

Anita Frisanco Oliveira

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E PERFIL MOLECULAR DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA JUVENIL SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM 5-AZACITIDINA. ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA CLÍNICA E GENÉTICA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia Clínica

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes

Co-orientador: Profa. Dra. Irene Lorand Metze

Barretos, SP
2020

Anita Frisanco Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E PERFIL MOLECULAR DE PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA JUVENIL SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM 5-
AZACITIDINA. ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA CLÍNICA E GENÉTICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação da Fundação Pio XII - Hospital
de Câncer de Barretos para obtenção do
título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia Clínica

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes

Co-orientador: Profa. Dra. Irene Lorand Metze

Barretos, SP
2020

O48c Oliveira, Anita Frisanco.

Caracterização imunofenotípica e perfil molecular de pacientes com leucemia mielomonocítica juvenil submetidos ao tratamento com 5-Azacitidina: associação com resposta clínica e genética. / Anita Frisanco Oliveira. - Barretos, SP 2020.

118 f. : il.

Orientador: Luiz Fernando Lopes.

Coorientadora: Irene Lorand-Metze.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2020.

1. Leucemia mielomonocítica juvenil. 2. Imunofenotipagem. 3. Citometria de fluxo. 4. Síndrome mielodisplásica. 5. Azacitidina. 6. Leucemia mielomonocítica crônica. I. Autor. II. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anita Frisanco Oliveira

Título:

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E PERFIL MOLECULAR DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA JUVENIL SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM 5-AZACITIDINA. ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA CLÍNICA E GENÉTICA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 07/12/2020

Banca Examinadora:

Dra. Maura Rosane Valério Ikoma

Instituição: Hospital Amaral Carvalho, HEMONÚCLEO REGIONAL DE JAU-LABORATÓRIO DE CITOMETRIA DE FLUXO.

Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP.

Dr. Alex Freire Sandes

Instituição: Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Medicina, Disciplina de Hematologia.

Dr. Luiz Fernando Lopes

Orientador

Dra. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze

Coorientador

Dra. Adriane Feijó Evangelista Lazarini

Presidente da Banca

Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

*Dedico à minha doce Alice, nascida durante essa jornada para me lembrar de
nossos verdadeiros propósitos nessa vida, todos norteados pelo amor.*

Ao meu marido James, meu amoroso companheiro.

*Aos meus pais, meus primeiros exemplos de dedicação, humanidade e
perseverança.*

*E a todos meus pequenos pacientes que me cativam diariamente com sua
inocência, sua resiliência e me impulsionam diariamente na busca do meu
melhor.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** que sempre me encorajou, sem nunca desamparar, me dando luz e paciência, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais **Eliane** e **Odilon**, meus eternos guias pelo caminho bem, da dedicação, do amor. Inspiração.

Ao meu amado marido **James** pelas inesgotáveis demonstrações de amor, carinho, companheirismo, motivação.

Ao **Professor Dr. Luiz Fernando Lopes** meu mestre incentivador, por quem tenho imensa admiração. Meu orientador, capaz de fazer de um desafio hoje a resposta amanhã. Meu mais sincero obrigado por ter por tantas vezes me impulsionado, perseverado e ensinado nesta jornada.

À minha co-orientadora **Professora Dra. Irene Lorand Metze** por ter me ensinado tanto. Agradeço por toda disposição, paciência, por ter sido tantas vezes capaz de mostrar o caminho correto da interpretação de resultados, metodologia, um mestre sempre presente.

Aos membros das bancas de acompanhamento **Dra. Maura Roseane Valerio Ikoma-Colturato** e **Dr. Cristovam Scapulatempo** por todo o conhecimento, sugestões e críticas sempre pertinentes que permitiram o crescimento deste trabalho.

Às queridas **Aline Tansini e Thais Toledo** do laboratório de citometria de fluxo pela amizade, paciência, ajuda inestimável com todos os resultados e comprometimento.

Ao meu professor de bioestatística **Marco Antônio Oliveira** que contribuiu com a pesquisa, em conjunto com o Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística – NEB.

À toda **equipe da pós-graduação** que tanto se dedicam aos alunos.

À toda equipe do **NAP infantil**, em especial meus amigos Gláucia e Diego sempre prontos a ajudar na coleta de dados.

À toda equipe **da Onco-hematologia** do Hospital Infanto-Juvenil de Barretos Bianca, Mário, Rafael, Robson, Juliana pelo companheirismo e apoio emocional sempre.

Aos demais membros do **Grupo Cooperativo Brasileiro de Síndrome Mielodisplásica em Pediatria** ainda não citados que há mais de 20 anos batalham para diagnóstico e tratamento desses pacientes. Em especial **Dras. Maria Lúcia de Martino Lee e Dra Ligia Niero** que de forma especial colaboraram no diagnóstico morfológico e revisão de lâminas dos pacientes, sempre com disposição, amizade e ensinamentos para toda a vida,

À equipe do Transplante do Hospital Infanto-Juvenil de Barretos, em especial **Dra Neysimelia e Dra Patricia** responsáveis pelo tratamento destes pacientes e pela pronta ajuda sempre.

Aos **pacientes e pais** que nos ensinam muito além da arte de cuidar, confiar, lutar, e não desistir.

“É preciso que eu suporte duas a três larvas se quiser conhecer as borboletas.

Dizem que são muito belas.”

O Pequeno Príncipe

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	A Leucemia Mielomonocítica Juvenil	1
1.1.2	Quadro clínico e laboratorial	4
1.1.3	Diagnóstico por imunofenotipagem por citometria de fluxo	5
1.1.3	Tratamento	7
1.2	O GBC-SMD-PED	11
2.	JUSTIFICATIVA	12
3.	OBJETIVOS	13
3.1	Objetivo geral	13
3.2	Objetivos específicos	13
4.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
4.1	Desenho da pesquisa	14
4.2	Casuística	14
4.3	Métodos	14
4.3.1	Coleta de dados clínicos e laboratoriais	14
4.3.1.1	Mielograma e hemograma (sangue periférico)	15
4.3.1.2	Citogenética	15
4.3.1.3	Molecular - perfil de mutações LMMJ	15
4.3.1.4	Métodos de análise da imunofenotipagem	16
4.3.1.4.1	Calibração do citômetro de fluxo	16
4.3.1.4.2	Processamento das amostras para imunofenotipagem	16
4.3.1.4.3	Identificação das populações celulares	17
4.3.1.4.4	Padronização dos valores de referência	26
4.4	Análise estatística dos dados	26
5.	RESULTADOS	28
5.1	Análise da casuística	28
5.2	Dados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico e após 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina	29
5.3	Perfil molecular e citogenético dos pacientes com LMMJ ao diagnóstico	30
5.4	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	32
5.4.1	Imunofenotipagem por citometria de fluxo ao diagnóstico	32

5.4.2	Perfil imunofenotípico ao diagnóstico x Perfil molecular	40
5.5	Resposta clínica após tratamento com 5-azacitidina – parâmetros clínicos e genéticos	43
5.5.1	Perfil imunofenotípico após tratamento com 5-azacitidina	43
5.5.1.1	Células CD34+	43
5.5.1.2	Série granulocítica	44
5.5.1.3	Monócitos	44
5.5.1.4	Linfócitos maduros	44
5.5.2	Perfil imunofenotípico x resposta clínica obtida com tratamento com 5-azacitidina	46
5.6	Identificação de fatores preditivos de resposta	51
5.7	Modelo preditivo de resposta	56
6.	DISCUSSÃO	57
7.	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69
 ANEXOS		
ANEXO A -	Carta de aceitação do Comitê de Ética em Pesquisa	80
ANEXO B –	Ficha de coleta de dados	90
ANEXO C –	Artigo: <i>Immunophenotypic characteristics of Juvenile Myelomonocytic Leukemia and their relation with the molecular subgroups of the disease.</i>	94
ANEXO D -	Tabela 13 – Características clínicas e laboratoriais dos 2 pacientes com negatização de PTPN11 após 6 ciclos de azacitidina	95
ANEXO E –	Tabela 14 - Características clínicas, laboratoriais, imunofenotípicas e resposta dos 21 pacientes com avaliação ao diagnóstico, com 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina.	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Linha do Tempo – Cronologia da LMMJ.	2
Figura 2 -	Algoritmo de tratamento para LMMJ baseado na alteração molecular encontrada.	8
Figura 3 -	Plot de separação das populações pelo gráfico CD45/SSC.	18
Figura 4 -	Análise de SSC (adaptado de Ogata, 2009).	19
Figura 5 -	Plots de análise de precursores mieloides.	20
Figura 6 -	Plots de análise de distribuição de Hematogônias tipo 1, tipo 2 e linfócitos B maduros.	21
Figura 7 -	Plots de análise de padrão de maturação granulocítico	22
Figura 8 -	Plots de análise de monócitos.	24
Figura 9 -	Plots de análise das subpopulações de linfócitos T e NK.	25
Figura 10 -	Fluxograma da casuística de pacientes com LMMJ analisados	28
Figura 11 -	Plots de separação de células CD45/SSC Controle x LMMJ.	35
Figura 12 -	Plots de maturação granulocítica Controle x LMMJ.	36
Figura 13 -	Plots de precursores linfoides B e linfócitos B maduros Controle x LMMJ.	37
Figura 14 -	Plots de células CD34+ precursores mieloides Controle x LMMJ.	38
Figura 15 -	Plots de distribuição de monócitos Controle x LMMJ.	39
Figura 16 -	Curva de distribuição CD34/117 diagnóstico, 3 e 6 ciclos.	46
Figura 17 -	Curva de distribuição de monócitos diagnóstico, 3 e 6 ciclos.	46
Figura 18 -	Curva de distribuição de linfócitos T diagnóstico, 3 e 6 ciclos.	47
Figura 19 -	Curva de distribuição de linfócitos NK diagnóstico, 3 e 6 ciclos.	47
Figura 20 -	Curvas de distribuição das populações de células CD34/CD117, linfócitos T, monócitos totais e subpopulações, de acordo com a resposta clínica com 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Critérios diagnósticos para LMMJ, <i>WHO</i> 2016.	3
Tabela 2 -	Variáveis na avaliação de resposta de pacientes com LMMJ.	10
Tabela 3 -	Painel de anticorpos utilizados para auxílio de diagnóstico das síndromes mielodisplásicas por citometria de fluxo.	17
Tabela 4 -	Dados clínicos e de hemograma dos pacientes com LMMJ ao diagnóstico e após 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina (mediana, percentil 10 e 90).	29
Tabela 5 -	Dados clínicos e de hemograma dos pacientes com LMMJ e cariótipo com monossomia do 7 (Média, mín e máx).	31
Tabela 6 -	Distribuição das mutações moleculares dos pacientes com LMMJ.	32
Tabela 7 -	Populações celulares pela imunofenotipagem por citometria de fluxo dos pacientes com LMMJ e grupo controle (mediana, percentil 10 e 90).	34
Tabela 8 -	Quantificação das populações celulares por citometria de fluxo dos pacientes com LMMJ nos diferentes perfis moleculares (mediana, percentil 10 e 90).	41
Tabela 9 -	Alterações imunofenotípicas nos pacientes com LMMJ nos diferentes perfis moleculares.	42
Tabela 10 -	Características imunofenotípicas dos pacientes com LMMJ ao diagnóstico, após 3 ciclos e 6 ciclos de 5-azacitidina (mediana, percentil 10 e 90)	45
Tabela 11 -	Características imunofenotípicas dos pacientes com LMMJ depois de 3 ciclos de 5-azacitidina de acordo com a resposta clínica (mediana).	49
Tabela 12 -	Características imunofenotípicas dos pacientes com LMMJ depois de 6 ciclos de 5-azacitidina de acordo com a resposta clínica (mediana).	50
Tabela 13 -	Relação da expressão de CD7 em precursores mielóides e tipo de resposta à 5-azacitidina.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

CBL	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
COG	<i>Cooperative Oncology Group</i>
DRM	Doença Residual Mínima
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
EWOG - MDS	<i>European Working Group - MDS</i>
FAB	<i>French American British</i>
FAN	Fator anti-núcleo
FISH	<i>Fluorescent in-situ hybridization</i>
GATA2	<i>GATA-2 binding protein 2 deficiency</i>
GCB-SMD-PED	Grupo Cooperativo Brasileiro de SMD pediátrica
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor</i>
H1	Hematogônias tipo 1
HbF	Hemoglobina fetal
HLA-DR	<i>Human leucocyte antigen DR</i>
ICF	Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo
KRAS	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
LMMC	Leucemia Mielomonocítica crônica
LMMJ	Leucemia Mielomonocítica Juvenil
MO	Medula óssea
NF1	Neurofibromatose tipo 1

NK	<i>Natural killers</i>
NRAS	<i>NRAS proto-oncogene, GTPase</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Ph	<i>Philadelphia</i>
PTPN11	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11</i>
RALD	<i>Ras Associated Leukoproliferative Disease</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RCE	Rebordo Costal Esquerdo
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SP	Sangue periférico
SSC	<i>Side Scatter</i>
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TMO	Transplante de Medula Óssea
Treg	Linfócitos T reguladores

LISTA DE SÍMBOLOS

\geq	Maior ou igual
\leq	Menor ou igual
®	Marca registrada
%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
+	Positivo
-	Negativo

RESUMO

Oliveira AF. Caracterização imunofenotípica e perfil molecular de pacientes com leucemia mielomonocítica juvenil submetidos ao tratamento com 5-azacitidina. Associação com resposta clínica e genética. Barretos. Hospital de Câncer InfantoJuvenil de Barretos.

Introdução: A Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) é uma doença hematopoiética clonal rara da infância, com características de mielodisplasia e mieloproliferação. Apesar de critérios clínicos e laboratoriais bem definidos para seu diagnóstico, a imunofenotipagem por citometria de fluxo (ICF), ferramenta importante no diagnóstico de outras neoplasias hematológicas, não é utilizada rotineiramente no diagnóstico. Assim, são poucos os estudos acerca das características imunofenotípicas dos pacientes com LMMJ, se semelhantes aos já descritos em síndrome mielodisplásica (SMD) ou com os mesmos achados da LMMC, doença de adultos, mas com características clínicas e laboratoriais que se sobrepõem à LMMJ. É sabido que cerca de 90% dos pacientes terão alteração molecular em um dos genes da via do RAS, com evoluções e terapêuticas distintas a depender do gene mutado envolvido. Além disso, com os recentes avanços no conhecimento da patogênese da doença com estudos em epigenética, novos tratamentos clínicos vêm sendo propostos como uma ponte ao transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), único tratamento curativo para a maioria dos pacientes. Com o objetivo de reduzir a carga de doença e melhorar performance para o tratamento curativo, a 5-azacitidina é uma medicação que se mostrou segura e eficiente, com resposta clínica e laboratorial em pacientes com LMMJ. Critérios de reavaliação foram criados a fim de definir resposta ao uso dessas medicações, estratificando os pacientes com resposta completa, resposta parcial, doença estável ou progressão de doença. A ICF, implementada na reavaliação de doenças hematológicas como leucemia aguda após tratamento, foi realizada nos pacientes com LMMJ ao diagnóstico e após tratamento com 5-azacitidina. **Objetivos:** Caracterizar imunofenotípicamente os pacientes com LMMJ ao diagnóstico, de acordo com o perfil molecular, e após tratamento com 5-azacitidina nas diferentes populações celulares e buscar associação entre os achados obtidos com o tipo de resposta clínica e assim variáveis preditoras de resposta. **Materiais e Métodos:** Foi utilizado um painel de anticorpos de 8 cores baseado nas recomendações do *EuroFlow*, e já validado para população pediátrica com SMD.

Contemplando as populações de células CD34⁺, linfócitos B, T, NK, maturação granulocítica e monócitos, os pacientes com LMMJ foram avaliados ao diagnóstico e após 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina. Os achados foram comparados ao perfil molecular e ao tipo de resposta clínica obtida após tratamento com hipometilante. **Resultados:** Foram 32 pacientes com LMMJ tratados com 5-azacitidina e submetidos à reavaliação clínica no período de 2014-2019. Com mediana de 29 meses de idade, mutação de um dos genes da via do RAS foi encontrada em 82% da amostra, com PTPN11 sendo a mais frequente, em 35%. Das alterações imunofenotípicas ao diagnóstico e comparadas a um grupo controle com medula óssea normal, observamos uma mediana elevada de células CD34⁺/CD117⁺ de 3,35%, com 25 pacientes apresentando >2% dessas células; ainda neste compartimento celular, 50% tinham expressão aberrante de CD7. Redução de células CD34⁺/CD19⁺/CD10⁺ foi frequente, com ausência de hematogônias tipo 1 (H1) em 4 pacientes. Na população granulocítica, a alteração mais frequente foi redução de complexidade interna, identificada em 28 pacientes, seguida de alteração de padrão de maturação e assincronismo maturativo. Devido a proliferação monocítica característica da doença, um incremento da população monocítico foi observado ao diagnóstico em 29 pacientes, com redução de monócitos clássicos (mediana de 82,5%) quando comparado à população controle. Diferentemente dos monócitos clássicos, foi verificado aumento das subpopulações de monócitos CD16⁺ (intermediário e não clássicos). Da população de linfócitos maduros, tanto linfócitos T quanto NK estavam reduzidos. Quando os achados foram comparados aos perfis moleculares, os pacientes com mutação de PTPN11 e NF1 apresentaram-se com as maiores medianas de células CD34⁺; além do aumento de precursores mieloides, expressão aberrante de CD7 foi observada somente neste grupo de pacientes, com 82% e 66% dos pacientes com PTPN11 e NF1 respectivamente. Da distribuição das subpopulações de monócitos, esta também foi variável entre as diferentes mutações, com maiores porcentagens de monócitos clássicos nos pacientes com NF1 e NRAS, inferindo imunofenótipos distintos a depender da mutação molecular associada. Após tratamento com hipometilante, os pacientes apresentaram uma redução das células CD34⁺, com mediana de células CD34⁺/CD117⁺ passando de 3,35% para 2,3% após 3 ciclos de medicação; esta redução foi observada somente nos pacientes com resposta clínica ao tratamento. Já os pacientes com progressão de doença se apresentaram com elevação da população de precursores mieloides. No compartimento de H1, antes ausentes em 4 pacientes, nova redução foi observada com o tratamento; ausência de H1 foi vista em 50% dos pacientes com LMMJ após 5-azacitidina. A

população monocítica também sofreu redução, passando de 11,91% para 4,98% após 6 ciclos de tratamento com variação das subpopulações mas sem relação com a resposta clínica. Por fim, a população de linfócitos T reduzida ao diagnóstico mostrou incremento importante, principalmente nos pacientes com resposta clínica completa ou parcial ($p < 0,001$). As alterações imunofenotípicas como expressão aberrante, expressão anormal de HLA-DR em monócitos, complexidade interna e padrão de maturação de granulócitos não sofreram alteração com o tratamento clínico. Foi observada relação entre expressão aberrante de CD7 e pior resposta ao tratamento; todos os pacientes que evoluíram com progressão aberrante exibiram essa marcação anômala em precursores mieloides. Quando os pacientes foram reavaliados nos 3 momentos, aqueles com melhor resposta tinham medianas inferiores de CD34⁺ ao diagnóstico e durante terapia e tiveram um maior incremento de linfócitos T.

Conclusões: A ICF foi uma ferramenta factível no diagnóstico de LMMJ, caracterizando um perfil imunofenotípico semelhante à SMD e com características das subpopulações monocíticas distintas da LMMC. Além disso, semelhante aos diferentes comportamentos da doença a depender do perfil molecular, as características imunofenotípicas também parecem distintas, com características de maior agressividade nos pacientes com PTPN11 e NF1. Após o tratamento com 5-azacitidina, os respondedores têm um controle do comportamento mieloproliferativo, com redução de precursores mieloides, e incremento de linfócitos T, variáveis que poderiam ser incorporadas na avaliação de resposta ao tratamento clínico dos pacientes com LMMJ. Estudos prospectivos são necessários para confirmação dos dados com maior número de pacientes, além de incluir avaliação do status pré e pós-transplante de medula óssea dos pacientes com LMMJ, identificando variáveis imunofenotípicas inclusive com impacto prognóstico.

Palavras chaves: Leucemia Mielomonocítica Juvenil; Imunofenotipagem; Citometria de fluxo; Síndrome Mielodisplásica; Azacitidina; Leucemia Mielomonocítica Crônica.

ABSTRACT

Oliveira AF. Immunophenotypic Characteristics and molecular profile of Juvenile Myelomonocytic Leukemia treated with 5-azacitidine. Association with clinical and genetic response. Barretos. Barretos Children's Cancer Hospital.

Introduction: Juvenile Myelomonocytic Leukemia (JMML) is a rare clonal hematopoietic disease of childhood, with characteristics of myelodysplasia and myeloproliferation. Despite well-defined clinical and laboratory criteria for its diagnosis, flow cytometry immunophenotyping (FCI), an important tool in the diagnosis of other hematological neoplasms, is not routinely used in the diagnosis. Thus, there are few studies on the immunophenotypic characteristics of patients with JMML, if they are similar to those already described in myelodysplastic syndrome (MDS) or with the same findings as CMML, an adult disease, but with clinical and laboratory characteristics that overlap JMML. It is known that about 90% of patients will have molecular changes in one of the genes in the RAS pathway, with different evolutions and therapies depending on the mutated gene involved. In addition, with recent advances in the knowledge of the pathogenesis of the disease epigenetic studies, new clinical treatments have been proposed as a bridge to hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), the only curative treatment for the majority of JMML patients. In order to reduce the disease burden and improve performance for curative treatment, 5-azacitidine is a medication that has been shown to be safe and efficient, with clinical and laboratory response in JMML patients. Reassessment criteria were created in order to define the clinical response with these medications, stratifying patients as complete response, partial response, stable disease or disease progression. FCI, implemented in the reevaluation of hematological diseases such as acute leukemia after treatment, was performed in patients with JMML at diagnosis and after treatment with 5-azacitidine. **Aims:** To characterize immunophenotypically JMML patients at diagnosis, according to the molecular profile, and after treatment with 5-azacitidine in different cell populations, and also to look for an association between immunophenotypic findings and the type of clinical response. **Materials and Methods:** An 8-color antibody panel was used, based on EuroFlow recommendations, and already validated for pediatric population with MDS. Contemplating populations of CD34+

cells, B, T, NK lymphocytes, granulocytic maturation and monocytes, JMML patients were evaluated at diagnosis and after 3 and 6 cycles of 5-azacitidine. The findings were compared to the molecular profile and the type of clinical response obtained after treatment with hypomethylant. **Results:** 32 patients with LMMJ were treated with 5-azacitidine and underwent clinical reevaluation in the period 2014-2019. With a median of 29 months of age, mutation in one of the genes in the RAS pathway was found in 82% of the sample, with PTPN11 being the most frequent, in 35%. From immunophenotypic changes to diagnosis and compared to a control group with normal bone marrow, we observed a high median of CD34+/CD117+ cells of 3.35%, with 25 patients presenting > 2% of these cells; in this cell compartment, 50% had an aberrant CD7 expression. Reduction of CD34+/CD19+/CD10+ cells was frequent, with absence of type 1 hematogones (H1) in 4 patients. In the granulocytic population, the most frequent change was a reduction in internal complexity, identified in 28 patients, followed by a change in the maturation pattern and maturation asynchronism. Due to the monocytic proliferation characteristic of the disease, an increase in the monocytic population was observed at diagnosis in 29 patients, with a reduction in classic monocytes (median of 82.5%) when compared with the control population. Unlike classic monocytes, there was an increase in CD16+ monocytes (intermediate and non-classic). Of the mature lymphocyte population, both T and NK lymphocytes were reduced. When the findings were compared to molecular profiles, patients with PTPN11 and NF1 mutations presented the highest medians of CD34+ cells; in addition to the increase in myeloid precursors, aberrant CD7 expression was observed only in this group of patients, with 82% and 66% of patients with PTPN11 and NF1 respectively. The distribution of monocyte subpopulations was also variable within the mutations, with higher percentages of classic monocytes in patients with NF1 and NRAS, inferring different immunophenotypes depending on the associated molecular mutation. After treatment with hypomethylant, patients showed a reduction in CD34+ cells, with median CD34+/CD117+ cells going from 3.35% to 2.3% after 3 cycles of medication; this reduction was observed only in patients with response to treatment. In the H1 compartment, previously absent in 4 patients, a further reduction was observed with the treatment; absence of H1 was seen in 50% of patients with LMMJ after 5-azacitidine. The monocytic population also decreased, from 11.91% to 4.98% after 6 treatment cycles with variation in subpopulations but with no relation to the clinical response. Finally, the population of T lymphocytes reduced at diagnosis showed an important increase, especially in patients with

complete or partial clinical response ($p < 0.001$). Immunophenotypic changes such as aberrant expression, abnormal expression of HLA-DR in monocytes, internal complexity and abnormal pattern of granulocyte maturation did not change with clinical treatment. A relationship was observed between aberrant CD7 expression and worse response to treatment; all patients who progressed exhibited this anomalous marking on myeloid precursors. When the patients were reassessed at the 3 moments, those with the best response had lower CD34 + medians at diagnosis and during therapy, and had a greater increase in T lymphocytes. **Conclusions:** FCI was a feasible tool in the diagnosis of JMML, featuring a similar immunophenotypic profile to MDS and with characteristics of monocytic subpopulations distinct from CMML. In addition, similar to the different behaviors of the disease depending on the molecular profile, the immunophenotypic characteristics also appear different, with characteristics of greater aggressiveness in patients with PTPN11 and NF1. After treatment with 5-azacitidine, responders have control of myeloproliferative behavior, with a reduction in myeloid precursors, and an increase in T lymphocytes, variables that could be incorporated into the assessment of response to clinical treatment of JMML patients. Prospective studies are necessary to confirm the data with a larger number of patients, and including assessment of the pre and post-bone marrow transplantation status, identifying immunophenotypic variables that can be of prognostic value.

Key Words: Juvenile Myelomonocytic Leukemia; Immunophenotyping; Flow cytometry; Myelodysplastic Syndromes; 5-azacitidine; Chronic Myelomonocytic Leukemia.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Leucemia Mielomonocítica Juvenil

A Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) é uma doença hematopoiética clonal rara, que acomete lactentes e crianças na primeira infância. De caráter mieloproliferativo/mielodisplásico, a LMMJ se caracteriza pela proliferação clonal de células mieloides e monocíticas, associado a achados de displasia celular.^{1,2}

Com incidência estimada de 1,2 casos para cada 1.000.000 crianças de 0-14 anos, a LMMJ responde por menos de 3% do total de leucemias da infância. Porém, quando considerada no contexto de doenças mielodisplásicas e mieloproliferativas, é responsável por 20-30% do total de pacientes nesta mesma faixa etária. A idade média de diagnóstico é de 2 anos de idade (varia de 0,1 a 11,4), e 75% dos pacientes são menores de 3 anos. Somente 9% dos pacientes tem menos de 4 meses ao diagnóstico e 5% se apresentam com idade acima de 4 anos. Tem um predomínio no sexo masculino, com uma incidência cerca de duas vezes maior neste grupo de pacientes.²⁻⁵

Desde suas primeiras descrições, há mais de 50 anos, a doença reconhecida inicialmente como Leucemia Mielocítica da Infância tinha duas principais formas de apresentação. Uma primeira semelhante a que ocorre em adultos, e contemplando crianças acima de 4 anos, e a outra forma mais agressiva, em crianças menores, caracterizada por sangramento, linfonodomegalias, *rash* cutâneo e com uma evolução em geral desfavorável. A doença como conhecemos hoje sob a nomenclatura de LMMJ já recebeu vários nomes e muitas das características propostas inicialmente pela classificação FAB para doenças mieloproliferativas eram também observadas nos pacientes com LMMJ. Leucemia Mieloide Crônica Juvenil, Leucemia Mielomonocítica Crônica e Subaguda, Leucemia Mielomonocítica Crônica da Criança, Leucemia Granulocítica Crônica Juvenil, Monossomia do cromossomo 7 Infantil, Síndrome da monossomia do 7 foram alguns dos nomes dados para uma mesma doença. Reisman e Trujillo foram os primeiros a tentar identificar características clínicas e fisiopatológicas que caracterizavam este grupo de pacientes, como a elevação de hemoglobina fetal, ausência do cromossomo *Philadelphia* (Ph), entre outros.^{4, 6-8}

Somente na década de 90, em um consenso internacional, foi proposto o nome Leucemia Mielomonocítica Juvenil como mais apropriado para contemplar as características

desta doença. Os pacientes deveriam ter monocitose, precursores mieloides circulantes em sangue periférico, <20% de blastos em medula óssea e cromossomo Ph negativo. A presença de monossomia do cromossomo 7 não descartava a possibilidade de LMMJ. Com esta nova definição de critérios diagnósticos, os pacientes também passaram a ter estratégias terapêuticas distintas. ¹

Em 2003, Hasle e col. propuseram uma classificação pediátrica para doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas dentro da classificação internacional de neoplasias hematopoiéticas da OMS (Organização Mundial da Saúde). A LMMJ aparece então como doença de carácter mieloproliferativo/mielodisplásico e com critérios diagnósticos clínicos e laboratoriais próprios. ⁹

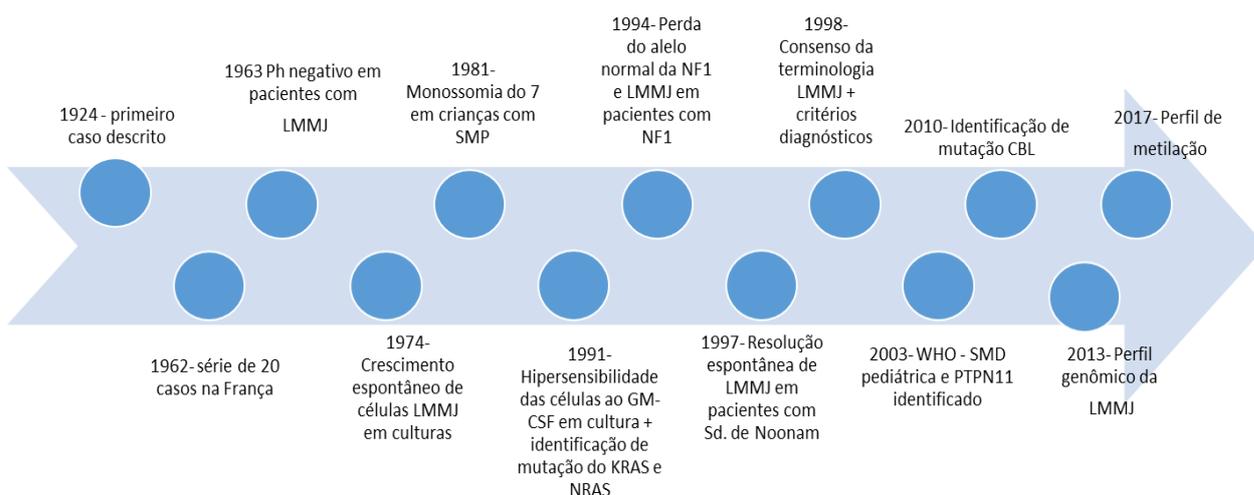


Figura 1 – Linha do tempo – cronologia da LMMJ

* Adaptado de *“Juvenile Myelomonocytic Leukemia – who’s the driver at the wheel”* – Niemeyer C., Flotho C., Blood 2019.

Durante todo esse período, a LMMJ mostrou-se uma doença multifacetada. Com o advento dos estudos moleculares de neoplasias mieloides e a evidência da participação da via do *RAS* na leucemogênese da doença, principalmente a partir do século 21, foi se descobrindo espectros de evolução e comportamento distintos da doença. Algumas síndromes genéticas já haviam sido associadas à um aumento no risco de LMMJ como os pacientes com neurofibromatose tipo 1 com 200-500x mais chances de desenvolverem uma neoplasia mieloide, e em especial a LMMJ, quando mutado o alelo *NF1* normal. Em portadores de Síndrome de Noonan também foi observada relação com LMMJ, e em alguns casos involução e remissão espontânea. Os genes *CBL*, *PTPN11* foram sendo associados à doença, permitindo o desenho de um perfil mutacional juntamente com os demais genes da via do *RAS*.¹⁰⁻¹² A figura 1 resume toda a evolução cronológica e de conhecimentos sobre a LMMJ.

Assim, hoje além da necessidade de um diagnóstico correto da doença, a pesquisa do gene mutado envolvido é imprescindível para estratificação da doença e assim definição de comportamento e terapêutica adequada.¹³⁻¹⁵ A análise epigenética através do perfil de metilação gênica também tem sido implicado com prognóstico e evolução desses pacientes.

16-18

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para LMMJ, WHO 2016

<p>Critérios clínicos e hematológicos (obrigatórios)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Esplenomegalia - Ausência de cromossomo Ph ou rearranjo do BCR-ABL - >1.000/mm³ monócitos em sangue periférico - <20% de blastos em sangue periférico e MO
<p>Critério genético (ao menos 1)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mutação somática em <i>PTPN11</i>, <i>KRAS</i> ou <i>NRAS</i> - Diagnóstico clínico de neurofibromatose tipo 1 ou mutação de <i>NF1</i> - Mutação germinativa de <i>CBL</i>, ou perda da heterozigose de <i>CBL</i>
<p>Outros critérios (Para os pacientes que preenchem os critérios clínicos e laboratoriais porém sem critério genético)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Monossomia do cromossomo 7 <li style="text-align: center;">Ou <li style="text-align: center;">≥2 dos seguintes: - Elevação de HbF para idade - Precusores mieloides ou eritróides em SP - Hipersensibilidade ao GM-CSF - Hiperfosforilação do STAT5

* Adaptado da classificação de Neoplasias Hematológicas *WHO*, 2016.

1.1.2 Quadro Clínico e Laboratorial

A apresentação clínica do paciente com LMMJ reproduz a infiltração de diferentes órgãos pela proliferação de células mielomonocíticas. Sinais e sintomas como sangramento, palidez, febre estão frequentemente presentes. A esplenomegalia e hepatomegalia são achados usuais, mas outros órgãos como pele, pulmão, intestino também podem ser acometidos. 50% dos pacientes apresentam linfonomegalia ao diagnóstico. A esplenomegalia maciça evidente ao exame físico é encontrada ao diagnóstico em quase todos os pacientes com LMMJ, ou alguns meses após confirmação da doença. A infiltração leucêmica de parede intestinal pode provocar diarreia e existem casos descritos de apresentação inicial com sangramento intestinal.^{1, 4, 19, 20}

Entre os achados laboratoriais, como doença de caráter mieloproliferativo, é frequente o achado de leucocitose, trombocitopenia e anemia; a mediana de leucometria ao diagnóstico é de $33 \times 10^9/L$ e pacientes com leucometria inferior a $10 \times 10^9/L$ são raros, sendo observado principalmente nos pacientes com monossomia do cromossomo 7.^{4,21} Apesar de plaquetopenia evidente, apenas 14% dos pacientes terão plaquetas $< 20 \times 10^9/L$ ao diagnóstico. A análise de sangue periférico traz informações importantes, com evidência de progenitores mieloides circulantes, muitas vezes eritroblastos, mieloblastos (média de 2%) e uma população atípica de monócitos circulantes. Como visto na tabela 1, ao menos 1.000 monócitos circulantes são necessários ao diagnóstico, e $< 20\%$ de blastos circulantes tanto em sangue periférico (SP) como medula óssea (MO). Outro achado laboratorial evidenciado nestes pacientes é o aumento da hemoglobina fetal (HbF) além do esperado para idade, critério diagnóstico menor.^{13,22,23} Foram descritos ainda nesses pacientes com LMMJ achados laboratoriais de provas de auto-imunidade positivos, como hipergamaglobulinemia e em cerca de 25% um aumento de anticorpos anti-núcleo (FAN), porém inespecíficos.⁵

Os critérios diagnósticos obrigatórios consistem nessas características clínicas, como a esplenomegalia, e os achados laboratoriais de doença mieloproliferativa, além da pesquisa do cromossomo Ph negativa para exclusão de leucemia mieloide crônica.²

Diante de um quadro de monocitose, com linfonomegalia, esplenomegalia, febre, é notável que a apresentação clínica se assemelha a um espectro de outras doenças. Infecções virais como pelo *Herpes vírus tipo 6*, *Epstein-Barr* e *citomegalovírus* por exemplo, podem mimetizar um quadro de LMMJ e figuram entre os principais diagnósticos diferenciais.^{24,25}

Outras doenças como leucemia aguda, leucemia mieloide crônica, síndrome hemofagocítica, osteopetrose, síndrome de *Wiskott-Aldrich* são outros diagnósticos a serem considerados. Um espectro de doenças auto-imunes (*RALD – RAS associated autoimmune leukoproliferative disease*) cursam com fenótipo idêntico ao da LMMJ mas com um comportamento indolente, e estão entre os possíveis diagnósticos diferenciais; ainda se estuda se seriam apenas mais uma doença do espectro de síndromes associadas a via do *RAS*, devendo esses pacientes serem monitorados pelo risco de evolução clonal.²⁶ Mais raramente, alguns pacientes com haploinsuficiência do gene *GATA2* podem fazer um quadro de mieloproliferação mimetizando LMMJ, com monossomia do cromossomo 7, porém sem esplenomegalia.²⁷

1.1.3 Diagnóstico e Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Além dos critérios clínicos e laboratoriais mencionados acima, outras características são observadas nestes pacientes e participam dos critérios diagnósticos propostos.

A hipersensibilidade de progenitores mieloides ao fator de crescimento de colônias de monócitos (GM-CSF), com hiperproliferação de unidades formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos foi descrita na década de 90. É uma ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial, porém tem pouca especificidade e pode ser positiva em outras situações como infecções virais.^{5,28}

A análise citogenética na avaliação destes pacientes mostra alteração em 1/3, sendo que a mais frequentemente encontrada é a monossomia do cromossomo 7, em cerca de 25% dos pacientes. Os pacientes com monossomia do 7 em geral se apresentam com menor leucometria, maior número de monócitos, hemácias macrocíticas e níveis de hemoglobina fetal normais.^{13,29}

Na análise molecular, desde a descrição do envolvimento de mutações de genes *RAS* ou reguladores da via do *RAS* na leucemogênese da doença, foi observado que cerca de 85% - 90% dos pacientes com LMMJ vão ter mutação de um dos seguintes genes envolvidos: *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL* ou *NF1*. A depender da mutação envolvida é esperado um comportamento distinto da doença e assim também proposta terapêutica. A mais comumente envolvida é a mutação do gene *PTPN11*, encontrado em 35% dos pacientes; *NRAS* e *KRAS* respondem por 20 a 25% do total de pacientes e *CBL* em torno de 15%, conforme descrição dos grupos cooperativos.^{13, 30-33}

Poucos são os trabalhos disponíveis mostrando a imunofenotipagem no contexto da LMMJ como uma ferramenta adicional no diagnóstico diferencial. Hasegawa e col. mostrou a imunofenotipagem como ferramenta de auxílio na diferenciação com outras doenças que também cursam com monocitose, principalmente naqueles pacientes com pesquisa negativa das mutações gênicas associadas. Foi observado que os pacientes com LMMJ exibem uma hiperfosforilação da via de transdução do STAT5, em resposta ao uso de estimulador de colônias. A imunofenotipagem detecta esta resposta em células CD34⁺CD33⁺ ou CD33⁺CD14⁺CD38⁺.³⁴

Na análise de sangue periférico a imunofenotipagem pode ter um papel no diagnóstico diferencial com as RALDpatias - desordens leucoproliferativas imunes associadas ao RAS. O perfil imunofenotípico de monócitos CD16⁺ circulantes (não-clássicos) e de uma população policlonal de células B CD10⁺ foi descrito em sangue periférico de pacientes com as RALDpatias. Embora os achados não terem sido comparados a pacientes com LMMJ, podem auxiliar na diferenciação entre essas duas patologias de características clínicas e moleculares tão semelhantes mostrando um outro possível papel para a imunofenotipagem por citometria de fluxo (ICF) neste contexto. Estudos adicionais são necessários para verificar o comportamento dessas células nos pacientes com LMMJ.²⁶

A Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC) é uma doença que tem caráter mieloproliferativo/mielodisplásico e características clínicas e laboratoriais que se sobrepõem à LMMJ, como a monocitose mantida e evidência de displasia de pelo menos uma linhagem. Foi descrito o padrão imunofenotípico da população monocítica em sangue periférico destes pacientes, com achado de monócitos normais ou clássicos CD14⁺/CD16⁻ em valores acima de 94% como característico da LMMC, diferente do padrão de distribuição que aparece em monocitoses reacionais e outras neoplasias com monocitose.^{35,36} Picot analisou através da imunofenotipagem multiparamétrica a distribuição de monócitos em amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com monocitose e suspeita de LMMC. Utilizando o perfil monocítico descrito de aumento de monócitos clássicos obteve especificidade de 97% para SP e 100% para MO utilizando um *cutoff* de 95% e 93% respectivamente; observou ainda que após o tratamento com hipometilante, 4/7 pacientes com LMMC tiveram redução da população monocítica e normalização da distribuição.³⁷ Além dessa alteração na distribuição das subpopulações de monócitos, marcadores aberrantes em células CD34⁺ como CD7, CD2,

CD56, ausência ou redução de hematogônias tipo 1, padrão de maturação granulocítico alterado entre outras características imunofenotípicas semelhantes às observadas em pacientes com SMD, foram também descritas em pacientes com LMMC.³⁸ Pouco se conhece do padrão de distribuição de monócitos em pacientes com LMMJ, se teriam essa mesma distribuição observada em pacientes adultos com LMMC.

1.1.4 Tratamento

O conhecimento das vias moleculares na patogênese da LMMJ, foi de fundamental importância na definição diagnóstica e de estratégia terapêutica da doença. A grande maioria dos pacientes têm uma doença de comportamento agressivo e fatal na ausência de tratamento apropriado.⁴ O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) ainda é a única terapêutica curativa para esses pacientes, apesar de uma alta taxa de recaída.³⁹ Em pacientes com mutação germinativa de *CBL* e alguns pacientes com mutação somática de *NRAS* observou-se remissão espontânea, sem intervenção terapêutica, enquanto pacientes com mutação somática em *PTPN11* e *KRAS* por exemplo tem doença de comportamento agressivo e indicação absoluta de transplante de medula óssea (TMO). O fluxograma com as estratégias de tratamento está resumido na figura 2.^{13,40}

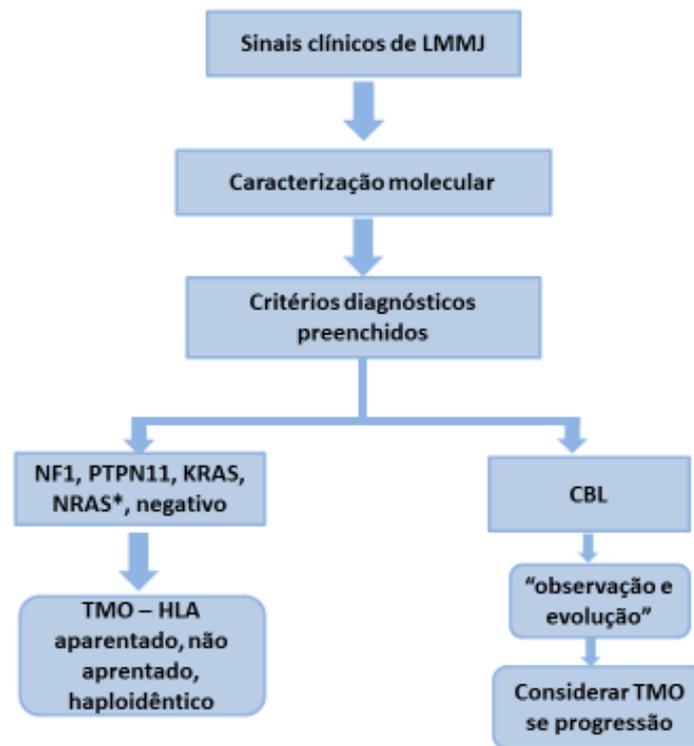


Figura 2 – Algoritmo de tratamento para LMMJ baseado na alteração molecular encontrada.

*Alguns pacientes com doença menos agressiva podem ser observados até o TMO – casos de regressão espontânea.

** Adaptado de *“How I treat Juvenile Myelomonocytic Leukemia”* Locatelli e col., 2015.

Além do impacto na via molecular envolvida, alguns fatores prognósticos clínicos e laboratoriais de resposta ao transplante também foram observados. Pacientes com idade superior a 2 anos, hemoglobina fetal superior a 10%, plaquetometria inferior a $40 \times 10^9/L$ e cariótipo complexo foram relacionados com curvas de sobrevida inferiores.⁴¹ Mais recentemente, Lipka e col. avaliaram 147 pacientes com LMMJ e identificaram 3 diferentes perfis distintos de metilação de DNA (alto, intermediário e baixo perfil de metilação). O alto perfil de metilação foi um fator independente de piora na sobrevida global, e de maiores índices de recaída após transplante de medula óssea.⁴²

Com o TMO sendo única terapia curativa para maioria dos pacientes, outras opções medicamentosas como baixas doses de mercaptopurina e citarabina têm sido empregadas principalmente naqueles pacientes que se apresentam com altas leucometrias, como uma terapia de citoredução. Terapias baseadas em regimes para leucemia mieloide aguda são bastante controversos e estão associados com uma alta taxa de recaída e morbimortalidade,

sem aparente benefício neste grupo de pacientes.^{39,43,44} Nos últimos anos, com o desenvolvimento de estudos epigenéticos na LMMJ e síndrome mielodisplásica (SMD), e a evidência de hipermetilação dos genes envolvidos, o uso de medicações hipometilantes como a 5-azacitidina se tornou uma terapêutica viável para esses pacientes.^{18,42,45-47} Em 2009 foi relatado o primeiro paciente tratado com o uso de 5-azacitidina; paciente apresentava mutação do RAS e monossomia do 7 em cariótipo, com resposta clínica e molecular após tratamento.⁴⁸ Recentemente o EWOG (*European Working Group - MDS*) iniciou um estudo clínico fase II multicêntrico baseado em resultados obtidos com uso da 5-azacitidina em 9 pacientes com LMMJ antes do transplante; desses 9 pacientes, resposta clínica completa foi obtida em 3 pacientes e resposta molecular, com desaparecimento da mutação, em 2 desses pacientes. Demonstrado o benefício do uso da medicação na redução de carga tumoral de doença, vem sendo utilizada como ponte para o transplante, com menor toxicidade e morbidade relacionadas a terapia.⁴⁹⁻⁵¹ Além disso, o impacto do *status* de hipermetilação na sobrevida global e recaída pós TMO favorecem o uso do agente hipometilante pré e até pós transplante, como ponte para um segundo TMO ou redução do risco de recaída. Outras terapias alvo têm sido estudadas para LMMJ, envolvendo a via *RAS/MAPK* e inibidores de *JAK2*, com poucos resultados disponíveis.^{5,43,52}

Diante do uso de tratamentos clínicos em pacientes com LMMJ como alternativa pré transplante, diferentes grupos propuseram formas de avaliar resposta clínica. Bergstraesser e col. e Chane col. utilizaram como variáveis a leucometria e tamanho do baço como adequadas para acessar a resposta destes pacientes.⁵³ Porém, com a aplicabilidade restrita a pacientes com leucometria $>20 \times 10^9/L$ e pacientes com esplenomegalia ao diagnóstico, urgiu a proposição de parâmetros de resposta que contemplassem a maioria das crianças com LMMJ, além de permitir avaliação de resposta pós transplante. Em 2015, o mesmo grupo europeu *EWOG - MDS*, juntamente com o *COG* e o grupo japonês de LMMJ se reuniram e propuseram novos e mais abrangentes critérios para avaliação de resposta clínica dos pacientes com LMMJ. Baseado na heterogeneidade das características observadas neste grupo ao diagnóstico, definiram 6 características clínicas e 2 genéticas para seguimento: leucometria, plaquetometria, tamanho do baço, porcentagem de precursores mielóides/eritróides/blastos em SP, porcentagem de blastos em MO, evidência de doença extramedular. A resposta genética é determinada pelos achados citogenéticos e de biologia molecular. De acordo com

os resultados os pacientes pré-transplante são considerados com resposta clínica completa, parcial, doença estável ou progressão/recaída de doença, conforme tabela 2.⁵⁴

Tabela 2 - Variáveis na avaliação de resposta de pacientes com LMMJ

Variáveis	Valores ao diagnóstico	Resposta completa	Resposta parcial	Progressão
Leucócitos	>20x10 ⁹ /L	3.0 a 15.0x10 ⁹ /L	Redução ≥50% do início mas > que 15x10 ⁹ /L	Aumento ≥50% e ≥20x10 ⁹ /L
Precursos mieloides e eritróides e blastos em SP	≥5%	0-1%	Redução ≥50% do início mas > 2%	Aumento do basal: <5% - ≥50%↑e ≥5% ≥5% - ≥50% de aumento do total de % de precursos mieloides e eritróides
Plaquetas	<100x10 ⁹ /L	≥100x10 ⁹ /L	Pacientes com plaquetometria inicial ≥20x10 ⁹ /L, aumento de ≥30x10 ⁹ /L Pacientes com plaquetometria <20x10 ⁹ /L, aumento >100% e 20x10 ⁹ /L	Dependência transfusional ou pacientes com contagem inicial ≥30x10 ⁹ /L e com redução de ≥50% e <100x10 ⁹ /L
Blastos MO	≥5%	<5%	Redução ≥50% do início, mas ainda ≥5%	Aumento do basal: <5%: ≥50% de aumento e ≥5% de blastos ≥5%: ≥50% de aumento dos blastos de MO
Tamanho do baço Clínico	≥2cm do rebordo costal E (RCE)	Ausência de esplenomegalia	Redução de 50% em cm do RCE	Aumento ≥100% se o inicial <4cm do RCE ≥50% se basal de 5-10cm >30% se basal >10cm
Doença extramedular	Infiltração extramedular	Sem evidência de infiltração leucêmica extramedular, em qualquer órgão	—	Piora das lesões ou aparecimento de novas lesões características de infiltração extramedular

* Adaptado de "Criteria for evaluating response and outcome in clinical trials for children with juvenile myelomonocytic leukemia." Niemeyer, 2015

1.2 O GCB-SMD-PED

Fundado em 1997 no Brasil o Grupo Cooperativo Brasileiro de Síndrome Mielodisplásica em Pediatria (GCB – SMD – PED) tinha como objetivo inicial estudar esta doença rara da faixa etária pediátrica. Formado por hematologistas, patologistas, pediatra-hematologistas e pediatra-oncologistas o grupo oferece suporte para diagnóstico e revisão de casos suspeitos. Se subdivide em comitês de morfologia/citometria de fluxo, falências medulares, SMD secundária, doenças mieloproliferativas, genética, tratamento, epidemiologia e Síndrome de Down. Com sede no Hospital de Amor Infanto-juvenil de Barretos desde 2013 o grupo já recebeu mais de 800 crianças com a suspeita diagnóstica desde o início de sua atuação e teve um aumento nos últimos anos atribuído a estratégia de divulgação da doença e seus critérios diagnósticos.⁵⁵

Nos últimos 10 anos, a imunofenotipagem por citometria de fluxo, ferramenta que constitui parte integrante no diagnóstico das neoplasias hematológicas em geral, foi também estudada e incorporada como técnica diagnóstica auxiliar nos pacientes encaminhados com a suspeita de SMD e LMMJ, visto a interface da doença com achados de mielodisplasia e mieloproliferação. Em 2016 nosso grupo mostrou que os pacientes com LMMJ possuem alterações imunofenotípicas semelhantes às encontradas nos pacientes com SMD como a redução de precursores linfóides B, o aumento de precursores mielóides, expressão aberrante de antígenos, além de achados característicos da doença como aumento da população de monócitos.⁵⁶ Porém faltam estudos mostrando caracterização imunofenotípica destes pacientes em maiores amostras e o comportamento das subpopulações monocíticas, como é descrito na LMMC.

Desde 2014 é oferecido tratamento com 5-azacitidina para os pacientes do GCB-SMD-PED como ponte até o transplante de medula óssea, baseado nos resultados do grupo europeu.⁵¹ Esses pacientes recebem ciclos de 7 dias da medicação na dose de 75mg/m² subcutânea a cada 28 dias, com realização de pelo menos 3 ciclos da medicação pré-transplante. Durante o tratamento os pacientes são reavaliados para obter análise de resposta clínica e genética. A imunofenotipagem por citometria de fluxo realizada ao diagnóstico é também utilizada como ferramenta de reavaliação após a terapêutica descrita.

2. JUSTIFICATIVA

Como a Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) é uma doença rara, são poucos os dados na literatura acerca das características imunofenotípicas da doença ao diagnóstico, e não há descrição se existe um imunofenótipo para cada perfil molecular, já que o gene mutado implica em características clínicas e prognósticas distintas. Também não é conhecido o impacto do tratamento clínico com hipometilante nos achados obtidos pela ICF na LMMJ, embora já descrito em outras doenças.

A imunofenotipagem foi incluída na avaliação diagnóstica dos pacientes inscritos no GCB – SMD – PED em 2008, e desde esta data os pacientes inscritos no grupo com suspeita de SMD e LMMJ tem a análise imunofenotípica incluída entre as ferramentas diagnósticas juntamente com a avaliação morfológica da medula óssea, citogenética, genética clínica e biologia molecular. Desde 2014 os pacientes tratados com hipometilante neste serviço são avaliados quanto à resposta clínica e laboratorial e a citometria de fluxo também é utilizada nos momentos de reavaliação da doença.

Dada a raridade da doença e escassez de literatura sobre achados imunofenotípicos neste grupo de pacientes, seria de grande valia análise destes dados obtidos ao diagnóstico e durante tratamento clínico com 5-azacitidina. Permitiria a caracterização do comportamento imunofenotípico da LMMJ ao diagnóstico e ao longo do tratamento, além de verificar se existe um perfil imunofenotípico para cada perfil molecular encontrado.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

1. Avaliar as mudanças no perfil imunofenotípico dos pacientes com LMMJ ao diagnóstico e após o tratamento clínico com 5-azacitidina.

3.2 - Objetivos específicos

1. Caracterizar imunofenotipicamente os pacientes com LMMJ ao diagnóstico e de acordo com o perfil molecular.

2. Avaliar as mudanças após uso de 5-azacitidina nas diferentes populações celulares como de células CD34⁺CD117⁺, CD34⁺CD19⁺CD10⁺, Linfócitos T, Linfócitos NK e monócitos.

3. Buscar associação entre as características imunofenotípicas dos pacientes com o tipo de resposta clínica, se completa, parcial ou progressão de doença e quanto à resposta genética e encontrar alterações que preveem resposta.

4. Examinar em qual momento a resposta à 5-azacitidina é maior, baseado nas mudanças fenotípicas.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 - Desenho da pesquisa

Este foi um estudo longitudinal, com coleta de dados retrospectiva.

4.2- Casuística

Para este estudo foram selecionados os pacientes com Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) cadastrados no GCB-SMD-PED entre 2013 e 2019, e com diagnóstico realizado segundo critérios bem definidos pela WHO. A data inicial de inclusão foi utilizada pelo ano de inclusão da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico inicial dos pacientes com suspeita de SMD e LMMJ e tratamento com 5-azacitidina.

De um total de 35 pacientes avaliados neste período, 1 foi excluído pois não realizou tratamento clínico com hipometilante, a 5-azacitidina, e outros 2 pacientes foram excluídos por recusa do responsável em assinar o termo de consentimento da pesquisa. Dos 32 pacientes com LMMJ incluídos ao final, todos preencheram os critérios de inclusão, ou seja, imunofenotipagem realizada dentro dos parâmetros sugeridos pelo comitê do GCB-SMD-PED e tratamento clínico com 5-azacitidina em um mínimo de 3 ciclos antes do transplante de medula óssea.

A pesquisa foi realizada no Hospital de Câncer Infanto-Juvenil de Barretos (Hospital de Amor de Barretos), com aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos sob Protocolo de Pesquisa Número do Parecer: 1119/2016 em 2016.

4.3 – Métodos

4.3.1 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

A coleta de dados clínicos e laboratoriais foi realizada para todos os pacientes através de revisão de prontuário e das fichas de coleta do acervo do GCB-SMD-PED (fichas 1 a 7) com sede atual no Hospital de Câncer Infanto-Juvenil de Barretos. Os dados clínicos como data de nascimento, gênero, estado de origem, data do diagnóstico, data de início dos ciclos de 5-azacitidina, foram coletados em ficha de coleta própria para o estudo, bem como data da última consulta e data do óbito.

4.3.1.1 Mielograma e Hemograma (Sangue Periférico)

A avaliação morfológica/histológica inicial para definição de displasias e contagem de blastos foi realizada por subcomitê especializado de morfologia e na dependência de ao menos dois observadores do GCB-SMD-PED; foram avaliadas lâminas de esfregaço de sangue periférico, medula óssea, e coágulo/biópsia de medula óssea, quando disponível, após coloração adequada, e complementação com imuno-histoquímica. A mesma avaliação morfológica de sangue periférico e medula óssea foi realizada após os ciclos de hipometilante.

4.3.1.2 Citogenética

A análise citogenética foi realizada através de cariótipo por bandeamento G convencional. A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) com sonda para monossomia do cromossomo 7 (-7) foi acrescentada como método complementar quando indicado, como por exemplo na ausência de crescimento de metáfases. Os resultados foram todos validados pelo comitê de citogenética do GCB-SMD-PED. Pacientes com achado de citogenética positiva como monossomia do 7 ou trissomia do 8 também tiveram nova análise genética após os ciclos de 5-azacitidina.

4.3.1.3 Análise Molecular – Perfil de mutações LMMJ

Todos os pacientes com suspeita diagnóstica de LMMJ foram submetidos à análise de painel mutacional incluindo os genes *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL* utilizando sequenciamento de Sanger. Inicialmente foi realizada extração de DNA em amostras de medula óssea coletadas em tubo de EDTA, seguido da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificação dos genes *PTPN11* (exons 3,4,8 e 13), *NRAS* (exons 2 e 3), *KRAS* (exons 2 e 3) e *CBL* (exons 8 e 9). A mutação do *NF1* foi considerada após preenchimento dos critérios clínicos para neurofibromatose tipo 1 e avaliação de geneticista clínico. Quando identificado mutação, essa pesquisa foi novamente realizada após ciclos de 5-azacitidina.

4.3.1.4 - Métodos de análise da imunofenotipagem

Em 2014, baseado em estudos em SMD de adultos com validação de marcadores com sensibilidade diagnóstica, foi padronizado um painel de 8 cores para avaliação de maturação mielomonocítica e células CD34⁺. Todos os pacientes encaminhados para o GCB-SMD-PED em

Barretos-SP com suspeita de SMD ou LMMJ passaram a ter coleta de amostra de medula óssea para análise da expressão antigênica de precursores hematopoiéticos utilizando esse painel de anticorpos.⁵⁶⁻⁵⁸

4.3.1.4.1 – Calibração do Citômetro de fluxo

Os ajustes de calibração do citômetro de fluxo FACSCanto foram realizados baseados no procedimento de padronização instrumental com auxílio das *beads* CS&T (*Cytometer Setup and Tracking* – BD Biosciences) e o monitoramento da calibração do equipamento foi realizado utilizando o software FACSDiva.

Antes de iniciar as análises, foi verificado diariamente o desempenho do citômetro com as *beads* de controle de qualidade CS&T, checando a performance do sistema e também manualmente a padronização instrumental através do monitoramento dos intervalos das medianas de fluorescências.

O intervalo de variação aceitável para os valores das medianas de fluorescência foi de +/- 15% para cada lote validado para o ensaio. Após a verificação da calibração o equipamento foi liberado para uso ou realizado nova padronização se necessário.

4.3.1.4.2 – Processamento das amostras para imunofenotipagem

De todos os pacientes encaminhados com suspeita de LMMJ foi coletado 2ml de medula óssea em tubo de EDTA. A imunofenotipagem foi realizada através do processamento de material coletado em uma concentração de $2-5 \times 10^6$ células usando uma técnica padronizada de “*lyse-wash-stain*” em até 24 horas da aspiração de medula óssea e de acordo com as recomendações do *European Leukemia Net* (ELN).⁵⁷ A expressão antigênica foi analisada utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, descritos na tabela 3. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton – Dickson – BD Biosciences) através do software FACSDiva® (BD – Biosciences) calibrado diariamente conforme descrição acima e analisados pelo software Infinicyt (Cytogonos®).

No mínimo 100.000 células nucleadas foram avaliadas, mas na maioria dos pacientes foram analisados 500.000 eventos por tubo. Os resultados disponíveis foram analisados pelo software Infinicyt 1.7 (Cytogonos®).

Tabela 3: Painel de anticorpos utilizados para o auxílio de diagnóstico das síndromes mielodisplásicas e LMMJ por citometria de fluxo.

Combinções de anticorpos usadas								
	FITC	PE	PERPCy5.5	PECy7	APC	APCH7	V450	V500
Tubo 1	CD7	CD56	CD34	CD117	CD10	CD19	CD38	CD45
Tubo 2	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD14	HLA-DR	CD45

4.3.1.4.3 – Identificação das Populações Celulares

As populações que compõem a medula óssea e de interesse foram identificadas utilizando um *dot plot* CD45/*sideward light scatter* (SSC) baseando-se na intensidade do marcador pan-leucocitário CD45 (figura 3). As células granulocíticas maduras foram definidas como CD45^{fraco} e SSC^{alto}; monócitos CD45^{intenso} e SSC^{int} em combinação com a expressão de CD14. Progenitores mieloides foram identificados como células CD45^{int} e SSC^{int} em combinação com a expressão de CD34, CD117 e/ou CD13 (mieloblastos). Células precursoras B (hematogônias tipo I) são CD45^{int}/SSC^{baixo} com um fenótipo CD34⁺/CD19⁺/CD10⁺.

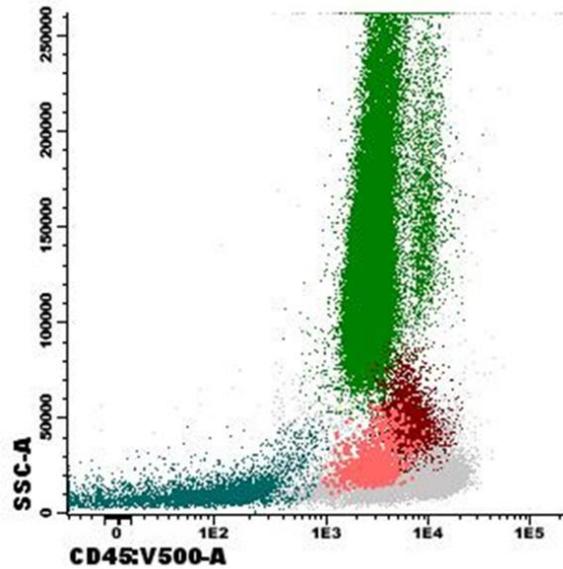


Figura 3 – Separação das populações pelo plot CD45/SSC. MO normal – paciente controle. Em **verde** população granulocítica madura; **Azul petróleo** população eritróide; **Rosa Salmão** precursores mieloides; **Vinho** monócitos; **Cinza** linfócitos

A avaliação de SSC e padrão de granulação foi realizada de acordo com os critérios de Ogata e cálculo da relação granulócitos/linfócitos. Um padrão de normalidade do SSC (complexidade interna) foi definido a partir da análise de uma população controle do laboratório, com medula óssea normal.^{56,59} (Figura 4)

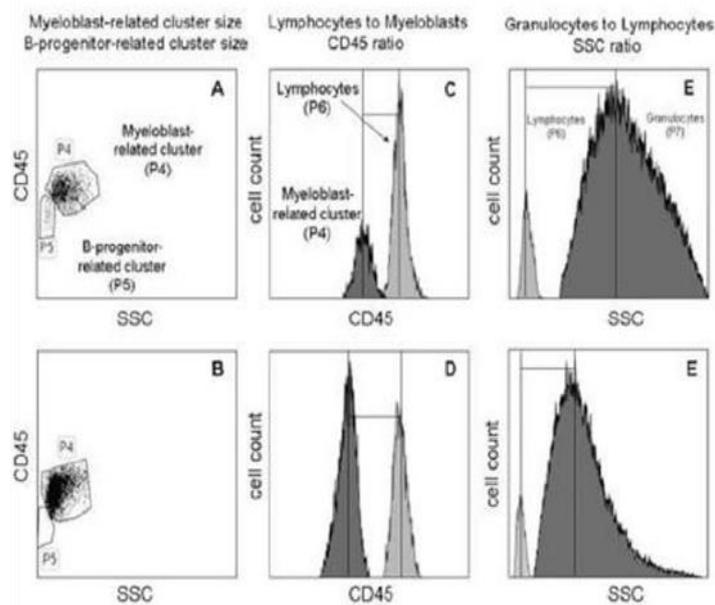


Figura 4 – Análise de SSC (adaptado de Ogata e col., 2012). Relação do pico de SSC granulócitos/linfócitos. Avaliação de SSC de granulócitos $CD10^- \div$ SSC de linfócitos maduros) >7.43 como normal.

As células $CD34^+$ foram separadas pelo dot plot SSC/CD34 e pelas coexpressões de CD19, CD10, CD13, CD117. Expressões anômalas de CD7 e CD56 também foram avaliadas.

Os precursores mieloides ($CD34^+/CD117^+/CD13^+$) então separados foram analisados também quanto à presença de expressão anormal de CD16, CD11b e expressão aberrante de CD7 e CD56 (considerado positivo quando em mais de 20% das células) ou redução da expressão de antígenos normais comparado a um padrão de normalidade. Além da quantificação, foi analisado se a porcentagem encontrada estava de acordo com esperado para idade ou com aumento de precursores circulantes segundo referência brasileira.⁶⁰(Figura 5). Os progenitores linfoides B ou hematogônias tipo 1 (H1) ($CD34^+/CD10^+/CD19^+$) foram também quantificados a partir do total de células nucleadas e comparados com um padrão de normalidade se estavam diminuídos ou ausentes.⁶⁰ (Figura 6)

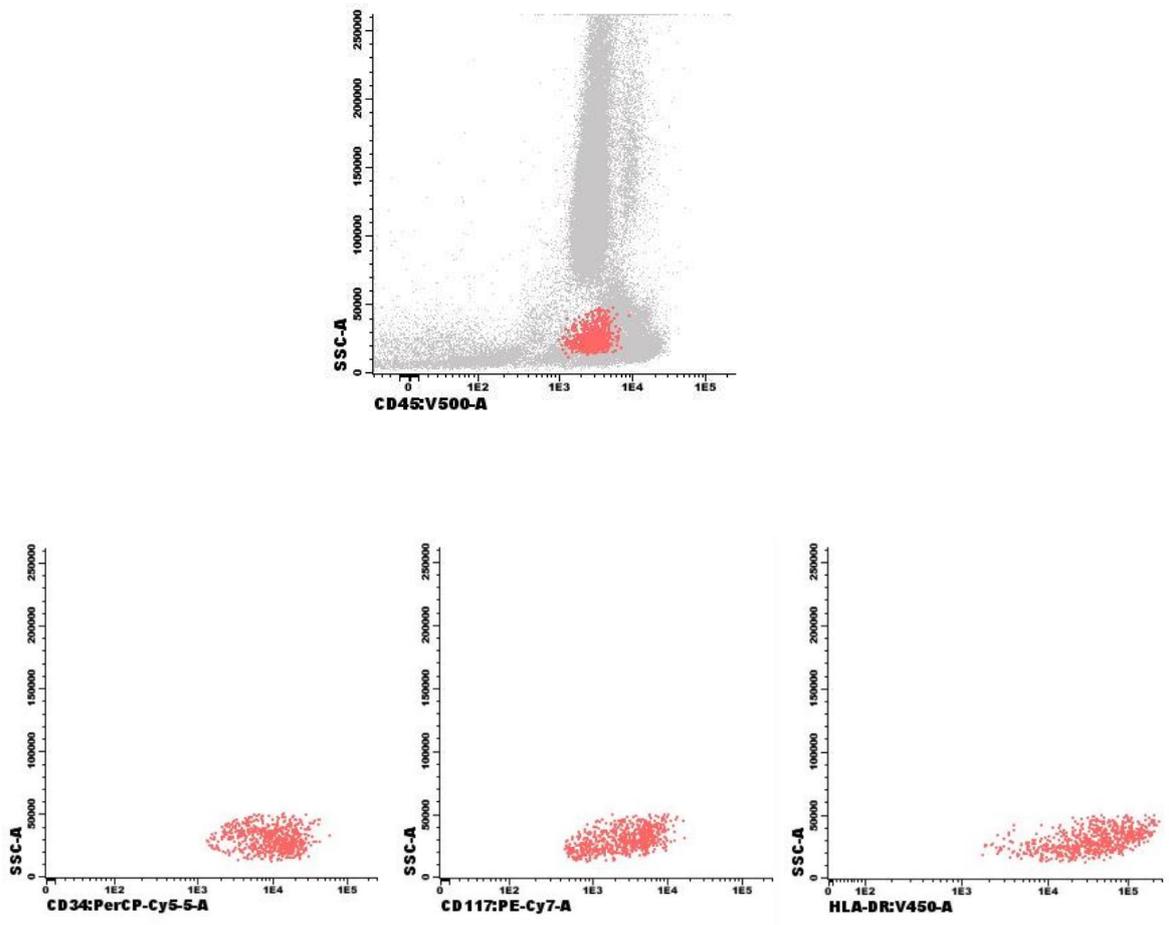


Figura 5 – Plots de análise de precursores mieloides em medula normal. Identificação de células CD34⁺ (salmão), com expressão de CD117 e HLA-DR normais

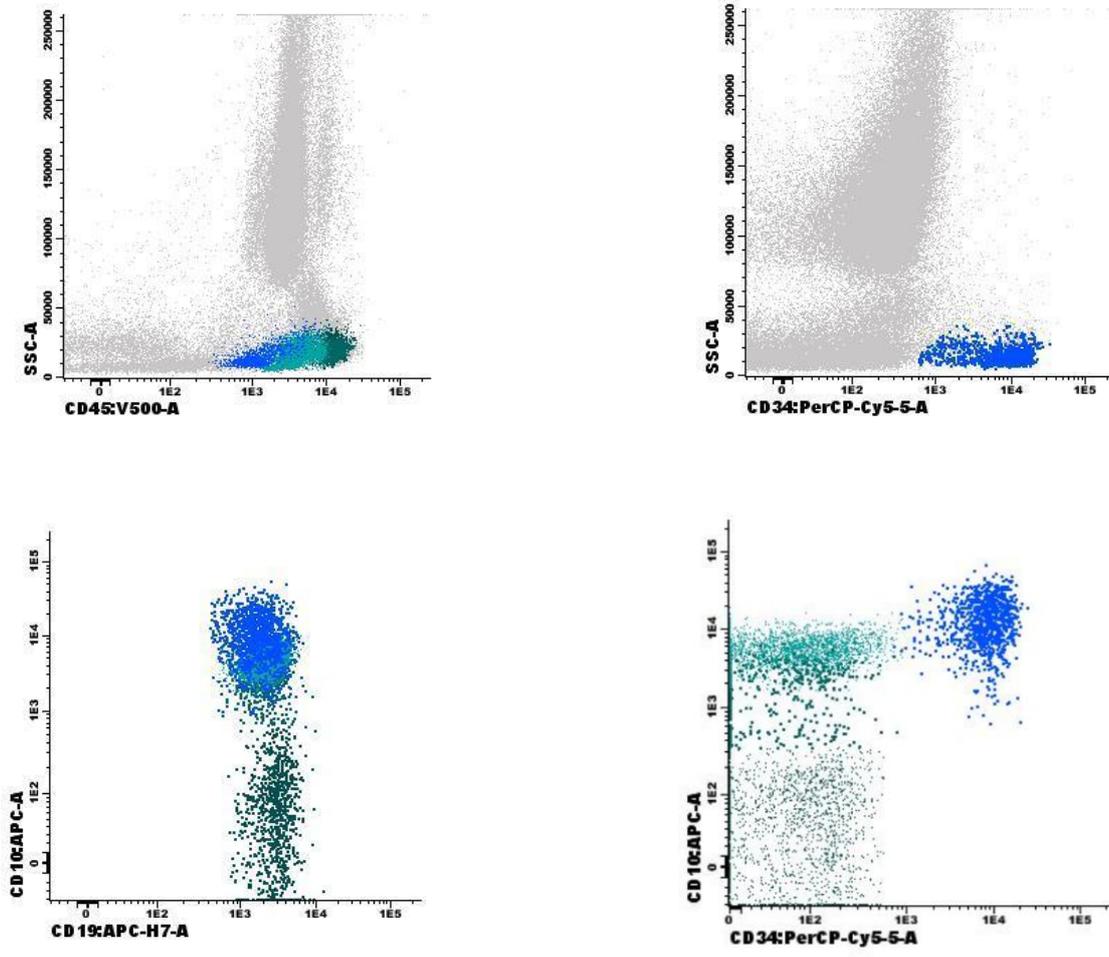


Figura 6 – Plots de análise de Hematogônias tipo 1, tipo 2 e linfócitos B maduros em MO normal. Em **azul** hematogônias tipo 1 (H1), em **verde claro** hematogônias tipo 2 (H2); **verde escuro** população de linfócitos B maduros.

O padrão de maturação granulocítica foi analisado utilizando a expressão de CD13, CD16, CD11b e também comparando com um padrão de normalidade. (Figura 7).

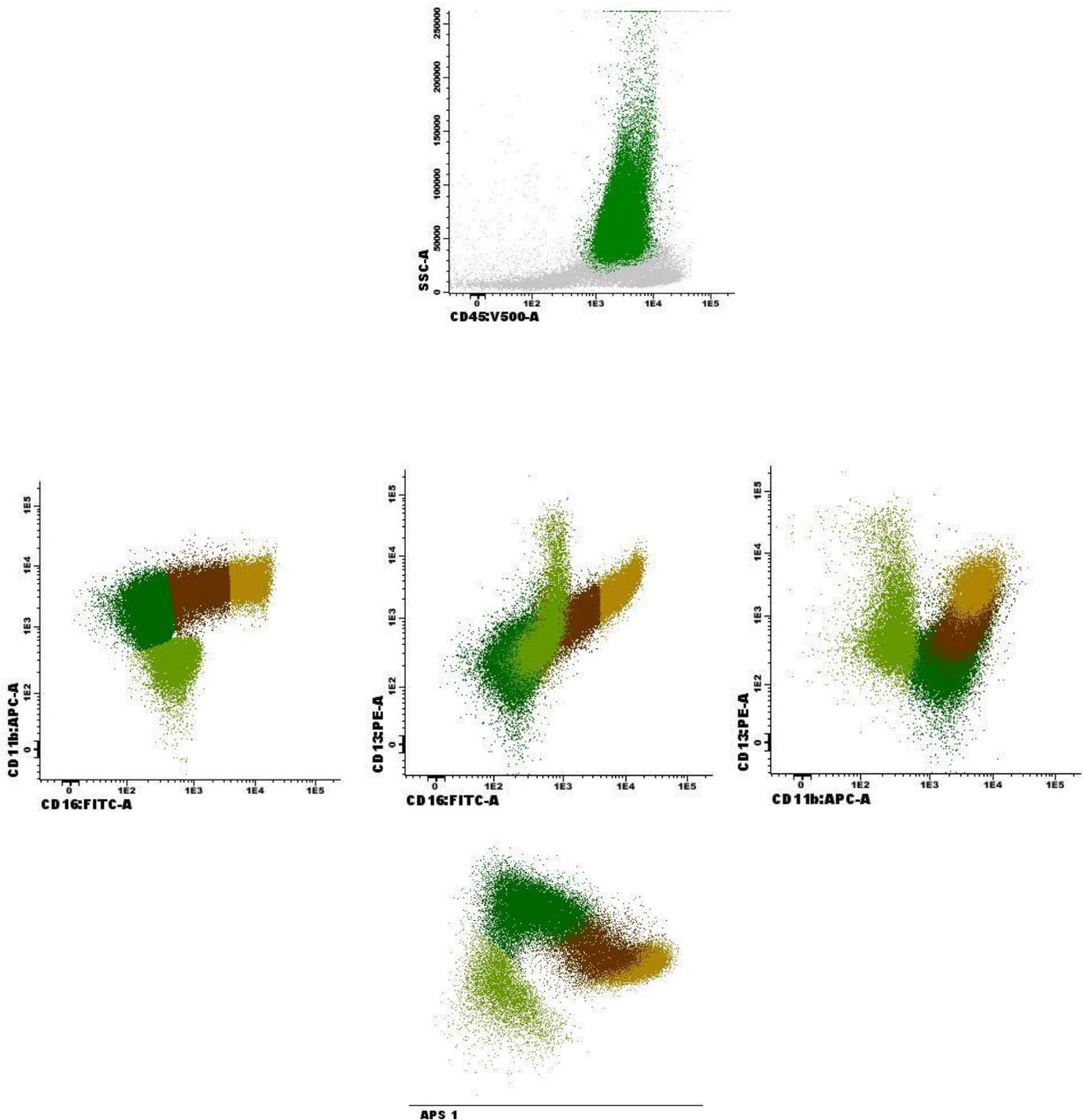


Figura 7 – Plots de análise de padrão de maturação granulocítico em MO normal - controle. Granulócitos em diferentes fases de maturação; em tons de **verde** granulócitos mais jovens e em tons de **marrom** granulócitos maduros com CD11b⁺/CD13⁺/CD16⁺.

A população monocítica, separada inicialmente no gráfico CD45/SSC foi avaliada na combinação de duas análises: da expressão de HLA-DR/CD14 após excluídas as células CD34⁺ (Figura 8), foram separados nas subpopulações de CD14⁺/CD16⁻ (monócitos clássicos), CD14⁺/CD16⁺ (monócitos intermediários) e CD14⁻/CD16⁺ (monócitos não clássicos) e analisados quanto às proporções encontradas em relação ao total de monócitos maduros e também quanto ao total de células nucleadas.^{35,36} A população restante CD14⁻/CD16⁻ foi considerada como precursores monocíticos. Além disso, a expressão aberrante de CD7 e CD56 em monócitos foi também examinada.

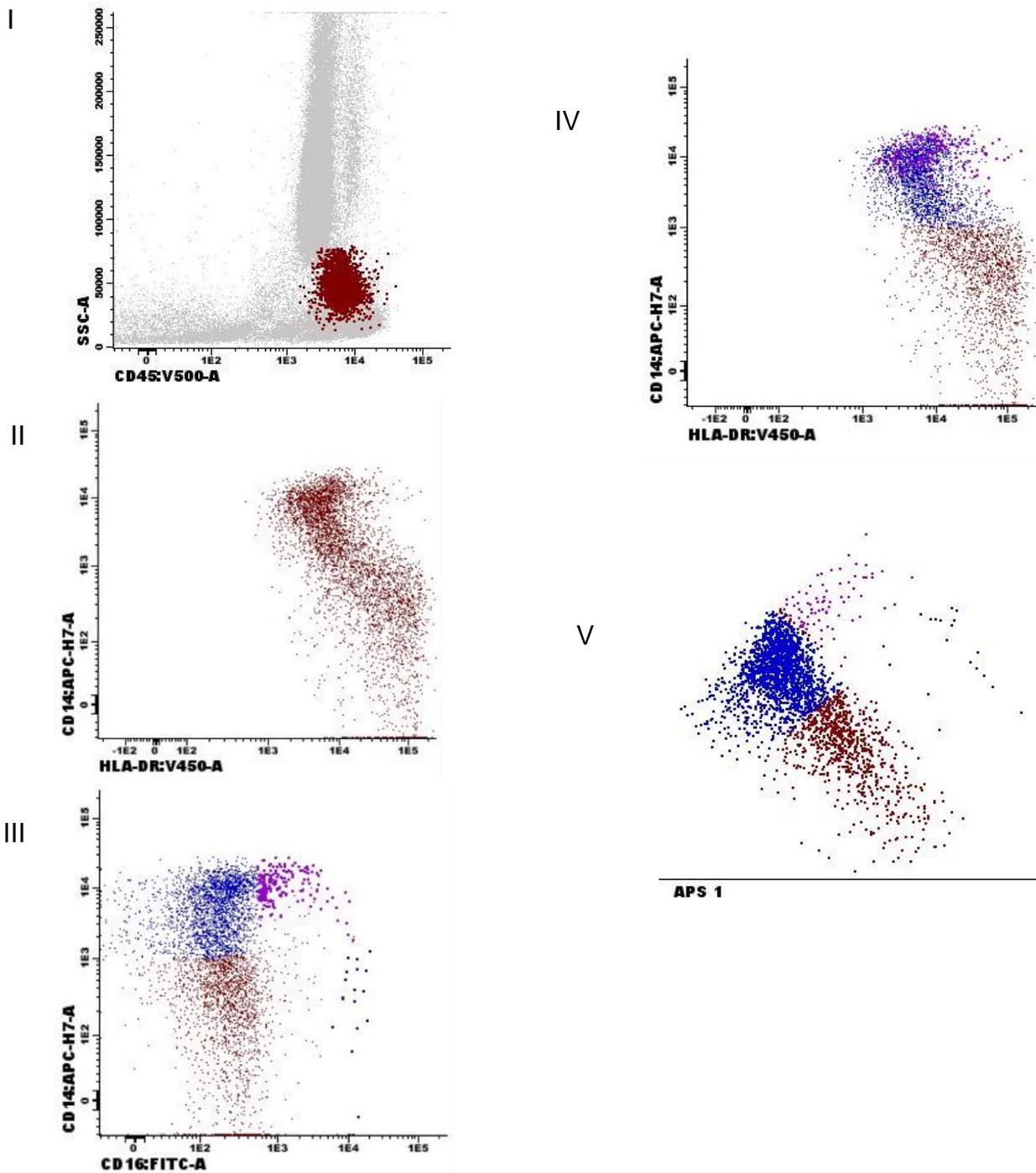


Figura 8 – Plots de análise da população monocítica. Expressão de HLA-DR em monócitos e separação das subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos) em MO normal – controle. No gráfico I monócitos em **vinho** separados pelo plot CD45/SSC, com expressão normal de HLA-DR (gráfico II). No gráfico III em **azul** monócitos clássicos; em **lilás** monócitos intermediários; **roxo escuro** monócitos não-clássicos; em **vinho** considerados precursores monocíticos. Nos gráficos IV e V representando posição das diferentes subpopulações de monócitos

A porcentagem de linfócitos T do total de células nucleadas foi estimada quantificando as células $CD7^+CD56^-$ isoladas da população linfoide ($CD45^{alto}SSC^{baixo}$), e os linfócitos NK (*Natural Killers*) a partir das células $CD7^-CD56^+$ identificadas na mesma estratégia de separação da população linfoide (Figura 9). Os linfócitos B maduros que são $CD45^{alto}$ ($CD34^-/CD19^+/CD10$) foram também quantificados.

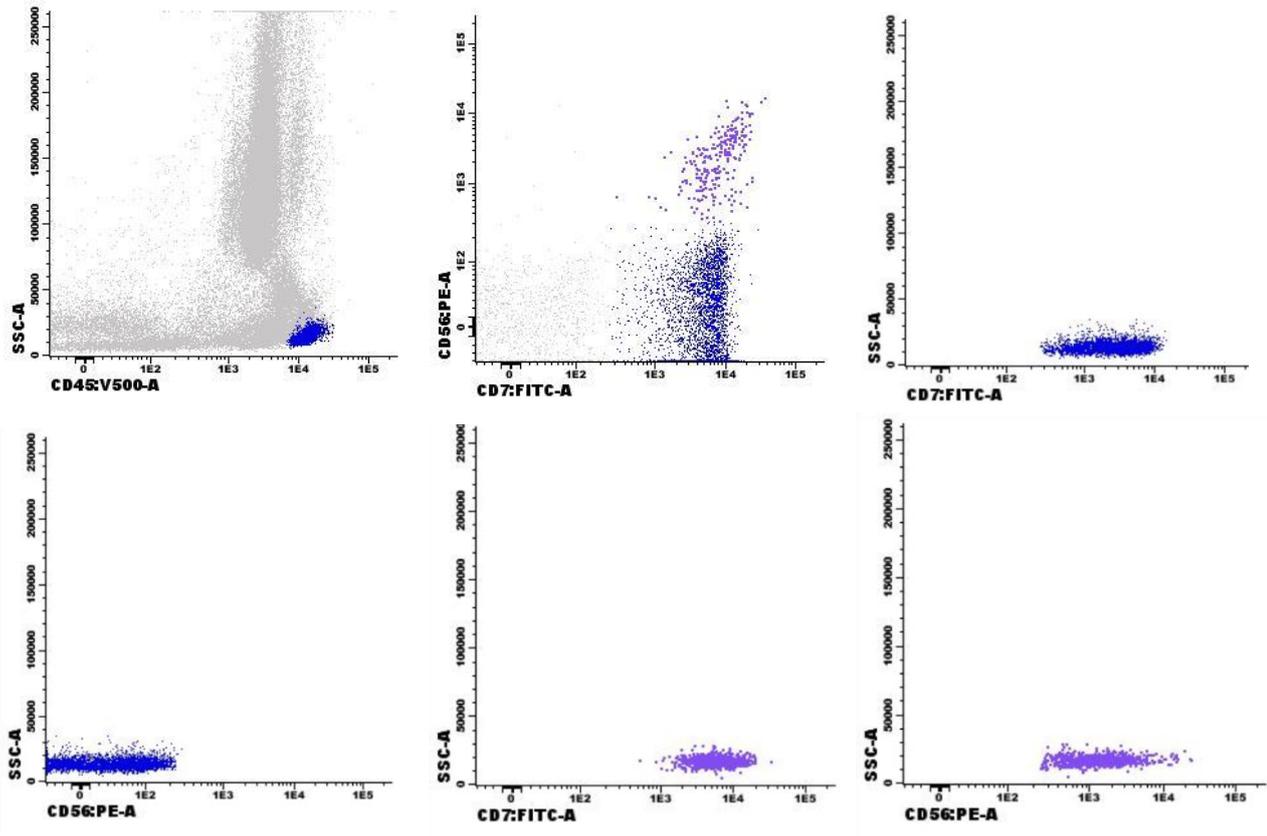


Figura 9 – Plots de análise e separação das subpopulações de linfócitos T e NK. Separação de linfócitos T em azul e Separação de linfócitos NK em lilás.

Para análise de porcentagem das subpopulações celulares foram consideradas todas as células nucleadas, incluindo eritroblastos.

Foi considerado como marcação aberrante quando expressão do antígeno em pelo menos 20% das células.

Todos os dados obtidos de quantificação celular foram comparados com uma população controle, com medula óssea normal, para definição se normal ou alterado ao diagnóstico.

A mesma análise imunofenotípica descrita foi realizada nas reavaliações após 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina.

4.3.1.4.4 Padronização dos valores de referência

Foram obtidas amostras de medula óssea de 10 pacientes com medula óssea normal pela análise morfológica, entre eles pacientes com anemia carencial, e determinado normalidade para comparação com pacientes com LMMJ.⁵⁶ Para quantificação de células CD34⁺ e H1 foi utilizada referência brasileira publicada recentemente, com parâmetros de acordo com a faixa etária.⁶⁰

4.4 Análise estatística dos dados

Foi realizada uma análise descritiva dos dados clínicos e laboratoriais com apresentação de frequências e porcentagens. A amostra foi caracterizada a partir da mediana, percentis 10 e 90 para as variáveis quantitativas, e pelas frequências relativa e absoluta, para variáveis qualitativas. A normalidade dos dados foi verificada a partir do teste de Shapiro-Wilks.

Depois foram analisadas a evolução dos dados laboratoriais e de citometria a partir dos Modelos Lineares Mistos, com correção de Bonferroni para comparação das médias dos momentos avaliados. A comparação das variáveis como tipo de resposta, perfil molecular, cariótipo, marcação aberrante de CD7 em precursores mieloides foram verificadas a partir do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher.

Foi examinada a relação da variação dos dados obtidos pela citometria ao diagnóstico, aos 3 e 6 meses com o tipo de resposta obtida pelos pacientes nestes momentos. Para diferenciar os pacientes com resposta daqueles com progressão de doença, as mutações genéticas e outras variáveis laboratoriais obtidas foram comparadas utilizando os testes de

Fisher (categóricas) e teste T para variáveis numéricas, após transformação logarítmica quando a distribuição não era normal.

Por fim, fizemos uma regressão logística múltipla para encontrar um modelo de variáveis capazes de prever a progressão da doença após 3 ciclos de 5-azacitidina.

As análises foram realizadas a partir do software estatístico SPSS v.21(IBM®), com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da casuística

Desde a introdução da imunofenotipagem por citometria de fluxo como ferramenta de diagnóstico e de seguimento para os pacientes com suspeita de síndrome mielodisplásica ou leucemia mielomonocítica juvenil do GCB-SMD-PED, foram avaliados ao diagnóstico 35 pacientes com LMMJ. Do total de 35 pacientes, 1 paciente não foi submetido ao tratamento com medicação hipometilante e foi excluído desta casuística. Outros 2 pacientes tiveram recusa do responsável em participar da pesquisa, e foram também excluídos, com um número final de 32 pacientes. Figura 10.

Dos 32 pacientes analisados ao diagnóstico, todos realizaram ao menos 3 ciclos de 5-azacitidina antes do transplante de medula óssea, com reavaliação dos dados clínicos e laboratoriais. No entanto, apenas 28 pacientes tiveram análise imunofenotípica medular neste momento do tratamento. Após 6 ciclos de 5-azacitidina, dos 32 pacientes com LMMJ, somente 25 pacientes tiveram dados de citometria disponíveis para análise pois: 5 pacientes foram submetidos ao transplante de medula óssea antes de 6 ciclos, 1 paciente não realizou imunofenotipagem neste momento de reavaliação de doença, e 1 paciente teve amostra hemodiluída e imprópria para análise de resposta.

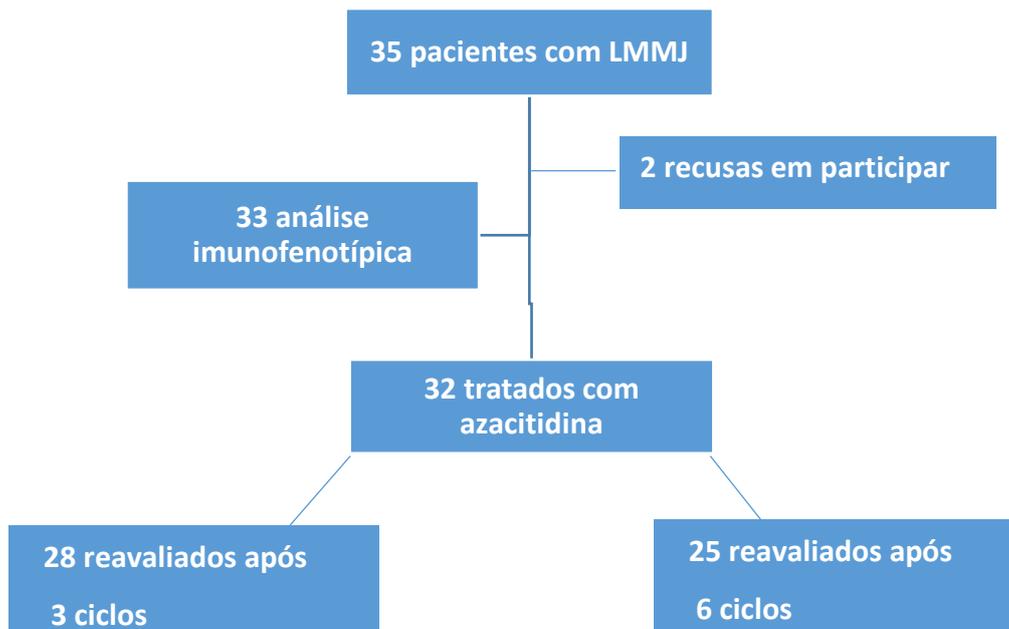


Figura 10 – Fluxograma da casuística dos pacientes com LMMJ analisados.

5.2 Dados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico e após 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina

A mediana de idade dos 32 pacientes com LMMJ ao diagnóstico foi de 29 meses, variando de 4 a 72 meses de idade. O predomínio foi do sexo masculino, com 58,1% de pacientes de sexo masculino e 41,9% do sexo feminino.

Os dados do hemograma ao diagnóstico e nos dois momentos de reavaliação estão resumidos na tabela 5. Ao diagnóstico, e conforme descrito na caracterização da doença, todos os pacientes se apresentaram com monócitos em SP > 1.000/mm³, com mediana de 6x10⁹/L, reduzindo para 0,98x10⁹/L e 0,8x10⁹/L após 3 e 6 ciclos de hipometilante respectivamente. A mediana de leucócitos foi de 33x10⁹/L, e somente 1 paciente se apresentou com leucometria superior a 100x10⁹/L. Após tratamento clínico a mediana de leucometria chegou a 6,35x10⁹/L e apenas 6 pacientes dos 25 analisados após 6 ciclos de azacitidina mantinham leucocitose, com máximo de 34,1x10⁹/L. A mediana de plaquetas foi de 68x10⁹/L e 8 pacientes se apresentaram com plaquetometria ao diagnóstico inferior a 20x10⁹/L. O incremento plaquetário foi evidente após tratamento com hipometilante, com mediana de 196,5x10⁹/L após 3 ciclos e 2 pacientes mantiveram plaquetometria abaixo de 20.000/mm³. Anemia foi observada em quase todos os pacientes, e apenas em 5 a hemoglobina estava acima de 11,0g/dL. Houve pouca alteração após uso de 5-azacitidina (Tabela 4).

A hemoglobina fetal apresentou mediana inicial de 9,55%, acima do esperado para a idade conforme esperado na LMMJ. Também não houve alteração significativa destes níveis ao longo do tratamento. A mediana de blastos no mielograma foi de 5,2% ao diagnóstico, com máximo de 15%; 14/32 pacientes tinham contagem de blastos em MO dentro da normalidade enquanto 22/28 após 3 ciclos e 20/25 após 6 ciclos. Um paciente evoluiu com >20% de blastos em medula óssea após 6 ciclos e foi classificado com progressão de doença (24,4%).

O tamanho do baço avaliado ao diagnóstico apresentou-se com mediana de 5,5cm e redução ao longo do tratamento (tabela 4). Porém 17/28 pacientes mantiveram baço palpável após 3 ciclos e 17/25 após 6 ciclos, sendo que quatro pacientes foram submetidos a esplenectomia ao longo do tratamento clínico.

Tabela 4 – Dados clínicos e de hemograma dos pacientes com LMMJ ao diagnóstico e após 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina (mediana, percentil 10 e 90).

	Diagnóstico N= 32	3 ciclos N=28	6 ciclos N=25	p
Hb(mg/dL)	10.0 (7.7-12.1)	11.1 (9.0-13.0)	11.2 (9.5-12.8)	NS
Leucócitos x 10⁹/L	33.3 (10.7-78.7)	7.6 (5.1-31)	6.35 (3.0-15.6)	<0.001
Neutrófilos x 10⁹/L	11.6 (1.8-35.7)	1.33 (0.5-21.2)	1.8 (0.3-6.5)	<0.001
Monócitos x 10⁹/L	6.0 (1.8-14.6)	0.98 (0.35-4.6)	0.8 (0.14-3.6)	<0.001
Linfócitos x 10⁹/L	8.8 (3.6-20.5)	4.5 (2.4-6.6)	3.6 (1.5-6.4)	<0.001
Plaquetas x 10⁹/L	68 (9-427)	196 (26-477)	183 (17-426)	0.016
Blastos SP %	1 (0-6)	0 (0-2)	0 (0-3.3)	0.001
Blastos MO %	5.2 (2.5-12)	2.9 (0.8-8.9)	2.8 (1.1-8.1)	0.033
HbFetal %	9.5 (0-64.5)	7.9 (1.5-45.9)	5.7 (1.6-53.1)	NS
Baço cm	5.5 (0-10)	2.0 (0-6)	2.0 (0-5)	<0.01

5.3 Perfil molecular e citogenética dos pacientes com LMMJ ao diagnóstico

Os 32 pacientes tiveram análise do perfil molecular e citogenética ao diagnóstico. Apenas cerca de 19% (6) apresentaram alguma alteração citogenética sendo 4 pacientes com monossomia do cromossomo 7 e 2 com trissomia do cromossomo 8. Dos 4 pacientes com monossomia do cromossomo 7, 2 eram do sexo feminino e 2 do sexo masculino, com idade que variou de 4 a 42 meses; os dados de hemograma destes pacientes estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5 – Dados clínicos e de hemograma dos pacientes com LMMJ e cariótipo com monossomia do cromossomo 7 (média, min e máx).

	Monossomia do 7 N= 4
Idade meses	4-42
Hb(mg/dL)	10.4 (9.6-11.4)
Leucócitos x 10⁹/L	25 (8.5-39.3)
Plaquetas x 10⁹/L	153 (39-440)
Blastos MO %	5.5 (4.8-7.6)
HbFetal %	5.6 (0-13.1)
Baço cm	1.7 (0-3)

O painel de mutações envolvendo via do RAS, identificou alteração em 20 dos pacientes. 10 (31%) com mutação somática de *PTPN11*, 4 com mutação somática de *KRAS*, 4 com mutação somática de *NRAS*, 1 com mutação germinativa de *CBL* e 1 paciente com mutação de *PTPN11* e *NRAS*. Dos 12 pacientes com pesquisa negativa, 6 tiveram diagnóstico clínico de neurofibromatose tipo 1 pelo geneticista. Quando os dados obtidos da análise citogenética foram cruzados com o perfil molecular observamos que dos 4 pacientes com monossomia do cromossomo 7, 2 tinham mutação de *KRAS*, 1 diagnóstico clínico de neurofibromatose tipo 1 e 1 com mutação de *PTPN11*. Os dados estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição das mutações moleculares dos pacientes com LMMJ

	Número de pacientes/%
PTPN11	10 / 31,2%
NRAS	4 / 12,5%
KRAS	4 / 12,5%
CBL	1 / 3,1%
PTPN11 + NRAS	1 / 3,1%
NF1*	6 / 18,8%
Negativo	6 / 18,8%
Total	32 / 100%

*Diagnóstico clínico pelo geneticista.

5.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

5.4.1 Imunofenotipagem por citometria de Fluxo ao diagnóstico

Todos os 32 pacientes tiveram amostra medular analisada por citometria de fluxo ao diagnóstico. Os dados obtidos pela imunofenotipagem foram divididos em quantitativos e qualitativos (alterações imunofenotípicas).

As quantificações das populações celulares ao diagnóstico dos pacientes com LMMJ e grupo controle estão descritas na tabela 7.

A mediana de células CD34⁺ foi de 5,2%, com 3,4% de CD34⁺/CD117⁺ e 0,75% de CD34⁺/CD19⁺/CD10⁺, estatisticamente diferente das porcentagens encontradas nos pacientes do grupo controle nos precursores mieloides (*p* 0,04). 75% dos pacientes tinham mediana de precursores mieloides acima do considerado como referência de normalidade. Além da quantificação, foi observada expressão aberrante de antígenos em precursores mieloides.

Expressão anômala de CD7 foi vista em 16 pacientes com LMMJ. Nenhum paciente apresentou expressão de CD56 nesta subpopulação celular.

Os monócitos foram quantificados na totalidade e subpopulações. Os pacientes com LMMJ apresentaram uma mediana de 11,91% monócitos ao diagnóstico, e 24 pacientes tinham mais de 3,15% de monócitos (percentil 10 do grupo controle). 6,4% eram monócitos CD14⁺/CD16⁻ (clássicos), representando a maior porcentagem em relação ao total de monócitos maduros, mas inferior à observada no grupo controle, 82,5% LMMJ x 92,7% controle (p 0,008). As demais subpopulações monocíticas estão descritas na tabela 6. Os monócitos foram analisados ainda quanto expressão antigênica e 22 pacientes exibiram redução na expressão de HLA-DR, e nenhum paciente teve expressão aberrante de CD7 ou CD56.

Os granulócitos avaliados quanto ao padrão de maturação (CD13/CD11b/CD16) mostraram-se alterados em 37,5% dos pacientes, com assincronismo de maturação em 18,7%. A redução de complexidade interna e SSC foi observada em 28 dos 32 pacientes ($< 7,43$), com uma mediana de 5,47, bem inferior à mediana encontrada no grupo controle de 7,83 com $p < 0,001$. Não foi observada marcação antigênica aberrante na população granulocítica.

Os linfócitos foram quantificados e as medianas, com percentis 10 e 90 estão descritas na tabela 6. Quando comparado ao grupo controle, a mediana de linfócitos T foi bem inferior nos pacientes com LMMJ, 2,85% LMMJ x 5,3% do grupo controle, com p de 0,037. As medianas de linfócitos B maduros e linfócitos NK tiveram quantificações estatisticamente semelhantes ao grupo controle.

As figuras 10 a 14 ilustram o comportamento das populações de precursores mielóides, linfócitos B, granulócitos e monócitos nos pacientes com LMMJ.

Tabela 7 – Populações celulares pela imunofenotipagem por citometria de fluxo dos pacientes com LMMJ e grupo controle (mediana, percentil 10 e 90).

	LMMJ	Grupo Controle	
	N=32	N=10	P
SSC	5.47 (4.5-7.8)	7.83 (7.43-8.51)	<0,001
CD34+/CD117+/CD13+ %	3.4 (0.6-13.5)	0.71 (0.5-1.2)	<0,001
CD34+/CD19+/CD10+ %	0.75 (0-6.6)	0.83 (0.1-3.0)	0,82
Linfócitos T %	2.85 (0.8-19.7)	5.3 (3.7-16.8)	0,037
Linfócitos NK %	1.01 (0.21-2.71)	0.78 (0.3-1.42)	0,77
Linfócitos B maduros %	2.17 (0.56-5.28)	2.6 (0.1-18.2)	NS
Monócitos			
%Monócitos Total	11.91 (2.35-29.9)	3.76 (3.15-5.16)	0,001
%Clássicos	6.4 (1.57-20.71)	2.63 (2.09-3.14)	0,006
%Intermediários	0.77 (0.03-11.48)	0.12 (0.06-0.14)	<0,001
%Não clássicos	0.12 (0.01-2.00)	0.02 (0.06-0.14)	0,002
%Precusores monocíticos	2.41 (0.36-16.9)	1.29 (0.34-2.12)	0,03
%Mono Classico/Monos	82.5 (42.9-98.6)	95.7 (93.6-96.3)	0,008
%Mono intermediário/Monos	17.2(0.22-48.3)	4.22 (2.7-4.5)	0,013
%Mono não classico/Monos	1.51(0.18-16.3)	0.92(0-2.0)	0,07

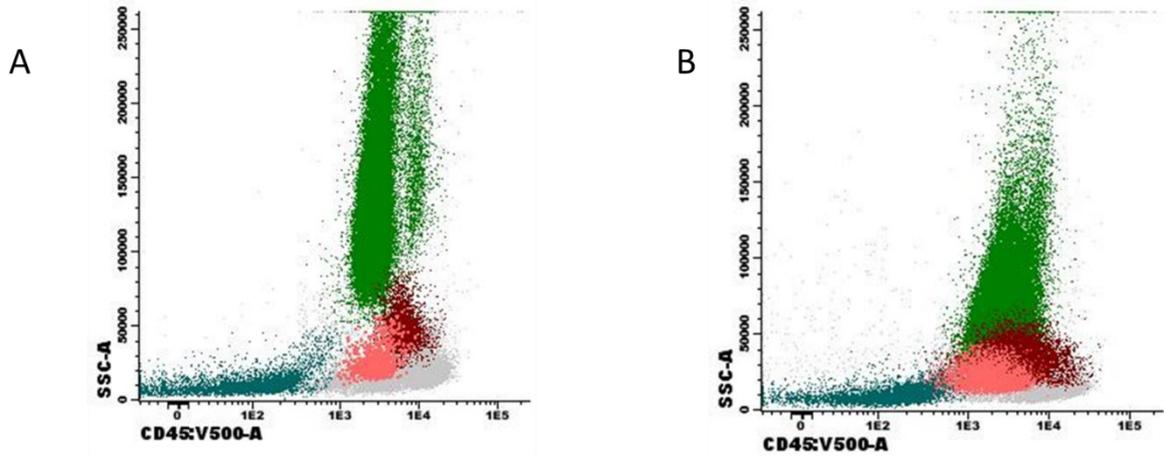


Figura 11 – Plots de separação das populações celulares pelo gráfico CD45/SSC Controle x LMMJ. **A**- Paciente com MO normal (controle) x **B** – paciente com LMMJ. Em **verde** os granulócitos com redução de complexidade interna (SSC); **rosa salmão** precursores mieloides, aumentado nos pacientes com LMMJ; em **vinho** população monocítica também aumentada no paciente com LMMJ; em **cinza** precursores linfoides e linfócitos maduros diminuídos no paciente com LMMJ; em **azul petróleo** população eritróide.

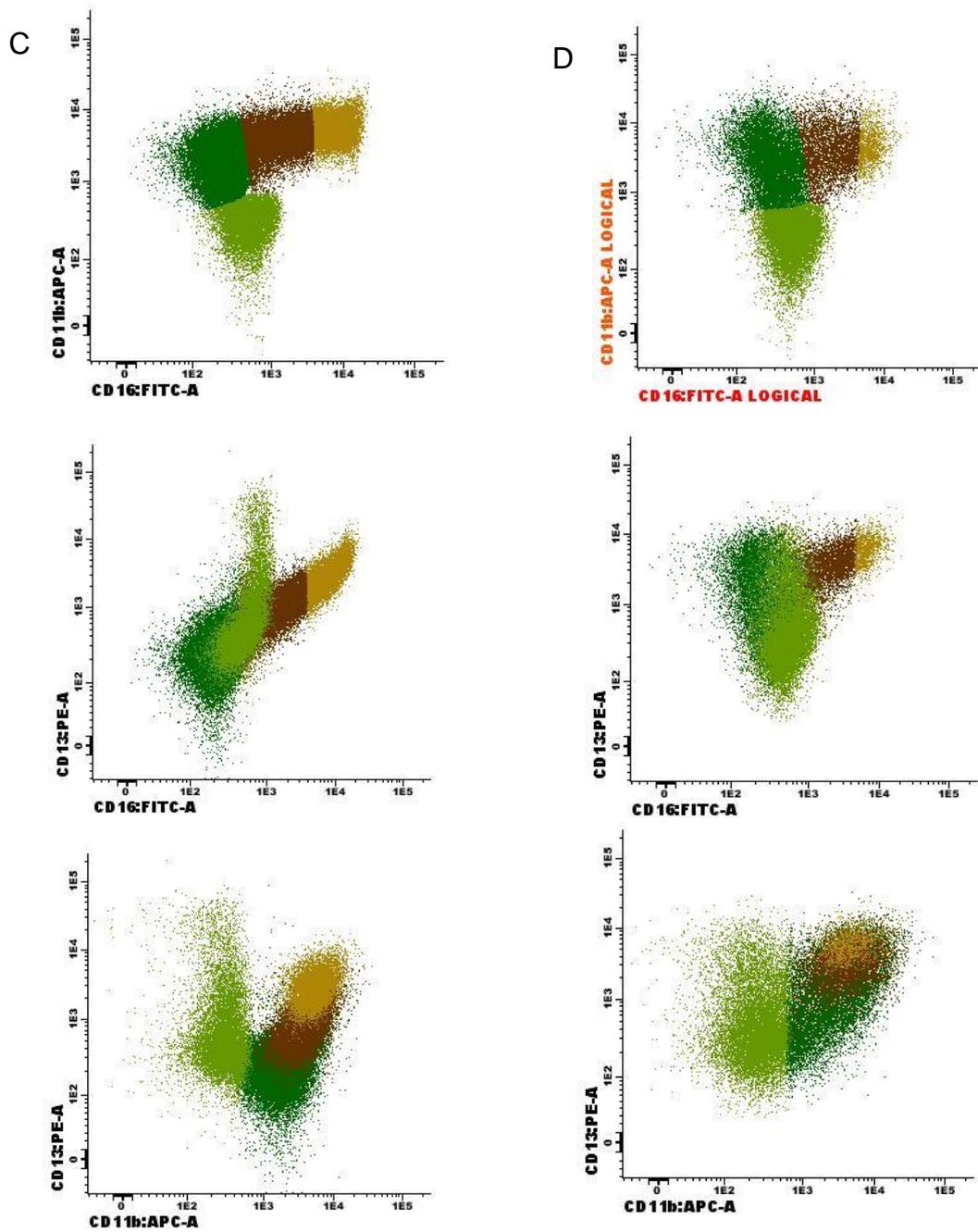
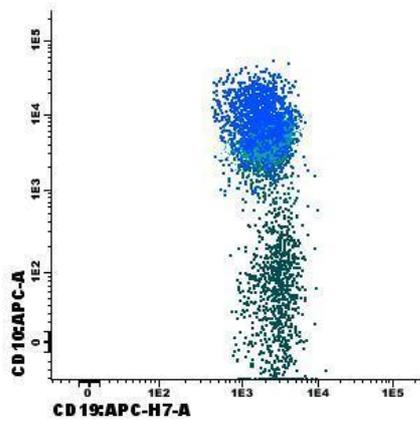
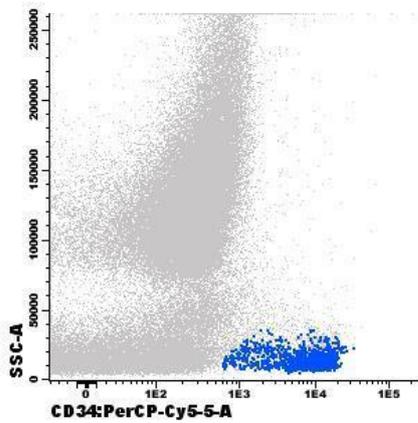
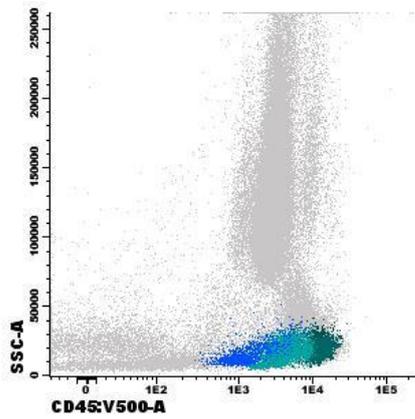


Figura 12- Plots de maturação granulocítica Controle x LMMJ. **C** - Paciente com MO normal (controle) x **D** – paciente com LMMJ. Observamos alteração no padrão de maturação granulocítico no paciente com LMMJ, com aumento de granulócitos jovens (**verdes claro e escuro**), redução de granulócitos maduros (**marrom claro e escuro**) e com expressão assincrônica de CD13/CD16/CD11b.

E



F

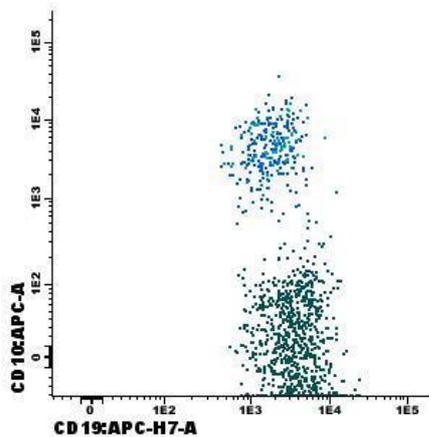
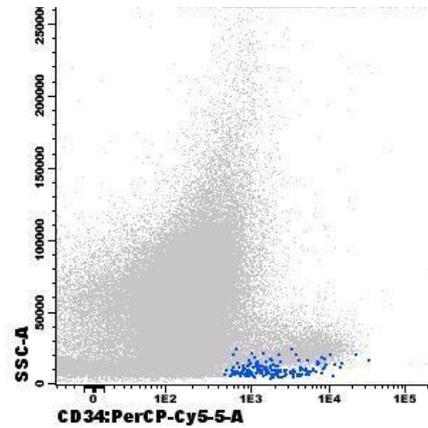
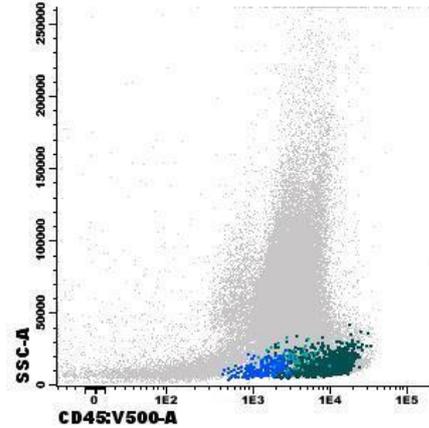


Figura 13 – Plots de precursores linfoides B e linfócitos B maduros Controle x LMMJ. **E** – medula óssea normal (controle) x **F** – paciente com LMMJ. Redução de precursores linfoides B, H1 CD34⁺/CD19⁺/CD10⁺ (**azul claro**) e H2 CD34⁻/CD10⁺/CD19⁺ (**verde claro**) nos pacientes com LMMJ. Em **verde escuro** linfócitos B maduros também diminuído.

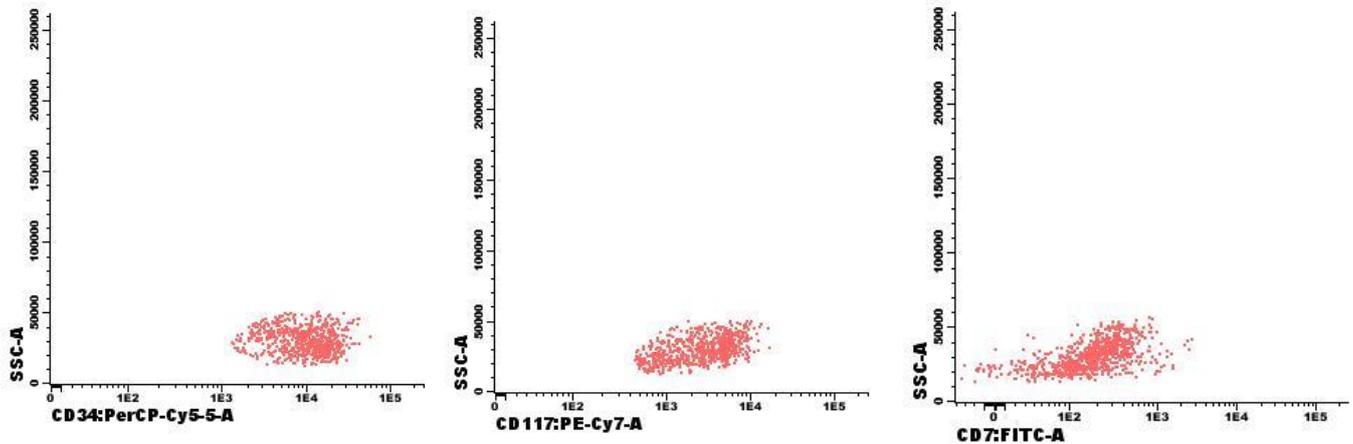
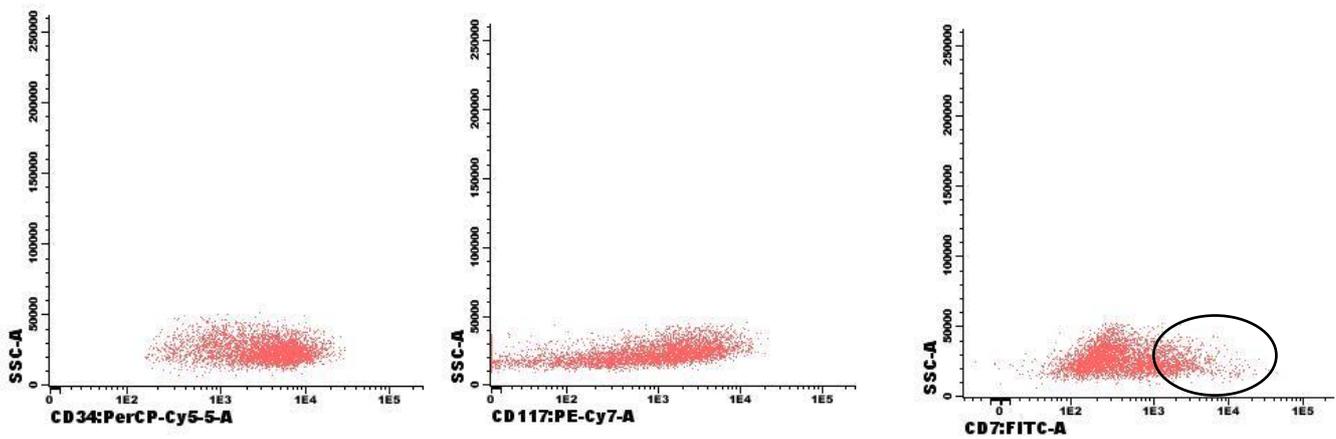
G**H**

Figura 14 – Plots de células CD34+ precursoras mieloides Controle x LMMJ. **G** – Paciente com MO normal – controle x **H** – Paciente com LMMJ. Precursoras mieloides representados em **salmão** com redução da expressão de CD117 no paciente com LMMJ, além de expressão aberrante de CD7 nesta população (28%).

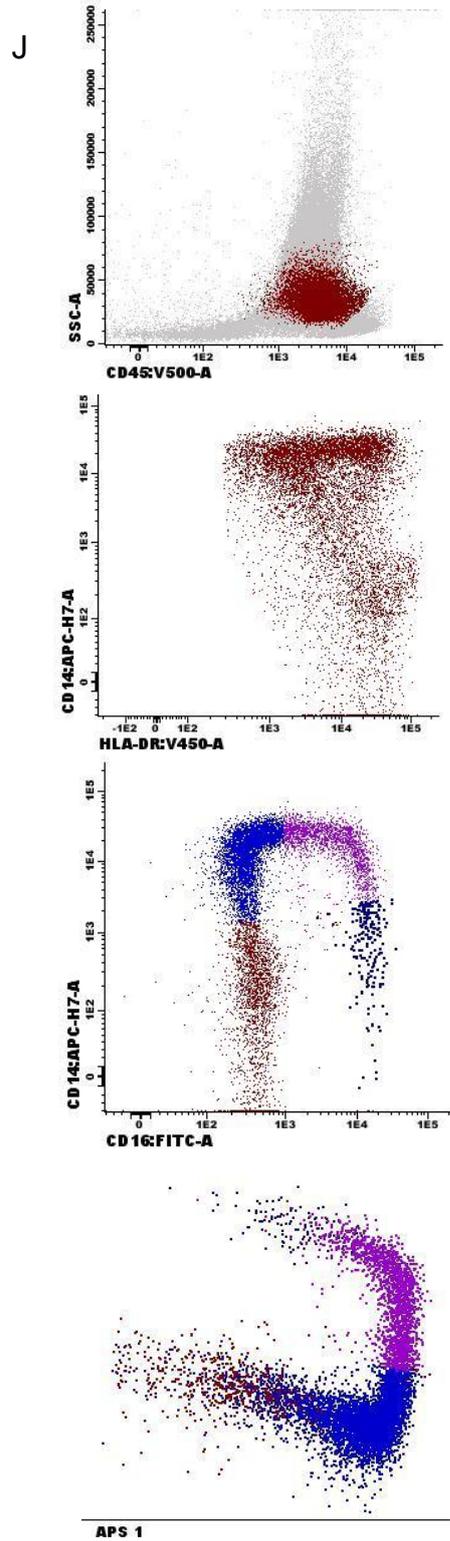
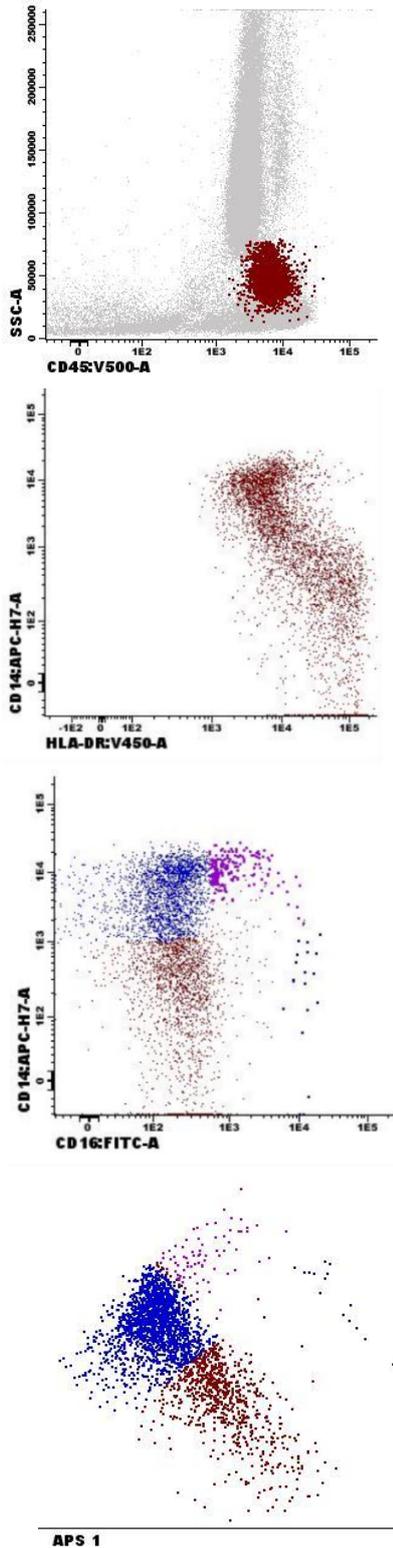


Figura 15 – Plots de Distribuição de monócitos Controle x LMMJ. **I**- Paciente com medula óssea normal (controle) x **J** – Paciente com LMMJ. Aumento da população monocítica em **vinho**, com redução da expressão de HLA-DR no paciente com LMMJ. Em **azul** monócitos clássicos ($CD14^+/CD16^-$), **lilás** os monócitos intermediários ($CD14^+/CD16^+$), **roxo escuro** os monócitos não clássicos ($CD14^-/CD16^+$) com distribuição distinta nos pacientes com LMMJ.

5.4.2 Perfil imunofenotípico ao diagnóstico x Perfil molecular

Para análise estatística dos subgrupos moleculares, o paciente com mutação germinativa de *CBL* foi excluído por ser somente um e o paciente com mutação combinada de *PTPN11* + *NRAS* foi agrupado com os pacientes com mutação de *PTPN11*. Os dados estão resumidos na Tabela 7.

Quando analisado a população de células CD34⁺ observamos os maiores valores nos pacientes com perfil de mutação negativo, com mediana de 7,55%, diferente dos 3,1% dos pacientes com *NRAS* e *KRAS* ($p = 0,038$). Na quantificação de células CD34/CD117/CD13⁺ positivas, precursores mieloides, a maior porcentagem foi obtida nos pacientes com *NF1* e *PTPN11*, e menor mediana nos pacientes com mutação de *NRAS* (4,28% x 1,8% respectivamente). Não foi observada diferença estatística quanto porcentagem de hematogônias tipo 1 entre os subgrupos moleculares. Quanto à análise de expressão aberrante nesta população celular, somente pacientes com mutação de *PTPN11* e *NF1* apresentaram expressão anômala de CD7 (82% dos pacientes com *PTPN11* mutado e 67% com neurofibromatose tipo 1).

Os linfócitos maduros B, T e NK também foram analisados e apesar de menor mediana nos pacientes com mutação *NRAS* (1,89%), a diferença entre os subgrupos moleculares não foi estatisticamente significativa.

Os monócitos inicialmente classificados na sua totalidade e nas suas subpopulações se apresentaram com medianas distintas entre os subgrupos moleculares. Os pacientes com mutação de *KRAS* tiveram os maiores valores, seguidos dos pacientes com *NF1* ($p 0.035$). A distribuição das subpopulações monocíticas também foi distinta entre os grupos, com porcentagens acima de 90% de monócitos clássicos/total nos pacientes com *NRAS* e *NF1*, e valores inferiores a 80% nos pacientes com mutação de *PTPN11* e *KRAS*. Já os monócitos CD16⁺, tiveram uma inversão dessa distribuição com maiores porcentagens/total nos pacientes com *KRAS* e *PTPN11*.

As características qualitativas avaliadas estão resumidas na Tabela 8. A maioria dos pacientes com mutação de *PTPN11* e *KRAS* (83% e 75% respectivamente) apresentaram redução da expressão de HLA-DR, enquanto apenas 25% dos pacientes com mutação de *NRAS*. A população granulocítica avaliada se mostrou com alteração de padrão de maturação em todos os pacientes com mutação de *KRAS* e menos de 50% dos pacientes com *PTPN11*.

Tabela 8 – Quantificação das populações celulares por citometria de fluxo dos pacientes com LMMJ nos diferentes subgrupos moleculares (mediana percentil 10 e 90).

	PTPN11 N=11	NF1 N=6	NRAS N=4	KRAS N=4	Negative N=6	P valor
% Granulocitos	65(28.6-72.2)	48.5(14.6-70.9)	71.95(58.7-73.5)	35.2(25.2-58)	38.9(22-62)	0.033
%CD34 ⁺ /CD117 ⁺	4.1(2.8-12)	4.28(2.4-6.9)	1.8(1.5-2.7)	1.95(0.8-2.8)	3.65(0.9-13.5)	0.017
%CD34 ⁺ /CD19 ⁺ /CD10 ⁺	0.7(0-5.7)	0.84(0-2.5)	1.04(0.3-2.2)	0.74(0.3-6.6)	0.53(0.1-4.4)	NS
% Linfócitos T	3.4(1-15.4)	3.89(0.9-8.5)	1.89(1.3-2.4)	3.9(0.9-19.7)	2.92(1.7-9.3)	NS
% Linfócitos NK	0.8(0.43-1.68)	1.02(0.45-1.74)	1.07(0.21-1.91)	1.68(0.64-2.71)	1.1(0.49-2.2)	NS
% Monócitos Total	10.74(2.35-13.28)	16.58(5.91-29.9)	9.58(6.63-13.17)	22.03(7.78-28.63)	13.23(2.93-17.32)	0.024
% Precusores monocíticos	1.43 (0.36-3.69)	5.62 (1.78-16.9)	1.82 (1.32-2.87)	4.37 (0.97-6.18)	2.45 (0.59-3.61)	NS
%Mono clássico/Monos	76.25(50.2-91.83)	94.74(83.0-98.26)	94.99(89.3-98.57)	71.09(48.25-94.05)	85.51(67.65-93.4)	0.017
%Mono intermediário/Monos	20.12(5.12-38.0)	3.84(1.23-9.0)	3.68(1.2-8.45)	25.99(5.68-46.65)	14.12(5.6-27.61)	0,004
%Mono não clássico/Monos	3.6(0.90-12.79)	0.98(0.18-8.0)	1.32(0.23-2.24)	2.92(0.27-5.1)	1.06(0.27-6.85)	0.019

Tabela 9 – Alterações imunofenotípicas nos pacientes com LMMJ nos diferentes subgrupos moleculares.

	PTPN11 N=11	NF1 N=6	NRAS N=4	KRAS N=4	Neg N=6
Granulócitos					
Redução SSC	11	5	4	3	4
Alteração Padrão de Maturação	5	5	2	4	1
CD7 aberrante	0	0	0	0	0
CD56 aberrante	0	0	0	0	0
Monócitos					
%monócitos>3.5%	8	6	4	4	5
Alteração expressão HLA-DR	10	4	1	3	4
CD7 aberrante	0	0	0	0	0
CD56 aberrante	0	0	0	0	0
Células CD34+					
CD34/CD117>2%*	11	6	2	3	3
CD34/CD19/CD10 <1.14%*	6	4	2	3	4
CD7 aberrante	9	4	0	0	3
CD56 aberrante	0	0	0	0	0

*De acordo com a referência para a faixa etária na população brasileira (Lorand-Metze 2018)

5.5 Resposta Clínica após tratamento com 5-azacitidina – parâmetros clínicos e genéticos

Dos 28 pacientes analisados com imunofenotipagem após 3 ciclos de azacitidina, 7 obtiveram resposta completa, 16 obtiveram resposta parcial e 4 evoluíram com progressão de doença; 1 paciente não contemplou nenhuma das características clínicas ou genéticas para serem avaliadas após tratamento clínico e com doença estável foi agrupado no grupo de resposta completa.

Dos 25 pacientes evoluídos após 6 ciclos, 21 também tinham sido avaliados após 3 ciclos de medicação, e 4 só tiveram exames coletados após 6 ciclos. 5/25 tiveram resposta completa, 16/25 resposta parcial e 4 tiveram progressão de doença. Um dos 21 pacientes avaliados nos dois momentos e que tinha resposta considerada completa teve progressão de doença após 6 ciclos de medicação (recaída).

Dos 6 parâmetros de resposta clínica avaliáveis foi possível acessar 5 em 3 pacientes, 4 em 8 pacientes, 3 em 13 pacientes, 2 em 6 pacientes, 1 em somente 1 paciente; 1 dos 32 pacientes não tinha parâmetros clínicos para seguimento segundo padronização proposta, mas mostrou mudanças na leucometria e plaquetometria com uso de 5-azacitidina, considerado com doença estável. O baço foi a variável mais acessível ao diagnóstico para seguimento, seguida pela leucometria e plaquetometria.

A reavaliação do status mutacional revelou somente dois pacientes com resposta molecular e negatização da mutação de *PTPN11* por PCR após 6 ciclos de 5-azacitidina e um paciente com negatização de *KRAS*. As características clínicas e laboratoriais desses dois pacientes com *PTPN11* estão descritas no Anexo D.

5.5.1 Perfil imunofenotípico após tratamento com 5-azacitidina

5.5.1.1 – Células CD34⁺

Os dados estão todos resumidos na tabela 9. Durante o tratamento com 5-azacitidina a redução de células CD34⁺ e CD34/117⁺ foi observada nos dois momentos de reavaliação após azacitidina. 87% dos pacientes tinham mais de 2% dessas células ao diagnóstico, e apenas 64% e 44% após 3 e 6 ciclos de hipometilante. A mediana inicial de 3,35% foi para 2,3% e 1,63% respectivamente, com $p 0.012$ (Figura 15). Já o compartimento de precursores linfoides B, já reduzidas ao diagnóstico, apresentou-se com novas quedas após o uso da medicação, com

mediana de 0,01% após 3 ciclos. De 4/32 pacientes com ausência de células CD34⁺/CD19⁺/CD10⁺ ao diagnóstico, encontramos 14/28, ou seja, 50% da amostra após 3 ciclos.

Alterações imunofenotípicas quanto expressão de antígenos e marcações aberrantes também foram avaliadas. A expressão aberrante de CD7 em precursores mieloides se manteve ao longo de todo tratamento clínico, e com mediana mantida da população de blastos com esta expressão anômala, 49,57%, 47,55% e 41,84% ao diagnóstico, após 3 e 6 ciclos respectivamente.

5.5.1.2 Série granulocítica

Os granulócitos, analisados em porcentagem, padrão de SSC, alterações de maturação e expressão antigênica, mostraram como principal achado um aumento da complexidade interna (SSC) em relação ao diagnóstico. Porém, apenas em 6/28 pacientes normalizaram este valor após 3 ciclos e 3/25 pacientes após 6 ciclos de 5-azacitidina. Expressão antigênica aberrante e alterações de padrão de maturação e assincronismo de maturação não tiveram diferenças durante tratamento.

5.5.1.3 Monócitos

Foi evidente uma redução da população total de monócitos após tratamento hipometilante, de 11,91% para 4,58% após 6 ciclos ($p=0,001$). A mesma diferença, com significância estatística foi observada na queda de monócitos clássicos, CD14⁺/CD16⁻, não acompanhada pelas duas outras subpopulações CD16⁺ (Figura 16). A porcentagem dos subgrupos de monócitos em relação ao total de monócitos maduros foi variável durante o tratamento com droga hipometilante, com incremento na porcentagem de monócitos não clássicos/total (Tabela 9).

A expressão anormal de antígenos como a redução de expressão de HLA-DR nesta população celular não teve alteração com a 5-azacitidina.

5.5.1.4 Populações linfoides maduras

A população de linfócitos T, reduzida ao diagnóstico, mostrou importante incremento com uso de hipometilante. Somente 12/32 pacientes tinham linfócitos T acima de 3,7% (usado percentil 10 de linfócitos T do controle para normalidade) enquanto após 3 ciclos de

azacitidina 22/28 pacientes e 18/25 pacientes após 6 ciclos da medicação. O mesmo incremento foi observado nos linfócitos NK, com p 0,009 (Figuras 17 e 18).

Na casuística analisada, os linfócitos B maduros não apresentaram alterações significativas durante o tratamento clínico.

Os dados estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 10– Características imunofenotípicas dos pacientes com LMMJ ao diagnóstico, após 3 ciclos e 6 ciclos de 5-azacitidina (mediana, percentis 10 e 90)

	Diagnóstico N=32	3 ciclos N=28	6 ciclos N=25	p
SSC	5.47 (4.47-7.8)	6.32 (3.87-8.15)	6.08 (4.38-7.92)	NS
% total CD34	5.2 (1.8-13)	3.0 (0.46-6.82)	1.93 (0.7-7.05)	0.016
% CD34 ⁺ /117 ⁺	3.35 (1.08-6.87)	2.3 (0.45-5.86)	1.63 (0.62-5.57)	0.012
%Precusores CD7 ⁺	49.57(22.86-97.55)	47.55(23.42-96.11)	41.84(20.13-93.03)	NS
% CD34 ⁺ /CD10 ⁺ /CD19 ⁺	0.75 (0-5.17)	0.01 (0-0.5)	0.1 (0-1.3)	<0.001
LINFÓCITOS				
% Linfócitos T	2.86 (1.07-8.98)	12 (2.55-31.37)	8.5 (1.82-27.75)	<0.001
% Linfócitos NK	1.01 (0.44-2.14)	1.85 (0.78-5.17)	1.44 (0.39-6.21)	0.009
% Linfócitos B maduro	2.17(0.56-5.28)	2.84 (0.74-10.58)	2.53 (0.36-8.25)	
MONÓCITOS				
%Monócitos Total	11.91 (3.21-25.62)	6.17 (2.42-17.39)	4.58 (2.25-14.6)	0.001
% Precusores monocíticos	2.41 (0.85-6.12)	1.27 (0.46-4.48)	0.94 (0.21-4.09)	0.01
% Monócitos CD14 ⁺ /CD16 ⁻	6.4 (1.72-12.71)	3.89 (1.09-11.82)	3.13 (1.11-7.15)	0.04
% Monócitos CD14 ⁺ /CD16 ⁺	0.77 (0.13-4.81)	0.42 (0.05-2.91)	0.36 (0.13-3.36)	NS
% Monócitos CD14 ⁻ /CD16 ⁺	0.12 (0.02-1.19)	0.1 (0.01-0.59)	0.1 (0.03-0.75)	NS
%Mono clássico/Monos	82.55 (46.49-98.16)	80.92 (49.1-97.05)	81.89 (49.1-97.06)	NS
%Mono intermediário/Monos	17.22 (1.33-40.54)	11.62 (0.39-34.47)	10.44 (2.56-42.06)	NS
%Mono não-clássico/Monos	1.81 (0.23-13.71)	3.78 (0.13-10.23)	4.88 (0.46-14.21)	0.03

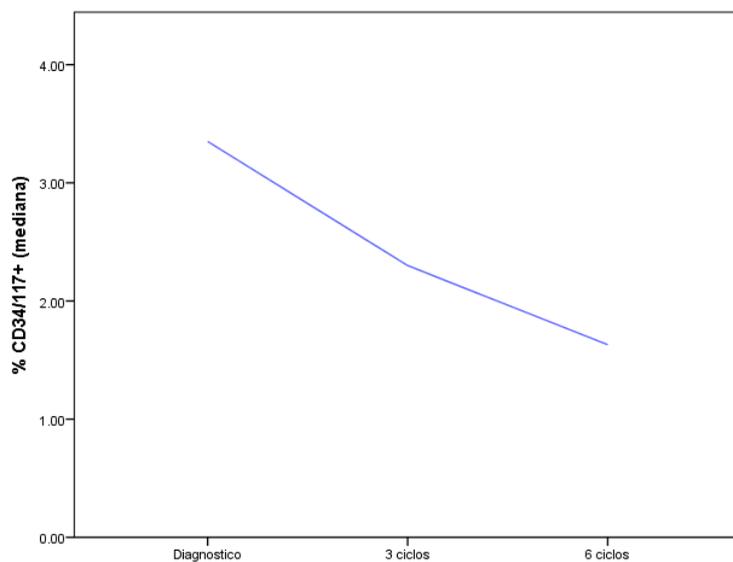


Figura 16 – Curva de distribuição de células CD34/CD117⁺ diagnóstico, 3 ciclos e 6 ciclos

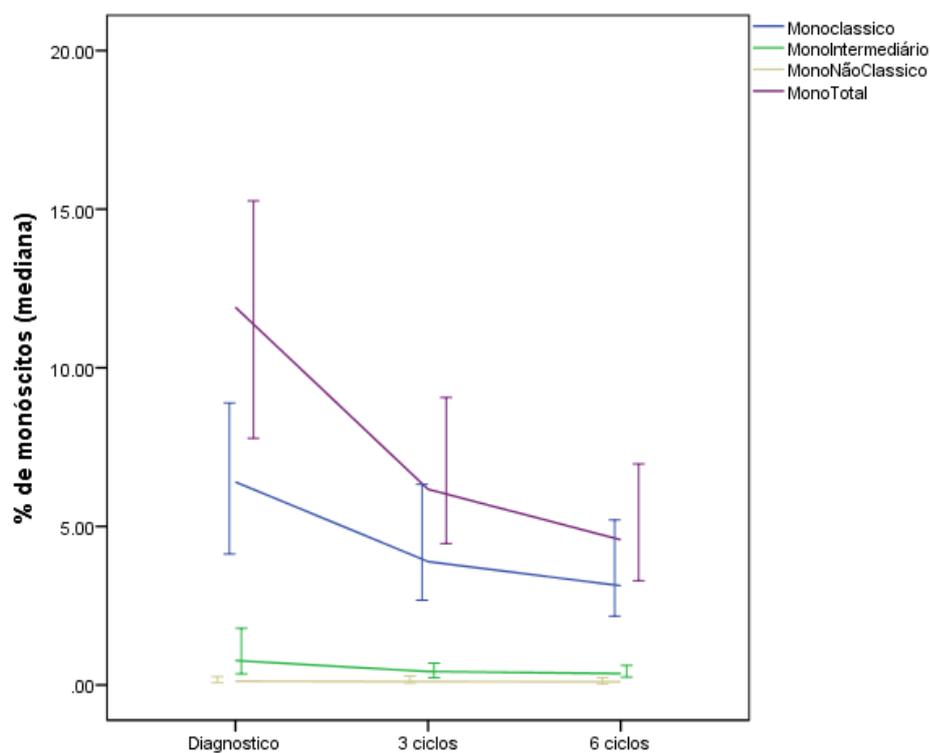


Figura 17 – Curva de distribuição de monócitos ao diagnóstico, 3 e 6 ciclos

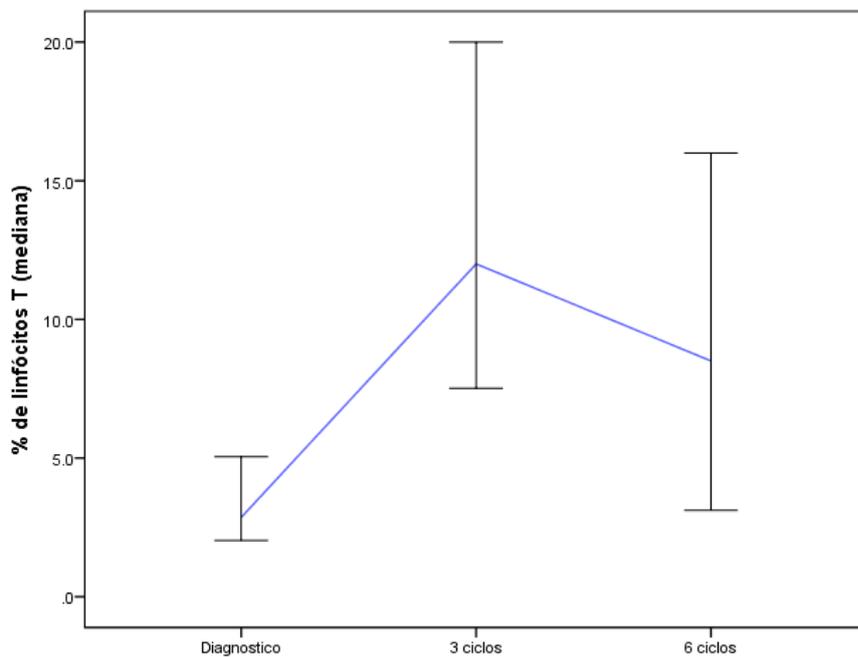


Figura 18 – Curva de distribuição de Linfócitos T diagnóstico, 3 e 6 ciclos.

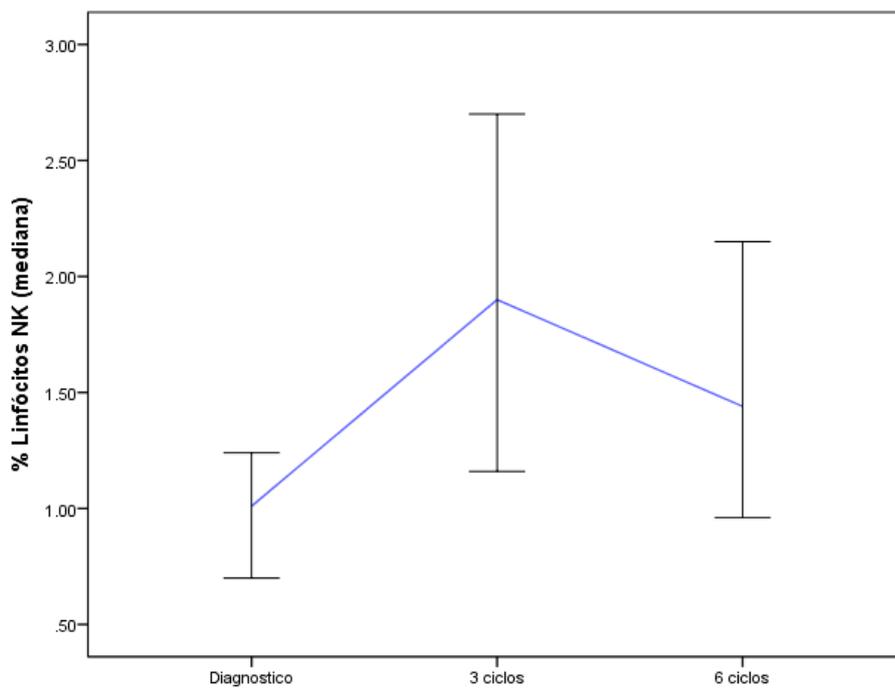


Figura 19 – Curva de distribuição de Linfócitos NK diagnóstico, 3 e 6 ciclos

5.5.2 Perfil Imunofenotípico x Resposta clínica obtida com tratamento com 5-azacitidina

Os dados obtidos pela citometria de fluxo após tratamento com hipometilante foram comparados com o tipo de resposta clínica obtida. Os dados estão todos resumidos nas tabelas 11 e 12. Dos 28 pacientes avaliados com ICF após 3 ciclos de 5-azacitidina, aqueles que apresentaram alguma resposta, parcial ou completa, se apresentaram com uma mediana inferior de células CD34⁺ e CD34/CD117⁺ quando comparados aqueles com progressão de doença. Os pacientes com progressão de doença inclusive tiveram mediana de células CD34/CD117⁺ de 6,36%, superior ao encontrado ao diagnóstico de LMMJ. Nenhum dos pacientes com <2% de precursores mieloides ao diagnóstico teve progressão de doença.

As hematogônias tipo 1, como já observado nos pacientes pós tratamento, apresentaram redução da porcentagem mas sem diferença entre os tipos de resposta. Já os linfócitos T, que sofreram incremento com o tratamento, tiveram maior mediana nos pacientes com resposta completa quando comparados aos dois outros subgrupos (*p* 0.052).

Embora observada uma redução do total de monócitos, aqueles com progressão de doença se apresentaram com medianas superiores de monócitos totais e monócitos clássicos; este mesmo grupo teve as menores medianas de monócitos CD16⁺ (intermediário e não clássico). Apesar desta diferença da distribuição dos subtipos de monócitos nos pacientes com progressão de doença, esta não foi estatisticamente significativa (Tabelas 10 e 11).

Após 6 ciclos de 5-azacitidina, os 25 pacientes apresentaram características fenotípicas semelhantes às observadas após 3 ciclos e de acordo com a resposta clínica. Foi observado o mesmo aumento na mediana de células CD34/CD117⁺ e menores medianas de linfócitos T no subgrupo que evoluiu com progressão de doença. De comportamento distinto, após 6 ciclos, os 4 pacientes com progressão de doença tinham as maiores medianas de monócitos intermediários, com valores inclusive acima daquele encontrado nos pacientes com LMMJ ao diagnóstico (0,77% x 1,57% respectivamente).

Quanto às alterações imunofenotípicas qualitativas, estas ficaram estáveis ao longo do tratamento e independente da resposta clínica obtida. Todos os pacientes com expressão aberrante de CD7 em precursores mieloides mantiveram a alteração ao longo do tratamento. Todos os 4 pacientes com progressão de doença em dois momentos distintos de avaliação

tinham a expressão anômala de CD7, enquanto somente 33% e 40% dos pacientes com respostas clínicas completa e parcial respectivamente ($p 0,055$), conforme tabela 12.

Tabela 11 – Características imunofenóticas dos pacientes com JMML depois de 3 ciclos de 5-azacitidina de acordo com a resposta clínica (mediana).

	Resposta Completa N= 8	Resposta Parcial N=16	Progressão N=4	p
%CD34 Total	3.25	2.49	6.99	0.016
% CD34 ⁺ /CD117 ⁺	2.62	1.87	6.36	0.008
% CD34 ⁺ /CD10 ⁺ /CD19 ⁺	0.17	0.1	0.08	NS
% Linfócitos T	23.8	12.1	7.5	0.052
% Linfócitos NK	2.8	2.3	1.3	NS
MONÓCITOS				
% Total monócitos	7.17	7.53	12.64	NS
% Precursores monocíticos	1.18	1.59	4.44	NS
% Monócitos Clássicos	4.66	4.32	7.79	NS
% Monócitos Intermediários	1.08	1.35	0.33	NS
% Monócitos Não-clássicos	0.24	0.28	0.08	NS
%Mono clássico/Monos	76.42	83.98	91.87	NS
%Mono intermediário/Monos	17.46	11.04	6.93	NS
%Mono não-clássico/Monos	3.78	3.93	1.19	NS

Tabela 12 - Características imunofenotípicas dos pacientes com LMMJ depois de 6 ciclos de 5-azacitidina de acordo com a resposta clínica (mediana).

	Resposta Completa N= 5	Resposta Parcial N=16	Progressão N=4	p
% Total CD34+	1.99	2.42	5.23	0.016
% CD34 ⁺ /CD117 ⁺	1.59	1.81	4.89	0.014
% CD34 ⁺ /CD10 ⁺ /CD19 ⁺	0.12	0.54	0.12	NS
% Linfócitos T	20.5	9.7	5.7	0.047
% Linfócitos NK	4.1	2.1	1.3	NS
MONÓCITOS				
% Total de monócitos	5.79	6.71	6.69	NS
% Precursores monocíticos	1.9	1.46	1.15	NS
% Monócitos Clássicos	3.14	4.14	3.87	NS
% Monócitos Intermediários	0.58	0.88	1.57	NS
% Monócitos Não-Clássicos	0.18	0.24	0.1	NS
%Mono Clássico/Monos	81.89	88.17	61.92	NS
%Mono Intermediário/Monos	9.02	9.35	17.81	NS
%Mono Não Clássico/Monos	4.88	2.81	11.61	NS

Tabela 13 – Relação da expressão de CD7 em precursores mieloides e tipo de resposta a 5-azacitidina.

	Resposta completa	Resposta Parcial	Progressão	P
CD7+	2 33%	8 40%	6 100%	0.055
CD7-	4 66%	12 60%	0 0%	

5.6 Identificação de fatores preditivos de resposta

Os 21 pacientes analisados nos 3 momentos, diagnóstico, 3 ciclos e 6 ciclos de hipometilante foram observados quanto às mudanças imunofenotípicas sofridas ao longo do tratamento e de acordo com o status de resposta clínica obtida.

Cinco pacientes foram classificados com resposta clínica completa após 3 ciclos de azacitidina, e desses, 2 mantiveram o status na reavaliação posterior; todos tinham < 2% de células CD34⁺/CD117⁺ na reavaliação medular. Outros 2 pacientes passaram para resposta parcial após 6 ciclos de azacitidina, mas ambos já se apresentavam com >2% de precursores mieloides ao diagnóstico e na reavaliação com 3 ciclos de azacitidina. O único paciente com progressão de doença após 6 ciclos da medicação manteve durante os 3 momentos de avaliação imunofenotípica níveis elevados de CD34/CD117⁺, 12%, 5,8% e 7,7% respectivamente, apesar de melhora de parâmetros clínicos e laboratoriais propostos na reavaliação com 3 ciclos de 5-azacitidina. Os linfócitos T também observados nos 3 momentos mostrou incremento em 4/5 pacientes analisados após 3 ciclos de azacitidina e com resposta completa, com redução após 6 ciclos no paciente com progressão de doença. Imunofenótipo aberrante com marcação de CD7⁺ em precursores mieloides somente não foi observada em 1 dos 5 pacientes, que manteve resposta completa nas reavaliações. Dois pacientes com resposta completa e com dados nos 3 momentos de avaliação tiveram redução expressiva das porcentagens de precursores mieloides com expressão aberrante de CD7 (Paciente 1: 64,23%-43,79%-19,13% e Paciente 2: 97,94%-97,81%-30,18%).

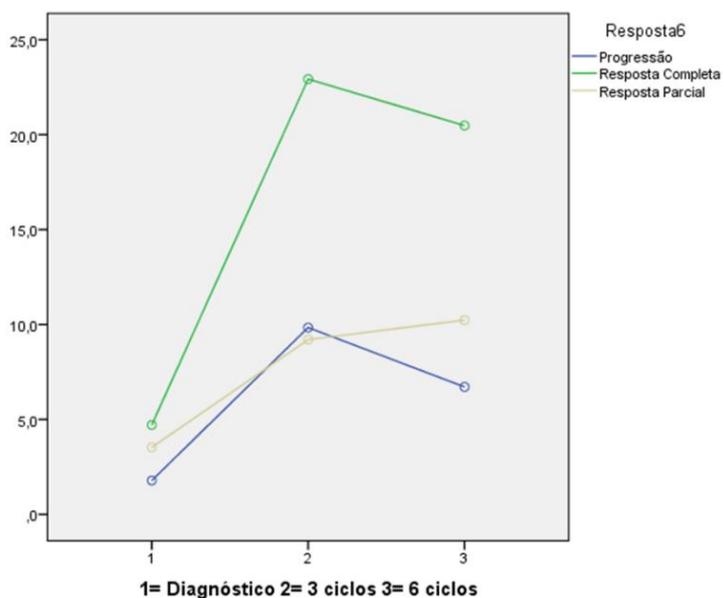
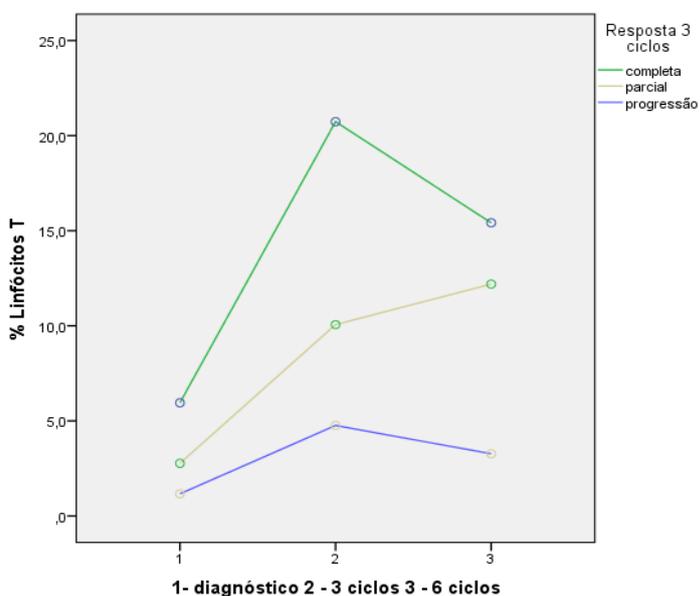
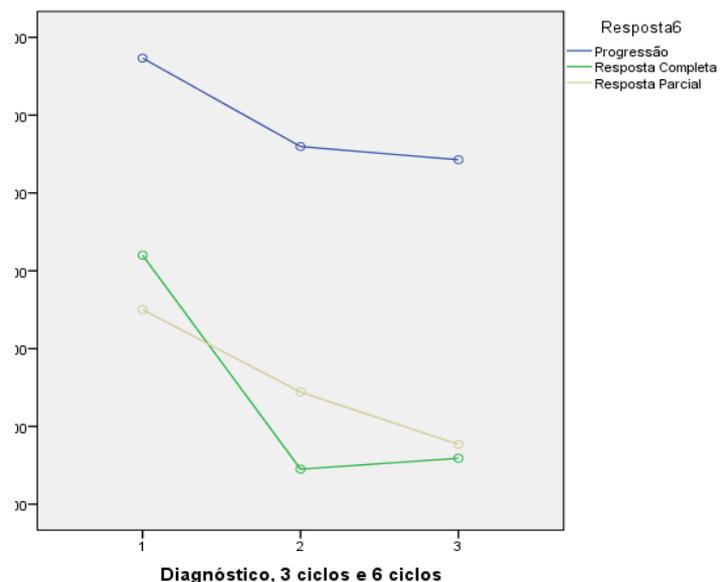
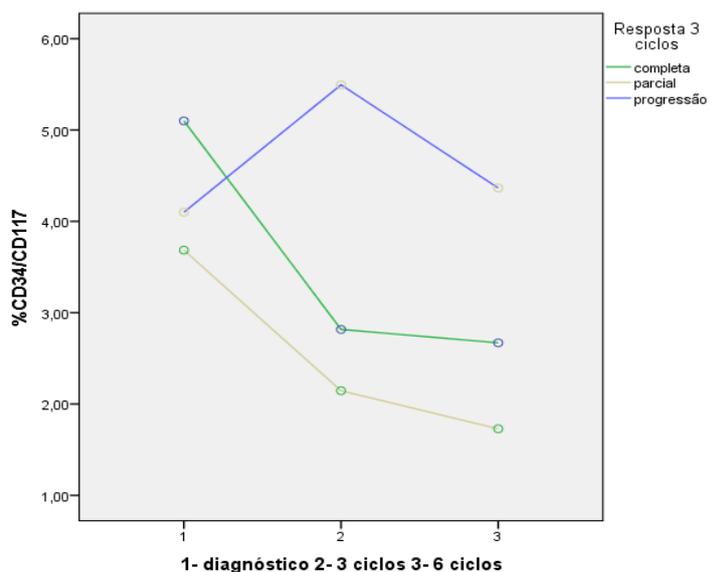
Dois pacientes dos 21 se mostraram com progressão de doença após 3 ciclos e mantiveram status após 6 ciclos de medicação. Ambos tinham valores acima de 2% de CD34/CD117⁺ nos 3 momentos de avaliação medular e não tiveram incremento de linfócitos T, (Paciente 1: 0,9%-7,5%-4,9% e Paciente 2: 1,5%-2,0%-1,6%). Todos os pacientes tinham expressão anômala de CD7 em precursores mieloides.

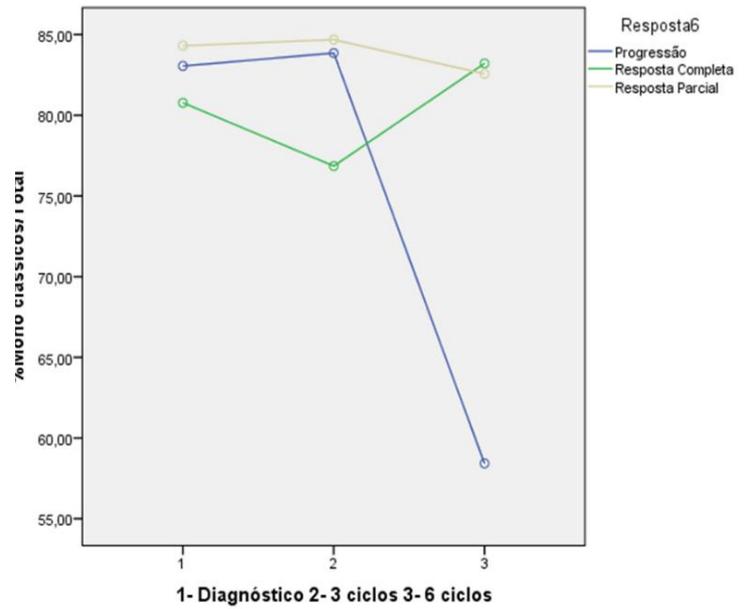
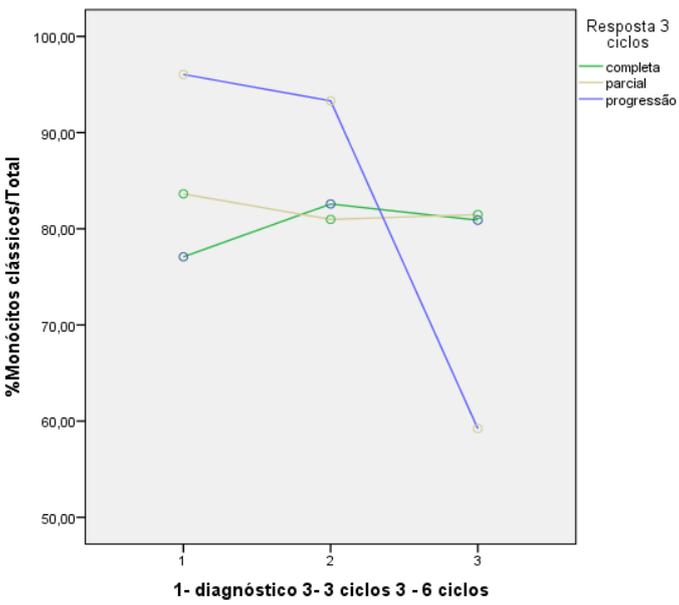
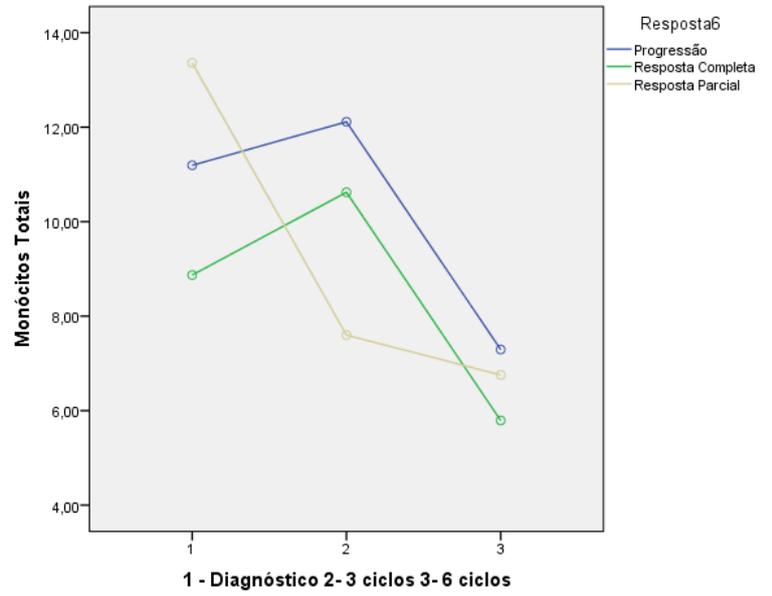
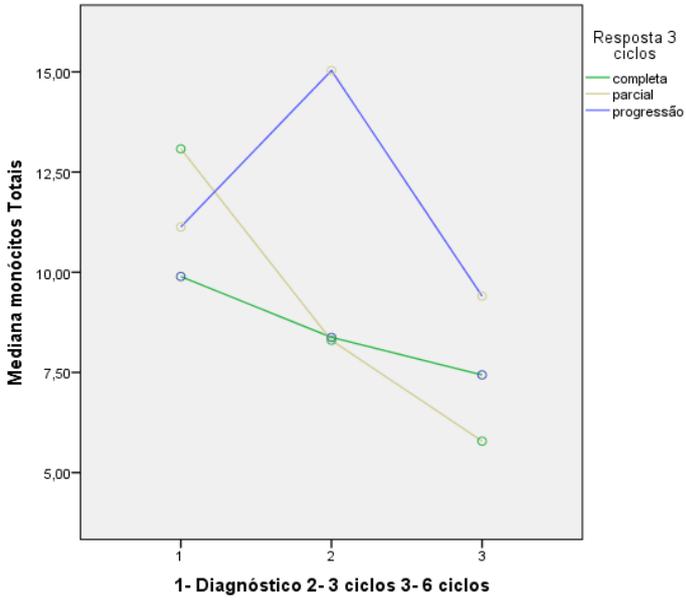
Por fim, 13/21 pacientes foram caracterizados como resposta clínica parcial após 3 ciclos de azacitidina. Desses, 8 pacientes tinham >2% de precursores mieloides ao diagnóstico, e 5 mantiveram valores acima de 2% apesar de redução após 3 ciclos, e apenas 3 pacientes após 6 ciclos mostrando uma resposta progressiva na redução de precursores mieloides apesar

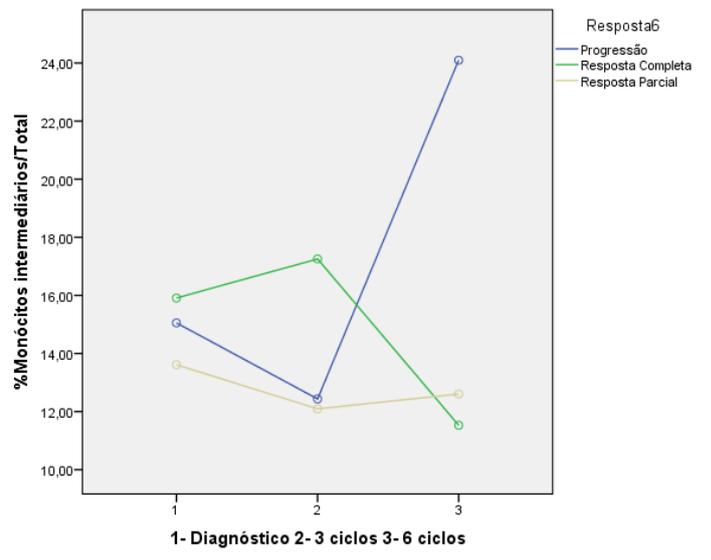
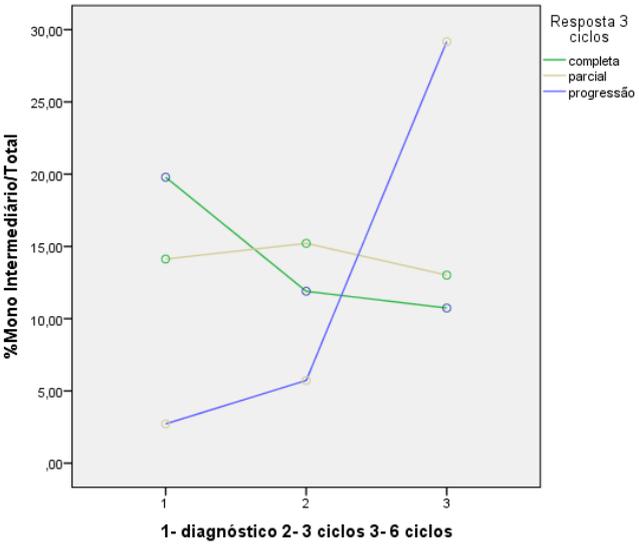
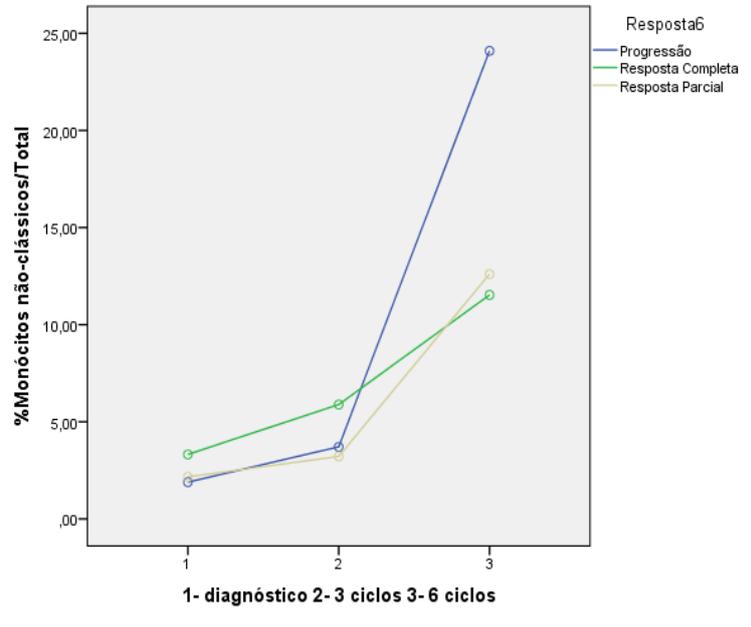
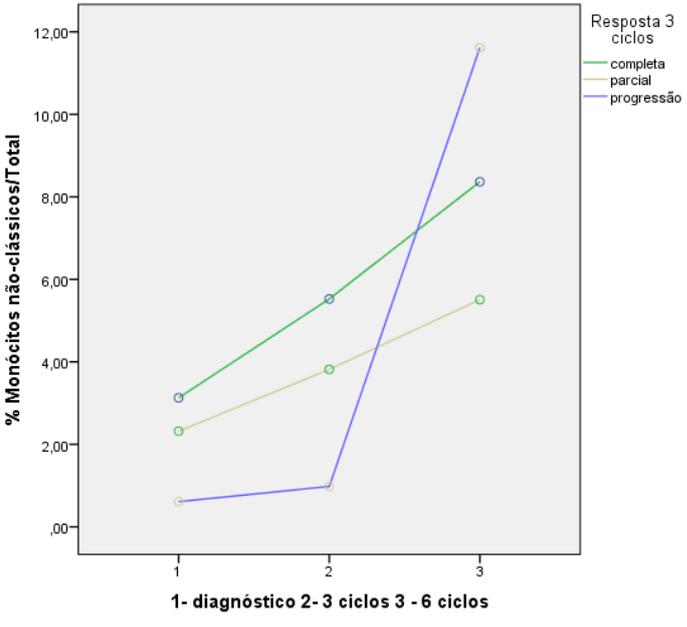
de manutenção do status. Apenas dois pacientes evoluíram para resposta completa após 6 ciclos. O incremento de linfócitos T foi variável neste grupo.

Os dados estão descritos no Anexo E e ilustrados na figura 20.

Figura 20 – Curvas de distribuição da mediana das populações de células CD34/CD117⁺, linfócitos T, monócitos totais e subpopulações, de acordo com a resposta clínica com 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina.







5.7 Modelo preditivo de resposta

Para tentar diferenciar os pacientes com LMMJ e com alguma resposta ao tratamento com 5-azacitidina daqueles com progressão de doença durante terapia foi realizada uma análise discriminante. Após comparar as mutações moleculares com variáveis laboratoriais ao diagnóstico como idade, expressão anômala de CD7 em precursores mieloides, porcentagem de monócitos intermediários, porcentagem de linfócitos T foi realizada uma regressão logística com junção de variáveis com $p < 0,1$ para identificação da melhor combinação preditora de progressão de doença após 3 ciclos de 5-azacitidina. As variáveis foram simultaneamente analisadas em uma regressão logística multivariada binária, com inclusão progressiva ($p = 0,05$). O modelo final foi baseado em duas variáveis independentes, presença de mutação NF1 e expressão aberrante de CD7 em precursores mieloides. Os pacientes foram classificados desta forma em score 0 (ausente), 1 (1 dessas duas variáveis) e 2 (2 variáveis presentes). Somente os pacientes com score 2 pela regressão logística foram de risco para progressão de doença. Com a aplicação deste score na casuística de 32 pacientes com LMMJ, 93,7% dos pacientes foram corretamente preditos para progressão de doença ou resposta à terapia.

6. DISCUSSÃO

A Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) é uma doença hematológica clonal rara, com critérios diagnósticos clínicos e laboratoriais bem definidos.^{2,9,13} Apesar do diagnóstico criterioso e cerca de 90% dos pacientes com LMMJ apresentando-se com mutação de um dos genes envolvidos na via do RAS, 10-15% necessitarão de critérios diagnósticos adicionais, menos específicos, como elevação de hemoglobina fetal e precursores circulantes em sangue periférico.^{2,13} A imunofenotipagem por citometria de fluxo (ICF), amplamente utilizada no diagnóstico de doenças hematológicas e no monitoramento de resposta ao tratamento, não faz parte das ferramentas diagnósticas rotineiramente empregadas na LMMJ. Como esta doença tem características de mielodisplasia e mieloproliferação, a iniciativa de realizar este estudo surgiu da necessidade de verificar qual o comportamento imunofenotípico da LMMJ e se a ICF poderia auxiliar no diagnóstico diferencial com outras doenças neoplásicas. Utilizando-se de um painel de anticorpos validado para avaliação de pacientes pediátricos com SMD, os pacientes com LMMJ foram analisados quanto suas características imunofenotípicas.⁵⁶ Como a apresentação clínica, evolução de doença e terapêutica proposta são distintas a depender da mutação molecular encontrada, os achados obtidos pela ICF ao diagnóstico foram ainda associados com o perfil molecular.^{13,14}

Com o incremento recente de estudos acerca da genética envolvida na doença, a LMMJ vem se mostrando uma doença multifacetada. A evidência de hipermetilação gênica, e de perfis distintos de metilação em pacientes com LMMJ com impacto em prognóstico, permitiu a utilização de novos tratamentos clínicos.^{5,33,42} Apesar do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) ser a única terapêutica curativa para maioria dos pacientes com LMMJ, a 5-azacitidina, medicação hipometilante, provou ser uma opção segura na melhora da performance pré-transplante.^{49,51}

Assim, com o conceito de utilização da ICF na reavaliação de outras doenças hematopoiéticas, o presente estudo buscou analisar as alterações imunofenotípicas após uso da 5-azacitidina. Como os pacientes com LMMJ podem ter oscilações da leucometria, monocitose e esplenomegalia, ou doença estável por anos sem tratamento, os critérios clínicos de reavaliação do paciente podem deixar dúvidas a respeito da real resposta obtida.⁵³ Com esse objetivo, o mesmo painel de anticorpos utilizado ao diagnóstico foi novamente empregado na reavaliação dos pacientes com LMMJ submetidos ao tratamento clínico; as

características imunofenotípicas foram correlacionadas com o tipo de resposta clínica obtida, a fim de identificar variáveis que auxiliam na avaliação da resposta ao tratamento e até possíveis preditores de resposta.

Com uma mediana de 29 meses de idade, os 32 pacientes analisados se distribuíram com uma maior frequência no sexo masculino. É esperada uma idade média de diagnóstico para LMMJ de 2 anos de idade e somente 5% acima de 4 anos de idade; nossa mediana pouco superior àquela descrita na literatura, porém com 15,7% dos pacientes maiores de 4 anos.^{4,5} A dificuldade de acesso a um serviço de saúde acarreta atraso no diagnóstico, realidade ainda tão frequente em países em desenvolvimento como o Brasil. Apesar de nenhum dos nossos pacientes serem menores de 4 meses, a literatura mostra 9% com diagnóstico nesta faixa etária. A predominância do sexo masculino é bem descrita em publicações anteriores, com uma distribuição de 2:1; nossa casuística confirmou essa predominância.^{3,4}

As características clínicas e laboratoriais que descrevem os pacientes com LMMJ ao diagnóstico foram verificadas no presente estudo. Com leucocitose e monocitose na maioria dos pacientes, nossa mediana de $33 \times 10^9/L$ foi idêntica àquela descrita na literatura. Embora a leucocitose seja mais frequente, alguns raros pacientes se apresentam com leucometrias inferiores a $10 \times 10^9/L$, principalmente naqueles com monossomia do cromossomo 7. Na nossa casuística apenas 2 pacientes (<10%) tinham leucometria inferior a $10 \times 10^9/L$, um deles com monossomia do cromossomo 7.^{4,21} A plaquetopenia, achado frequentemente descrito, leva a sangramentos, mas apenas 14% terão menos de $20 \times 10^9/L$ plaquetas. Entre nossos pacientes, 25% tiveram plaquetopenia inferior a esse valor. A hemoglobina fetal elevada para idade, que faz parte dos critérios diagnósticos menores, mostrou-se elevada na maioria dos pacientes. Passmore e col., descreveram pior prognóstico para os pacientes com hemoglobina fetal superior a 10%, presente em 46,9% da nossa amostra.⁴¹ Dos dados obtidos da análise citogenética, apenas 1/3 dos pacientes com LMMJ terão alguma alteração citogenética. A mais frequente é a monossomia do cromossomo 7 responsável por 25% das alterações.^{4,5} Este padrão também ocorreu nos nossos pacientes.

É descrita uma maior prevalência desta alteração citogenética em pacientes com mutação de KRAS, e essa combinação foi observada em 50% desses pacientes.⁴⁹ A avaliação do perfil de mutações moleculares, imprescindível para o diagnóstico e correta proposição terapêutica, encontrou mutação de um dos genes envolvidos na patogênese da doença em

82% dos pacientes, sendo o mais frequente o gene *PTPN11*, seguido dos *RAS* e *NF1*. Cerca de 90% dos pacientes com LMMJ terão envolvimento de mutação de um dos genes da via do RAS, com maior prevalência do *PTPN11*.³³ Apesar da raridade de se encontrar mais de um gene mutado, nossa casuística tinha um paciente com mutação de *PTPN11* e *NRAS*.

Das características imunofenotípicas ao diagnóstico e ao longo do tratamento foi possível avaliar a população de células CD34⁺ com progenitores mieloides e linfoides B, monócitos, granulócitos, linfócitos B, T e NK, quanto à quantificação das populações celulares e verificação da existência de alterações imunofenotípicas.

Quando avaliamos os pacientes com LMMJ ao diagnóstico, algumas características imunofenotípicas puderam ser identificadas. Em 2016, nosso grupo publicou uma casuística de 13 pacientes com LMMJ com descrição do perfil imunofenotípico de algumas populações celulares que puderam ser confirmadas na casuística atual.⁵⁶ O presente estudo confirma o observado anteriormente. Os pacientes se apresentaram com um importante incremento no compartimento de células CD34⁺ às custas dos progenitores mieloides. Como a LMMJ é uma doença de caráter mieloproliferativo, com proliferação de granulócitos e monócitos, este aumento observado era esperado. Quando correlacionamos essa população celular com o perfil mutacional foi evidente um comportamento distinto a depender do gene envolvido. Os pacientes com mutação somática de *PTPN11* e mutação de *NF1* se apresentaram com as maiores porcentagens de precursores mieloides. Tem sido descrito um perfil de doença mais agressivo e de prognóstico inferior para os pacientes com LMMJ e mutações de *PTPN11* e *NF1*.⁶⁶ A associação do achado imunofenotípico de um aumento de progenitores mieloides nestes pacientes parece corroborar o comportamento mais agressivo desses dois perfis moleculares. Além da proliferação de células CD34/CD117⁺ descrita na nossa coorte, observamos uma alta frequência de expressão aberrante de CD7 nesses precursores mieloides, que só foi observada nos pacientes com *PTPN11* e *NF1*. É descrito em estudos com pacientes com SMD a expressão aberrante de CD7 inclusive com implicações prognósticas. Veltroni e col. em 2009, descreveram uma casuística de pacientes pediátricos com SMD subtipo AREB e sobrevida global inferior naqueles com expressão aberrante de CD7.⁶³ Ogata e col. em 2002 também explorou esse comportamento em pacientes adultos com SMD, corroborando o comportamento imunofenotípico semelhante entre LMMJ e SMD.⁶⁴ Este

achado nos permite traçar um paralelo dos nossos pacientes com aqueles com SMD, além de apontar para um prognóstico pior nestes pacientes.⁶⁶

Ainda no compartimento de células CD34⁺, os progeitores linfoides B, ou hematogônias tipo I (H1), foram também analisados. Semelhante ao descrito em pacientes com síndrome mielodisplásica adultos e pediátricos, observamos uma redução de H1 nos pacientes com LMMJ.^{56,59,65} Apesar de tratar-se de pacientes jovens, em que é esperado maiores porcentagens de H1, esta população se apresentou com medianas reduzidas quando comparados com a população brasileira, e independente do perfil molecular.⁶⁰ Diferentemente do apresentado, pacientes com neoplasias mieloproliferativas costumam preservar os progenitores linfoides B, reforçando um comportamento da LMMJ mais semelhante à SMD do que SMP.⁶⁹

Quanto à população monocítica, esta foi avaliada na porcentagem total e das subpopulações, com novos achados em relação ao nosso estudo anterior. O aumento desta população observado nos pacientes com LMMJ e semelhante ao observado quanto às células CD34/CD117⁺, condiz com a proliferação desta série, característica da doença. A distribuição em monócitos clássicos, intermediários e não clássicos mostrou características próprias quando comparada à população controle e ao já descrito em pacientes com Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC). Em pacientes adultos com LMMC é observado um aumento na população de monócitos clássicos circulando em sangue periférico (SP) e em medula óssea (MO). Selimoglu-Buet e col. compararam as subpopulações monocíticas de pacientes com LMMC com o de monocitoses não-clonais e encontraram um *cut-off* de >94% de monócitos clássicos com alta sensibilidade e especificidade no *screening* diagnóstico.³⁵ Hudson e col. avaliaram amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com suspeita de LMMC e encontraram na quantificação de monócitos não clássicos, reduzidos nesses pacientes, um teste para *screening* diagnóstico de também alta sensibilidade e especificidade para LMMC.³⁶ De modo semelhante, Picot e col. avaliaram a população monocítica destes pacientes com concordância dos achados ao diagnóstico, e evidenciaram uma normalização da distribuição das subpopulações após tratamento clínico.³⁷ Em pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) tem sido descrito menores proporções de monócitos clássicos, diferente do observado na LMMC.⁷⁰ Nos 32 pacientes com LMMJ avaliados, a porcentagem de monócitos clássicos foi

bastante inferior ao controle e ao descrito na LMMC, e a de monócitos não clássicos estavam aumentadas, mais compatível com SMD que com LMMC.

Recentemente, Gandgeel e col. descreveram o comportamento das subpopulações monocíticas de 14 pacientes com LMMJ, a maioria com material congelado. O perfil de distribuição de monócitos também não foi auxiliar no diagnóstico para LMMJ, mas estes autores não apresentam porcentagens destes subtipos. Porém, foi observado uma relação entre porcentagens > 94% de monócitos clássicos e mutação de PTPN11.⁷¹ Quando comparamos os achados imunofenotípicos das populações monocíticas com o perfil molecular, a distribuição de monócitos clássicos foi diferente a depender do gene mutado. Os pacientes com PTPN11 tiveram porcentagens de monócitos clássicos inferiores a 80% enquanto aqueles com NF1 tiveram uma mediana superior a 94%, corroborando mais uma vez perfis imunofenotípicos distintos de acordo com o perfil molecular. Embora Gandgeel e col. tenham observado uma população de monócitos clássicos > 94% nos pacientes com PTPN11, esse valor foi achado em apenas 4 pacientes e obtido a partir de amostras congeladas de sangue periférico, o que pode ter influenciado na marcação antigênica. É importante ressaltar que os monócitos de sangue periférico não foram analisados no presente estudo, embora comportamento semelhante dos dois compartimentos celulares, SP e MO, já tenha sido descrito na LMMC.^{36,37}

Ainda sobre a população monocítica, Calvo e col. estudaram as populações celulares em sangue periférico de pacientes com doenças leucoproliferativas associadas ao RAS (RALDpatias), espectro de doença com quadro clínico e laboratorial idêntico à LMMJ, de curso indolente; encontraram uma população de monócitos CD16⁺ circulantes, diferente do grupo controle estudado. Apesar do presente estudo não ter acessado sangue periférico, a população monocítica encontrada na medula óssea dos pacientes com LMMJ sinaliza comportamento semelhante e corrobora a necessidade de estudos adicionais de populações monocíticas circulantes.²⁶

Ao diagnóstico, do compartimento de células granulocíticas, a alteração mais freqüentemente observada foi uma redução da complexidade interna. Como uma doença com características mielodisplásicas, achados morfológicos de disgranulopoiese como de hipogranulação são frequentes e podem refletir neste achado imunofenotípico.⁷² De maneira

semelhante, alteração de padrão de maturação e assincronismo maturativo são achados dispoéticos frequentemente descritos em pacientes com síndrome mielodisplásica, caracterizando o comportamento mielodisplásico da LMMJ.^{57,58}

Os linfócitos maduros analisados mostraram achados interessantes acerca dos linfócitos T, e semelhantes aos encontrados no estudo prévio de 2016.⁵⁶ Uma redução desta população foi observada ao diagnóstico de pacientes com LMMJ podendo estar relacionada a uma desregulação imune associada à doença. Quando comparado com o perfil molecular, independente desse, a população linfocítica mostrou-se diminuída ao diagnóstico.

Das alterações qualitativas, além da expressão anômala em precursores mieloides, alterações de maturação e complexidade interna observados na população granulocítica, foi frequentemente observada alterações imunofenotípicas em monócitos. Foi frequente nos pacientes com LMMJ uma redução da expressão de HLA-DR. Semelhante ao observado nas outras populações celulares, um imunofenótipo anômalo com redução da expressão de HLA-DR foi mais observado nos pacientes com mutação de *PTPN11* quando comparado aos outros perfis moleculares. Estudos descrevendo os monócitos em pacientes com LMMC mostram alterações imunofenotípicas como redução da expressão de HLA-DR, expressão aberrante de CD2, expressão aberrante de CD56.³⁸ Nenhum dos pacientes da nossa amostra apresentou expressão aberrante de CD56 em monócitos. Apesar de sua descrição na LMMC, pacientes pós tratamento quimioterápico e controles saudáveis também podem apresentar essa marcação aberrante em monócitos e este achado não deve ser considerado como marcador diagnóstico ou de suspeição de doença.^{38,73} Feng e col. avaliaram as alterações imunofenotípicas em pacientes com LMMC comparadas a monocitoses reacionais. Os pacientes com LMMC apresentam scores superiores de alterações imunofenotípicas em todas as subpopulações, mais exuberante na população de precursores mieloides, auxiliando no diagnóstico diferencial da LMMC e outras doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas de monocitoses reacionais. Nossa coorte de pacientes com LMMJ apresentaram como alteração imunofenotípica mais frequente nos precursores mieloides a expressão anômala de CD7, mas outras alterações como da expressão anormal de CD117 devem ser estudadas em estudos subsequentes.⁶⁸

Após o tratamento com 5-azacitidina alterações imunofenotípicas puderam ser observadas e relacionadas à resposta obtida com tratamento clínico.

Ao longo do tratamento com 5-azacitidina houve uma redução das células CD34/CD117+ naqueles pacientes com resposta clínica, evidenciado o controle do caráter mieloproliferativo da doença, o que foi mais evidente após 3 ciclos da medicação. Os pacientes que evoluíram com progressão de doença após tratamento hipometilante mostraram aumento destas células, o que reforça o conceito de controle da mieloproliferação exercido pela 5-azacitidina somente naqueles pacientes com resposta clínica. Shen e col. descreveram recentemente o perfil imunofenotípico de pacientes com LMMC quanto às populações celulares ao diagnóstico e após tratamento e encontraram uma baixa mediana de células CD34⁺, mas com várias alterações imunofenotípicas também encontradas na SMD e que não sofreram alteração após tratamento com droga hipometilante.³⁸ Apesar da semelhança dos critérios diagnósticos clínicos e laboratoriais entre LMMC e LMMJ, nossa casuística mostrou aspectos distintos, com um aumento desta população celular ao diagnóstico e queda nas porcentagens de acordo com a resposta à terapêutica.

Da população CD34/CD117⁺ da nossa casuística e resposta, observamos também que todos os pacientes que tiveram progressão de doença em algum momento tinham expressão aberrante de CD7, que foi menos frequente nos pacientes com alguma resposta, sinalizando para um possível fator prognóstico ou preditor de resposta. Outro achado que reforça possível implicação deste marcador com tipo de resposta é sua associação com maior risco de progressão de doença e resposta inferior ao tratamento clínico quando realizada regressão logística, e em conjunto com a mutação de *NF1*. Alhan e col. encontraram uma associação entre esta variável e uma resposta inferior ao tratamento clínico com 5-azacitidina em pacientes com SMD.⁶² Observamos ainda a manutenção da marcação de CD7 em precursores mieloides ao longo de todo o tratamento clínico, sem diferença na porcentagem de células positivas de acordo com o tipo de resposta. Este dado corrobora para uma persistência do clone leucêmico nestes pacientes apesar de resposta clínica, laboratorial e controle da mieloproliferação. Apesar da 5-azacitidina permitir o controle da doença, não é esperado a cura somente com o uso do agente hipometilante. Ainda não há estudos disponíveis se a resposta obtida com o uso dessa medicação antes do transplante pode ser traduzida em

melhora da sobrevida e diminuição das taxas de recaída.⁴⁹ A 5-azacitidina parece ter uma ação de melhorar a performance dos pacientes para o transplante, sem erradicar o clone de células doentes, como já descrito.

Ainda no compartimento de células CD34⁺, a redução observada de progenitores linfoides B, com ausência de H1 em maior número de pacientes tratados do que antes do tratamento pode ser secundária à toxicidade do hipometilante. Pacientes com LMMC tratados com hipometilante também mostraram a mesma distribuição de hematogônias tipo 1 do diagnóstico, sem incremento desta população.^{37,38}

O mesmo controle mieloproliferativo nas células CD34/CD117⁺ foi observado na população monocítica. Apesar da queda da proporção de monócitos, ela não foi acompanhada de um rearranjo das subpopulações monocíticas, com manutenção da porcentagem de monócitos clássicos após 3 ciclos de azacitidina nos 3 grupos de resposta. Esse dado nos permite inferir que apesar da redução de carga tumoral, o aumento de monócitos CD16⁺ persiste, inclusive com aumento da porcentagem/total de monócitos. Estudos recentes têm mostrado o papel dos monócitos CD14⁻CD16⁺ derivados de monócitos clássicos, que teriam uma função anti-inflamatória, na hemostasia sanguínea e na cicatrização tecidual, além de controle de disseminação de células tumorais metastáticas. No contexto de algumas doenças crônicas, como na artrite reumatóide e esclerose múltipla, esses mesmos monócitos não clássicos têm sido associados com um efeito inflamatório e até de auto-imunidade, embora os estudos sejam conflitantes.⁷⁴ Selimoglu-Buet e col. identificaram um envolvimento do miR-150 e TET3 na regulação da distribuição de monócitos; a deleção implica em divisões anormais das subpopulações. Na LMMC ocorre hipermetilação de um gene promotor do MiR-150, com consequente redução da expressão e assim redução de monócitos não clássicos circulantes.⁷⁵ Na LMMJ, o incremento de monócitos não clássicos em medula óssea observado ao diagnóstico e ao longo do tratamento com droga hipometilante parece mostrar uma patogênese distinta.

Estudo recente do comportamento das subpopulações monocíticas de pacientes com LMMC após tratamento com 5-azacitidina mostrou uma reorganização das subpopulações monocíticas naqueles com resposta à terapia. Na nossa coorte de pacientes com LMMJ houve uma queda dos monócitos totais, mais intensa após os primeiros 3 ciclos, com queda

proporcional dos 3 subtipos em relação ao total de células nucleadas. Porém, embora a proporção de monócitos clássicos em relação aos monócitos totais fique mantida, há rearranjo entre os monócitos CD16⁺ com aumento dos não clássicos, também mais intensa após os primeiros 3 ciclos.

Da população linfóide T, diminuída ao diagnóstico, observamos importante incremento com o tratamento, principalmente nos pacientes com resposta clínica completa. Este achado foi mais evidente com 3 ciclos da medicação e favorece um possível efeito imunomodulador da 5-azacitidina nestes pacientes e com resposta ótima nos ciclos iniciais da medicação. Infelizmente, não analisamos os diversos subtipos de linfócitos T e fizemos apenas um screening de linfócitos NK. Isto deverá ser feito prospectivamente nos pacientes inseridos no Grupo no futuro.

Vários estudos têm mostrado mecanismo de ação de medicações inibidoras da DNA metiltransferase como a 5-azacitidina in vitro e in vivo. Pacientes com síndrome mielodisplásica avançada se apresentam com valores de linfócitos T reguladores (Treg) elevados quando comparados a doadores de medula óssea. Respondedores ao tratamento com hipometilante evoluem com mudanças no perfil de linfócitos T CD4. É observada uma redução da população de Treg, desmetilação e aumento de expressão de linfócitos Treg FOXP3⁺ e aumento da produção de IL-17 (interleucina 17). Os linfócitos Treg perdem sua tradicional função imunossupressora, conferindo um papel imunomodulador à 5-azacitidina.⁷⁶⁻⁷⁹ O presente estudo não avaliou comportamento das subpopulações de linfócitos T, mas diante do incremento numérico desta população, tão reduzida ao diagnóstico, investigação adicional do papel da 5-azacitidina em pacientes pediátricos com doença de comportamentos mieloproliferativo e mielodisplásico se faz necessária, assim como acessar essa mudança de perfil de linfócitos Treg.

Todos os outros achados qualitativos descritos ao diagnóstico como alterações de maturação granulocítica, expressão reduzida de HLA-DR e redução de complexidade interna mantiveram-se ao longo do tratamento com 5-azacitidina, com 3 e 6 ciclos, e podem ser reflexo da toxicidade ao tratamento com 5-azacitidina e não de uma ausência de melhora da dispoiese medular.

Por fim, quando analisamos os pacientes com resultados nos 3 momentos de avaliação algumas características puderam ser observadas. Como os pacientes respondedores ao hipometilante, com redução de carga tumoral de doença, são pacientes com menores contagens de células CD34/CD117⁺ ao diagnóstico e durante o tratamento, este achado favorece a melhor resposta nos pacientes com menores porcentagens de precursores mieloides (melhor controle do comportamento mieloproliferativo); além disso, eles têm um aumento mais exuberante da população de linfócitos T que os outros pacientes indicando talvez papel imunomodulador da 5-azacitidina nos pacientes respondedores. Aparentemente a melhor resposta parece ser obtida com 3 ciclos de azacitidina, visto ser onde há redução significativa de precursores mieloides, aumento de linfócitos T, redução de monócitos, com apenas manutenção dos valores nos ciclos subsequentes naqueles pacientes com alguma resposta. Além disso, a perda desse imunofenótipo de respondedor foi observada nos pacientes que progrediram doença com 6 ciclos. Apesar da casuística pequena e estratificada pelos tipos de resposta clínica obtida, os resultados do presente estudo permitem inferir o melhor momento para o TCTH seja após 3 ciclos de medicação, com melhor controle do clone leucêmico, e risco de não manutenção da resposta com ciclos subsequentes. Os pacientes com NF1 e CD7 aberrante em precursores mieloides talvez sejam elegíveis ao transplante mais rapidamente devido aparente resposta inferior e progressão de doença com 5-azacitidina. Estudos com maior número de pacientes em cada estrato são necessários para confirmar estes achados.

Diante da dificuldade de acessar resposta à terapia dos pacientes com LMMJ somente com parâmetros clínicos, já que alguns pacientes podem permanecer com doença estável independente do tratamento, e com oscilações de tamanho de baço e leucometria, outros parâmetros de avaliação são necessários.^{49,53} A associação de avaliação de resposta genética pré-transplante aos parâmetros clínicos tem sido utilizada inclusive com implicações prognósticas. Hecht e col. descreveram uma casuística de 21 pacientes com LMMJ e evidenciaram uma sobrevida livre de eventos de 100% nos pacientes com resposta genética completa com terapia pré-transplante contra 61% no grupo de não respondedores.⁸⁰ De maneira semelhante, os parâmetros imunofenotípicos descritos, como a população CD34/CD117⁺ e linfócitos T, poderiam ser acrescentados na avaliação de resposta dos

pacientes com LMMJ submetidos o tratamento clínico, e comparados quanto ao impacto nas curvas de sobrevida.

Características imunofenóticas aberrantes não mudaram com o tratamento, e sugerem persistência do clone leucêmico. Um parâmetro imunofenotípico, a expressão antigênica aberrante de CD7, talvez seja uma variável a ser observada no acompanhamento pós-transplante dos pacientes com LMMJ para rápida detecção de recaída de doença, comum entre esses pacientes (40-50%).^{39,61}

Alguns grupos têm estudado o uso da 5-azacitidina após transplante naqueles pacientes com recaída de doença e como ponte para um segundo procedimento, ou como tratamento paliativo. O emprego como profilaxia para recaída, já que doença tem altas taxas de recaída pós TCTH ainda é uma questão em debate.^{49,67} No contexto pós-transplante, estudos avaliando o uso da 5-azacitidina em pacientes com SMD evidenciaram benefício naqueles pacientes com doença residual mínima positiva (DRM).⁸¹ Os achados do nosso estudo apontam para necessidade de avaliar essa população celular doente pós-transplante para identificar um clone residual com potencial impacto prognóstico, e até identificar uma população de pacientes com LMMJ que teriam benefício de tratamento adicional pós-transplante com droga hipometilante, semelhante ao descrito na SMD.

7. CONCLUSÕES

A imunofenotipagem por citometria de fluxo se mostrou uma ferramenta factível ao diagnóstico de pacientes com LMMJ, identificando características semelhantes às observadas em pacientes com síndrome mielodisplásica, além da mieloproliferação esperada pela doença. O imunofenótipo, apesar do pequeno número de pacientes, mostrou algumas alterações distintas àqueles encontrados na LMMC, principalmente na população monocítica, podendo a ICF auxiliar na distinção com outras neoplasias mieloides. Além disso, parece haver um imunofenótipo distinto de acordo com o perfil de mutação molecular observada, com características de maior agressividade como maiores populações de precursores mieloides e expressão aberrante de CD7 naqueles perfis mutacionais sabidamente de evolução mais agressiva.

Na evolução de resposta de pacientes com LMMJ sob tratamento clínico a imunofenotipagem também se mostrou viável na identificação de fatores de resposta e até preditores dessa, e poderia ser incorporada aos critérios clínicos na reavaliação. As populações de células CD34/CD117⁺ e de linfócitos T sofreram alterações evidentes de acordo com a resposta clínica observada. Além disso os status pré e pós transplante poderiam ser acessados na tentativa de identificar uma população de maior risco de recaída e assim com benefício de tratamentos adicionais.

O número de pacientes em cada grupo de resposta foi pequeno e estudos maiores são necessários para confirmar estes achados. E em estudos posteriores seria importante incluir avaliação do *status* imunofenotípico pré-transplante e pós-transplante, avaliar perfil de linfócitos T dos pacientes com LMMJ ao diagnóstico e com a imunomodulação secundária ao uso da 5-azacitidina, além de avaliação dos monócitos de sangue periférico.

8. REFERÊNCIAS

- 1 - Aricó M, Biondi A, Pui C-H. Juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 1997;90:479–488.
- 2 - Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20):2391-405.
- 3 - Castro-Malaspina H, Schaison G, Passet S, Pasquier A, Berger R, Bayle-Weisgerber C, Miller D, Seligmann M, Bernard J. Subacute and chronic myelomonocytic leukemia in children (juvenile CML). Clinical and hematologic observations, and identification of prognostic factors. *Cancer*. 1984;15;54(4):675-86.
- 4 - Niemeyer C, Aricó M, Basso G, Biondi A, Rajnoldi AC, Creutzig U, Haas O, Harbott J, Hasle H, Kendrup G. Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: a retrospective analysis of 110 cases. *Blood*. 1997;89(10): 3534-3543.
- 5 - Locatelli F, Alegri M, Merli P, Strocchio L. Novel approaches to diagnosis and treatment of Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Expert review of hematology*. 2018;11(2):129-143.
- 6 - Reisman LE and JM Trujillo. Chronic granulocytic leukemia of childhood: Clinical e cytogenetic studies. *The Journal of Pediatrics*. 1963;62(5): 710-723.
- 7 - Hardisty R, Speed DE, Till M. Granulocytic leukemia in childhood. *British Journal of hematology*. 1964;10(4): 551-566.
- 8 - Lopes LF, Oliveira AF. Definição, Histórico e Estudos descritos na literatura. Capítulo 1 em: *Mielodisplasia em Pediatria, 1º Edição*. Editora Lemar & Goi. 2019;21-34.

- 9 – Hasle H, Niemeyer C, Chessells J, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, Head DR. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 2003;17:277–282.
- 10 -Stiller CA, Chessells JM, Fitchett M. Neurofibromatosis and childhood leukemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study. *Br J Cancer*. 1997;70(5):969-72.
- 11 - Bader-Meunier B, Tchernia G, Mielot F, Fontaine JL, Thomas C, Lyonnet S, Lavergne JM, Dommergues JP. Occurrence of myeloproliferative disorder in patients with Noonan syndrome. *J Pediatric*. 1997;130(6):885-9.
- 12 – Loh ML and Dvorak CC. Juvenile myelomonocytic leukemia: molecular pathogenesis informs recurrent approaches to therapy and hematopoietic cell transplantation. *Frontiers in pediatrics*. 2014;2:25.
- 13 - Locatelli F, Niemeyer CM. How I treat Juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood Journal*. 2015;125(7):1083-90
- 14 - Hasle H. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood. *ASH Education Program Book*. 2016;(1):598-604.
- 15 - Niemeyer CM, Flotho C. Juvenile Myelomonocytic leukemia: who’s the driver at the wheel? *Blood*. 2019;133(10):1060-1070.
- 16 – Stieglitz E, Mazor T, Olshen AB, Geng H, Gelston LC, Akutagawa J, Lipka D, Plass C, Flotho C, Chehab FF, Braun BS, Costello JF, Loh ML. Genome-wide DNA methylation is predictive of outcome in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Commun*. 2017;8(1):2127.
- 17 - Murakami N, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Nagae G, Suzuki K et al. Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2018;131(14):1576-1586.

18 - Olk-Batz C, Poetsch AR, Nollke P, Claus R, Zucknick M, Sandrock I, Witte T, Strahm B, Hasle H, et al. Aberrant DNA methylation characterizes juvenile myelomonocytic leukemia with poor outcomes. *Blood*. 2011;117(18):4871-80.

19 - Hasle H. and Niemeyer C. Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. *British Journal of Hematology*. 2011;154(2): 185-195.

20 – Luna-Fineman S, Shannon KM, Atwater SK, Davis J, Masterson M, Ortega J, Sanders J, Steinherz P, Weinberg V, Lange BJ. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: a study of 167 patients. *Blood*. 1999 Jan 15;93(2):459-66.

21 - Passmore SJ, Chessels JM, Kempinski H, Hann IM, Brownbill PA, Stiller CA. Pediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia in the UK: a population-based study of incidence and survival. *British Journal Haematology*. 2003; 121:758-767.

22 - Marques MGA, Lee MLM and Kendrup GB. Blood and Bone Marrow Morphology in JMML. In: *Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children*. Lopes LF and Hasle H, 1^o Edition. Editora Lemar. 2003;197-207.

23 - Loh ML. Childhood myelodysplastic syndrome: focus on the approach to diagnosis and treatment of juvenile myelomonocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematologyc Education Program*. 2010;357-62.

24 - Pinkel D. Differentiating juvenile myelomonocytic leukemia from infectious disease. *Blood*. 1998;01;91(1):365-7.

25 - Manabe A, Yoshimasu T, Ebihara Y, Yagasaki H, Wada M, Ishikawa K, et al. Viral infections in Juvenile Myelomonocytic Leukemia: Prevalence and Clinical Implications. *J Pediatric Hematology Oncology*. 2004;Oct:26(10):636-641.

- 26 - Calvo KR, Price S, Braylan RC, Oliveira JB, Lenardo L, Fleisher TA, Rao VA. JMML and RALD (Ras-associated autoimmune leukoproliferative disorder): common genetic etiology yet clinically distinct entities. *Blood*. 2016, Apr 30 125(18):2753-8.
- 27 - Stieglitz E, Liu YL, Emanuel PD, Castleberry RP, Cooper TM, Shannon KM, Loh ML. Mutations in GATA2 are rare in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2014, Feb 27;123(9):1426-7.
- 28 - Emanuel PD, Bates LJ, Castleberry RP, Gualtieri RJ, Zuckerman KS. Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. *Blood*. 1991, Mar 1;77(5):925-9.
- 29 – Chang YH, Jou ST, Lin DT, Lu MY, Lin KH. Differentiating juvenile myelomonocytic leukemia from chronic myeloid leukemia in childhood. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26(4):236-42.
- 30 - Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Xiaoling S, Jochen B, Jung A, Hählen K, Hasle H, Licht JD, Gelb, BD. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2003 Jun;34(2):148-50.
- 31 - Flotho C, Valcamonica S, Mach-Pascual S, Schmahl G, Corral L, Ritterbach J, Hasle H, Aricò M, Biondi A, Niemeyer CM. RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia*. 1999 Jan;13(1):32-7.
- 32 - Chang TY, Dvorack CC, Loh ML. Bedside to bench in juvenile myelomonocytic leukemia: insights into leukemogenesis from a rare pediatric leukemia. *Blood*. 2014 Oct 16;124(16):2487-97.
- 33 – Stieglitz E, Taylor-Weiner AN, Chang TY, Gelson LC, Wang YD, Mazot T, Esquivel E, Yu A, et al. The genomic landscape of juvenile myelomonocytic leukemia. *Nature Genetics*. 2015;47(11):1326-1333.

- 34 - Hasegawa D, Bugarin C, Giordan M, Bresolin S, Longoni D, Micalizzi C, Ramenghi U, Bertania A, Basso G, Locatelli F, Biondi A, Gaipa G. Validation of flow cytometric phospho-STAT5 as a diagnostic tool for juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2013 Nov; 3(11): e160.
- 35 - Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheickh et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2015;125:3618-26.10.1182.
- 36 - Hudson CA, Burack WR, Bennet JM. Emerging utility of flow cytometry in the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia Research.* 2018;13:12-15.
- 37 - Picot T, Aanei CM, Gresta PF, Noyel P, Tondeur S, Tavernier ET, et al. Evaluation by Flow Cytometry of Mature Monocyte Subpopulations for the Diagnosis and Follow-Up of Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Frontiers in Oncology.* 2018 April 12;8:109.
- 38 - Shen Qi, Ouyang J, Tang G, Jabbourz EJ, Garcia-Manero G, Routbort M, Konoplev S, Bueso-Ramos C, Medeiros J, Jorgensen JL, Wang AS. Flow cytometry immunophenotypic findings in chronic myelomonocytic leukemia and its utility in monitoring treatment response. *European Journal Haematology.* 2014 Aug;95(2):168-76.
- 39 - Locatelli F, Nollke P, Zecca M, Korthof E, Lanino E, Peters C, Pession A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):410-9.
- 40 - Matsuda K, Shimada A, Yoshida N, Ogawa A, Watanabe A, Yajima S, et al. Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5477-80.

- 41 - Passmore SJ, Hann IM, Stiller CA, Ramani P, Swansbury GJ, Gibbons B, Reeves BR, Chessells JM. Pediatric myelodysplasia: a study of 68 children and a new prognostic scoring system. *Blood*. 1995 Apr 01;85(7):1742-50.
- 42 - Lipka DB, Witte T, Toth R, Yang J, Wiesenfarth M, Nöllke P, Fischer A, et al. RAS-pathway mutation patterns define epigenetic subclasses in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nature Communications*. 2017; 8: 2126.
- 43 - Loh ML, Tasian SK, Rabin KR, Brown P, Magoon D, Reid JM, Chen X, Ahern CH, Weigel BJ, Blaney SM. A phase 1 dosing study of ruxolitinib in children with relapsed or refractory solid tumors, leukemias, or myeloproliferative neoplasms: A Children's Oncology Group phase 1 consortium study (ADV11011). *Pediatric blood & cancer*. 2015 Oct;62(10):1717-24.
- 44 – Lee MLM, Villela NC, Lopes LF. Tratamento Conservador, suporte ou quimioterápico. Capítulo 14 em: Síndromes mielodisplásicas em Pediatria, de Lopes LF, 1º Edição. Editora Lemar&Goes. 2019;245-256.
- 45 – Vidal DO, Paixão MB, Souto EX, Caballero OL, Lopes LF, Vettore AL. Aberrant methylation in pediatric myelodysplastic syndrome. *Leukemia research*. 2007;31(2):175-181.
- 46 – Wilhelm T, Lipka DB, Witte T, Wierzbinska JA, Fluhr S, Claus R, Nolke P. Epigenetic silencing of AKAP12 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Epigenetics II*. 2016;11(2):110-9.
- 47 - Flotho C. Gene mutations do not operate in a vacuum: the increasing importance of epigenetics in juvenile myelomonocytic leukemia. *Epigenetics*. 2019; 14(3): 236–244.
- 48 - Furlan I, Batz C, Flotho C, Mohr B, Lubbert M, Suttorp M and Niemeyer CM. Intriguing response to azacitidine in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia and monosomy 7. *Blood*. 2009 Mar 19;113(12):2867-8.

49 - Flotho C, Sommer S, Lubbert M. DNA-hypomethylating agentes as epigenetic therapy before and after alogenic hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia. *Seminars in cancer biology*. 2019.

50 - Villela NC, Gouveia RV, Seber A. Tratamento com drogas hipometilantes, Capítulo 16, Em: Síndromes Mielodisplásicas em Pediatria, de Lopes LF 1ª Edição. Editora Lemar&Goes. 2019;269-277.

51 - Cseh A, Niemeyer CM, Yoshimi A, Dworzak M, Hasle H, van den Heuvel-Eibrink MM, Locatelli F et al. Bridging to transplant with azacitidine in juvenile myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of the EWOG-MDS study group. *Blood*. 2015 Apr 2;125(14):2311-3.

52 - Castleberry RP, Loh ML, Jayaprakash N, et al. Phase II window study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 (Zarnestra (R)) in untreated juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): A children's oncology group study. *Blood*. 2005;106(11):727A-728A.

53 - Bergstraesser E, Hasle H, Rogge T, Fischer A, Zimmermann M, Noellke P, et al. Non hematopoietic stem cell transplantation treatment of juvenile myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis and definition of response criteria. *Pediatric Blood Cancer*. 2007;49(5):629-33.

54 - Niemeyer C, Loh LM, Cseh A, Cooper T, Dvorak C, Chan R, et al. Criteria for evaluating response and outcome in clinical trials for children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015 Jan;100(1):17-22.

55 – Fonte NAP Pediatria – Hospital de Câncer InfantoJuvenil de Barretos. 2020.

56 - Oliveira AF, Tansini A, Vidal DO, Lopes LF, Metze K, Lorand-Metze I. Characteristics of the phenotypic abnormalities of bone marrow cells in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatric Blood Cancer*. 2017;Apr64(4).

57 - Van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, Della Porta MG, Drager AM, Feuillard J. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94, 1124– 1134.

58 - Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CSP, Batista LS, Metze K. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk Res*. 2007;31:147–155.

59 - Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, Yamashita T, Tamura H, Tsukada J, Dan K. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica*. 2009 Aug; 94(8): 1066–1074.

60 - Lorand-Metze I, Longuini AL, Oliveira-Duarte G, Correia RP, Santos Silva MC, Yamamoto M, Sandes AF, Oliveira AF, Souto EX, Ikoma MRV, Pereira-Cunha FG, Beltrame M, Metze K. Normal variation of bone marrow B-cell precursors according to age – reference ranges for studies in myelodysplastic syndromes in Brazil. *Cytometry B Clinical Cytometry*. 2018; 94(5):644-650.

61 – Manabe A, Okamura J, Yumura-Yagi K, Akiyama Y, Sako M, Uchiyama H, Kojima S, Koike K, Saito T, Nakahata T. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on the criteria of the International JMML Working Group. *Leukemia*. 2002;16: 645-649.

62 - Alhan C, Westers TM, Van der Helm LH, Eeltink C, Huls G, Witte BI., Buchi F, Santini V, Ossenkoppele GJ, Van de Loosdrecht AA. Absence of aberrant myeloid progenitors by flow cytometry is associated with favorable response to azacitidine in higher risk myelodysplastic syndromes. *Cytometry part B*. 2014;86B: 207 – 2015.

63 - Veltroni M, Sainati L, Zecca M, Fenu S, Tridello G, Testi AM, et al. Advanced pediatric myelodysplastic syndromes: can immunophenotypic characterization of blast cells be a diagnostic and prognostic tool? *Pediatric Blood Cancer*. 2009;52:357-363.

64 – Ogata K, Nakamura K, Yokose N, Tamura T, Tachibana M, Taniguchi O, et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002, 1;100(12):3887-96.

65 – Aalbers A, Van den Heuvel-Eibrink MM, Baumann I, Dworzak M, Hasle H, Locatelli F, et al. Bone marrow immunophenotyping by flow cytometry in refractory cytopenia of childhood. *Haematologica*. 2015 Mar;100(3):315-23.

66 – Niemeyer CM. JMML genomics and decisions. *Hematology*. 2018;307-312.

67 – Yoshimi A, Mohamed M, Bierings M, Urban C, Korthof E, Zecca M, Sykora KW et al. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) results in outcome similar to that of first HSCT for patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;(3)556-560.

68 – Feng R, Raj Bhatt V, Fu K, Pirruccello S, Yuan J. Application of immunophenotypic analysis in distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018, Nov;94(6):901-909.

69 - Subira D, Font P, Villalon L, Serrano C, Askari E, Góngora E, Castañón S, Gonzalo R, Mata R, Román A, Llamas P. Immunophenotype in chronic myelomonocytic leukemia: is it closer to myelodysplastic syndromes or to myeloproliferative disorders? *Transl Res*. 2008;151:240–5.

70 - Talati C, Zhang L, Shaheen G, et al. Monocyte subset analysis accurately distinguishes CMML from MDS and is associated with a favorable MDS prognosis. *Blood*. 2017; 129(13):1881-1883.

71 - Gadgeel M, Bagla S, Buck S, Shamoun M, Ravindranath Y. CD14/16 monocyte profiling in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2020 Jul 10;e28555.

72 – Niero L, Lee MLM, Oliveira AF. Diagnóstico Morfológico em síndrome mielodisplásicas, capítulo 4. Em: Síndromes Mielodisplásicas em Pediatria, de Lopes LF 1ª Edição. Editora Lemar&Goes. 2019;71-85.

73 - Sconocchia G, Keyvanfar K, El Ouriaghli F, Grube M, Rezvani K, Fujiwara H, McCoy JP Jr, Hensel N, Barrett AJ. Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte. *Leukemia*. 2005;19:69–76.

74 - Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, and Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2019;37:439-456.

75 – Selimoglu-Buet D, Rivière J, Ghamloul H, Bencheikh L, Lacout C, Morabito M, et al. A miR-150/TET3 pathway regulates the generation of mouse and human non-classical monocyte subset. *Nature Communications*. 2018;9:5455.

76 - Lindblad KE, Goswami M, Hourigan CS, Otjen KA. Immunological effects of hypomethylating agents. *Expert Rev Hematol*. 2017; 10(8):745-752.

77 - Costantini B, Kordasti SY, Kulasekararaj AG, Jiang J, Seidl T, Abellan PP, et al. The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2013; 98(8): 1196-1205.

78 - Jia X, Yang W, Zhou X, Han L, Shi J. Influence of demethylation on regulatory T and Th17 cells in myelodysplastic syndrome. *Oncology Letter*. 2020; 19(1):442-448.

79 - Fozza C, Corda G, Barraqueddu F, Viridis P, Contini S, Galleub A, Isoni A, et al. Azacitidine improves the T-cell repertoire in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia. *Leukemia Research*. 2015.

80 – Hecht A, Meyer J, Cghehab FF, White KL, Magruder K, Dvorak CC, Loh ML, Stieglitz E. Molecular assessment of pretransplant chemotherapy in the treatment of juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*. 2019;66 e27948.

81 - Platzbecker U, Middeke JM, Sockel K, Herbst R, Wolf D, et al. Measurable residual disease-guided treatment with azacitidine to prevent haematological relapse in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia (RELAZA2): an open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Dec;19(12):1668-1679.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização Imunofenotípica da Síndrome Mielodisplásica em Pediatria e dos diagnósticos diferenciais. Definição de critérios diagnósticos e prognósticos dos pacientes com SMD. **Pesquisador:** Anita Frisanco Oliveira **Área**

Temática:

Versão: 5

CAAE: 54386316.0.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.391.618

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1274167_E2.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 31/05/2019)

RESUMO:

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) são doenças raras em pediatria. A imunofenotipagem foi incluída em 2008 no work-up diagnóstico do Grupo Brasileiro de SMD em Pediatria. Porém são poucos os estudos que abordam os achados da imunofenotipagem por citometria de fluxo em pediatria bem como identificação de fatores prognósticos nos marcadores encontrados. Objetivo: Caracterizar os achados imunofenotípicos dos diferentes subtipos de SMD em pediatria ao diagnóstico e ao longo de tratamento com hipometilantes, e identificar fatores prognósticos e de resposta terapêutica. Materiais e métodos: será realizado um estudo prospectivo observacional em uma coorte de 80 pacientes (amostra por conveniência) com diagnóstico de SMD, até 18 anos de idade. Os dados serão analisados no programa estatístico SPSS v.21.

INTRODUÇÃO:

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) compreende um grupo heterogêneo de desordens clonais da hematopoiese que variam quanto progressão e riscos. Em pediatria é dividida segundo a classificação OMS nas seguintes categorias: Citopenia Refratária (CR), Anemia Refratária com Excesso de Blastos e em transformação (AREB e AREB-t); Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) nas doenças mieloproliferativas/mielodisplásicas; e SMD/LMA relacionada ao paciente com síndrome de Down (Hasle et al., 2003). Dentro do seu espectro variado, a doença pode evoluir tanto para leucemia mieloide aguda (LMA) ou para um quadro de citopenia progressiva e falência medular (Malcovati et al., 2005). A determinação dos fatores prognósticos associados a esta evolução já são bem definidos em adultos, com scores clínicos estabelecidos como o IPSS – R (International Prognostic Scoring System – Revised) e WPSS (WHO classification based Prognostic Score System) (Greenberg et al., 2012 Malcovati et al., 2011). O IPSS é baseado em 3 pilares: porcentagem de blastos, citogenética e número de citopenias no sangue periférico, e classifica os pacientes em quatro diferentes grupos de acordo com o risco de evoluir para LMA. (Della Porta et al., 2012). No contexto da oncologia pediátrica, a SMD figura como uma patologia rara com taxa de incidência anual de 0.8 a 1.8 por milhão de crianças de 0 a 14 anos (Passmore et al., 2003 Hasle et al., 2003) e diferentemente da bem estabelecida estratificação de risco em adultos são poucos os trabalhos realizados com esses pacientes (Albers et al., 2015 Lorand-Metze et al., 2007 Veltroni et al., 2009). Dentro da classificação de SMD em pediatria merece um parágrafo a parte a Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ) que diferente dos demais subtipos da doença é uma patologia que assume um comportamento mieloproliferativo (Hasle et al., 2003). Com maior incidência em pacientes até 2 anos de idade, o diagnóstico se baseia em achados clínicos e laboratoriais e se caracteriza por uma proliferação descontrolada de leucócitos e monócitos (>1000 monócitos em sangue periférico), com pesquisa de mutação BCRABL necessariamente negativa, frequente aumento da hemoglobina fetal (principalmente nos pacientes com cariótipo normal), e esplenomegalia (Baumman et al., 2008 Aricó et al., 1997). Em 90% dos casos encontramos mutação somática em um dos genes: NF1, PTPN11, KRAS, NRAS, CBL (Locatelli et al., 2015). A baixa incidência destas doenças, < 5% do total de neoplasias hematológicas em crianças até 14 anos de idade (Lopes et al., 1999), tem impacto

direto no atraso do diagnóstico e do início da terapêutica adequada com consequente piora da sobrevida desses pacientes. Além disso, dificulta novas pesquisas na definição dos fatores prognósticos e de resposta terapêutica neste grupo. Em 1997, no Brasil, foi fundado o Grupo Cooperativo Brasileiro de Síndrome Mielodisplásica em Pediatria (GCB – SMD – PED). Com o objetivo inicial de estudar esta doença rara da faixa etária

pediátrica (até 18 anos de idade) o grupo oferecia suporte para revisão de casos suspeitos e auxílio com ferramentas diagnósticas novas como a biologia molecular. O GCB-SMD-PED é formado por hematologistas, pediatra-hematologistas e pediatra-oncologistas, e se subdivide em comitês de morfologia/citometria de fluxo, falências medulares, SMD secundária, doenças mieloproliferativas, genética, tratamento, epidemiologia e Síndrome de Down. Com sede no Hospital de Câncer Infanto-juvenil de Barretos desde 2013 o grupo já recebeu um total de 536 crianças desde o início de sua atuação e teve um aumento nos últimos anos atribuído a estratégia de divulgação da doença e seus critérios diagnósticos; cerca de 5 pacientes são encaminhados de todo território brasileiro ao mês com suspeita diagnóstica de SMD. No período de 2013 a 2015 foram 146 pacientes inscritos, 28,7% com diagnóstico confirmado de SMD. Atualmente, além de propiciar treinamento dos profissionais que encaminham estas crianças, o grupo oferece também possibilidade de tratamento para os casos confirmados com uso de medicações hipometilantes (Azacitidina) e o transplante de medula óssea no Hospital de Câncer de Barretos. A imunofenotipagem por citometria de fluxo, incluída no “work-up” diagnóstico de crianças do GCB-SMD-PED em 2008, constitui parte integrante no diagnóstico das neoplasias hematológicas em geral, estando bem padronizada como técnica diagnóstica auxiliar da SMD de adultos. Permite a diferenciação da SMD de citopenias periféricas reacionais (não clonais) principalmente em pacientes com cariótipo normal e poucas atipias na citologia da medula óssea (Westers et al., 2012). Embora ainda não incluída em scores prognósticos, numerosos trabalhos vêm demonstrando que a

82

imunofenotipagem permite a identificação de fatores implicados com o prognóstico e resposta terapêutica (Alhan et al., 2014). O score gerado pelas alterações encontradas na imunofenotipagem, o FCSS (Flow Cytometry Scoring System) foi considerado em vários estudos como complementar ao score clínico IPSS, já que permitiria a identificação de alterações na amostra ainda não vistas através da análise morfológica (Malcovatti et al., 2011 Van de Loosdrecht et al., 2009 Reis-Alves et al., 2013) Entre os achados da imunofenotipagem, o número de alterações encontradas, o aumento de células CD34+ mieloides e o achado de co-expressões aberrantes nestas células têm sido associados a uma doença mais agressiva e à progressão. (Van de Loosdrecht et al., 2009). Nos casos pediátricos, pela menor prevalência da doença, a imunofenotipagem como parte integrante do fluxo diagnóstico ainda é uma ferramenta em implementação. Porém já é demonstrada a sua importância na análise de diagnósticos diferenciais como no caso das citopenias refratárias com medula óssea hipocelular (Aalbers et al., 2015) e na identificação dos clones aberrantes nos pacientes com excesso de blastos (Veltroni et al., 2009). Na LMMJ, a imunofenotipagem auxilia na diferenciação com outras doenças que cursam

com monocitose e mimetizam doença mieloproliferativa, como as infecções virais exemplificadas pelo citomegalovírus e herpes vírus tipo 6, principalmente naqueles pacientes com pesquisa negativa das mutações gênicas associadas. (Hasegawa et al., 2013). Mas nesta doença há poucos relatos das características imunofenotípicas, bem como o seu significado prognóstico. Justificativa: Como a síndrome mielodisplásica/mieloproliferativa é um grupo de doenças raras em pediatria são poucos os trabalhos que demonstram a importância dos achados imunofenotípicos destes pacientes ao diagnóstico. Não é bem estabelecida a relação entre os marcadores encontrados pela citometria de fluxo e a sua importância prognóstica. Além disso, seu valor para acompanhamento de resposta terapêutica também não está estabelecido. A imunofenotipagem foi incluída na avaliação diagnóstica dos pacientes inscritos no GCB – SMD – PED em 2008 e desde esta data os pacientes

inscritos no grupo com suspeita de SMD tem a análise imunofenotípica incluída entre as ferramentas diagnósticas juntamente com a avaliação morfológica da medula óssea (citologia e histologia), citogenética, genética clínica, biologia molecular e os dados clínicos. Portanto a análise destes dados permitiria a caracterização do perfil imunofenotípico da doença nas suas diferentes apresentações quando comparado a casos com medula normal – casos controles (não neoplásicos); possibilitaria a identificação de marcadores com potencial valor prognóstico e ainda de sucesso terapêutico com o tratamento proposto pois a maioria das crianças com indicação de tratamento são reavaliadas no Hospital de Câncer infanto-juvenil de Barretos, sede do GCB-SMD-PED.

HIPÓTESE:

A imunofenotipagem por citometria de fluxo permitirá identificar populações clonais, expressões aberrantes e padrão de maturação de granulócitos além da definição de subpopulações celulares. Cada subtipo de síndrome mielodisplásica terá suas particularidades imunofenotípicas o que auxiliará no diagnóstico diferencial; além disso a expressão de marcadores anormais em alguns grupos celulares como blastos e monócitos e porcentagem de blastos identificados ao diagnóstico serão marcadores prognósticos e de resposta ao tratamento com hipometilantes.

Objetivo da

Pesquisa: OBJETIVO

PRIMÁRIO:

Caracterização e comparação das diferentes formas de mielodisplasia (AREB, CR, LMMJ) em relação aos achados da imunofenotipagem por citometria de fluxo.

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

- 1- Caracterização dos subgrupos de SMD diagnosticados pelo GCB – SMD - PED e grupo controle quanto suas características sociodemográficas e clínicas de maneira retrospectiva para aqueles já com análise imunofenotípica e prospectiva para

pacientes que ainda serão incluídos com esse diagnóstico ao longo da realização do projeto.

2- Comparação dos achados da imunofenotipagem ao diagnóstico dos pacientes com LMMJ, AREB, CRe controle quanto às populações de células identificadas (linfócitos T, monócitos e hematogônias por exemplo), expressão de marcadores aberrantes, padrão de maturação, número de alterações encontradas, quantidade de blastos.

3- Avaliar as mudanças no perfil imunofenotípico dos pacientes com LMMJ após o tratamento com azacitidina:

- Avaliar o papel da azacitidina nas diferentes populações avaliadas pela imunofenotipagem.

- Encontrar alterações na imunofenotipagem que preveem resposta clínica e evolução pós transplante.- Comparar as características imunofenotípicas dos pacientes com resposta completa, resposta parcial ou ausência de resposta clínica e quanto resposta molecular.

4- Identificar possíveis fatores prognósticos nos pacientes com SMD pediátrica através da imunofenotipagem

5- Caracterização imunofenotípica e sociodemográfica dos pacientes encaminhados ao GCB - SMD PED e com diagnóstico descartado de síndrome mielodisplásica após análise dos subcomitês responsáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

Neste projeto será avaliado o resultado de exames que já estão implementados na rotina diagnóstica dos pacientes encaminhados ao Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos com suspeita de SMD. O desenvolvimento deste projeto não resultará em riscos adicionais aos participantes de pesquisa. Entretanto, mesmo que mínimo, há o risco de quebra acidental de sigilo sobre as informações pessoais e clínicas dos participantes incluídos no estudo. Os pesquisadores envolvidos se comprometeram a garantir o sigilo de todos os participantes, não divulgando publicamente o nome ou qualquer outra informação que possa identificar os envolvidos neste estudo.

BENEFÍCIOS:

O desenvolvimento deste estudo não resultará em benefícios diretos aos participantes, entretanto pode contribuir no estabelecimento de novos parâmetros para auxiliar o diagnóstico de pacientes com síndrome mielodisplásica no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

RESPOSTAS REFERENTES AS PENDÊNCIAS EMITIDAS NO PARECER DE EMENDA N°3.136.251:

1. Na nova versão do projeto apresentado não foi realizada a alteração solicitada no item 4 do pedido de emenda, ou seja, o desmembramento do Objetivo. Solicita-se adequação.

- **RESPOSTA PESQUISADOR:** Foi adicionado no projeto final o desmembramento do objetivo 3 que será **foco do projeto de doutorado nas pag7 e 8, grifado em amarelo.**

- **ANÁLISE CEP:** PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 1119/2016, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetida em 31/05/2019;

Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- (x) O Estudo deve Continuar;
- () O Estudo dever ser Interrompido;
- () O Estudo está Finalizado;
- () Solicita-se Esclarecimento;

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1274167_E2.pdf	31/05/2019 11:03:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	mestradofinalE2_1.doc	31/05/2019 11:02:34	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	Carta_pendecia.pdf	31/05/2019 11:00:13	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_Pendencias.docx	31/05/2019 11:00:00	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	emendaAnita2.docx	10/12/2018 16:54:51	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	mestradofinalE2.doc	10/12/2018 16:54:03	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	Formulario_para_Emenda.pdf	08/06/2016 11:05:39	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	Formulario_para_Emenda.doc	08/06/2016 10:59:54	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_a_Pendencia2.docx	28/04/2016 16:17:16	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	mestradofinalNovo2.doc	28/04/2016 16:16:44	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_a_Pendencia.docx	28/04/2016 14:15:52	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	mestradofinalNovo.doc	27/04/2016 12:32:47	Anita Frisanco Oliveira	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoAssentimento12a18anosNovo.doc	27/04/2016 12:22:40	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoAssentimento6a11anosnovo.doc	27/04/2016 12:15:52	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NOVO.DOCX	27/04/2016 12:01:56	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	Ficha_6_SMD_v1_2_01_2015_Genetica.pdf	11/04/2016 10:34:02	Bruna Aline Roque Alves	Aceito
Outros	Ficha_5_SMD_v1_1_03_2016_Imunofenotipagem.pdf	11/04/2016 10:33:45	Bruna Aline Roque Alves	Aceito

Página 07 de

Outros	Ficha_4_SMD_v1_1_09_2014_Citogenetica.pdf	11/04/2016 10:29:46	Bruna Aline Roque Alves	Aceito
Outros	Ficha_3_SMD_v1_2_02_2015_Histologia.pdf	11/04/2016 10:29:17	Bruna Aline Roque Alves	Aceito
Outros	Ficha_2_SMD_v1_4_02_2015_Citologia.pdf	11/04/2016 10:28:54	Bruna Aline Roque Alves	Aceito
Outros	Ficha_1_SMD_v1_2_03_2015_Identificacao.pdf	11/04/2016 10:28:18	Bruna Aline Roque Alves	Aceito
Outros	Fontedefinanciamiento1.pdf	17/03/2016 18:37:15	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostofinal.pdf	17/03/2016 18:36:13	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoAssentimento12a18anos.doc	17/03/2016 14:01:07	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TermoAssentimento6a11anos.doc	17/03/2016 14:00:51	Anita Frisanco Oliveira	Aceito

Ausência				
Outros	Ciencia_e_Autorizacao.pdf	16/03/2016 16:45:50	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	CadastrodoProjeto.pdf	16/03/2016 16:38:30	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	mestradofinal.doc	16/03/2016 16:37:25	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Responsabilidade.pdf	16/03/2016 16:32:40	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
Outros	MABIN.pdf	16/03/2016 16:29:56	Anita Frisanco Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	16/03/2016 16:25:32	Anita Frisanco Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FICHA DE COLETA

Serviço de origem			
1	ID Coleta	1	
2	Origem (Cidade/Estado) Descrever_____	2	
3	ID GCB-SMD Ped	3	
4	RH no HCB	4	
5	Paciente Descrever_____	5	
6	Data de nascimento (não precisa incluir no banco novamente) DD/MM/AAAA	6	__/__/____
7	Diagnóstico final WHO 2016	8	
Dados sobre a coleta			
8	Data de coleta no grupo SMD DD/MM/AAAA	8	__/__/____
9	Momento da avaliação 1- Diag 2- 3 ciclos 3- 6 ciclos	9	
10	Idade na data da Coleta em meses	10	
11	Esplenomegalia ao exame físico 1- Sim 2- Não	11	
12	Medida (cm)	12	
13	US abdome com esplenomegalia 1- Sim 2- Não 3- Não realizado	13	
14	Medida (cm)	14	
Hemograma			
15	Hemoglobina (Hb)	15	
16	Hematócrito (Ht) em %	16	
17	VCM	17	
18	HCM	18	
19	Leucócitos	19	
20	Promielócitos %	20	
21	Mielócitos %	21	
22	Metamielócitos %	22	
23	Bastão %	23	

24	Segmentados %	24	
25	Eosinófilos %	25	
26	Linfócitos %	26	
27	Monócitos %	27	
28	Blastos em %	28	
29	Plaquetas	29	
Mielograma			
30	Blastos %	30	
31	Displasia linhagens Descrever _____	31	
Outros exames			
32	Citogenética/Cariótipo Descrever _____	32	
33	Painel Molecular 1- Sim 2- Não	33	
34	Resultado Painel Molecular Descrever _____	34	
35	Hemoglobina Fetal	35	
Série granulocítica			
36	Série granulocítica % %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	36	
37	SSC gran 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	37	
38	IMF CD45 gran/IMF CD45 linfo 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	38	
39	Padrão CD13/CD16 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	39	
40	Padrão CD11b/CD16 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	40	
41	Padrão CD13/CD11b 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	41	
42	Expressão aberrante de CD34 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	42	
43	Expressão aberrante de CD7 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	43	
44	Expressão aberrante de CD19 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	44	
45	Expressão de CD56 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	45	
46	Desvio à esquerda assíncrono 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	46	
Série monocítica			
47	Série monocítica % %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	47	
48	Granularidade 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	48	
49	%Monócitos CD14+/CD16-	49	

50	% Monócitos CD14+/16+	50	
51	% Monócitos CD14-/CD16+	51	
52	%Precusores mononocíticos	52	
53	Padrão anormal HLA-DR 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	53	
54	Expressão de CD56 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	54	
55	Expressão aberrante de CD34 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	55	
56	Expressão aberrante de CD7 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	56	
57	Expressão aberrante de CD19 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	57	
Blastos			
58	% CD34 %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	58	
59	CD34 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	59	
60	% Células precursoras B %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	60	
61	Células precursoras B 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	61	
62	% CD34+/CD13+/CD117+ %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	62	
63	CD34+/CD13+/CD117+ 1- Normal; 2- Alterado; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	63	
64	Expressão anormal de CD7 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	64	
65	Expressão anormal de CD56 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	65	
66	Assincronismo maturativo (CD11b, CD15) 0- Ausente; 1- Presente; 3- Não realizado; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	66	
67	Linfócitos T %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	67	
68	Linfócitos NK %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	68	
69	Hematogonia tipo I (CD34 CD19 CD10) %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	69	
70	Hematogonia tipo II (CD19 CD10) %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	70	
71	Linfócitos B maduros %; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	71	
72	Total de alterações 888- Não se aplica; 999- Ignorado	72	
Tratamento			
73	Realizou tratamento 1- Sim 2-Não	73	
74	Azacitidina 1- Sim 2- Não	74	
75	TMO 1- Sim 2- Não	75	
76	Data TMO DD/MM/AAAA	76	__/__/__

77	Óbito	1- Sim 2- Não	77	
78	Data óbito	DD/MM/AAAA	78	__/__/____
79	Data Última informação	DD/MM/AAAA	79	__/__/____

Immunophenotypic characteristics of juvenile myelomonocytic leukaemia and their relation with the molecular subgroups of the disease

Anita Frisanco Oliveira,^{1,2} Aline Tansini,^{1,2} Thais Regina Toledo,^{1,3} Rafael Balçairo,^{1,2} Daniel Onofre Vidal,⁴ Maria Lucia de Martino Lee,^{1,5} Irene Lorand-Metzé^{2,6} and Luiz Fernando Lopes^{1,4}

¹Barretos Children's Cancer Hospital, ²Brazilian Co-operative Study Group for Paediatric Myelodysplastic Syndrome (GCB-SMD-PED) – Morphology and Flow Cytometry Committee, ³GCB-SMD-PED – Flow cytometry Committee, ⁴GCB-SMD-PED – Molecular Biology and Genetic Committee, ⁵GCB-SMD-PED – Morphology and Myeloproliferative Diseases Committee, and ⁶GCB-SMD-PED – Chairman, Barretos, São Paulo, Brazil

Received 8 July 2020; accepted for publication 18 August 2020

Correspondence: Anita Frisanco Oliveira, Barretos Children Cancer Hospital, Av. João Baroni 3025, ZC 14784-390 Barretos – São Paulo, Brazil.

E-mail: anita_frisanco@yahoo.com.br

Abstract

The diagnosis of juvenile myelomonocytic leukaemia (JMML) is based on clinical, laboratory and molecular features but immunophenotyping [multiparametric flow cytometry (MFC)] has not been used routinely. In the present study, we describe the flow cytometric features at diagnosis with special attention to the distribution of monocytic subsets and the relation between MFC and molecular subgroups. MFC was performed with an eight-colour platform based on Euroflow. We studied 33 JMML cases. CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ cells >2% was found in 25 cases, and 51.5% presented an aberrant expression of CD7. A decrease of CD34⁺/CD19⁺/CD10⁺ cells was seen in eight cases and in four they were absent. The granulocytic population had a decreased side scatter in 29 cases. Bone marrow monocytic precursors were increased in 28 patients, with a decrease in classical monocytes (median 80.7%) and increase in CD16⁺ (intermediate and non-classical). A more pronounced increase in myeloid CD34⁺ cells was seen in patients with Neurofibromatosis type 1 (*NF1*) and tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (*PTPN11*), with aberrant CD7 expression in four of six and 10/12 patients respectively. Thus, JMML shows an immunophenotypic profile similar to myelodysplastic syndromes, and a different monocyte subset distribution when compared with chronic MML. MFC proved to be an important diagnostic tool that can help in differential diagnosis with other clonal diseases with monocytosis.

Keywords: juvenile myelomonocytic leukaemia, flow cytometry, CMML, myelodysplastic syndrome, molecular subtypes.

Juvenile myelomonocytic leukaemia (JMML) is a rare clonal haematopoietic disease responsible for ~3% of all paediatric haematological malignancies and more common during early childhood (half of cases aged <2 years). With an incidence of approximately 1.2/1,000,000 children aged 0–14 years, JMML has characteristics from both myelodysplastic and myeloproliferative syndromes.^{1–3} The major diagnostic criteria according to the 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukaemia include clinical, laboratory and molecular findings, such as splenomegaly, monocytosis in peripheral blood (PB) (>1.0 × 10⁹/l), breakpoint cluster region-Abelson (*BCR-ABL*) rearrangement negative and bone marrow (BM) blasts of <20%.^{2,4} Just one-third of the patients present an

abnormal karyotype and monosomy 7 is the most frequent finding.^{5,6}

More than 80% of patients with JMML present a mutation in the Rat Sarcoma (RAS) signalling pathway, considered the main driver, including the genes tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (*PTPN11*), KRAS proto-oncogene, GTPase (*KRAS*), NRAS proto-oncogene, GTPase (*NRAS*), Casitas B-lineage lymphoma (*CBL*) and Neurofibromatosis type 1 (*NF1*).^{7–9} According to the mutated gene, a different clinical presentation and outcome are expected.^{6,10} In ~15% of the cases, no molecular marker can be identified, and minor diagnostic criteria are necessary to establish differential diagnosis, mainly with other myeloproliferative conditions like chronic myeloid leukaemia and myeloproliferation

ANEXO D - Tabela 14 – Características clínicas e laboratoriais dos 2 pacientes com negatização de *PTPN11* após 6 ciclos de azacitidina.

	Idade Meses	Molecular	Cariótipo	Baço cm diag	Leucócitos diag	Plaquetas diag	%Blastos MO	%CD34/CD117 diag	%CD34/CD117 6 ciclos	%Linfócitos T diag	% Linfócitos T 6 ciclos
Paciente 6	17	PTPN11	normal	0	20.000	144.000	6	3	NA	8,2	NA
Paciente 9	46	PTPN11	-7	6	22.900	84.000	4,8	3,4	0,71	2,7	24,1

NA = não avaliável. Amostra hemodiluída prejudicando análise imunofenotípica.

ANEXO E – Tabela 15 - Características clínicas, laboratoriais, imunofenotípicas e resposta dos 21 pacientes com avaliação ao diagnóstico, com 3 e 6 ciclos de 5-azacitidina.

	Idade meses	Molecular	%CD34/CD117 diagnóstico	%CD34/CD117 3 ciclos	%CD34/CD117 6 ciclos	CD7	%Linfócitos T diagnóstico	%Linfócitos T 3 ciclos	%Linfócitos T 6 ciclos	Resposta 3 ciclos	Resposta 6 ciclos
Paciente 1	49	PTPN11	6,8	3,76	0,58	+	15,4	12,0	28,9	Completa	Parcial
Paciente 2	46	PTPN11	3,4	0,32	0,71	+	2,7	31,0	24,1	Completa	Completa
Paciente 3	8	NF1	3,8	3,4	4,6	-	1,2	7,8	2,4	Parcial	Parcial
Paciente 4	9	KRAS	1,9	2,6	0,7	-	5,6	21,2	26,6	Parcial	Parcial
Paciente 10	29	Neg	0,9	3,0	5,5	+	3,3	23,3	16,2	Completa	Completa
Paciente 11	32	Neg	1,6	0,17	0,64	-	9,3	34,7	6,7	Completa	Completa
Paciente 12	38	NF1	4,7	3,3	1,6	-	8,5	10,5	10,0	Parcial	Parcial
Paciente 13	30	PTPN11	2,8	3,17	1,63	+	4,4	10,0	11,0	Parcial	Parcial
Paciente 14	14	NRAS	1,5	0,62	1,4	-	2,4	23,7	16,0	Parcial	Parcial
Paciente 16	11	Neg	5,9	1,6	1,9	-	2,6	2,6	3,1	Parcial	Parcial
Paciente 17	37	KRAS	0,8	1,9	2,8	-	2,2	3,1	8,9	Parcial	Parcial
Paciente 19	72	NF1	3,3	4,59	3,0	+	0,9	7,5	4,9	Progressão	Progressão
Paciente 20	10	NRAS	2,7	2,28	2,21	-	2,4	2,6	4,4	Parcial	Parcial
Paciente 21	8	NRAS	4,0	2,09	1,1	-	1,4	2,1	8,4	Parcial	Parcial
Paciente 22	55	NF1	4,9	6,40	5,73	+	1,5	2,0	1,6	Progressão	Progressão
Paciente 23	42	PTPN11	12,0	5,80	7,55	+	3,0	20,0	13,6	Completa	Progressão
Paciente 24	14	NRAS	1,6	1,44	0,4	-	1,3	12,0	24,4	Parcial	Completa
Paciente 25	9	Neg	1,9	1,67	1,80	-	1,9	16,8	8,6	Parcial	Parcial
Paciente 26	31	Neg	13,5	2,32	0,7	+	7,0	13,7	31,0	Parcial	Completa
Paciente 28	14	KRAS	2,8	1,50	1,63	-	0,9	5,2	1,5	Parcial	Parcial
Paciente 31	21	PTPN11	5,9	3,85	1,04	+	2,0	3,4	3,0	Completa	Parcial

