elucidado na SMD, a detecção dessa mutação é importante no contexto de progressão para a LMA (Horiike et al., 1997). Um estudo dirigido por Georgiou e colaboradores, por exemplo, dos 97 pacientes analisados, apenas três pacientes apresentavam a mutação portada SMD, e os três evoluíram para a LMA em apenas um mês

(Georgiou et al., 2006), demonstrando que a importância do papel da mutação ITD como um marcador de progressão da doença (Pinheiro et al., 2007).

É interessante mencionar que a análise da presença dessa mutação deve estar inserida em um contexto clonal, uma vez que a *FLT3-ITD* mutado, interessantemente, em modelos animais, sugere ser capaz de originar a LMA a partir de um cenário de hematopoiese clonal preexistente, mas não a partir de uma hematopoiese normal (Loberg et al., 2019).

Na LMA, o *FLT3* é frequentemente superexpresso, e mutações como a *FLT3-ITD* estão associadas a mecanismos de proliferação celular desregulada. Essa variante é encontrada em aproximadamente 15% dos casos de LMA secundária (Kottaridis et al., 2001), sendo reconhecida como marcador de prognóstico adverso, especialmente em pacientes jovens (idade < 60 anos). No presente estudo, a identificação da *FLT3-ITD* na amostra analisada corrobora esses achados, uma vez que a paciente, com idade inferior a 60 anos, evoluiu para óbito, desfecho compatível com a literatura, que aponta maior taxa de recidiva e menor sobrevida global nesses casos (Warren et al., 2012).

Em relação ao perfil hematológico, a leucocitose, presente em 17,5% dos casos, mostrou forte associação com o diagnóstico de LMA da paciente de número 8. Além disso, a paciente também é portadora da mutação *FLT3-ITD*, sugerindo um quadro clinicamente mais agressivo, como descrito na literatura. A leucocitose, segundo Daver et al, 2019, pode indicar uma ativação concomitante de vias de sinalização proliferativas, como as cascadas *STAT5* e *MAPK*, frequentemente hiperativadas em casos de *FLT3-ITD*, sendo um sinal da doença mieloproliferativa se mostrando mais agressiva.

Além disso, o papel do cariótipo no diagnóstico e na predição de prognóstico é inquestionável. Na análise global, os cariótipos complexos (10% dos casos) apresentaram mortalidade de 100%. A paciente com diagnóstico de LMA, amostra de número 8, também é portadora da a translocação t(2;11)(p21;q23), conferindo maior complexidade.

Embora translocações envolvendo 11q23 sejam associadas a LMA, sua associação com o cromossomo 2 é menos frequente (Meyer et al., 2018). Com isso, estudos sugerem que essas alterações citogenéticas raras podem contribuir para uma instabilidade genômica, levando a progressão da doença e conferindo um perfil mais agressivo a doença (Papaemmanuil et al., 2016), o que pode justificar a rápida evolução para o óbito da paciente.

O impacto do prognóstico de muitos marcadores depende do contexto, uma vez que o efeito de uma determinada anormalidade normalmente depende da presença ou ausência de outras (Döhner et al., 2017), sendo, portanto, uma análise que envolve múltiplos parâmetros. Nesse sentido, observar somente a presença da mutação *FLT3-ITD*, por si só no contexto da LMA, por ser um dos genes mais mutados na doença, é importante devido ao seu impacto no que tange o fator de prognóstico, mas não deve ser o único viés a ser analisado.

As mutações no gene *NPM1* na LMA, por exemplo, confere um prognóstico favorável aos pacientes, mas quando combinada com a mutação *FLT3-ITD* o prognóstico e sobrevida do paciente muda para desfavorável, comparando com pacientes com outras mutações (Metzeler et al., 2016).

6. CONCLUSÃO

Em síntese, a SMD representa um desafio diagnóstico e terapêutico devido à sua natureza complexa e heterogênea, onde alterações moleculares como a *FLT3-ITD* desempenham papel crucial na progressão para LMA, especialmente nos subtipos EB1/EB2. Nossos resultados destacam a viabilidade de um protocolo diagnóstico em duas etapas: triagem inicial por PCR convencional com eletroforese em gel de agarose a 2%, capaz de detectar alterações no tamanho dos fragmentos, e confirmação por sequenciamento de Sanger, que em nosso estudo permitiu a identificação precisa de uma *ITD* de 27 pb.

Este enfoque mostrou-se particularmente valioso no caso analisado, onde a coexistência da *FLT3-ITD* com a translocação $t(2;11)(p21;q23)$, uma alteração citogenética rara associada a instabilidade genômica que se relaciona com a evolução clínica agressiva e desfecho fatal, reforçando a importância da análise integrada de marcadores moleculares e citogenéticos.

A detecção confiável da *FLT3-ITD*, embora desafiadora pelas limitações técnicas do NGS em identificar grandes inserções, mostrou-se fundamental para orientar a estratificação de risco conforme diretrizes atuais (ELN 2022) que incluem: identificar candidatos a terapia-alvo com inibidores de *FLT3* e permitir o monitoramento sensível de doença residual. O protocolo validado nesse estudo oferece uma alternativa robusta e economicamente viável para laboratórios clínicos, preenchendo uma lacuna importante no manejo de pacientes com SMD de alto risco e LMA.

7. REFERÊNCIAS

- ABEGUNDE, S. O. *et al.* An inflammatory environment containing TNF α favors Tet2-mutant clonal hematopoiesis. **Experimental hematology**, v. 59, p. 60–65, 2018.
- ABELSON, S. *et al.* Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. **Nature**, v. 559, n. 7714, p. 400–404, 2018.
- AMBINDER, A. J.; LEVIS, M. Potential targeting of FLT3 acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 106, n. 3, p. 671–681, 2021.
- ARBER, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 2016.
- International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. **Blood**, v. 140, n. 11, p. 1200–1228, 2022.
- AVGERINOU, C. *et al.* Occupational, dietary, and other risk factors for myelodysplastic syndromes in Western Greece. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 22, n. 7, p. 419–429, 2017.
- BAO, E. L.; CHENG, A. N.; SANKARAN, V. G. The genetics of human hematopoiesis and its disruption in disease. **EMBO molecular medicine**, v. 11, n. 8, p. e10316, 2019.
- BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **British journal of haematology**, v. 51, n. 2, p. 189–199, 1982.
- BERNARD, E. *et al.* Molecular International Prognostic Scoring System for myelodysplastic syndromes. **NEJM evidence**, v. 1, n. 7, p. EVID0a2200008, 2022.
- BEZERRA, M. F. *et al.* Screening for myeloid mutations in patients with myelodysplastic syndromes and AML with myelodysplasia-related changes. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 44, n. 3, p. 328–331, 2022.
- BOSE, K. S.; SARMA, R. H. Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 66, n. 4, p. 1173–1179, 1975.
- BOULTWOOD, J. The role of haploinsufficiency of RPS14 and p53 activation in the molecular pathogenesis of the 5q- syndrome. **Pediatric reports**, v. 3 Suppl 2, n. 12, p. e10, 2011.
- BURNATT, G. *et al.* Analysis of the presence of FLT3 gene mutation and association with prognostic factors in adult and pediatric acute leukemia patients. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 2, p. e16105, 2017.
- CALVETE, O. *et al.* Are the current guidelines for identification of myelodysplastic syndrome with germline predisposition strong enough? **British journal of haematology**, v. 201, n. 1, p. e5–e11, 2023.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK *et al.* Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 22, p. 2059–2074, 2013.

CAZZOLA, M. Myelodysplastic syndromes. **The New England journal of medicine**, v. 383, n. 14, p. 1358–1374, 2020.

CHANIAS, I. *et al.* Myelodysplastic syndromes in the postgenomic era and future perspectives for precision medicine. **Cancers**, v. 13, n. 13, p. 3296, 2021.

CHATTERJEE, T.; CHOUDHRY, V. P. Childhood myelodysplastic syndrome. **Indian journal of pediatrics**, v. 80, n. 9, p. 764–771, 2013.

CHISHOLM, K. M.; BOHLING, S. D. Childhood myelodysplastic syndrome. **Clinics in laboratory medicine**, v. 43, n. 4, p. 639–655, 2023.

COREY, S. J. *et al.* Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 2, p. 118–129, 2007.

DAN, C.; CHI, J.; WANG, L. Molecular mechanisms of the progression of myelodysplastic syndrome to secondary acute myeloid leukaemia and implication for therapy. **Annals of medicine**, v. 47, n. 3, p. 209–217, 2015.

DANSEY, R. Myelodysplasia. **Current opinion in oncology**, v. 12, n. 1, p. 13–21, 2000.

DAVER, N. *et al.* FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. **American journal of hematology**, v. 88, n. 1, p. 56–59, 2013.

Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. **Leukemia**, v. 33, n. 2, p. 299–312, 2019.

DELLA PORTA, M. G. *et al.* Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM). **Leukemia**, v. 29, n. 7, p. 1502–1513, 2015.

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.

Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. **Blood**, v. 140, n. 12, p. 1345–1377, 2022.

DOTSON, J. L.; LEBOWICZ, Y. Myelodysplastic syndrome. *Em: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. .

ELLEGAST, J. M. *et al.* Unleashing cell-intrinsic inflammation as a strategy to kill AML blasts. **Cancer discovery**, v. 12, n. 7, p. 1760–1781, 2022.

ELYAMANY, G.; AWAD, MOHAMMAD; *et al.* Frequency and prognostic relevance of FLT3 mutations in Saudi acute myeloid leukemia patients. **Advances in hematology**, v. 2014, p. 141360, 2014.

ELYAMANY, G.; AWAD, MOHAMMED; *et al.* FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in patients with acute lymphoblastic leukemia and its clinical significance. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 6, n. 1, p. e2014038, 2014.

FRANÇA, I. G. DA F. *et al.* Role of conventional cytogenetics in sequential karyotype analysis of myelodysplastic syndrome: a patient with der(1;7)(q10;p10). **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 41, n. 1, p. 91–94, 2019.

FRÖHLING, S. *et al.* Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4372–4380, 2002.

GALTON, D. A. The myelodysplastic syndrome. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 299, n. 6699, p. 582, 1989.

GEYH, S. *et al.* Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 3, p. 683–691, 2016.

GHARIANI, I. *et al.* Myelodysplastic syndrome classification. **Annales de biologie clinique**, v. 71, n. 2, p. 139–144, 2013.

GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1532–1542, 2002.

GOODMAN, J. I.; COUNTS, J. L. Hypomethylation of DNA: a possible nongenotoxic mechanism underlying the role of cell proliferation in carcinogenesis. **Environmental health perspectives**, v. 101 Suppl 5, p. 169–172, 1993.

GRANFELDT ØSTGÅRD, L. S. *et al.* Epidemiology and clinical significance of secondary and therapy-related acute myeloid leukemia: A national population-based cohort study. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 31, p. 3641–3649, 2015.

GREENBERG, P. L. *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454–2465, 2012.

GRÖBNER, S. N. *et al.* The landscape of genomic alterations across childhood cancers. **Nature**, v. 555, n. 7696, p. 321–327, 2018.

HAFERLACH, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 241–247, 2014.

HORIIKE, S. *et al.* Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. **Leukemia**, v. 11, n. 9, p. 1442–1446, 1997.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF THE CARCINOGENIC RISK OF CHEMICALS TO HUMANS. **Benzene**. [s.l.] IARC, 2020.

JABBOUR, E. *et al.* Acquisition of cytogenetic abnormalities in patients with IPSS defined lower-risk myelodysplastic syndrome is associated with poor prognosis and

transformation to acute myelogenous leukemia. **American journal of hematology**, v. 88, n. 10, p. 831–837, 2013.

JALTE, M. *et al.* FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Unraveling the molecular mechanisms and implications for targeted therapies. **Cureus**, v. 15, n. 9, p. e45765, 2023.

JEREZ, A. *et al.* Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. **Blood**, v. 119, n. 25, p. 6109–6117, 2012.

KELLY, L. M. *et al.* FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. **Blood**, v. 99, n. 1, p. 310–318, 2002.

KELLY, L. M.; GILLILAND, D. G. Genetics of myeloid leukemias. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 3, n. 1, p. 179–198, 2002.

KENNEDY, J. A.; EBERT, B. L. Clinical implications of genetic mutations in myelodysplastic syndrome. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 35, n. 9, p. 968–974, 2017.

KENNEDY, V. E.; SMITH, C. C. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Key concepts and emerging controversies. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 612880, 2020.

KIYOI, H. *et al.* Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 93, n. 9, p. 3074–3080, 1999.

KIYOI, H. *et al.* Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. **Oncogene**, v. 21, n. 16, p. 2555–2563, 2002.

KOTTARIDIS, P. D. *et al.* The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1752–1759, 2001.

LEE, W.-H. *et al.* Validation of the molecular international prognostic scoring system in patients with myelodysplastic syndromes defined by international consensus classification. **Blood cancer journal**, v. 13, n. 1, p. 120, 2023.

LEVIS, M.; SMALL, D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. **Leukemia**, v. 17, n. 9, p. 1738–1752, 2003.

LI, W. The 5(th) edition of the world health organization classification of hematolymphoid tumors. *Em: Leukemia*. Brisbane (AU): Exon Publications, 2022. .

LOBERG, M. A. *et al.* Sequentially inducible mouse models reveal that Npm1 mutation causes malignant transformation of Dnmt3a-mutant clonal hematopoiesis. **Leukemia**, v. 33, n. 7, p. 1635–1649, 2019.

LYMAN, S. D. *et al.* The flt3 ligand: a hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from steel factor. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 12 Suppl 1, p. 99–107; discussion 108–10, 1994.

MACEČKOVÁ, D. *et al.* Current knowledge about FLT3 gene mutations, exploring the isoforms, and protein importance in AML. **Molecular biology reports**, v. 51, n. 1, p. 521, 2024.

MCKENNA, H. J. *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3489–3497, 2000.

MEDEIROS, B. C. *et al.* Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. **Leukemia**, v. 31, n. 2, p. 272–281, 2017.

MEDINA, K. L. Flt3 signaling in B lymphocyte development and humoral immunity. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 13, p. 7289, 2022.

MEDYOUF, H. The microenvironment in human myeloid malignancies: emerging concepts and therapeutic implications. **Blood**, v. 129, n. 12, p. 1617–1626, 2017.

MÉNDEZ-FERRER, S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 829–834, 2010.

MESHINCHI, S. *et al.* Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 89–94, 2001.

METZELER, K. H. *et al.* Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 128, n. 5, p. 686–698, 2016.

MEYER, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. **Leukemia**, v. 32, n. 2, p. 273–284, 2018.

MOMENILANDI, M. *et al.* FLT3L governs the development of partially overlapping hematopoietic lineages in humans and mice. **Cell**, v. 187, n. 11, p. 2817–2837.e31, 2024.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 327–334, 2014.

NAKAO, M. *et al.* Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 10, n. 12, p. 1911–1918, 1996.

NOGUEIRA ZERBINI, M. C. *et al.* World Health Organization Classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, 4th edition, 2008 – major changes from the 3rd edition, 2001. **Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 57, n. 1, p. 66–73, 2011.

OGAWA, S. Genetics of MDS. **Blood**, v. 133, n. 10, p. 1049–1059, 2019.

PAPAEMMANUIL, E. *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616–27; quiz 3699, 2013.

Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 23, p. 2209–2221, 2016.

PCDT Resumido SMD.pdf. Disponível em: <<https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/resumidos/pcdt-resumido-smd.pdf/view>>. Acesso em: 30 jul. 2025.

PINHEIRO, R. F. *et al.* FLT3 mutation and AML/ETO in a case of Myelodysplastic syndrome in transformation corroborates the two hit model of leukemogenesis. **Leukemia research**, v. 31, n. 7, p. 1015–1018, 2007.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. DE L. L. F. Síndrome mielodisplásica secundária à quimio ou radioterapia: SMD relacionada a tratamento. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 28, n. 3, p. 201–203, 2006.

RODRIGUEZ-SEVILLA, J. J.; COLLA, S. Inflammation in myelodysplastic syndrome pathogenesis. **Seminars in hematology**, v. 61, n. 6, p. 385–396, 2024.

RUBNITZ, J. E.; GIBSON, B.; SMITH, F. O. Acute myeloid leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 24, n. 1, p. 35–63, 2010.

SAEZ, B.; WALTER, M. J.; GRAUBERT, T. A. Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies. **Blood**, v. 129, n. 10, p. 1260–1269, 2017.

SALLMAN, D. A. *et al.* TP53 mutations in myelodysplastic syndromes and secondary AML confer an immunosuppressive phenotype. **Blood**, v. 136, n. 24, p. 2812–2823, 2020.

SALLMAN, D. A.; LIST, A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 133, n. 10, p. 1039–1048, 2019.

SCHLENK, R. F. *et al.* Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 18, p. 1909–1918, 2008.

STEENSMA, D. P. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 126, n. 1, p. 9–16, 2015.

STIREWALT, D. L.; RADICH, J. P. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 9, p. 650–665, 2003.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Myelodysplastic syndromes. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 19, p. 1872–1885, 2009.

TRIA, F. P., 4th; ANG, D. C.; FAN, G. Myelodysplastic syndrome: Diagnosis and screening. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 7, p. 1581, 2022.

TROWBRIDGE, J. J.; STARCZYNOWSKI, D. T. Innate immune pathways and inflammation in hematopoietic aging, clonal hematopoiesis, and MDS. **The journal of experimental medicine**, v. 218, n. 7, 2021.

TSAPOGAS, P. *et al.* The cytokine Flt3-ligand in normal and malignant hematopoiesis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

VASSALLO, J.; MAGALHÃES, S. M. M. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 31, n. 4, p. 267–272, 2009.

VILLAUME, M. T.; SAVONA, M. R. Pathogenesis and inflammaging in myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, v. 110, n. 2, p. 283–299, 2025.

WARREN, M. *et al.* Clinical impact of change of FLT3 mutation status in acute myeloid leukemia patients. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 25, n. 10, p. 1405–1412, 2012.

WATTAD, M. *et al.* Impact of salvage regimens on response and overall survival in acute myeloid leukemia with induction failure. **Leukemia**, v. 31, n. 6, p. 1306–1313, 2017.