

Juliana B da Costa<sup>1</sup>; Rafaella G Naressi<sup>1</sup>; Telma F Padilha<sup>1</sup>; Jordana Ramires<sup>1,2</sup>; Renata Lyrio<sup>3</sup>; Danielle T Vianna<sup>1,4</sup>; Kadma Caniço<sup>2</sup>; Ilana R Zalberg<sup>1</sup>; Luciana M Gutiyama<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular - CEMO/INCA. <sup>2</sup>Departamento de Hematologia/INCA. <sup>3</sup>Hospital Pedro Ernesto/UERJ. <sup>4</sup>Hospital da Lagoa  
\* Autor correspondente: lgutiyama@inca.gov.br

## INTRODUÇÃO

FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) é um receptor tirosina quinase envolvido na regulação do crescimento e da diferenciação das células hematopoéticas. Mutações nesse gene têm sido relacionadas a um pior prognóstico nos pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA). A mutação mais frequente em FLT3 consiste em duplicações em tandem da região codificante do domínio justamembrana (FLT3-ITD), assim a proteína permanece ativa constitutivamente e estimula a proliferação celular. Em 2017, a *European Leukemia Net* (ELN) incluiu FLT3-ITD na estratificação de risco da LMA de acordo com a carga alélica. Segundo essas diretrizes, pacientes com alta carga de FLT3-ITD associada a NPM1 selvagem têm prognóstico adverso, pacientes com baixa carga de FLT3-ITD e NPM1 mutado têm prognóstico favorável. Atualmente, não há uma metodologia-padrão adotada internacionalmente para determinação da carga alélica (Tabela 1). Neste estudo, comparamos duas técnicas de quantificação de FLT3-ITD, dois modelos matemáticos e dois valores de corte para estabelecimento de alta ou baixa carga.

$$FA = \frac{\sum \text{altura do(s) pico(s) mutado (s)}}{\sum \text{alturas do(s) pico(s) mutados e selvagens}}$$

$$CA = \frac{\sum \text{altura do(s) pico(s) mutado (s)}}{\text{altura do pico selvagem}}$$

Figura 1. Equações da frequência alélica (FA) e carga alélica (CA).

Tabela 1. Critérios de quantificação de FLT3-ITD na literatura

Autor	Metodologia	Modelo matemático	Valor de corte
European Leukemia Net	DNA	CA	0.5
David G.J. Cucchi <i>et al.</i>	RNA	CA	0.5
Prajwal C. Boddu <i>et al.</i>	DNA	CA	0.5
David Grimwade <i>et al.</i>	DNA	FA	0.5
Christian Thiede <i>et al.</i>	DNA	FA	0.7

## OBJETIVO

Estabelecer a linearidade, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade dos métodos descritos na literatura para quantificação de FLT3-ITD e verificar qual modelo de cálculo se correlaciona com o seu desfecho clínico do paciente.

## MÉTODOS

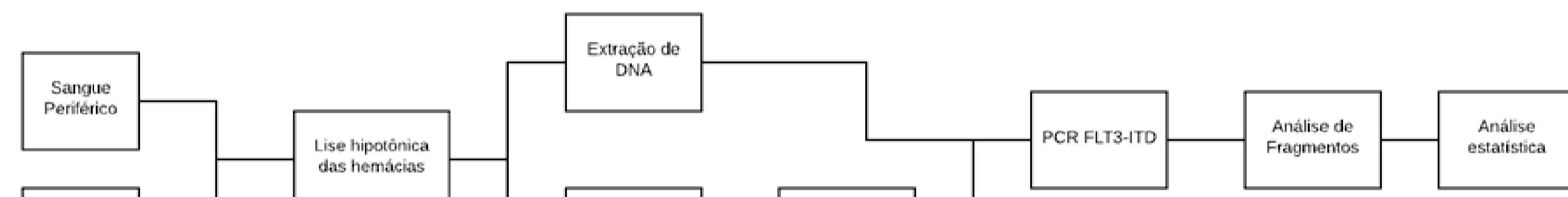


Figura 2. Fluxo de análise de FLT3-ITD dos pacientes com LMA diagnosticados pelo CEMO-INCA entre janeiro de 2004 e março de 2018. O DNA e o RNA foram extraídos a partir de 5 ml de medula óssea ou 20 ml de sangue periférico. As hemácias do material foram lisadas e preparadas para a extração de DNA ou RNA. A amplificação de FLT3-ITD foi realizada por dois PCR específicos para o DNA ou o cDNA. Apenas as corridas que tenham sido aprovadas no critério de qualidade do marcador de peso molecular e também que apresentaram picos principais com intensidade superior a 1000 rfu (unidades relativas de fluorescência) e inferior a 8000 rfu foram consideradas para este estudo.

### Padronização das técnicas

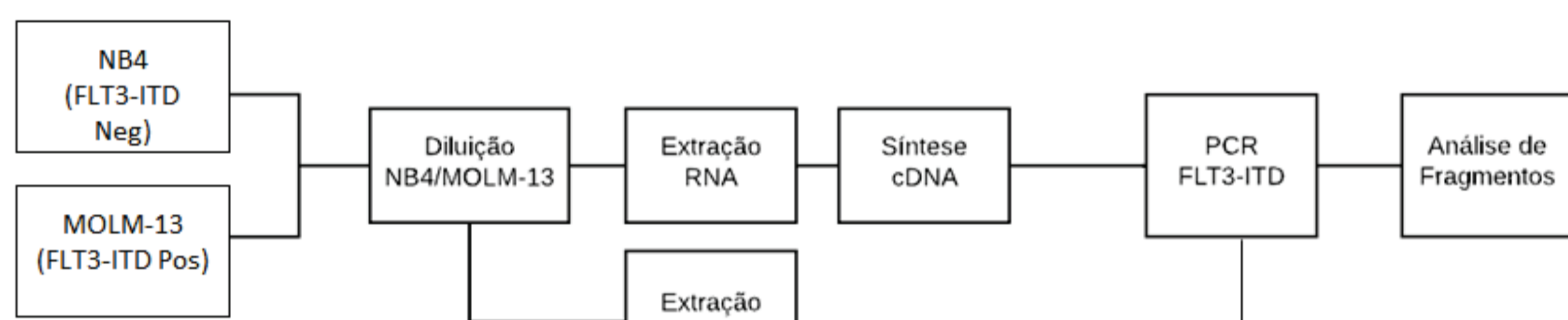


Figura 3. Esquema da padronização da metodologia. Os PCRs foram padronizados com base em curva padrão de uma linhagem celular positiva para FLT3-ITD (MOLM-13) em uma linhagem negativa para FLT3-ITD (NB4). As curvas foram feitas através da diluição das linhagens nas seguintes proporções 0%, 10%, 40%, 50%, 60%, 75%, 95% e 100% de MOLM-13 num total de 8 milhões de células para cada ponto. As células foram diluídas no reagente Trizol, do qual foi extraído tanto o DNA quanto o RNA. O RNA extraído foi quantificado e convertido à cDNA. O DNA foi utilizado para a padronização do PCR a partir do DNA e o cDNA foi utilizado para padronizar o outro PCR.

## RESULTADOS

Tabela 2. Características da coorte de pacientes

Total de pacientes avaliados por DNA e cDNA	224
Sexo (M)	52,23% (117)
FLT3-ITD Positivo	21,43% (46)
Mediana da Idade	66,5 anos (18 - 92 anos)
Amostras FLT3-ITD no DNA e selvagem no cDNA (M)	2,23% (5)
Amostras FLT3-ITD que não expressaram FLT3 ou FLT3-ITD (M)	6,69% (15)

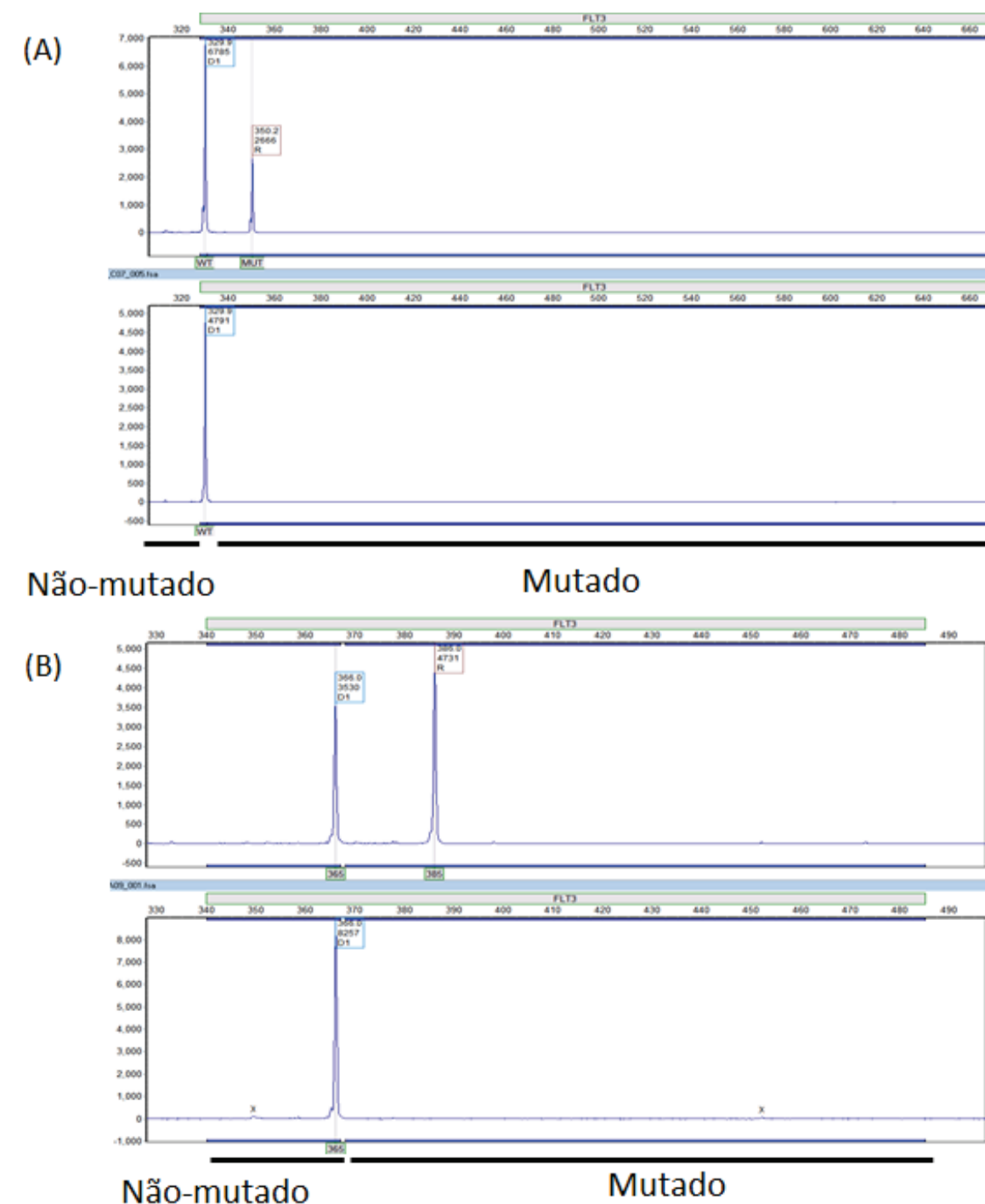


Figura 4. Tanto o PCR para DNA quanto para o cDNA apresentam amplificação específica, sem ruído ou stutter. O pico mutado pode variar de 3 a 400 pares de bases adicionais ao tamanho do pico não-mutado. (A) Eletroferograma de amostras de DNA. Pico não-mutado na posição 329.9 e pico mutado na posição 350.2. (B) Eletroferograma de amostras de cDNA. Pico não-mutado na posição 366.0 e pico mutado na posição 386.0.

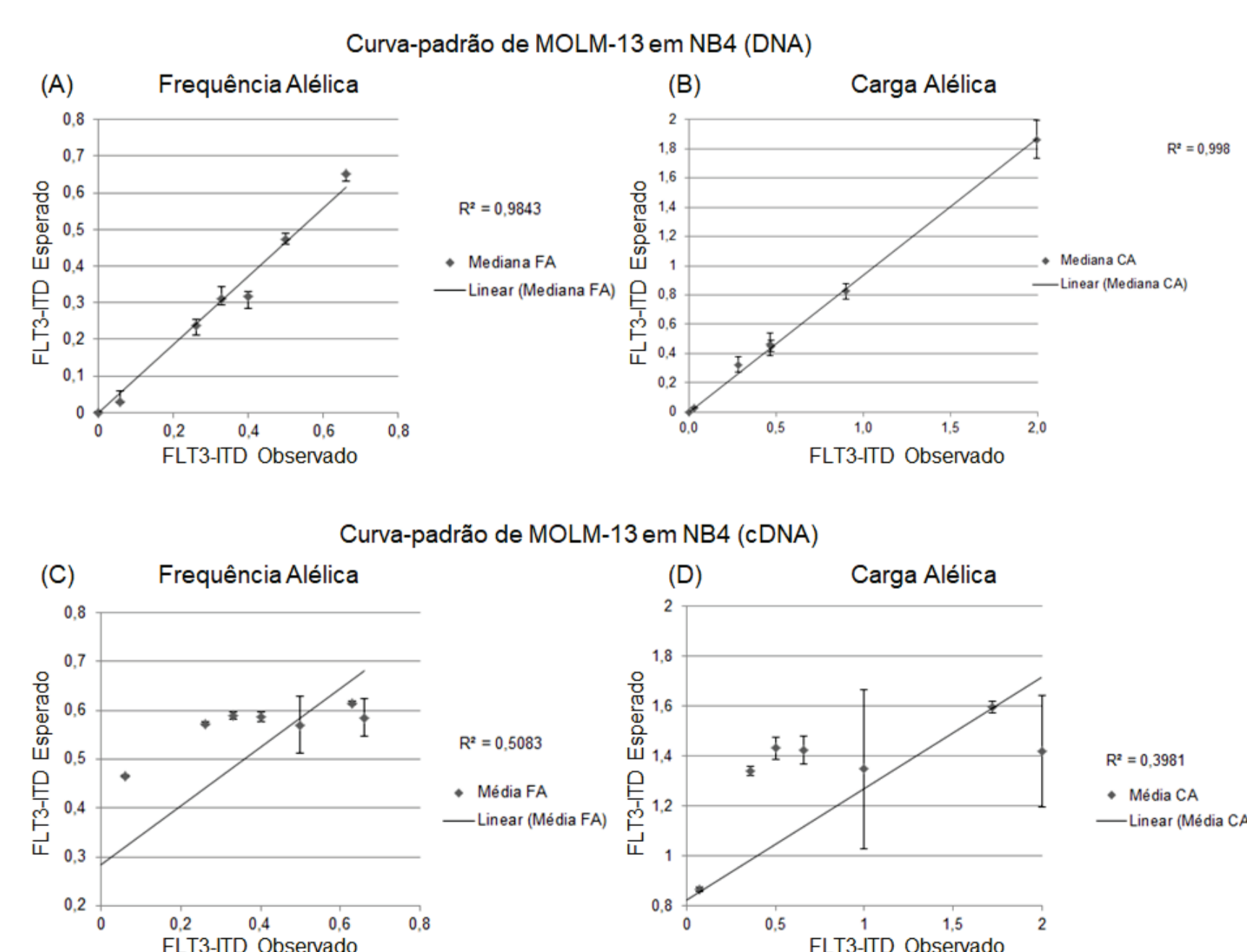


Figura 5. Apenas o PCR para quantificação de FLT3-ITD no DNA é linear e apresenta correlação com o esperado, nos dois modelos de cálculo FA e CA. Foram construídas duas curvas de diluição entre linhagem positiva para FLT3-ITD (MOLM-13) e negativa para FLT3-ITD (NB4) para os seguintes pontos 0%, 10%, 40%, 50%, 60%, 75%, 95% e 100% de MOLM-13. Da mesma amostra de cada ponto de diluição foram extraídos DNA e RNA, posteriormente convertido à cDNA. A linhagem NB4 possui um cariótipo poliploide com, dentre outras modificações, uma adição do cromossomo 13, assim, exibe 3 cópias selvagens do gene FLT3; a linhagem MOLM-13 também apresenta 3 alelos para o gene FLT3, sendo dois FLT3-ITD e um selvagem. A curva-padrão de DNA foi construída a partir de três experimentos independentes, cada um em triplicata. As quantificações geradas a partir de FA (A) e de CA (B) foram lineares (R2 de 0,9843 e 0,9985, respectivamente) e o desvio padrão variou de 0,003 a 0,128. A curva-padrão de cDNA também foi construída a partir de três experimentos independentes, cada um em triplicata. Entretanto, apesar do baixo desvio padrão entre as replicatas e os experimentos (0,0026 a 0,3177) não houve correlação entre a quantificação esperada nem por FA (C), nem por CA (D) (R2 de 0,5083 e 0,3981, respectivamente).

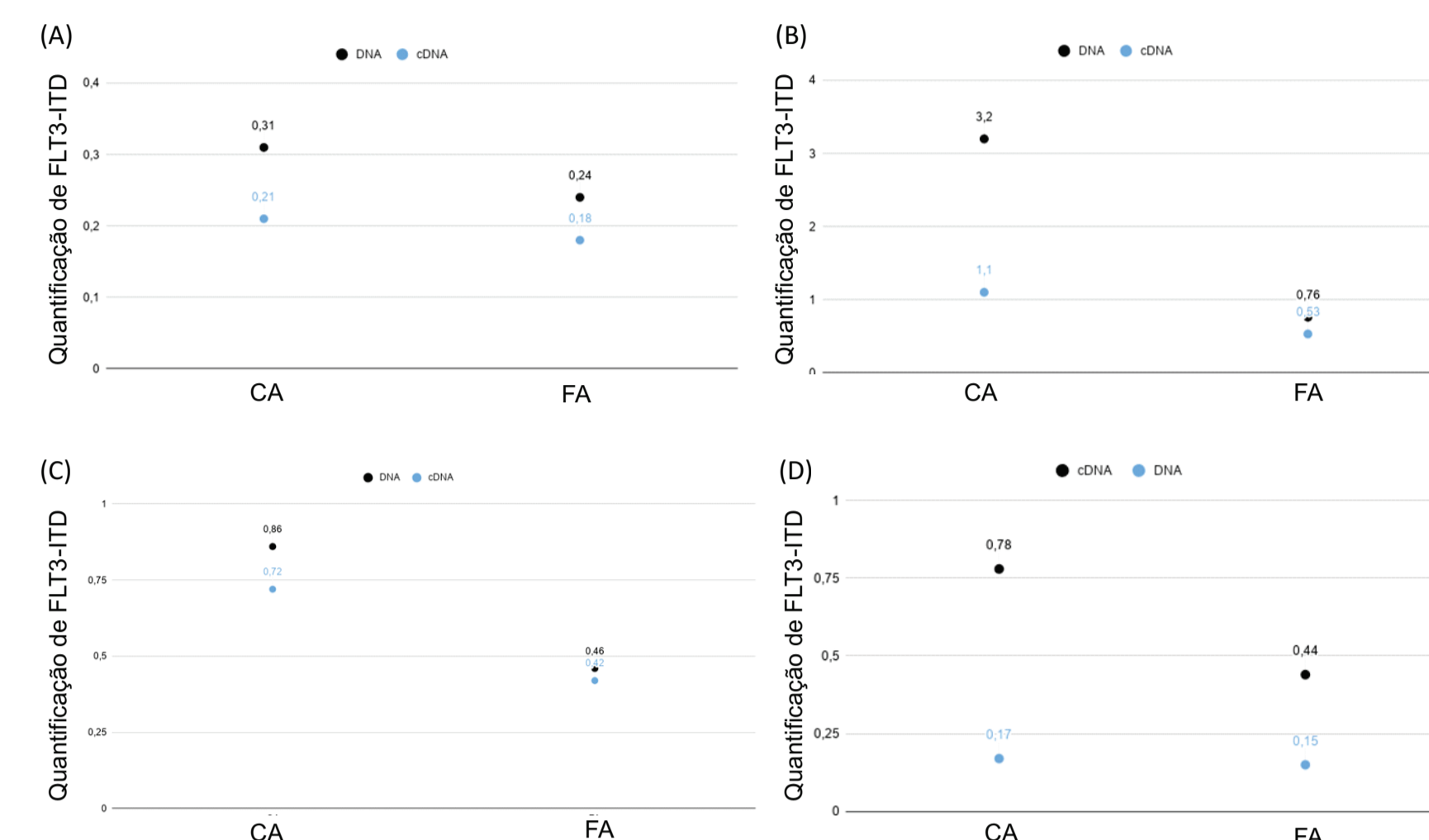


Figura 6. Pacientes com quantificações de FLT3-ITD intermediária (0,4-0,7) podem ser classificados em grupos de risco diferentes devido tanto ao modelo matemático ou molécula escolhida. Exemplos de quantificação realizada em DNA (preto) e cDNA (azul), calculada por CA (esquerda) e FA (direita). (A) Exemplo de paciente classificado como baixa quantificação de FLT3-ITD em qualquer modelo descrito na literatura. (B) Exemplo de paciente classificado como alta quantificação de FLT3-ITD em qualquer modelo descrito na literatura, apesar da diferença entre os valores obtidos. (C) Exemplo de paciente com quantificação intermediária de FLT3-ITD, este exemplo mostra que dependendo do modelo matemático adotado o paciente seria classificado como alta ou baixa quantidade de FLT3-ITD, correspondendo a diferentes grupos de risco da doença, enquanto que a escolha entre cDNA e DNA não tem efeito. (D) Exemplo de paciente com quantificação intermediária, classificado em grupos de risco diferentes de acordo com a escolha entre DNA ou cDNA.

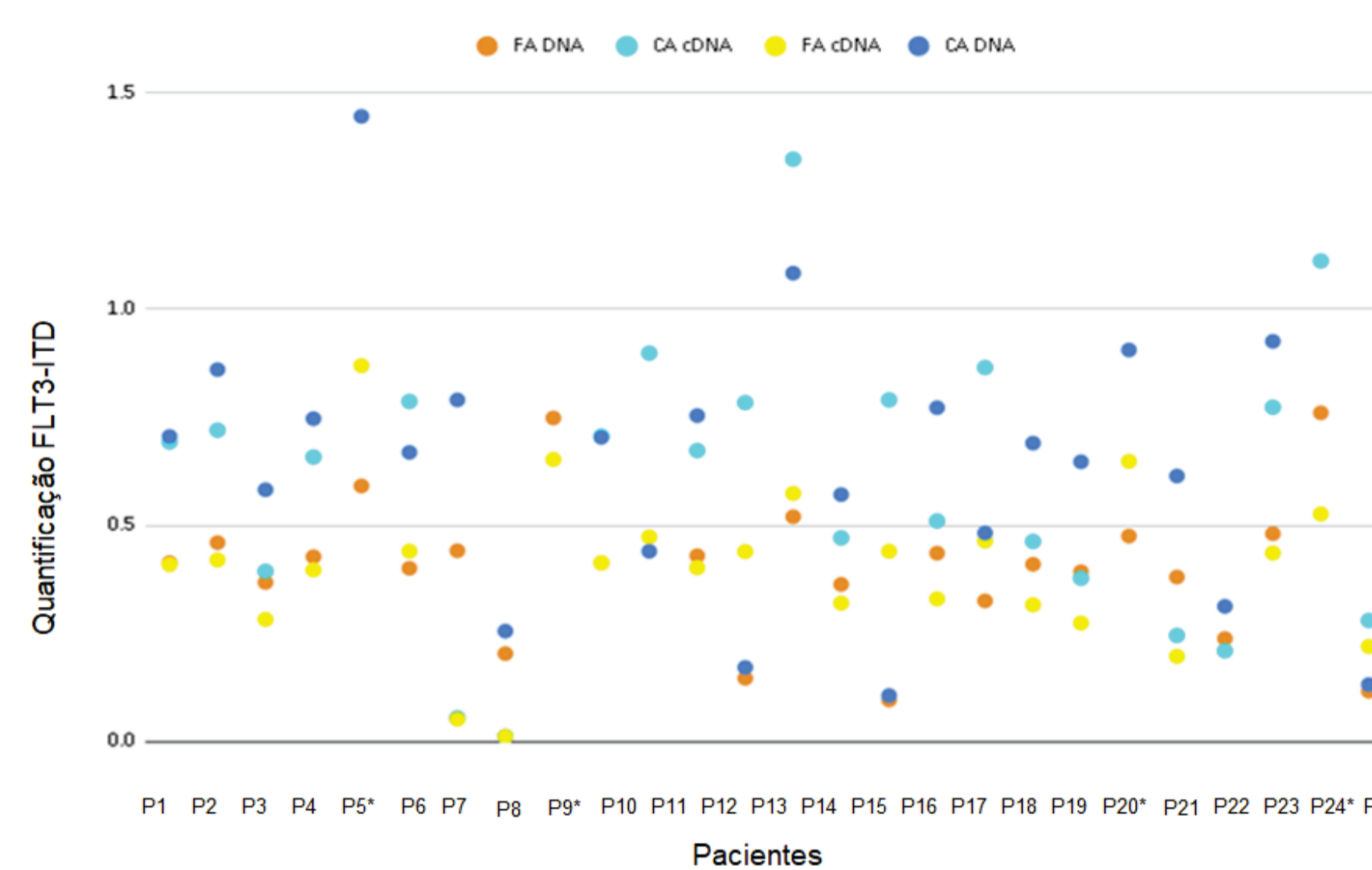


Figura 7. A quantificação obtida pelo modelo CA, em geral, é maior que os resultados gerados por FA, entretanto a relação entre os modelos não é constante. Modelo gráfico para visualização da diferença entre os modelos matemático de FA (amarelo e laranja) e CA (ciano e azul escuro) para DNA (laranja e azul escuro) e cDNA (amarelo e ciano) para cada um dos pacientes positivos (P1 a P25). No eixo y, estão ordenados cada um dos 25 pacientes, a escala do eixo y foi limitada a 1,5, assim, os seguintes pontos de quantificação acima de 1,5 não estão no gráfico: paciente 5 (CA cDNA = 6,64); paciente 9 (CA DNA = 2,97 e CA cDNA = 1,88); paciente 20 (CA cDNA = 1,84) e paciente 24 (CA DNA = 3,20).

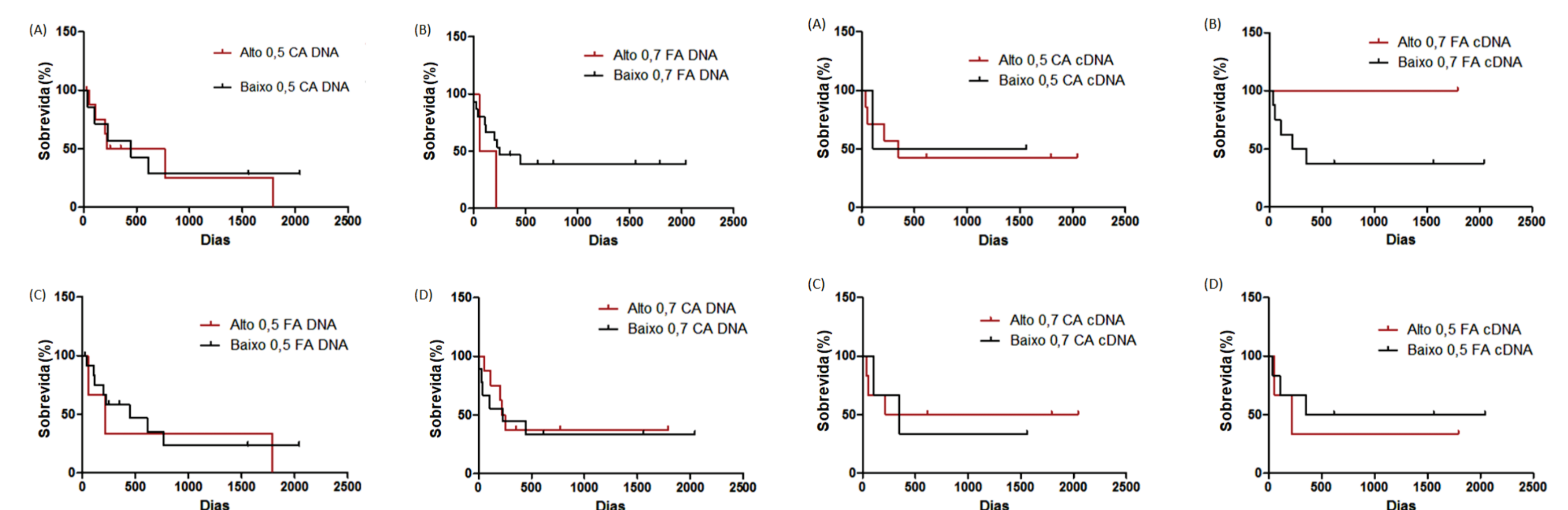


Figura 8. Dados preliminares indicam que a sobrevida entre pacientes classificados com alta ou baixa quantidade de FLT3-ITD no DNA em cada um dos modelos é semelhante, exceto nos grupos classificados por FA e com corte em 0,7. Curva Kaplan-Meier construída de acordo com a sobrevida (dias) ou a data da última consulta. N total = 17 pacientes.

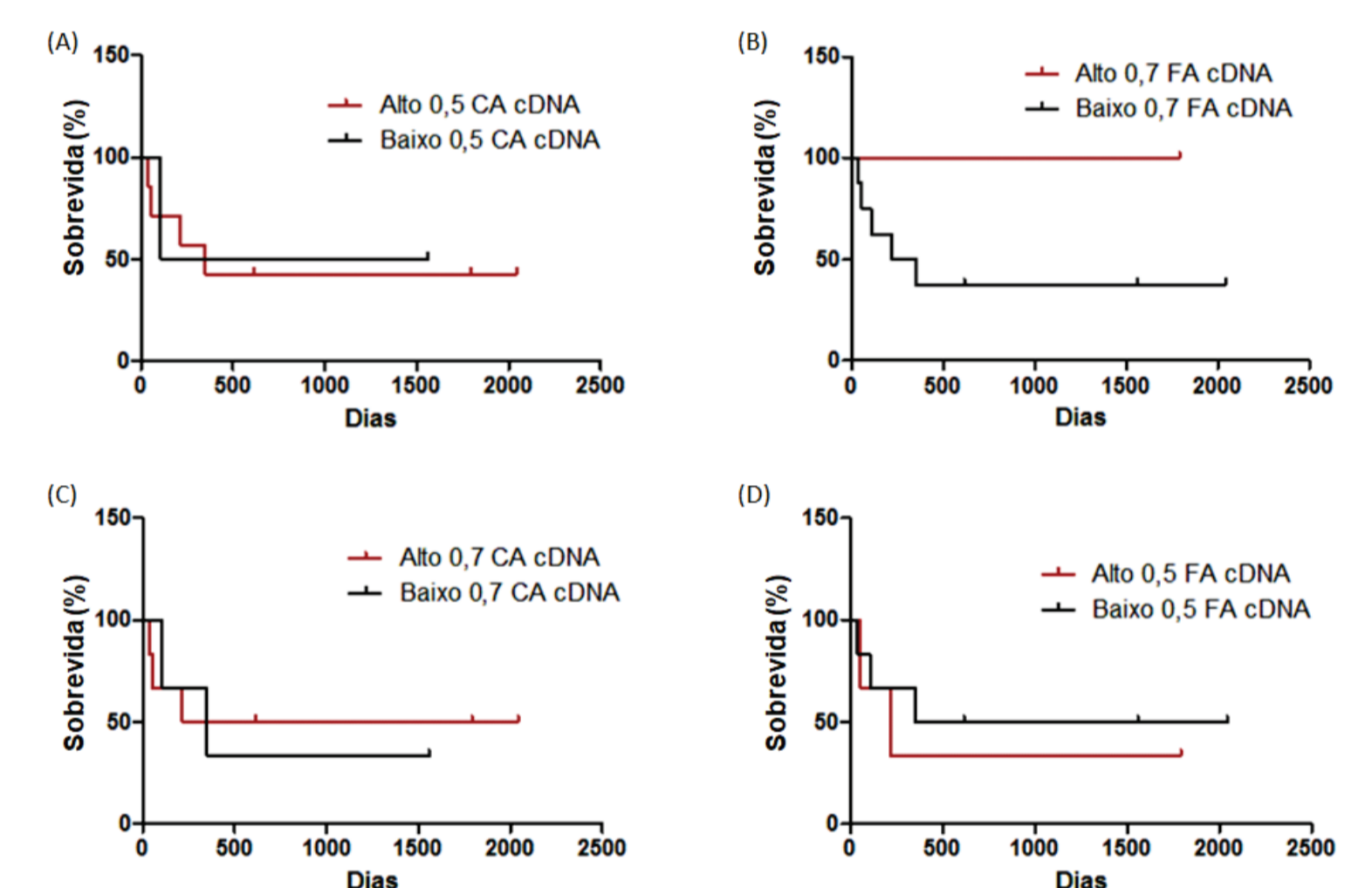


Figura 9. Dados preliminares indicam que a sobrevida entre pacientes classificados com alta ou baixa quantidade de FLT3-ITD no cDNA varia de acordo com cada um dos modelos. Curva Kaplan-Meier construída de acordo com a sobrevida (dias) ou a data da última consulta. Esses dados preliminares indicam que o ponto de corte 0,7, tanto para CA (C) e FA (B) não se correlaciona com o desfecho clínico do paciente. N total = 9 pacientes.

## CONCLUSÕES PARCIAIS

Nesta etapa do trabalho, foi possível concluir que:

- 1) tanto a curva-padrão a partir do DNA quanto a do cDNA para quantificação de FLT3-ITD por frequência alélica e carga alélica apresentaram baixa variação intra ou inter experimental;
- 2) a frequência de pacientes positivos para FLT3-ITD numa coorte de 224 pacientes foi de 21,43%, que é próxima à proporção de pacientes positivos em estudos internacionais;
- 3) enquanto o PCR por DNA apresentou-se linear e correlacionado com os valores esperados, o PCR por cDNA mostrou-se não linear, sendo as duas curvas baseadas nas mesmas diluições celulares;
- 4) apesar dos valores, em geral, serem mais altos quando calculados por CA, a diferença entre as quantificações de FLT3-ITD obtidas por CA, FA ou cDNA ou DNA varia de acordo com cada paciente;
- 5) 5 pacientes foram FLT3-ITD positivos apenas no PCR por DNA (baixa quantificação), demonstrando menor sensibilidade do PCR por cDNA;
- 6) 15 pacientes positivos FLT3-ITD não expressam FLT3, impossibilitando a quantificação. Verificamos que há pacientes negativos para a duplicação e linhagens celulares mieloídes que também não expressam o gene;
- 7) Curvas de sobrevida preliminares construídas apenas com pacientes positivos tratados no INCA indicam que a classificação dos pacientes baseada no cDNA e com corte em 0,7, nos dois modelos matemáticos não se correlaciona entre o desfecho clínico dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

- DÖHNER, Hartmut, ESTEY, Elihu, GRIMWADE, David, *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 2017, vol. 129, no 4, p. 424-447.
- BODDU, Prajwal C., KADIA, Tapan M., GARCIA-MANERO, Guillermo, *et al.* Validation of the 2017 European LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with NPM1 and FLT3-internal tandem duplication genotypes. *Cancer*, 2019, vol. 125, no 7, p. 1091-1100.
- CUCCHI, David G., DENYS, Barbara, KASPER, Gertjan J.L., *et al.* RNA-based FLT3-ITD allelic ratio is associated with outcome and ex vivo response to FLT3 inhibitors in pediatric AML. *Blood*, 2018, vol. 131, no 22, p. 2485-2489.
- THIEDE, Christian, STEUDEL, Christine, MOHR, Brigitte, *et al.* Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 2334). *Blood*, 2002, vol. 99, no 12, p. 4326-4335.
- GRIMWADE, David, IVEY, Adam, et HUNTLY, Brian J.P. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2016, vol. 127, no 1, p. 29-41.