

Graciele Burnatt

**ANÁLISE DAS MUTAÇÕES NOS GENES *FLT3* (DIT E D835) E
NPM1 COMO MARCADORES MOLECULARES PARA
ESTRATIFICAÇÃO DO PROGNÓSTICO EM PACIENTES
PORTADORES DE LEUCEMIA AGUDA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Santos da Silva
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís Cristina Marques Sincero

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Burnatt, Graciele
ANÁLISE DAS MUTAÇÕES NOS GENES FLT3 (DIT E D835) E NPM1
COMO MARCADORES MOLECULARES PARA ESTRATIFICAÇÃO DO
PROGNÓSTICO EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA AGUDA /
Graciele Burnatt ; orientador, Maria Cláudia Santos da
Silva ; coorientador, Thais Cristina Marques Sincero . -
Florianópolis, SC, 2015.
130 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Leucemia aguda. 3. Mutações . 4. Gene
FLT3. 5. Gene NPM1. I. Santos da Silva, Maria Cláudia .
II. Marques Sincero , Thais Cristina . III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. IV. Título.

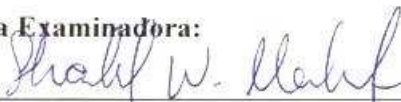
**“ANÁLISE DAS MUTAÇÕES NOS GENES FLT3
(DIT E D835) E NPM1 COMO MARCADORES
MOLECULARES PARA ESTRATIFICAÇÃO DO
PROGNÓSTICO EM PACIENTES PORTADORES
DE LEUCEMIA AGUDA”**

POR

Graciele Burnatt

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Sharbel Weidner Maluf (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Bazzo (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Caroline Brunetto de Farias (ICI-RS - Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC –
Orientador(a))

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 31 de março de 2015.

*Dedico este trabalho aos
meus pais Maria Elena e
Ildemar pelo amor e pela
dedicação.*

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Elena e Ildemar por serem meus exemplos, pelo apoio, pela dedicação e por estarem sempre presentes em minha vida. Sem vocês nada seria possível, amo vocês!

À minha irmã, Raphaela, pelo carinho, incentivo e amizade.

Ao meu namorado, Guilherme, pelo amor, parceria, pela paciência nesses últimos meses. Pelas inúmeras correções, sugestões e por todo o conhecimento adquirido sobre leucemias, mutações, *FLT3*...para a realização desse trabalho.

À Prof.^a Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva pelo profissionalismo, pela oportunidade e orientação.

À minha coorientadora Thaís pela colaboração, ensinamentos, pela imensa ajuda com as técnicas de biomol e sequenciamento, essenciais a esse trabalho.

Às amigas de Mafra, Daniele, Mariana e Naryan pela amizade, apesar da distância.

Às amigas de laboratório Amanda e Katiuce, que se tornaram amigas da vida, obrigada pelas conversas e pelo carinho.

À Marley pelo incentivo, por me ensinar os primeiros passos dentro do laboratório de biologia molecular, o qual proporcionou o começo desse trabalho.

À Ana Carolina pela ajuda na análise estatística, pelas revisões, pela paciência e por estar sempre disposta a ajudar.

À Lica e a Letícia pelas várias dúvidas esclarecidas, muito obrigada.

A todos os colegas de Laboratório, em especial a Chris, a Camila, ao Arthur, pelo apoio, amizade e pelos bons momentos de convívio no laboratório.

Aos colegas do Hospital Regional responsáveis por tornarem os plantões menos estressantes e mais divertidos, obrigada pela amizade e pela convivência.

Aos pacientes ou responsáveis pela participação nesse estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, a qual ofereceu condições para a conclusão dessa etapa.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPESC, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos vocês, muito obrigada!

“A razão é o passo, o aumento da ciência o caminho, e o benefício da humanidade é o fim.”

(Thomas Hobbes)

RESUMO

As leucemias agudas (LA) compreendem um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas pela rápida e incontrolada expansão clonal de células progenitoras do sistema hematopoiético. Segundo a OMS, características imunofenóticas, citogenéticas e moleculares, além de outras associações, estão relacionadas ao prognóstico e contribuem para a estratificação das LAs, que é baseada na citogenética e na incidência de mutações gênicas, como as mutações no gene *NPM1* e *FLT3*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação das mutações nos genes *NPM1* e *FLT3* (*DIT* e *D835*) com outros parâmetros laboratoriais e clínicos em casos de LA, atendidos pelo Serviço de Hematologia (HU-UFSC), no período de janeiro de 2012 a setembro de 2014. Entre as 57 amostras encaminhadas ao LOEH, 42 estavam de acordo aos critérios de inclusão. A análise das amostras em relação a essas alterações foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para avaliar a presença de mutações no gene *NPM1*, foi realizado o sequenciamento da região de interesse. Entre os pacientes diagnosticados com leucemia mieloide aguda (LMA), 30,7% apresentaram a mutação no gene *FLT3* (*FLT3-DIT*: 19,2% e *FLT3-D835*: 11,5%). Nos pacientes diagnosticados com o subtipo leucemia linfóide aguda (LLA) apenas um caso (7,1%) apresentou a mutação *FLT3-D835*. Não foi observada associação entre a presença dessas mutações com o subtipo de LA. Porém, observou-se que a presença da mutação foi mais incidente em pacientes com LMA. Os resultados mostram que nos casos onde foi detectada a mutação *FLT3-DIT*, os pacientes apresentaram tanto pior progressão clínica da doença ($P=0,006$) quanto menor taxa de sobrevivência global ($P=0,002$). Ainda mais, foi possível observar valores para leucocitose, atividade da enzima LDH e porcentagem de blastos maiores em relação àqueles sem a presença da mutação. Esses resultados sugerem que a presença de mutações *FLT3-DIT* são preditivos de mau prognóstico e atuam de forma independente, pois não foi possível observar associação com os demais fatores prognósticos. Em relação à mutação *FLT3-D835*, não foi possível encontrar associação entre esta variável e os demais parâmetros analisados. Na análise da mutação *NPM1* entre os pacientes incluídos no estudo, nenhum apresentou mutações compatíveis às descritas na literatura. No entanto, foi possível detectar uma nova mutação no gene *NPM1* em amostras de três pacientes. Apesar do número pequeno de casos, pode-se observar que os pacientes apresentaram fatores prognósticos desfavoráveis como o percentual do número de blastos,

leucocitose em dois dos três casos, e foram a óbito antes da primeira remissão. Esses dados sugerem que essa mutação pode ser considerada de mau prognóstico, como as mutações no gene *NPM1* do tipo não-A. Entretanto, a avaliação prognóstica requer maior número de casos avaliados para sua elucidação. Esses resultados mostram, que diferentes mutações no gene *NPM1* podem não ser raras, e requerem a análise da sequência alvo completa. Assim, outros tipos de alteração podem ser detectadas. No geral, o presente estudo destaca a importância de incluir a investigação de marcadores moleculares na avaliação prognóstica dos pacientes portadores de LA no momento do diagnóstico, a fim de que a escolha do protocolo terapêutico seja o mais apropriado.

Palavras-chave: Leucemia aguda. Mutações. Gene *FLT3*. Gene *NPM1*. Fatores prognósticos.

ABSTRACT

MUTATIONS ANALYSIS IN *NPM1* AND *FLT3* (DIT AND D835) GENE AS MOLECULAR MARKERS FOR PROGNOSTIC STRATIFICATION IN ACUTE LEUKEMIA PATIENTS

Acute leukemias (ALs) are a heterogeneous group of diseases characterized by a fast and uncontrolled clonal proliferation of hematologic progenitor cells. According to the current classification proposed by WHO, the prognosis is defined by immunophenotypic, cytogenetic and molecular characteristics, which contribute to the stratification of ALs, which is based on cytogenetic and on the incidence of gene mutations, as mutations in *NPM1* and *FLT3*. Thus, the aim of this study was to evaluate the prognostic impact of the association between mutations in *NPM1* and *FLT3* (DIT and D835) genes with other laboratory and clinical parameters in patients with AL before the first therapy. Patients attended the Hematology Department (UFSC-HU) from January 2012 to September 2014. Among the 57 samples sent to (LOEH), 42 were according to the inclusion criteria. The analysis of the mutations in the samples was performed by polymerase chain reaction (PCR). To assess the presence of mutations in *NPM1* gene, it was further carried out the sequencing of the region of interest. Among the patients diagnosed with acute myeloid leukemia (AML) included in this study, 30.7% had mutations in the *FLT3* gene (*FLT3-DIT*: 19.2% and *FLT3-D835*: 11.5%). Among the patients diagnosed with acute lymphocytic leukemia (ALL), only one patient (7.1%) had a mutation *FLT3-D835*. There was no association between the presence of these mutations and the LA subtype. However, it was observed that the presence of the mutation was more prevalent in patients with AML. The results show that when the mutation *FLT3-DIT* was observed, patients had a worse clinical progression ($P=0.006$) and a reduced overall survival rate ($P=0.002$). Moreover, patients with this mutation had higher values of white blood cell count, LDH enzyme activity and blasts percentage in relation to those without the mutation. The results suggest that the presence of *FLT3-DIT* mutations are predictive of a worse prognosis, but they act independently, since it was not observed an association with the other prognostic factors. Regarding *NPM1* mutation, none of the patients included in this study showed mutations according to the described in the literature. However, by sequencing analysis, it was possible to detect a new mutation in *NPM1* gene in three patient samples. Despite the small number of patients, it may be noted

that all three cases had unfavorable prognostic factors such as the percentage of blasts, high white blood cell count in two of the three cases, and all of them died before the first remission. These data suggest that this mutation can be considered as poor prognosis, such as mutations in *NPM1* gene non-A type. However, the prognostic evaluation of this new mutation requires a larger number of cases to be fully elucidated. These results show that different mutations in *NPM1* gene may not be rare, and require analysis by sequencing of the complete target sequence. Thus, other types of changes can be detected. Overall, the present study highlights the importance of including the investigation of molecular markers in prognostic evaluation of patients with AL at the diagnosis, so the most appropriate treatment protocol can be chosen.

Keywords: Acute leukemia. Mutations. *FLT3* gene. *NPM1* gene. Prognostic factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação espacial das taxas de incidência de leucemia por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o biênio 2014-2015.....	30
Figura 2	Representação esquemática do receptor FLT3.....	45
Figura 3	Estrutura e ativação do receptor FLT3.....	46
Figura 4	Representação esquemática das mutações <i>FLT3</i>	48
Figura 5	Representação esquemática das mutações do gene <i>NPM1</i>	51
Figura 6	Novas mutações descritas no gene <i>NPM1</i> éxon 12.....	52
Figura 7	Representação esquemática do delineamento das amostras incluídas no estudo.....	56
Figura 8	Gel representativo da PCR para mutação <i>FLT3-DIT</i>	58
Figura 9	Gel representativo da PCR para mutação <i>FLT3-D835</i>	60
Figura 10	Esquema representativo onde mostra a ação da enzima de purificação ExoSAP-IT.....	63
Figura 11	Gel representativo das bandas amplificadas correspondentes ao fragmento do gene <i>NPM1</i> após padronização da técnica.....	66
Figura 12	Representação esquemática da nova mutação encontrada no gene <i>NPM1</i>	67
Figura 13	Representação das sequências obtidas através da análise de sequenciamento do fragmento de 568 pb do éxon 12 do gene <i>NPM1</i>	68
Figura 14	Curva de sobrevida global de todos os pacientes incluídos neste estudo.....	76

Figura 15 Curva de sobrevida global dos pacientes em relação ao subtipo de LA..... 77

Figura 16 Curva de sobrevida global dos pacientes portadores de LA que expressaram a mutação no gene *FLT3*..... 77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação imunofenotípica das LLAs de linhagem B e T.....	34
Quadro 2	Expressão de marcadores imunofenotípicos utilizados no diagnóstico e classificação das LMAs.....	35
Quadro 3	Classificação para as LMAs e neoplasias relacionadas..	36
Quadro 4	Classificação para as LLAs e neoplasias relacionadas...	37
Quadro 5	Anormalidades citogenéticas utilizadas na classificação das LAs da OMS (2008).....	41
Quadro 6	Classificação das mutações encontradas em neoplasias hematológicas.....	42
Quadro 7	Estratificação de risco com base no perfil de anormalidades moleculares e citogenéticas.....	44
Quadro 8	Novas mutações apresentadas no gene <i>NPM1</i> e suas respectivas sequências.....	52
Quadro 9	Iniciadores utilizados na amplificação da sequência alvo do gene <i>NPM1</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Volumes e concentrações dos reagentes utilizados inicialmente na reação de PCR para detecção da mutação <i>NPM1</i>	61
Tabela 2	Volumes e concentrações padronizadas dos reagentes utilizados na reação de PCR para detecção da mutação <i>NPM1</i>	66
Tabela 3	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LA no momento do diagnóstico.....	69
Tabela 4	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LA que apresentaram a nova mutação no gene <i>NPM1</i>	71
Tabela 5	Distribuição do subtipo de LA de acordo com a presença das mutações <i>FLT3</i> (DIT e D835).....	72
Tabela 6	Avaliação da presença ou ausência das mutações no gene <i>FLT3</i> (DIT e D835) de acordo com o gênero.....	72
Tabela 7	Associação entre os fatores prognósticos e a presença ou ausência das mutações do tipo <i>FLT3-DIT</i>	73
Tabela 8	Associação entre os fatores prognósticos e a presença ou ausência das mutações do tipo <i>FLT3-D835</i>	73
Tabela 9	Análise da associação entre expressão de CD34 e a ausência ou presença das mutações no gene <i>FLT3</i> (DIT e D835).....	74
Tabela 10	Análise da associação entre a progressão clínica dos pacientes e a ausência ou presença de mutações no gene <i>FLT3</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARA-C	Citarabina
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Grupo de diferenciação (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
CEBPA	Proteína ligante ao amplificador CCAAT isoforma alfa (do inglês, CCAAT/enhancer-binding protein alpha)
cμ	Cadeia μ citoplasmática
DE	Domínio extracelular
DIT	Duplicação interna em <i>tandem</i>
DJ	Domínio justamembrana
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DRM	Doença residual mínima
DT	Domínio transmembrana
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELN	<i>LeukemiaNet Europea</i>
FISH	Hibridização in situ com fluorescência (do inglês, Fluorescence in situ hybridization)
FLT3	Tirosina cinase 3 semelhante a FMS (do inglês, FMS-like tyrosine kinase 3, Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3 ou fetal liver kinase-2)
FLT3-D835	Mutação pontual no gene <i>FLT3</i>
FLT3-DIT	Mutação do tipo duplicação interna em tandem no gene <i>FLT3</i>
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês, human leukocyte antigen)
HU-UFSC	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
H₂O	Água
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JM	Domínio justamembranar
LA	Leucemia aguda
LBA	Leucemia bifenotípica aguda
LDH	Lactato desidrogenase
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda do tipo B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda do tipo T

LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
LPA	LMA promielocítica com t(15;17)(q22;q12)
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês, Mitogen activated kinase protein)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MO	Medula óssea
MPO	Mieloperoxidase
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês, National Center for Biotechnology Information)
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NPM1	Nucleofosmina 1 (do inglês, Nucleophosmin 1)
nm	Nanômetros
µL	Microlitros
OER	Óbito em remissão
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSR	Óbito sem remissão
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, Polymerase chain reaction)
Ph	Cromossomo Philadelphia
pb	Pares de base
pRb	Proteína retinoblastoma
REC	Recidiva
REM	Remissão
RFLP	Polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição (do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ácido ribonucléico
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SMD	Síndrome mielodisplásica
SlgM	Imunoglobulina de superfície
SP	Sangue periférico
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês, Signal transducers and activators of transcription)
TdT	Terminal Desoxinucleotidil Transferase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMO	Transplante de medula óssea

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	29
3.1	LEUCEMIAS AGUDAS.....	29
3.1.1	Leucemia Mieloide Aguda.....	30
3.1.2	Leucemia Linfoide Aguda.....	31
3.1.3	Diagnóstico.....	32
3.1.4	Fatores prognósticos.....	38
3.1.5	Tratamento.....	53
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	55
4.1	CASUÍSTICA.....	55
4.1.1	Critérios de inclusão.....	55
4.1.2	Critérios de exclusão.....	55
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA.....	56
4.3	PCR PARA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO DO TIPO <i>FLT3-DIT</i>	57
4.4	DETECÇÃO DA MUTAÇÃO DO TIPO <i>FLT3-D835</i>	58
4.5	PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE <i>NPM1</i>	60
4.5.1	Concentração de $MgCl_2$	62
4.5.2	Adição de cosolventes.....	62
4.5.3	Quantidade de DNA.....	62
4.6	ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE <i>NPM1</i> POR SEQUENCIAMENTO.....	62
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5	RESULTADOS.....	65
5.1	PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES PARA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NO GENE <i>NPM1</i>	65
5.1.1	Padronização da técnica de PCR para detecção da mutação no gene <i>NPM1</i>	65
5.1.2	Sequenciamento.....	67
5.2	ANÁLISE DESCRITIVA DOS CASOS ANALISADOS.....	68
5.2.1	Descrição dos casos clínicos de pacientes que apresentaram a nova mutação no gene <i>NPM1</i>	70

5.2.2	Análise da associação entre as mutações no gene <i>FLT3</i> com outros fatores prognósticos.....	71
6	DISCUSSÃO.....	79
7	CONCLUSÕES.....	85
8	PERSPECTIVAS.....	87
	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo.....	113
	APÊNDICE B – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, sob número de registro 212/2009.....	121
	APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes do HU/UFSC.....	123

1 INTRODUÇÃO

No processo normal de hematopoiese as células utilizam sistemas complexos de proliferação, diferenciação e apoptose. As leucemias agudas (LAs) resultam de uma série de eventos mutacionais evidenciados durante o processo de hematopoiese, os quais alteram esses sistemas e conduzem a proliferação de células imaturas de forma descontrolada. A multiplicação excessiva dessas células, denominadas clones leucêmicos, conduz à produção insuficiente de células maduras normais na medula óssea (MO). Essa infiltração da medula frequentemente é acompanhada por neutropenia, anemia e/ou plaquetopenia no sangue periférico (SP), podendo levar a infecções e sangramentos, complicações potencialmente fatais, se não for instituído tratamento adequado (STONE; O'DONNELL; SEKERES, 2004; CAMMENGA, 2005; LIESVELD, 2010; CORNELL; PALMER, 2012).

Ainda com o avanço nas técnicas de diagnóstico e tratamento, a progressão rápida da doença faz com que essas neoplasias malignas ainda sejam responsáveis pela principal causa de óbito por câncer em crianças e, também, em adultos com menos de 39 anos de idade (DESCHLER; LUBBERT, 2006; RIVA; LUZI; PELICCI, 2012).

Nos últimos anos o progresso das tecnologias genômicas junto a caracterização de diversas mutações genéticas, fez com que as LAs passassem a ser identificadas como doenças altamente heterogêneas e permitiu que o entendimento da doença sofresse alterações em relação à classificação, ao diagnóstico e ao tratamento. A atualização do sistema de classificação das LAs pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, redefiniu o diagnóstico da doença, que combina características tradicionais como a clínica e parâmetros morfológicos, com análises imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares. O conhecimento a respeito dessas alterações genéticas possui valor prognóstico importante no que se refere a taxas de remissão, risco de recidiva e sobrevida global (SG). Com base nesses resultados é possível estabelecer a correta estratificação dos pacientes diagnosticados com LA em subgrupos, com o intuito de melhorar a avaliação individual e, também, a escolha de uma abordagem terapêutica diferenciada (SWERDLOW et al., 2008; VARDIMAN et al., 2009).

Além do sistema de classificação da OMS para as LAs, sistemas de diretrizes internacionais como *LeukemiaNet Europea* (ELN) e *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) atualizados com frequência, também incluem a pesquisa de alterações genéticas (*NPM1*, *CEBPA*, *FLT3* e *KIT*) nos guias de avaliação dos pacientes ao

diagnóstico (DÖHNER, 2010). Ainda mais, além das alterações genéticas serem amplamente utilizadas nas classificações de risco em favorável, intermediário e desfavorável, sua detecção também é utilizada para avaliar se os pacientes serão beneficiados com transplante de medula óssea (TMO) alogênico e na avaliação da doença residual mínima (DRM) (GRIMWADE, 2012; HEEL et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto prognóstico da associação das mutações no gene *FLT3* (duplicação interna em tandem-DIT e mutação pontual D835) e no gene *NPM1* com outros parâmetros laboratoriais e clínicos em pacientes portadores de LA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e implantar a metodologia de PCR seguida de sequenciamento para a detecção da mutação no gene *NPM1* no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias da UFSC;
- Investigar as mutações no gene *FLT3* (DIT e D835) e no gene *NPM1* nas amostras de SP e/ou MO de pacientes com diagnóstico de LA, referenciados ao Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, antes da primeira terapia;
- Associar a presença das mutações nos genes *FLT3* (DIT e D835) e no gene *NPM1* com outros fatores prognósticos, como: idade, leucometria, atividade da LDH, expressão de CD34 e marcadores aberrantes nos blastos e a presença de outras alterações citogenéticas, antes da primeira terapia;
- Relacionar presença das mutações nos genes *FLT3* (DIT e D835) e no gene *NPM1* e suas associações com o prognóstico e evolução clínica;
- Avaliar a importância da detecção das mutações nos genes *FLT3* (DIT e D835) e *NPM1* para a estratificação de prognóstico de pacientes portadores de LA.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LEUCEMIAS AGUDAS

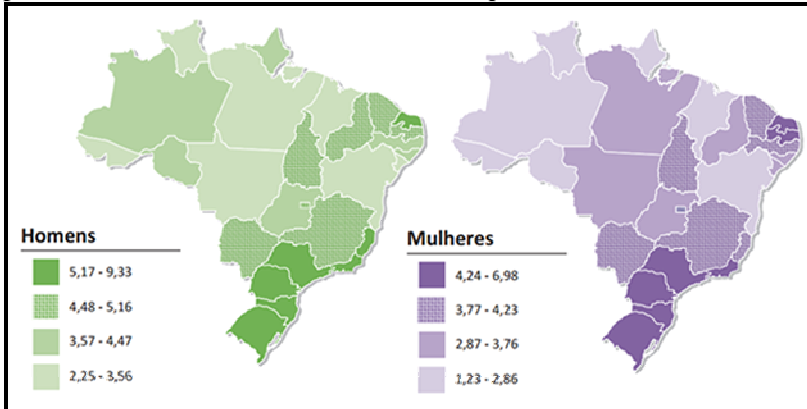
As transformações malignas envolvem a aquisição de uma série de mudanças genéticas e epigenéticas que desregulam o processo normal de desenvolvimento celular, resultando na geração de um clone neoplásico, com propriedades de crescimento desreguladas (GREAVES, 1999; CAGNETTA, 2014). Nesse contexto, as LAs podem ser caracterizadas por sucessivos eventos mutacionais nas células tronco hematopoiéticas, que se acumulam e resultam nos chamados clones leucêmicos, e apresentam dano na diferenciação celular normal, proliferação e apoptose. Esse processo é denominado leucemogênese (BAIN, 2003; LIESVELD, 2010; KITAMURA et al., 2014). A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação celular, o que caracteriza a LA como uma doença heterogênea em relação às características clínicas, morfológicas, imunológicas e moleculares, assim como o contexto celular em que as alterações genéticas ocorrem (VOGELSTEIN, 2004). Assim, as LAs podem ser divididas em mieloides e linfoides de acordo com o comprometimento da célula com a linhagem precursora (KERSEY, 1997; LIESVELD; LICHTMAN, 2010).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, (INCA, 2014), os índices de leucemias no Brasil mostram-se altos e a estimativa para o biênio 2014-2015 (as informações para o ano de 2014 são válidas também para o ano de 2015) é de aproximadamente 9.370 novos casos, sendo 5.050 casos novos de leucemia em homens e 4.320 em mulheres. Na região sul, em relação aos homens as leucemias ocupam a décima posição na lista de neoplasia mais frequente, enquanto que para as mulheres este tipo de câncer ocupa a oitava posição. Para o Estado de Santa Catarina, foram estimados 2.060 novos casos da patologia (1.140 para homens e 920 para mulheres) e, para a capital Florianópolis, estimam-se 330 novos casos (180 para homens e 150 para mulheres). Como pode ser observado na Figura 1, a região sul apresenta altos índices de prevalência da doença, dados que evidenciam a importância clínica dos avanços laboratoriais que devem ocorrer no diagnóstico e prognóstico das leucemias (INCA, 2014).

As leucemias mieloides agudas (LMAs) têm a incidência global de 3,7 por 100.000 habitantes e representam o tipo mais frequente de leucemia em pacientes adultos (25%) (KUMAR 2011; HOWLADER et al., 2013). Enquanto que as leucemias linfoides agudas (LLAs) possuem

uma frequência de um a dois casos por 100.000 habitantes e constituem 11% de todas as leucemias. A distribuição das LLAs, de acordo com a faixa etária, aponta para um modelo binodal mais prevalente em crianças e idosos (JABBOUR; FADERL; KANTARJIAN, 2005; SIEGEL et al., 2014).

Figura 1 - Representação espacial das taxas de incidência de leucemia por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o biênio 2014-2015.



Fonte: INCA, 2014

3.1.1 Leucemia Mieloide Aguda

As LMAs representam um grupo de doenças que podem ser causadas por diversas alterações genéticas as quais conduzem a uma desordem clonal em células tronco ou células progenitoras do sistema hematopoiético de origem mieloide na MO, com ou sem envolvimento do SP, e que ocasionalmente também podem infiltrar o fígado, baço, linfonodos e outros tecidos (O'DONELL et al., 2012; FERRARA; SCHIFFER, 2013). A progressão natural da doença é caracterizada pela supressão da hematopoiese normal, que leva ao comprometimento de células sanguíneas, como granulócitos, linfócitos, eritrócitos ou plaquetas, prejudicando suas funções normais (ESTEY, 2001; BASSAN et al., 2004). Sem o tratamento adequado, os pacientes portadores de LMA podem ir a óbito em dias, semanas ou meses, como consequência de infecções, sangramentos, anemia, entre outras causas (STONE; O'DONNELL; SEKERES, 2004; CAMMENGA, 2005; LIESVELD, LICHTMAN, 2010; CORNELL; PALMER, 2012).

A LMA é o tipo de leucemia mais predominante em adultos, com diagnóstico realizado com mediana de 66 anos e mais de 50% de todos os casos de LMA ocorrem em indivíduos com idade superior a 65 anos, ainda aproximadamente um terço dos pacientes é diagnosticado após os 75 anos de idade (PARIKH; JABBOUR; KOLLER, 2011; YIN et al., 2012; SCHLENK; DÖHNER, 2013; CAGNETTA et al., 2014). Dessa forma, a LMA é considerada uma doença heterogênea e é classificada em subtipos a partir de fatores biológicos e prognósticos definidos pela imunofenotipagem, pela análise citogenética e molecular (SMITH; HILLS; GRIMWADE, 2011; GRIMWADE, 2012).

As translocações e variações cromossômicas que frequentemente resultam de rearranjos gênicos são características nas LMAs, e sugerem que eventos genéticos são fatores importantes para a compreensão dos mecanismos da leucemogênese (BETZ; HESS, 2010), o que levou a uma identificação crescente nos últimos anos da variedade de anormalidades citogenéticas, e permitiu a elucidação mais precisa da heterogeneidade da doença (VARDIMAN et al., 2009; SANDERS; VALK, 2013; CAGNETTA et al., 2014). A incorporação das alterações cromossômicas como fatores primários de determinação de subgrupos representa um avanço importante nos sistemas de classificação das LMAs. Recentemente, um sistema de classificação de risco citogenético foi definido, e divide os pacientes em grupos de prognósticos favorável, intermediário e adverso de acordo com os achados citogenéticos ao diagnóstico (SWERDLOW et al., 2008).

3.1.2 Leucemia Linfóide Aguda

A LLA é uma neoplasia derivada de células linfóides indiferenciadas, que estão presentes em grande número na MO, no timo e nos gânglios linfáticos (UCKUN et al., 1998; PUI; RELLING; DOWNING, 2004). Embora as LLAs possam estar presentes em todas as idades, é considerada uma neoplasia predominantemente de crianças, pois acomete cerca de 80% dos pacientes neste grupo, enquanto que 20% dos pacientes adultos são acometidos. A mediana de idade relatada ao diagnóstico varia entre 25 e 45 anos, com 60% dos pacientes diagnosticados até os 20 anos de idade (JABBOUR; FADERL; KANTARJIAN, 2005; ESPARZA; SAKAMOTO, 2005; ASSELIN; GAYNON; WHITLOCK, 2013). Na classificação mais recente da OMS de 2008, as LLAs podem ser classificadas de acordo com o imunofenótipo em três principais grupos: LLA de células precursora B; LLA de células B associada a anormalidades genéticas recorrentes e

LLA de células T precursoras. Dessas, cerca de 75% dos casos são de origem de células pré-B, 5% de células B do tipo maduras e cerca de 20% dos casos pertencem ao grupo de células T (BÉNÉ, 2005; BASSAN; HOELZER, 2011).

As anormalidades estruturais cromossômicas são importantes para a classificação das LLAs em adultos e crianças, pois essas informações são consideradas de relevância prognóstica, e em conjunto com as alterações moleculares definem um perfil de risco nestes pacientes, assim como nos casos de LMA; o que contribui para uma melhor conduta terapêutica (PUI; RELING; DOWNING, 2004; ARMSTRONG; LOOK, 2005).

3.1.3 Diagnóstico

Geralmente, o diagnóstico de LA inicia-se a partir de uma suspeita clínica, e baseia-se na avaliação do histórico e exame físico do paciente (BAIN, 2003; (SWERDLOW et al., 2008). Segundo a OMS (2008), o diagnóstico das LAs é realizado pela junção dos resultados da análises citomorfológicas e imunofenotípicas, com métodos citogenéticos e moleculares (SWERDLOW et al., 2008). Segundo a OMS as características laboratoriais incluem as análises de amostras de SP e/ou MO, obtidas antes da primeira terapia. O uso de procedimentos diagnósticos permite a identificação da linhagem das células neoplásicas e a avaliação do grau de maturação, o que é fundamental para orientar a terapêutica e determinar, até certo ponto, o prognóstico das leucemias (FARIAS; DE CASTRO, 2004; SWERDLOW et al., 2008).

3.1.3.1 Dados morfológicos

A porcentagem de blastos é uma informação prática para categorizar as leucemias de acordo com sua progressão. Segundo a OMS (2008), amostras de pacientes com mais de 20% de blastos são consideradas LMAs. Em alguns casos associados com anormalidades genéticas definidas, como na translocação t(8;21)(q22;q22), o diagnóstico de LMA pode ser feito independentemente da contagem de blastos no SP ou MO (SWERDLOW et al., 2008). O diagnóstico de LLA é feito quando a amostra de MO do paciente apresenta 25% ou mais de linfoblastos. Porém, quando o paciente apresenta menos de 20% de linfoblastos na MO e não há evidência de massa extramedular, mas apresenta associação com anormalidades genéticas recorrentes, também é considerado um caso de LLA (VARDIMAN et al., 2009).

O aspecto morfológico representa a primeira etapa do algoritmo de diagnóstico, entretanto este método não atinge os critérios necessários para uma precisa diferenciação entre mieloblastos e linfoblastos. Sendo assim, a imunofenotipagem por citometria de fluxo tornou-se o padrão-ouro para identificação dessas linhagens celulares e correta subclassificação das LAs (LAI; HIRSCH-GINSBERG; BUESO-RAMOS, 2000; SEVILLA et al., 2010; CHIARETTI; ZINI, G; BASSAN, 2014).

3.1.3.2 Imunofenotipagem

Para a LA, a citometria de fluxo multiparamétrica tem sido o método preferencial para detectar a presença de antígenos específicos da linhagem celular e do estágio de maturação em amostras clínicas. A classificação imunofenotípica das LAs é baseada na avaliação de painéis de anticorpos monoclonais e policlonais contra os diversos antígenos de superfície celular, citoplasmáticos ou nucleares, os chamados “*cluster of differentiation*” (CD) (SWERDLOW et al., 2008).

A imunofenotipagem desempenha um papel fundamental no diagnóstico e classificação das doenças hematológicas e também possui contribuição relevante para definir a estratificação prognóstica dos pacientes e orientar na decisão terapêutica mais adequada (DEL VECHIO et al., 2004; SWERDLOW et al., 2008; HEEL et al., 2013). Seguindo este princípio, a combinação de anticorpos de alta sensibilidade e especificidade é feita para cada linhagem celular de maneira que possam definir o perfil das populações celulares avaliadas através de um painel, o qual contribui para a definição ou confirmação de um diagnóstico de acordo com a mais recente classificação da OMS (2008) (SWERDLOW et al., 2008; BAIN, 2010; HEEL et al., 2013). Além disso, o perfil imunofenotípico pode ser útil na detecção de anormalidades, como perfis antigênicos aberrantes e no monitoramento da DRM após o tratamento das LAs, e assim identificar casos de recidiva, aceleração ou transformação da doença (VARDIMAN et al., 2009; GRIMWADE, 2012; HEEL et al., 2013; NCCN, 2014).

Os antígenos de membrana e citoplasmáticos são característicos de diferentes tipos de células, e, em alguns casos podem ser específicos; isso possibilita identificar a linhagem celular nos seus diferentes estágios de maturação por meio de anticorpos contra esses antígenos, e assim classificar as leucemias em linfóides (subtipos B e T) ou mielóides. Como pode ser observado no Quadro 1, as células leucêmicas de linhagem B expressam comumente os antígenos de membrana CD19,

CD22 e o antígeno citoplasmático CD79a. Os linfoblastos nas LLA-T usualmente expressam TdT e variavelmente podem expressar CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8, entre esses, o antígeno CD3 citoplasmático ou de superfície e CD7 são os mais frequentemente positivos. O subtipo LLA-T pode ainda ser estratificado em três diferentes grupos de acordo com os antígenos de diferenciação celular (SWERDLOW et al., 2008; BÉNÉ et al., 2011).

Quadro 1 - Classificação imunofenotípica das LLAs de linhagem B e T.

Marcador	<i>Linhagem B</i>				<i>Linhagem T</i>			
	Pró-B	Comum	Pré-B	B madura	Pró-T	Pré-T	T cortical	T medular
HLA-DR	+	+	+	+	+	-/+	-	-
TdT	+	+	+	+/-	+	+	+	+
CD79a	+	+	+	+	-	-	-	-
CD19	+	+	+	+	-	-	-	-
CD22c	-/+	+	+	+	-	-	-	-
CD10	-	+	+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/-
CD20	-	-/+	+	+	-	-	-	-
cμ	-	-	+	-	-	-	-	-
SIgM	-	-	-	+	-	-	-	-
CD7	-	-	-	-	+	-	+	+
CD2	-	-	-	-	-	+	+	+
CD3(c)	-	-	-	-	+	+	+	+
CD1a	-	-	-	-	-	-	+	+
CD3	-	-	-	-	-	-	+	+
CD4/CD8	-	-	-	-	-	-	-/+	-/+

TdT=Terminal Desoxinucleotidil Transferase; CD22(c) = CD22 intracitoplasmático; cμ= cadeia μ citoplasmática; Smlg = imunoglobulina de superfície; +: expressão do antígeno; +/-: expressão variável, frequentemente positiva; -: ausência de expressão do antígeno; -/+ : expressão variável, frequentemente negativa.

Fonte: Adaptado de BÉNÉ et al., 2011.

As características imunofenotípicas das LMAs são extremamente heterogêneas provavelmente devido a sua variabilidade genética. A presença de marcadores como: mieloperoxidase (MPO), CD33 e CD34 caracterizam o diagnóstico de LMA (Quadro 2). A positividade para o CD117 é um achado importante, visto que é um marcador expresso somente nas LMA's (SWERDLOW et al., 2008; BÉNÉ et al., 2011).

Quadro 2 - Expressão de marcadores imunofenotípicos utilizados no diagnóstico e classificação das LMAs.

Linhagem imatura	MPOc, CD13, CD33, CD117
Maturação celular	HLA-DR, CD34, CD45
Linhagem monocítica	CD11c, CD13, CD14, CD33, CD64
Linhagem megariocítica	CD41, CD61, CD42
Linhagem granulocítica	CD13, CD15, CD33
Série eritróide	CD71, CD235a (glicoforina A)

Fonte: Adaptado de DÖHNER et al., 2010; LICÍNIO; SANTOS-SILVA, 2011.

3.1.3.3 Citogenética

A citogenética e os estudos moleculares frequentemente detectam anormalidades dentro do clone leucêmico, os quais podem sugerir o diagnóstico e/ou o prognóstico, auxiliar na escolha terapêutica, na detecção de eventual DRM e recidiva do paciente (GRIMWADE et al., 2001; HALL, 2001; SWIRSKY; RICHARDS, 2001; MRÓZEK; BLOOMFIELD, 2012; MALUF; RIEGEL, 2011). As aberrações citogenéticas adquiridas são detectadas em 55%-75% dos pacientes recentemente diagnosticados com LMA (GRIMWADE et al., 2001; LÖWENBERG, 2001) e aproximadamente em 80% dos pacientes com diagnóstico de LLA, incluindo tanto anormalidades numéricas quanto estruturais (HRUSAK; PORWIT-MACDONALD, 2002; MALUF; RIEGEL, 2011).

Estudos de alterações citogenéticas podem fornecer características das anormalidades cromossômicas, as quais são utilizadas na classificação das LMAs, o que possibilita identificar perfis de risco em favorável, intermediário e não favorável nos grupos analisados (GRIMWADE et al., 1998; MRÓZEK, 2008; MARCHESI et al., 2011; CORNELL; PALMER, 2012). Testes adicionais como a detecção de mutações genéticas contribuem para a avaliação do risco desses pacientes, e estão cada vez mais reconhecidas como importantes

marcadores de diagnóstico e prognóstico em neoplasias do sistema hematopoiético (SWERDLOW et al., 2008; DALAL et al., 2012; NCCN, 2014).

Como consequência, a classificação da OMS de 2008 inclui vários subconjuntos de LMAs, que além das classes caracterizadas pelas alterações cromossômicas recorrentes e aspectos morfológicos inclui classes provisórias com base em suas características genômicas (VARDIMAN et al., 2009) (Quadro 3).

Nessa mesma classificação, a LLA esta dividida em LLA de precursores de células B, de células T e leucemia de Burkitt (considerada uma fase leucêmica do linfoma de Burkitt) (Quadro 4).

Quadro 3 - Classificação para as LMAs e neoplasias relacionadas (Continua).

<p>LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes</p> <p>LMA com t(8 ;21)(q22,q22) ; Runx1-RUNXT1</p> <p>LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16 ;16) (p13.1;q22); CBFB-MyH11</p> <p>LPA com t(15 ;17)(q22,q12); PML-RARA</p> <p>LMA com t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL</p> <p>LMA com t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214</p> <p>LMA com inv(3) (p21;q26.2) ou t(3;3)(p21;q26.2); RPN- EVI1</p> <p>LMA megacarioblástica com t(1;22)(p13;q13); RBM15- MKL1</p> <p><i>Entidade provisória: LMA com mutação NPM1</i></p> <p><i>Entidade provisória: LMA com mutação CEBPA</i></p>
<p>LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia</p>
<p>Neoplasias mieloides associadas ao tratamento</p>
<p>LMA não categorizada nos itens anteriores</p> <p>LMA com mínima diferenciação</p>

Quadro 3 - Classificação para as LMAs e neoplasias relacionadas (Conclusão).

<p>LMA sem maturação LMA com maturação Leucemia mielomonocítica Leucemia monoblástica/monocítica Leucemia eritroide aguda Leucemia eritroide pura Eritrolecemia, eritroide/mieloide Leucemia megacarioblástica Leucemia basofílica Panmielose aguda com mielofibrose</p>
<p>Sarcoma mieloide</p>
<p>Proliferação mieloide relacionada com síndrome de Down</p> <p>Mielopoiese transitória anormal</p> <p>Leucemia mieloide associada com síndrome de Down</p>
<p>Neoplasias de células blásticas dendríticas plasmocitoides</p>

LMA: Leucemia mieloide aguda; LPA: Leucemia promielocítica

Fonte: Adaptado de SWERDLOW et. al., 2008.

Quadro 4 - Classificação para as LLAs e neoplasias relacionadas (Continua).

<p>Leucemia\Linfoma Linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes:</p> <p>Leucemia\Linfoma Linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL</p> <p>Leucemia\Linfoma Linfoblástico B com t(v;11q23);MLL</p> <p>Leucemia\Linfoma Linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22), TEL-AML1 (ETV6Runx1)</p> <p>Leucemia\Linfoma Linfoblástico B com hiperdiploidia</p> <p>Leucemia\Linfoma Linfoblástico B com hipodiploidia</p>

Quadro 4 - Classificação para as LLAs e neoplasias relacionadas (Conclusão).

IL3-CMI	Leucemia\Linfoma Linfoblástico B com t(5;14)(q31;q32)
	Leucemia\Linfoma Linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1
Leucemia\Linfoma linfoblástico B, não categorizada nos itens anteriores	
Leucemia\Linfoma Linfoblástico T	

Fonte: Adaptado de VARDIMAN et al., 2009

3.1.4 Fatores prognósticos

Fatores prognósticos em doenças malignas podem ser definidos como variáveis relacionadas ao paciente, seja de forma clínica ou biológica, bem estabelecidas e que devem ser avaliadas em conjunto, como por exemplo: detecção de marcadores moleculares, alterações citogenéticas, laboratoriais e outras comorbidades. Tais fatores estão amplamente ligados a estratificação do paciente e consequentemente a decisão terapêutica. Essas diferenças auxiliam na escolha do protocolo a ser seguido, seja através de um tratamento padrão ou por uma decisão terapêutica específica (SMITH et. al, 2010; LIERSCH et al., 2014).

O prognóstico dos pacientes portadores de LMA pode variar, mas a grande maioria apresenta prognóstico desfavorável, o qual tem sido associado a subgrupos de pacientes idosos, precoces de síndrome mielodisplásica (SMD), associado ao tratamento com quimioterapia durante o período de indução, leucocitose ou atividade elevada da enzima lactato desidrogenase (LDH) (LÖWENBERG; DOWNING; BURNETT, 1999; STONE, 2009; BURNETT, 2012; LIERSCH et al., 2014). Nas LLAs, um fator prognóstico importante a ser considerado é a presença do cromossomo Philadelphia (Ph), o qual está presente em 5% de crianças e em 25% de pacientes adultos diagnosticados com LLA (PULLEN et al., 1999; PUI; RELLING; DOWNING, 2004; SCHAFFEL; SIMÕES, 2008).

3.1.4.1 Idade

A idade do paciente ao diagnóstico é um fator prognóstico importante relacionado ao paciente portador de LMAs. A influência da idade no prognóstico é evidente nos pacientes com idade superior a 60 anos (APPELBAUM et al., 2006; JULIUSSON et al., 2009). Pois muitos fatores contribuem para isso, como a maior frequência de comorbidades, contraindicações do tratamento citotóxico intensivo, maior incidência de LMA secundária a SMD antecedente, e maior frequência de anormalidades citogenéticas adversas (SEKERES et al., 2004; BUCHNER et al., 2009; KRUG et al., 2010). Esses pacientes têm menores taxas de resposta à primeira indução do tratamento, maiores índices de mortalidade, menor sobrevida livre de doença (SLD) e menor sobrevida global (SG) (BURNETT, 2012). No entanto, mesmo considerando todos esses fatores, a idade do paciente continua a ser um forte fator prognóstico independente (BUCHNER et al., 2009; KRUG et al., 2010). Pacientes com 65 anos ou mais são considerados de mau prognóstico, mesmo após quimioterapia intensiva, independente do seu risco citogenético (SCHOCH et al., 2004; APPELBAUM et al., 2006; BUCHNER et al., 2009).

Em crianças diagnosticadas com LLA maiores de nove anos a idade é considerada como de prognóstico desfavorável (SCHULTZ et al., 2007). Pacientes adultos maiores de 35 anos e leucometria maior a $30.000/\text{mm}^3$, são considerados de alto risco, onde há uma significativa queda na duração da remissão e na taxa de SLD e SG (GÖKBUGET; HOELZER, 2006; BASSAN; HOELZER, 2011).

3.1.4.2 Parâmetros Laboratoriais

Outros fatores prognósticos considerados importantes ao diagnóstico e utilizados como ferramenta complementar, são a leucometria e a atividade da enzima LDH.

A leucometria elevada, com mais de $30.000/\text{mm}^3$, em pacientes portadores de LLA-B e mais que $100.000/\text{mm}^3$ em pacientes com LLA-T, é considerada como de prognóstico desfavorável. Enquanto que em pacientes portadores de LMA, a contagem global de leucócitos superior $10.000/\text{mm}^3$, já é considerada de alto risco (GÖKBUGET; HOELZER, 2006; ZANICHELLI; COLTURATO; SOBRINHO, 2010; BASSAN; HOELZER, 2011; CORNELL; PALMER, 2012).

A determinação da atividade da enzima LDH é utilizada no diagnóstico de LAs como um marcador tumoral, a sua atividade

relaciona-se tanto com volume da neoplasia como com sua taxa de crescimento. O aumento da concentração plasmática dessa enzima é considerado como um fator prognóstico desfavorável, tanto para os pacientes portadores de LLA quanto para aqueles com LMA. Desse modo, pacientes com elevada atividade da LDH podem requerer uma terapia quimioterápica mais intensiva (KERN; SCHNITTGER, 2003; TSIMBERIDOU et al., 2008; BUCHNER et al., 2009).

3.1.4.3 Alterações cromossômicas

Nas análises multivariadas incluindo idade, tipo de leucemia e contagem de leucócitos, as alterações de cariótipo foram relatadas como o fator independente de prognóstico mais significativo (APPELBAUM et al., 2006; DÖHNER et al., 2010; LIERSCH et al., 2014). A análise cromossômica é particularmente útil na avaliação do prognóstico, que consequentemente influenciará na decisão terapêutica. Para a avaliação dessas alterações genéticas, atualmente além da citogenética, os laboratórios clínicos têm disponíveis técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e de hibridação *in situ* com fluorescência (FISH) capazes de detectar anomalias que não são visíveis na análise de cariótipo, como micro deleções e rearranjos cromossômicos (NAOUM, 2001; VARDIMAN et al., 2009).

Na revisão da OMS (2008), foram incluídos subtipos de leucemia de acordo com a frequência em que essas anormalidades citogenéticas são encontradas (Quadro 5). A presente classificação apresenta um subgrupo denominado “LMA com anormalidades genéticas recorrentes” entre a classificação das LMAs e três outros grupos presente na classificação das LLAs de acordo o perfil de risco dos pacientes, o que demonstra a importância da análise dessas anormalidades como guia do perfil de risco/estratificação, além de identificar pacientes com alterações genéticas específicas que podem ser beneficiados com terapias moleculares (SWERDLOW et al., 2008; DÖHNER, 2010).

Da mesma forma que ocorre com as LMAs, algumas anormalidades citogenéticas também estão associadas às LLAs. A frequência dessas alterações pode variar conforme a idade do paciente em crianças e adultos, o que pode explicar a diferença entre as manifestações clínicas nessas duas populações. Por exemplo, em pacientes pediátricos a alteração mais comum é a hiperploídia (>50 cromossomos-25% dos casos) em células B, comparado a apenas 7% em pacientes adultos. Por outro lado, a alteração Ph-positivo, de prognóstico desfavorável, é frequentemente encontrada em adultos

(25%) e raramente encontrada em crianças (3%) (PULLEN et al., 1999; NCCN, 2014).

Quadro 5 - Anormalidades citogenéticas utilizadas na classificação das LAs da OMS (2008).

Fator de risco/Citogenética			
	<i>Favorável</i>	<i>Intermediário</i>	<i>Desfavorável</i>
LMA	inv(16) (p13q22)	Citogenética	Citogenética complexo
	t(16;16)(p13;q22)	normal	>3 anormalidades
	t(8;21)(q22;q22)	t(9;11)	Cariótipo monossomal
	t(15;17)(q22;q12-21)	(p22;q23)	inv(3)(q21q26)
		+8	t(3;3)(q21;q26)
	+6	t(6;9)(p23;q34)	
	-Y	t(9;22)(q34;q11)	
		11q;23	
		-5, 5q	
		-7, -7q	
LLA	Hiperplóidia	t(1;19)(q23;p13)	Hipoplóidia
	t(7;14)(14q;7q34 ou 7p14)		t(9;22)(q34;q11)
	t(12;21)(p13;q22)		t(4;11)(q21;q23)

Fonte: BASSAN et al., 2004; NCCN, 2014.

3.1.4.4 Marcadores Moleculares

O avanço nas novas técnicas de sequenciamento permitiu um rápido aumento na identificação de novas mutações genéticas. Segundo Naoe e Kiyoi (2013), aproximadamente 30 novas alterações foram identificadas com significado ainda desconhecido ou relacionado às LMAs com cariótipo normal (NAOE; KIYOI, 2013).

As mutações genéticas foram incorporadas às classificações de risco, o que aumentou a habilidade de indentificar alterações que apresentem um impacto positivo quando avaliadas em conjunto com outros grupos prognósticos, principalmente no que se refere a pacientes com cariótipo normal ou quando a análise citogenética não é suficiente para avaliar o perfil prognóstico, situações onde as alterações citogenéticas não podem ser detectadas pela técnica de *FISH* (GRIMWADE, 2001; SWERDLOW et al., 2008).

Essas mutações envolvem múltiplas vias de sinalização e podem ser divididas em duas classes: oncogenes de classe I, a qual inclui mutações que conferem vantagens proliferativas às células leucêmicas através da ativação de receptores tirosina-cinase como os receptores FLT3 e N-Ras, ou ainda mutações que atuam na inativação de supressores de tumor como o p53, induzindo a proliferação celular ou inibindo a apoptose. Oncogenes de classe II: inibem a diferenciação através do bloqueio de fatores de transcrição como *AML1/Runx1* e *MLL* (Quadro 6). Associações entre classe I e classe II desempenham um papel fundamental no desenvolvimento das LAs (HASSERJIAN, 2013; KITAMURA, 2014).

Quadro 6 - Classificação das mutações encontradas em neoplasias hematológicas.

Mutações de Classe I (induzem a proliferação e inibem a apoptose)
<i>FLT3-DIT, KIT, PDGFR, TEL-PDGFR, FGFR JAK2, JAK3, BCR-ABL NRAS, KRAS p53, NF1</i>
Mutações de Classe II (inibem a diferenciação)
<i>RUNX1/AML1, PUI, CEBPA Fusões MLL, PML-RARA, AML1-ETO</i>

Fonte: Adaptado de KITAMURA et al., 2014.

As alterações cromossômicas e as anormalidades genéticas têm papel fundamental na estratificação dos subtipos das LAs. Essas alterações em conjunto determinam um perfil de classificação de risco em favorável, intermediário e desfavorável de acordo com suas características (Quadro 7). A categoria de risco intermediário é a categoria mais heterogênea das LMAs, e está relacionada ao cariótipo normal sem anormalidades estruturais. Baseado na análise retrospectiva de grandes centros de estudos sabe-se que 40 a 50% dos pacientes com LMA possuem cariótipo normal (GRIMWADE et al., 2001; BYRD et al., 2002; GROSSMANN et al., 2012; PATEL et al., 2012).

Desse modo, a descoberta de mutações genéticas no processo de leucemogênese foi importante para caracterizar muitos casos de LMA citogeneticamente normais. Tanto nesses casos como naqueles em que apresentam características citogeneticamente anormais, essas anormalidades genéticas recém-descobertas podem estar associadas a características clínicas, morfológicas e/ou fenotípicas que permitem a identificação de uma entidade leucêmica específica, e, em outros casos mostraram ser indicadores prognósticos eficientes, mesmo quando eles não definem um subtipo leucêmico específico (VARDIMAN et al., 2009).

Como citado anteriormente, a estratificação de risco é baseada na citogenética e na incidência das mutações gênicas. Atualmente, apenas uma seleção limitada de mutações genéticas estão incluídas nos modelos de estratificação prognóstica amplamente utilizados, como no sistema *ELN* que, por exemplo, recomenda-se a pesquisa de alterações genéticas nos genes *CEBPA*, *FLT3-DIT* e *NPM1* para determinar o perfil prognóstico (SWERDLOW et al., 2008; DÖHNER et al., 2010).

As duas mutações mais comuns que acometem os pacientes com LMA e que possuem papel importante na avaliação prognóstica são as mutações no gene *NPM1*, presente em torno de 46-64% dos pacientes com cariótipo normal e 9-18% dos pacientes com cariótipo anormal, e as mutações no gene *FLT3* que ocorrem em aproximadamente 35% dos pacientes adultos (BOISSEL et al., 2006; FALINI et al., 2007; BEITINJANEH et al., 2010; ALLEN et al., 2013; PASCHKA; DÖHNER, 2013; LIERSCH et al., 2014).

Quadro 7 - Estratificação de risco com base no perfil de anormalidades moleculares e citogenéticas.

Perfil de risco	Alterações moleculares	Alterações citogenéticas
Favorável	Citogenética normal com: Mutação <i>NPM1</i> sem mutação <i>FLT3-DIT</i> Mutação <i>CEBPA</i>	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22) t(16;16)(p13;q22) t(15;17)(q22;q12-21)
Intermediário	t(8;21)(q22;q22) ou inv(16)(p13q22) ou t(16;16) com: Mutação <i>KIT</i>	+8 isolada t(9;11)(p22;q23) Outras não definidas
Desfavorável	Citogenética normal com: Mutação <i>FLT3-DIT</i>	Citogenética complexa (≥ 3 anormalidades): -5 -7 Anormalidades do 11q23, excluindo: t(9;11)(p22;q23) inv(3)(q21q26) t(3;3)(q21;q26) t(6;9)(p23;q34) t(9;22)(q34;q11)

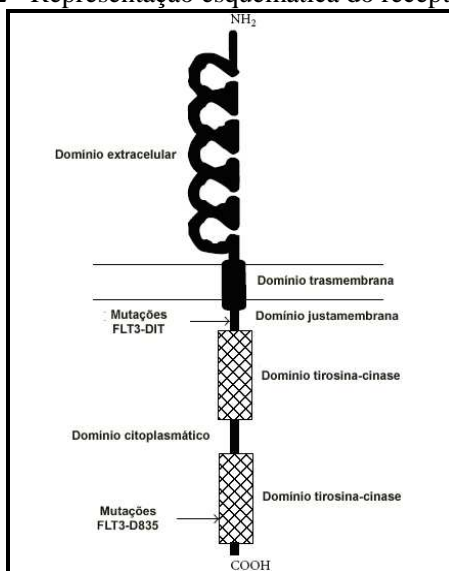
Fonte: Adaptado de NCCN, 2014.

3.1.4.4.1 Mutações no gene *FLT3*

O gene *FLT3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*) está localizado no cromossomo 13q12 e codifica um receptor transmembrana do tipo tirosina-cinase, o qual desempenha um papel fundamental na hematopoiese. O receptor *FLT3* pertence a subfamília III dos receptores tirosina-cinase e é composto por cinco domínios extracelulares (DE), um domínio transmembrana (DT), um domínio justamembrana (DJ), dois domínios tirosina-cinases intracelulares e um domínio citoplasmático (Figura 2) (AGNÈS et al., 1994; GABBIANELLI et al., 1995; ROSNET et al., 1996).

Na forma inativada o receptor FLT3 permanece na membrana na forma monomérica não fosforilada, pois sua conformação alostérica não permite que o receptor sofra dimerização e conseqüentemente não exponha o sítio de fosforilação tirosina-cinase através do domínio justamembrana. Na presença de um ligante, a proteína sofre rapidamente uma alteração para a forma dimérica, alterando sua conformação, o que caracteriza o estado ativo do receptor. Dessa forma, o sítio de fosforilação do domínio tirosina-cinase é exposto, o que promove sua ativação e condução a fosforilação de diversos sítios de domínio intracelular. A ativação desses receptores recruta uma série de proteínas no citoplasma formando um complexo, o qual é internalizado e dá seqüência a cascata de sinalização celular composta, principalmente, pelas vias *PI3K* e *MAP kinases* (Figura 3) (WEISS; SCHLESSINGER, 1998; ZHANG; BROXMEYER, 2000; GONFLONI et al., 2000).

Figura 2 - Representação esquemática do receptor FLT3.

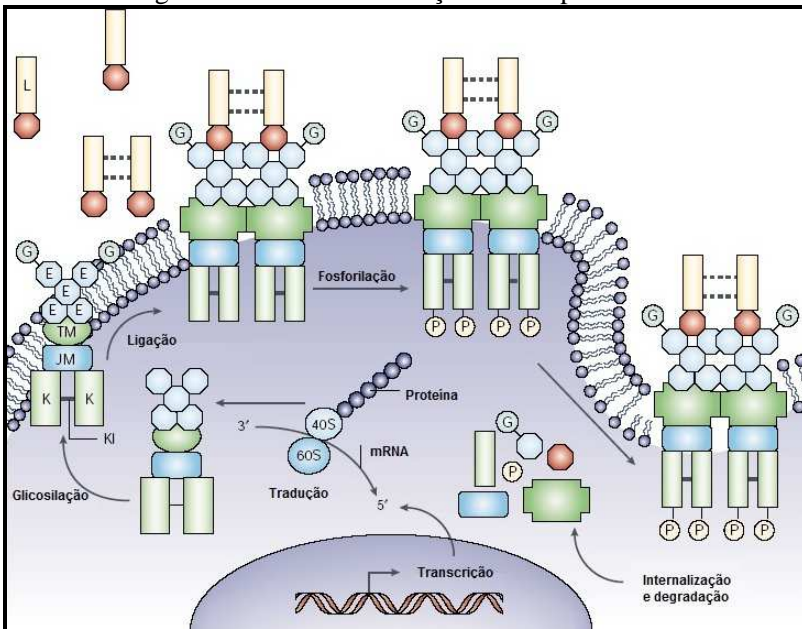


Nota: Representação esquemática do receptor *FMS-like tirosina quinase 3* (FLT3), que é composto por um domínio extracelular (DE), um domínio transmembrana (DT), um domínio justamembranar (JM), onde ocorrem as mutações *FLT3-DIT*, dois domínios tirosina-cinase altamente conservados onde ocorrem as mutações do tipo D835 e um domínio citoplasmático.

Fonte: Adaptado de SMALL, 2006.

Todos os membros da subfamília III dos receptores tirosina-cinase desempenham funções diretamente ligadas a proliferação, a diferenciação e a apoptose das células hematopoiéticas normais. Em células normais a expressão de FLT3 ocorre principalmente em células progenitoras mieloides e linfoides (GABBIANELLI et al., 1995; ROSNET et al., 1996; GILLILAND; GRIFFIN, 2002; STIREWALT; RADICH, 2003), entretanto a expressão de FLT3 também tem sido observada em órgãos linfohematopoiéticos, como no fígado, no baço e no timo (ROSNET et al., 1993; LYMAN; JACOBSEN, 1998; MCKENNA et al., 2000).

Figura 3 - Estrutura e ativação do receptor FLT3.



Nota: Transcrição do gene *FMS-like tirosina quinase 3 (FLT3)* em mRNA, o qual é traduzido na proteína FLT3. O receptor FLT3 citoplasmático sofre glicosilação que promove o deslocamento do receptor para a membrana, o receptor sem a presença da mutação, permanece como uma proteína monomérica inativa na superfície celular. Após a ligação com o ligante a proteína sofre dimerização, o receptor na forma dimerica promove a fosforilação dos domínios tirosina-cinase, ativando o receptor e seus efetores. Os receptores dimerizados são rapidamente internalizados e degradados.

Fonte: Adaptado de STIREWALT; RADICH, 2003.

Mutações no gene *FLT3* ocorrem em aproximadamente 35% de pacientes adultos com LMA e conferem um perfil de prognóstico desfavorável em pacientes que poderiam ser considerados como de risco citogenético favorável (BOISSEL et al., 2005; BEITINJANEH et al., 2010; ALLEN et al., 2013; PASCHKA; DÖHNER, 2013) ou intermediário (KOTTARIDIS et al., 2001; WHITMAN et al., 2001; FRÖHLING et al., 2002; THIEDE et al., 2002; GALE et al., 2008).

De forma geral, as alterações em *FLT3* têm sido consideradas como um fator de prognóstico e já incorporadas para a determinação de risco e intensificação terapêutica nos protocolos recém-atualizados nos países desenvolvidos (SWERDLOW et al., 2008; NCCN, 2014). Por mais que haja discordâncias quanto à agressividade da doença, todos os estudos revelam leucocitose e menor taxa de remissão na presença dessa alteração. Alguns estudos avaliam também a possibilidade de utilização das alterações em *FLT3* como marcadores tumorais para identificação de DRM, nesta avaliação pacientes com alterações genéticas de alto risco, como as mutações *FLT3-DIT* e citogenética desfavorável, apresentaram uma menor taxa de SLD comparadas com aqueles com risco intermediário (KOTTARIDIS et al., 2001; HEIDEL et al., 2006; LOKEN et al., 2012).

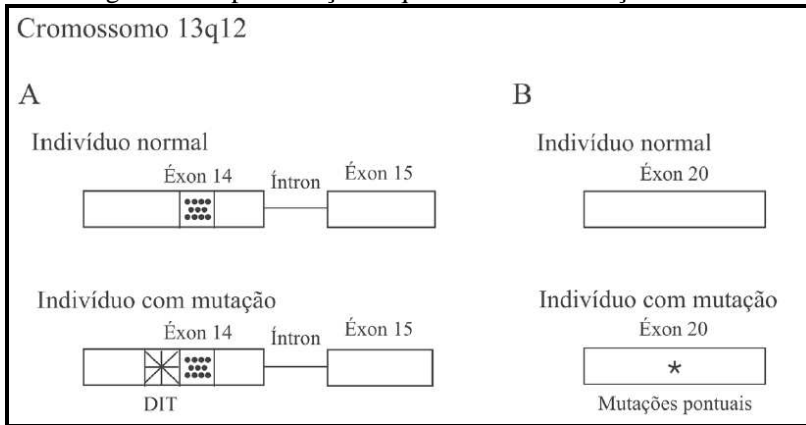
Alterações genéticas estudadas no gene *FLT3* identificam dois tipos distintos de mutação, uma no domínio justamembrana, as duplicações internas em *tandem* (DIT) no éxon 14 e o segundo tipo mais comum localizado no domínio tirosina-cinase, as mutações pontuais no resíduo D835 no éxon 20 como demonstrado na Figura 4 (STIREWALT et al., 2001; MESHINCHI et al., 2001; KOTTARIDIS et al., 2001; THIEDE et al., 2002).

As duplicações internas *in tandem* são caracterizadas pela duplicação de uma sequência de nucleotídeos sem a região que codifica o domínio justamembrana (éxon 14 e 15) ou uma região adjacente. A região duplicada pode variar de tamanho entre três e 400 pb. Esta inserção conduz a dimerização espontânea e ativação da enzima sem a presença do ligante com fosforilação autônoma e constitutiva do receptor, levando a uma proliferação celular descontrolada independente de citocinas (KIYOI et al., 1999; HAYAKAWA et al., 2000; MESHINCHI et al., 2008).

Nas doenças hematológicas malignas, as mutações do tipo DIT do gene *FLT3* são as mais encontradas, podem ser detectadas nas LMAs (15-35%), leucemia mieloide crônica (LMC) (5-10%), SMD (5-10%) e LLA (5-10%) (KIYOI et al., 1999; ABU-DUHIER et al., 2000; KOTTARIDIS et al., 2001). A prevalência dessa mutação aumenta com

a idade. Em indivíduos com idade superior aos 60 anos a frequência de mutações do tipo *FLT3-DIT* é de 30-35%. Já em pacientes mais jovens, essas alterações moleculares são detectadas em 20-25%, e podem variar entre 5-15% em pacientes pediátricos (STIREWALT et al., 2001; ANDERSSON et al., 2004).

Figura 4 - Representação esquemática das mutações *FLT3*.



Legenda: Mutações *FLT3* localizadas no cromossomo 13q12. A) mutação do tipo *FLT3-DIT*, éxon 14. B) mutação pontual *FLT3-D835*, éxon 20.

Fonte: Adaptado de LICÍNIO; SANTOS-SILVA, 2010.

A importância clínica das mutações em *FLT3* nas LMAs foi estabelecida a partir da associação entre a presença de DIT e leucocitose, alto percentual de blastos e resposta terapêutica desfavorável (KOTTARIDIS et al., 2001). Alguns grupos detectaram a presença da mutação do tipo *FLT3-DIT* concomitante a outras alterações, como, por exemplo, com a t(15;17)(q22;q12-21) indicando prognóstico favorável e com a t(6;9)(p23;q34) com prognóstico desfavorável (THIEDE et al., 2002; LIBURA et al., 2003). Entretanto, dois estudos avaliaram pacientes com LMA e t(15;17)(q22;q12-21) e não encontraram impacto significativo de *FLT3-DIT* na avaliação clínica dos pacientes, porém houve uma tendência no sentido de menor SLD e taxas maiores de recidiva nesses pacientes. Além disso, ambos os estudos encontraram uma associação significativa entre *FLT3-DIT* e leucocitose, o que indica que a presença da mutação pode influenciar no efeito biológico proliferativo em casos de LMA com t(15;17)(q22;q12-21) (KIYOI et al., 1999; NOGUERA et al. 2002).

Assim, o valor prognóstico da DIT no gene *FLT3* associada a outras alterações ainda não está bem estabelecido, pois a literatura mostra trabalhos que associam a mutação DIT no gene *FLT3* com maior frequência de recidivas, com taxas de remissão iguais aos do grupo controle ou até mesmo associado à resposta clínica favorável (LACAYO et al., 2004; GALE et al., 2007).

Além da mutação *FLT3-DIT* estar associada com a leucometria elevada, alta porcentagem de blastos na MO, também está relacionada com a diminuição de SLD e aumento do risco de recidiva na primeira remissão, em relação aos pacientes sem a mutação *FLT3-DIT*. Por isso, a presença dessa mutação está relacionada a casos de LA de prognóstico desfavorável (BALDUS et al., 2007; MRÓZEK et al., 2007; GALE et al., 2008). Vários estudos sugerem que o TMO alogênico em pacientes portadores de LMA com *FLT3-DIT*, durante a primeira remissão, apresenta resultados melhores ao tratamento do que aqueles que fazem quimioterapia convencional de consolidação, apesar do risco de recidiva persistir (MESHINCHI; APPELBAUM, 2009; GRIMWADE, 2012; HASSERJIAN, 2013).

As mutações pontuais na posição 835 do éxon 20 do gene *FLT3* estão localizadas no interior da alça de ativação do segundo domínio tirosina-cinase (YAMAMOTO et al., 2001). Essas mutações denominadas *FLT3-D835* promovem a autofosforilação constitutiva do receptor independente de ligante assim como as mutações *FLT3-DIT* (GRIFFIN, 2001). A mutação D835 acomete a alça de ativação do segundo domínio tirosina-cinase, e a mutação mais comum resulta da substituição de um resíduo de ácido aspártico por um resíduo de tirosina, entretanto, outras mutações pontuais, deleções e inserções menos frequentes que envolvem outros resíduos de aminoácidos, incluindo o Y842C, K662Q e V592A também têm sido descritas (BALDUS et al., 2007; WHITMAN et al., 2008). A alça de ativação é um componente comum aos receptores tirosina-cinase e tem como função bloquear o acesso de adenosina trifosfato (ATP) e do substrato ao domínio cinase quando o receptor está inativo. Com uma mutação pontual nessa região, o receptor se encontra autoativado e assim, como na presença da mutação *FLT3-DIT*, o controle da cascata de sinalização promovido por *FLT3* é perdido, o que leva à proliferação celular e bloqueio da diferenciação (GRIFFIN, 2001). Essa mutação está presente tanto em pacientes com LMA (5-10%) e SMD (2-5%) quanto em pacientes com LLA (1-3%). No entanto, a sua relevância clínica ainda é controversa, alguns trabalhos demonstram que a presença de mutação do tipo *FLT3-D835* pode ocorrer em um subgrupo de pacientes com prognóstico favorável

(presença das mutações *NPM1* ou *CEPBA*), também que a presença da mutação isolada, em conjunto com a t(15;17)(q22;q12) ou com a mutação *FLT3-DIT*, o prognóstico passa a ser desfavorável (ABU-DUHIER et al, 2000; YAMAMOTO et al., 2001; THIEDE, 2002; FRÖHLING et al., 2002). Entretanto, um estudo realizado por Wang et al. (2010) a presença da mutação *FLT-D835* não apresentou associação positiva com taxas de SLD e SG como foi encontrado para a mutação *FLT3-DIT* (WANG et al., 2010).

As discrepâncias encontradas entre esses estudos podem ser um resultado importante das diferenças entre características dos pacientes, presença de outras alterações genéticas concomitantes ou inclusive de um subtipo específico de leucemia como as leucemias promielocíticas agudas (LPA) (SCHLENK et al., 2008; BACHER et al., 2008).

Devido a baixa incidência (1,7%) relatada da presença das duas mutações no gene *FLT3* em pacientes portadores de LA, a avaliação do valor clínico dessas mutações em conjunto é difícil, no entanto o prognóstico desfavorável parece prevalecer e estudos *in vitro* sugerem a aquisição de resistência às terapias convencionais e alvo específicas nesses pacientes (LACAYO et al., 2004).

3.1.4.4.2 *NPM1*

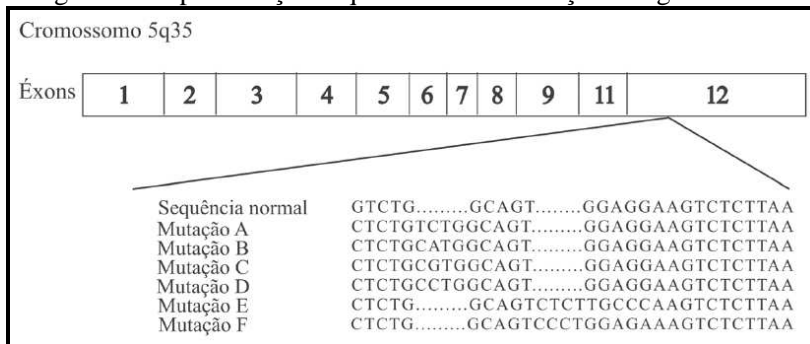
A *NPM1* (*nucleolar phosphoprotein 1*) é uma fosfoproteína nucleolar que transita entre o núcleo e o citoplasma durante o ciclo celular e interage com diversas proteínas. Assim, a *NPM1* é considerada como uma proteína multifuncional, pois está envolvida no processamento do RNA ribossomal, na duplicação do centríolo, na resposta a estímulos de estresse (irradiação UV e hipóxia), na manutenção da estabilidade genômica, na participação em processos de reparo de ácido desoxirribonucleico (DNA) e na regulação da transcrição por meio da modulação de eventos de condensação e descondensação da cromatina (GRISENDI et al., 2006; THIEDE et al., 2006). Além disso, a *NPM1* liga-se ao p53 e regula a proteína retinoblastoma (pRb), o p19^{ARF} e HDM2 (TAKEMURA et al., 2002; BERTWISTLE, SUGIMOTO, SHERR, 2004; KURKI et al., 2004).

Em 2005, foi relatado por Falini e colaboradores que as mutações no gene *NPM1* são encontradas em cerca de 35% de todos os pacientes portadores de LMA e destes 50% em pacientes com LMA de cariótipo normal. Em um estudo onde foi investigada a presença da mutação *NPM1* em 400 pacientes com diagnóstico de leucemia a presença dessa mutação foi encontrada em 26,2% dos pacientes, todos portadores de

LMA. A mutação não foi detectada em pacientes diagnosticados com LLA ou com LMC (BOONTHIMAT; THONGNOPPAKHUN; AUEWARAKUL, 2008). Outro estudo, realizado por Zhang et al., em 2007, relatou pela primeira vez na literatura presença da mutação *NPM1* em dois pacientes com SMD (ZHANG et al., 2007).

Essas mutações heterozigotas foram classificadas de A a F (Figura 5), de acordo com inserção ou deleção de quatro pares de bases no éxon 12 da região C-terminal do gene *NPM1*. Falini e colaboradores (2007) relataram que 75-80% dos pacientes portadores de LMA com mutação no gene *NPM1*, possuíam a mutação do tipo A (FALINI et al., 2007). Em outro estudo, realizado por Koh et al. (2009), observou-se que indivíduos portadores de LMA e com a mutação *NPM1* do tipo A possuem prognóstico favorável, enquanto que aqueles com mutações no gene *NPM1* do tipo não-A são de prognóstico desfavorável (KOH et al., 2009).

Figura 5 - Representação esquemática das mutações do gene *NPM1*.



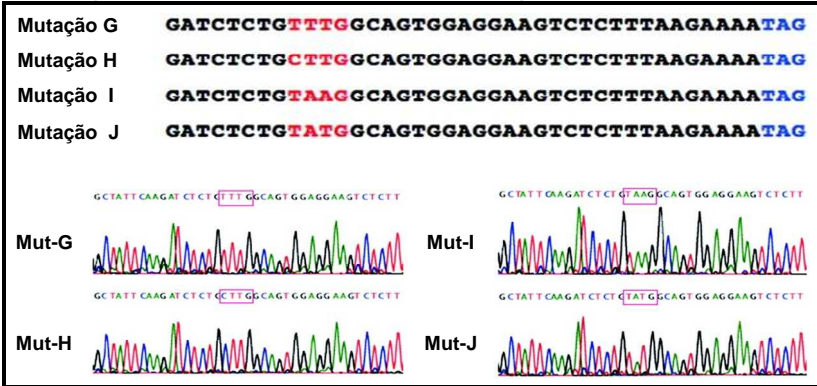
Fonte: Adaptado de LÍCINIO; SANTOS-SILVA, 2010.

Posteriormente, em 2005, Suzuki et al. descreveram outras quatro novas mutações no gene *NPM1* que foram designadas de G a J, e que assim como as mutações anteriormente descritas resultam da inserção de quatro pares de base na posição 960 (Figura 6). As proteínas resultantes das mutações descritas como G e H foram as mesmas das mutações do tipo A, já a mutação J compartilha a mesma proteína da mutação do tipo B. Porém, a proteína que provém da mutação I contém um resíduo de lisina na posição 289, enquanto que os outros resíduos permanecem inalterados (SUZUKI et al., 2005).

Ainda, em outros estudos nos quais foi avaliada a presença da mutação no gene *NPM1* também descobriram novas variantes (Quadro

8). Entretanto, como foram observadas em poucos pacientes, o impacto no prognóstico ainda é discutível e requer mais estudos (ZHANG et al., 2007; BOONTHIMAT et al., 2008; LÍCINIO; SANTOS-SILVA, 2010; JEON et al., 2013).

Figura 6 - Novas mutações descritas no gene *NPM1* éxon 12.



Legenda: Quatro novas variantes da mutação no gene *NPM1*, designadas de G a J. Em vermelho representado as inserções de quatro pares de base de acordo com cada nova mutação, abaixo as sequências obtidas após a clonagem.

Fonte: Adaptado de SUZUKI et al., 2005

Quadro 8 - Novas mutações apresentadas no gene *NPM1* e suas respectivas sequências.

Estudo	Sequência			
Sequência normal	AAGATCTC	TG	GCAG	T GGAGGGAA
Mutação A	AAGATCTC	TG TCTC	GCAG	T GGAGGGAA
Zhang et al. (2006)	AAGATCTC	TG	GCAG	T CTTTCTCCC GAA
Boonthimat et al. (2008)	AAGATCTC	TG TGTG	GCAG	T GGAGGGAA
	AAGATCTC	TG TTCG	GCAG	T GGAGGGAA
	AAGATCTC	TG TAAA	GCAG	T GGAGGGAA
	AAGATCTC	TGGCAG CGGC		T GGAGGGAA
	AAGATCTC	CGCA TG	GCAG	T GGAGGGAA
	AAGATCTC	TG CACGCG	AG	T GGAGGGAA
	AAGATCTC	TG CCAGAG	AG	T GGAGGGAA
	AAGATCTC	TGGCAG		T CCTTTCTA AGGGAA
Jeon et. al (2013)	AAGATCTC	TG	GCAG AAAC	T GGAGGGAA
	AAGATCTC	TG	GCAG	T CTTTAGCCC GGAGGGAA

Fonte: Adaptado de ZHANG et al., 2007; BOONTHIMAT et al., 2008; LÍCINIO; SANTOS-SILVA, 2010; JEON et al., (2013).

3.1.5 Tratamento

O tratamento das LAs consiste em duas principais fases: quimioterapia de indução e pós-remissão (consolidação) e para alguns subtipos específicos ainda pode optar-se por uma terceira fase chamada de manutenção. A primeira fase tem por objetivo induzir a remissão completa, ou seja, diminuir a quantidade de blastos na MO (menos de 5%) e restaurar a hematopoiese normal. Nos pacientes diagnosticados com LMA, este ciclo é realizado com uma terapia intensa em um regime com uma dose de 100 a 200mg/m²/dia de citarabina (ARA-C), administrada por infusão venosa por sete dias seguidos, entre os dias dois e quatro também é administrada uma dose 12 mg/m²/dia de mitoxantrona (WESOLOWSKI et al., 2010; ZIMMERMANN et al., 2013; ROWE, 2013).

Nos pacientes com diagnóstico de LLA uma variedade de esquemas quimioterápicos podem ser utilizados para induzir a remissão; todos incluem a vincristina e a prednisona, a maioria deles acrescenta a L-asparaginase e/ou daunorrubicina administradas num período de três a quatro semanas (HAFERLACH et al., 2007; INTERMESOLI et al., 2011).

Após a fase de indução inicia-se a fase de pós-remissão com a administração de outros quimioterápicos, ou apenas doses maiores dos mesmos administrados para induzir a remissão inicial. Essa etapa visa evitar a recidiva e a doença residual mínima, a qual se caracteriza pela presença de células leucêmicas em quantidade indetectável pelos métodos diagnósticos atuais. Nessa segunda fase deve-se levar em conta variáveis como: estado clínico do paciente, presença de outras comorbidades, idade, histórico anterior de SMD e terapia citotóxica, assim como fatores prognósticos (WESOLOWSKI et al., 2010; ZIMMERMANN et al., 2013). Para as LMAs o protocolo utilizado na consolidação é o mesmo da terapia de indução. No caso das LLAs, os medicamentos utilizados são: metotrexato em altas doses, a ciclofosfamida e a citarabina, entre outras. A manutenção implica na administração de quimioterápicos em baixas doses numa base diária ou semanal, em ambulatório, por longos períodos de tempo. O esquema de manutenção mais frequentemente usado na LLA é o que associa 6-mercaptopurina diária e metotrexato semanal ou duas vezes por mês (NCCN, 2014).

Na versão atual da NCCN (2014) foram incluídos marcadores moleculares de genes específicos como *KIT*, *FLT3*, *CEBPA* e *NPM1*, além das anormalidades citogenéticas como critério de risco de recidiva

nestes pacientes, de forma que o tratamento possa ser realizado de modo individualizado considerando o perfil de risco dos pacientes. Além disso, em um estudo onde foi avaliado a terapia de intensificação pós-remissão com transplante alogênico em pacientes portadores de LMA com *FLT3-DIT* demonstrou que esses pacientes obtiveram uma melhora clínica e uma taxa menor de risco de recidiva em comparação àqueles que receberam tratamento quimioterápico convencional, 22 % e 49%, respectivamente (GALE et al., 2005). Sendo assim, para uma correta estratificação prognóstica e decisão terapêutica, inclusive indicação para TMO alogênico, novos trabalhos devem ser realizados para esclarecimento dos fatores de riscos prognóstico de pacientes portadores de LMA que apresentem as mutações no gene *FLT3* e *NPM1*.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram coletadas amostras consecutivas de SP ou MO de pacientes de ambos os gêneros, com suspeita de LA, encaminhadas ao Setor de Onco-hematologia da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago-HU/UFSC no período de janeiro de 2012 a setembro de 2014. As amostras foram colhidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante e só foram incluídas no estudo aquelas cujos pacientes ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (212/2009; Apêndice B).

4.1.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão considerados foram:

- Pacientes atendidos no HU-UFSC
- Pacientes com suspeita de LA
- Disponibilidade de material

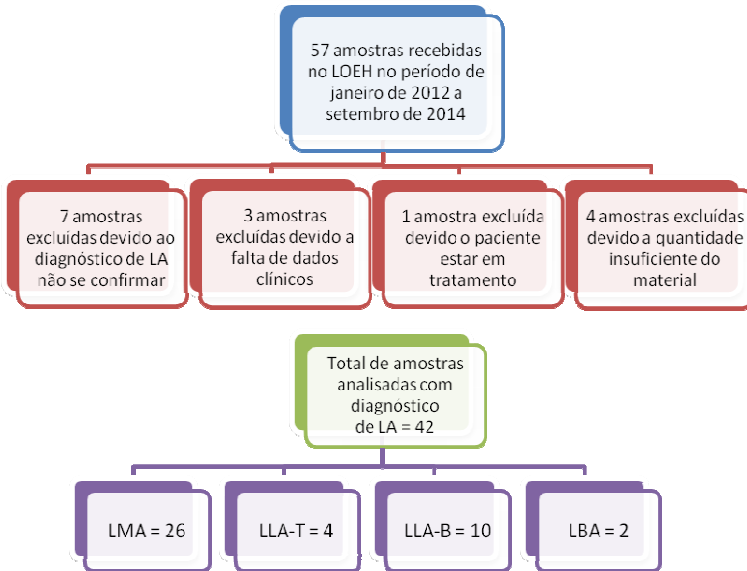
4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos desse grupo de estudo os pacientes que apresentaram as seguintes condições:

- Pacientes com idade inferior a 15 anos
- Pacientes diagnosticados com LMC, SMD e aplasia de MO
- Pacientes em recidiva
- Pacientes em tratamento
- Impossibilidade de obtenção de dados clínicos

Desse modo, do total de amostras recebidas, sete pacientes não confirmaram o diagnóstico de LA, três pacientes não apresentavam todos os dados clínicos disponíveis, um paciente estava em tratamento e quatro pacientes não apresentavam material suficiente para a análise. Assim, das 57 amostras enviadas, 42 tiveram o diagnóstico confirmado e foram incluídas no presente estudo (Figura 7).

Figura 7 - Representação esquemática do delineamento das amostras incluídas no estudo.



Fonte: A autora, 2015.

4.2. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi obtido a partir de 200 μ L de SP ou MO utilizando-se o kit comercial *QIAamp DNA kit* (QIAGEN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente, 200 μ L de amostra foram misturados com 20 μ L de enzima protease K em um microtubo de 1,5 mL. As células foram lisadas utilizando-se 200 μ L de tampão AL na amostra, homogeneizadas em vortex durante 15 segundos e incubadas a 56 °C por 10 minutos. Para cada 200 μ L de amostra, adicionou-se 200 μ L de etanol (96-100%) e novamente as amostras foram homogeneizadas em vortex durante 15 segundos. A solução obtida foi transferida para a coluna QIAamp e centrifugada a 6.000 g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e adicionaram-se 500 μ L de solução de lavagem AW1, a coluna foi centrifugada a 6.000 g por 1 minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com 500 μ L de um segundo tampão de lavagem (AW2) e centrifugada a

20.000 g por 3 minutos. O filtrado foi desprazado e adicionado a coluna 100 µL de água destilada. Posteriormente, a coluna foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 6.000 g por 1 minuto. O DNA obtido foi armazenado a -20 °C para ser utilizado na reação seguinte de PCR.

4.3 PCR PARA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO DO TIPO *FLT3-DIT*

Para a detecção da mutação do tipo *FLT3-DIT* foi utilizada a técnica de PCR com iniciadores específicos (5' - GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' e 5' - CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC 3') para a amplificação dos éxons 14 e 15 do gene *FLT3*, previamente descritos por Meshinchi et al., (2001).

As amostras foram amplificadas nas seguintes condições: 100 ng de DNA genômico; 5 µL de tampão 10X concentrado para Taq-DNA polimerase (10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl); 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM); 0,4 µL de dNTP mix (200 µM de cada); 2,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (0,4 µM), 0,25 µL Taq-DNA polimerase (*recombinant*) (5 U/µL); e água ultrapura para completar o volume final da reação de 50 µL.

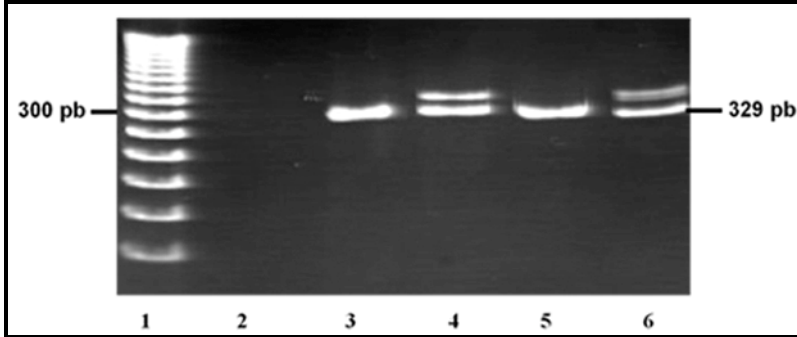
A reação constituiu de uma incubação inicial de 94 °C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, ligação dos iniciadores a 61 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 72°C por 8 minutos. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Personal® (Eppendorf, Alemanha), com reagentes Invitrogen (Carlsbad, EUA).

Os produtos de PCR foram inicialmente separados por eletroforese em gel de agarose (2%) a 100 V por 30 minutos, e corados por brometo de etídeo, para verificar se houve a amplificação da sequência alvo. Posteriormente, os produtos de PCR foram avaliados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% a 80 V por 90 minutos e corados com brometo de etídeo. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA).

A detecção de somente uma banda de 329 pb correspondeu ao alelo do gene não mutado, ou seja, ausência da mutação do tipo DIT no gene *FLT3*. Já a presença de um fragmento de tamanho maior a 329 pb (até 400 pb), devido ao número diferente de duplicações em *tandem* presentes, foi relacionada com a mutação homozigota. A detecção de dois ou mais fragmentos foi interpretada como presença da mutação heterozigota (Figura 8). Estimou-se o tamanho dos produtos da PCR por

comparação, ao marcador de tamanho molecular (DNA ladder 50 pb Invitrogen™ Life Technologies).

Figura 8 - Gel representativo da PCR para mutação *FLT3-DIT*.



Legenda: 1) Marcador de tamanho molecular de 50 pb; 2) Controle negativo da reação; 3) Amostra paciente sem banda compatível com a mutação *FLT3-DIT*; 4) Amostra do paciente heterozigoto com banda compatível com a mutação *FLT3-DIT*; 5) Controle negativo para mutação DIT no gene *FLT3*; 6) Controle positivo para mutação DIT no gene *FLT3*.

Fonte: A autora, 2015.

4.4 DETECÇÃO DA MUTAÇÃO DO TIPO *FLT3-D835*

Para a detecção da mutação do tipo *FLT3-D835* foi utilizada a técnica de PCR seguida de uma digestão por enzima de restrição, conforme descrito por Liang et al. (2003). Amplificou-se a região do éxon 20 do gene *FLT3* utilizando-se oligonucleotídeos específicos (5'-CCGCCAGGAACGTGCTTG-3' e 5' GCAGCCTCACATTGCCCC-3'). Foram amplificados 100 ng de DNA em uma solução, a qual continha os seguintes volumes e concentrações finais: 5 µL de tampão 10X concentrado para Taq-DNA polimerase (10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl); 2,25 µL de MgCl₂ (2,25 mM); 0,6 µL de dNTP mix (300 µM de cada); 2,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (0,4 µM de cada); 0,25 µL Taq-DNA polimerase (*recombinant*) (5 U/µL); e água ultrapura para completar o volume final da reação de 50 µL.

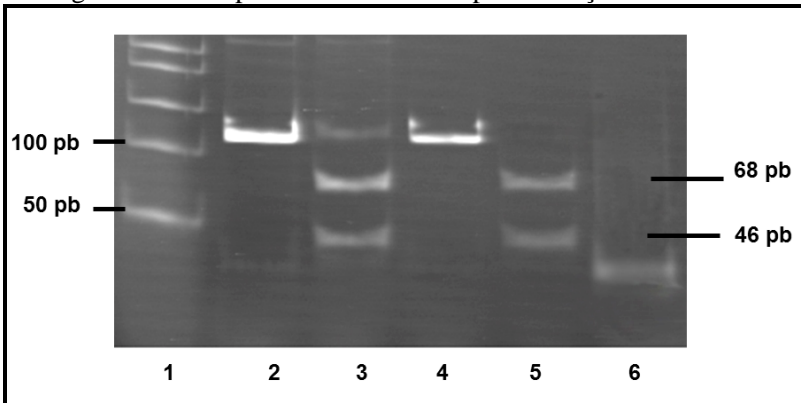
A reação constituiu de incubação inicial de 94 °C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, ligação dos iniciadores a 66 °C por um minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 72 °C por 8 minutos. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Personal® (Eppendorf, Alemanha), com reagentes Invitrogen (Carlsbad, EUA).

Ao término da PCR, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, a 100 V por 30 minutos, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA).

Em seguida, os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática através da técnica de *RFLP* (*restriction fragment length polymorphism*), onde foi utilizado 10 μL do produto amplificado em uma solução contendo 1,0 μL da enzima Eco-RV (10 U/ μL), 3,0 μL de tampão H 10X concentrado (500 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM MgCl_2 ; 10 mM DTT; 1 M NaCl), e 1,0 μL de água ultra-pura para cada amostra. A solução foi incubada por 1 hora a 37 °C. Os produtos digeridos foram avaliados em gel de poliacrilamida 12%, a 80 V por 90 minutos, corados pelo brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta em ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular (DNA ladder 50 pb Invitrogen™ Life Technologies).

Sabendo-se que a sequência codificante de D835 compreende GATA, sítio de atividade da endonuclease Eco-RV, as amostras que não apresentam a mutação do tipo D835, após a digestão enzimática apresentaram duas bandas: 46 e 68 pb indicando que houve a digestão completa dos alelos correspondentes ao gene em questão. Enquanto que as amostras com presença da mutação pontual D835, apresentaram uma única banda de 114 pb (mutação homocigota) ou presença de três fragmentos: 46, 68 e 114 pb (mutação heterocigota), representado na Figura 9.

Figura 9 - Gel representativo da PCR para mutação *FLT3-D835*.



Legenda: 1) Marcador de tamanho molecular 50 pb; 2) Amostra de paciente antes da digestão enzimática; 3) Amostra de paciente heterozigoto para a mutação *FLT3-D835*; 4) Amostra de paciente antes da digestão enzimática; 5) Amostra paciente negativo para a mutação *FLT3-D835*; 6) Controle negativo da reação.

Fonte: A autora, 2015.

4.5 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *NPM1*

O estudo da padronização da técnica de PCR para a mutação no gene *NPM1* iniciou-se com desenho dos iniciadores senso e anti-senso através do *software* Primer Select do Pacote DNA STAR (Lasergene). Para isso, foi realizada a análise da formação de dímeros e *hairpins* para o par de iniciadores no próprio *software*, os quais podem interferir na reação de amplificação. Além disso, foi avaliado no programa *Primer Blast* (NCBI) se os pares escolhidos estavam de acordo com a sequência de interesse, ou seja, apresentavam similaridade. Os iniciadores escolhidos permitem a amplificação de uma sequência conservada que compreende o local onde ocorrem as inserções referentes às mutações *NPM1* (Quadro 9).

Quadro 9 - Iniciadores utilizados na amplificação da sequência alvo do gene *NPM1*.

Iniciadores	Sequência de Nucleotídeos	Produto Amplificado
Senso	5' - CCATGTCTGACCACCGCTACTAC - 3'	568 pb
Anti-Senso	5' - ATTGGCATATGGGTCTCTGTTC - 3'	

Dessa forma, estabeleceu-se que seria utilizado o protocolo descrito previamente por Pazhakh et al. (2011), no qual a reação foi preparada de acordo com o descrito na Tabela 1 nas seguintes condições de amplificação: 5 minutos a 95 °C para denaturação do DNA, 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C para anelamento dos iniciadores, 1 minuto a 72 °C para extensão da sequência alvo repetidos por 40 ciclos e ainda 7 minutos a 72 °C para uma extensão final.. A reação foi realizada em termociclador Mastercycler Personal® (Eppendorf, Alemanha), com reagentes Invitrogen (Carlsbad, EUA). Posteriormente, a amplificação dos produtos foi visualizada em gel de agarose 2%, por meio de eletroforese a 100 V por 30 minutos, corados com brometo de etídeo e visualizadas sob luz ultravioleta de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV-20), utilizando-se um sistema de foto-documentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems).

Tabela 1 - Volumes e concentrações dos reagentes utilizados inicialmente na reação de PCR para detecção da mutação *NPM1*.

Reagente	Volume	Concentração
H ₂ O	37,1 µL	qsp 50 µL
Tampão 10x	5,0 µL	1X
MgCl ₂ 50 mM	2,0 µL	1,5 mM
dNTP 25 mM	0,4 µL	0,2 mM
Iniciador Senso 10 µM	1,0 µL	1 µM
Iniciador Anti-Senso µM	1,0 µL	1 µM
Taq Polimerase 5 U/µL	0,5 µL	2,5 U
DNA molde	3,0 µL	37,5 ng
Volume Final	50,0 µL	-

Fonte: Adaptado de PAZHAKH et al., 2011.

Visando aumentar a sensibilidade, outras variáveis foram analisadas durante a padronização da PCR como: concentração de $MgCl_2$, aditivos como dimetil-sulfóxido (DMSO) e glicerol e a quantidade de DNA molde.

4.5.1 Concentração de $MgCl_2$

A concentração do reagente de $MgCl_2$ pode influenciar o resultado da PCR, pois atua como importante cofator da enzima DNA polimerase, sendo assim um fator indispensável na reação.

De modo a atingir a quantidade necessária desse reagente na reação, foi realizado um gradiente de concentração, onde as concentrações testadas foram: 0,75 mM; 1,0 mM; 1,25 mM e 1,5 mM.

4.5.2 Adição de cosolventes

Em reações de PCR onde o DNA molde é rico em bases C-G, adicionando-se aditivos como DMSO e glicerol a reação pode ser beneficiada, pois esses reagentes facilitam a desnaturação da fita dupla de DNA e o pareamento dos iniciadores melhorando a sua especificidade. Assim, para aumentar a qualidade da reação de PCR e diminuir possíveis ampliações inespecíficas foram realizados testes adicionando-se esses dois cosolventes em reações diferentes.

4.5.3 Quantidade de DNA

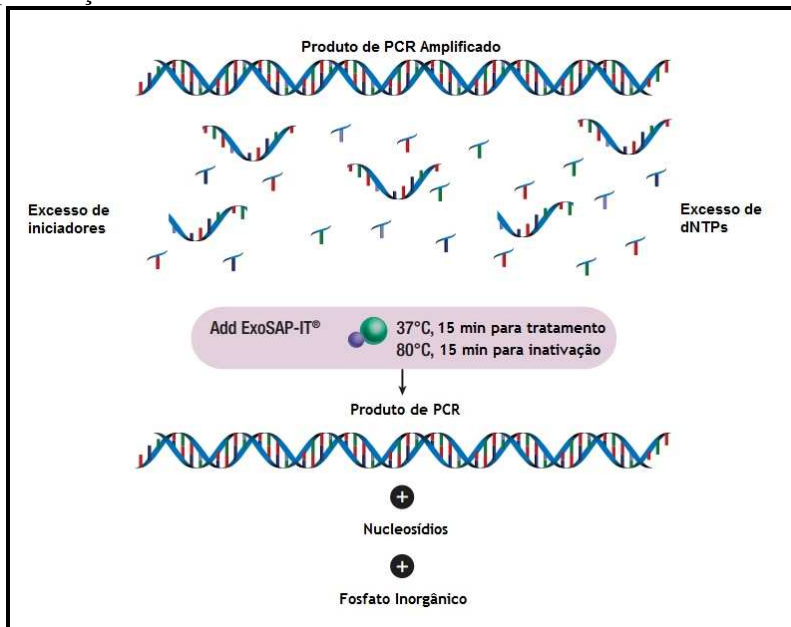
O excesso de DNA pode ser um fator que leva a formação de produtos inespecíficos ou mesmo a inibição da reação. No entanto a baixa quantidade pode levar a amplificação de bandas fracas prejudicando a visualização no gel. Desse modo, a influência da quantidade de DNA foi avaliada alterando-se gradativamente o volume adicionado na reação.

4.6 ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *NPM1* POR SEQUENCIAMENTO

Os produtos amplificados das amostras foram purificados utilizando-se a enzima ExoSAP-IT (Affymetrix, Inc. EUA), sendo que para cada 5 μ L do produto de PCR foi acrescentado 2 μ L da enzima. Posteriormente, a solução foi incubada a 37 °C por 15 minutos, para remover o excesso de iniciadores e nucleotídeos que não foram

incorporados na reação de PCR. Depois, a solução foi incubada a 80 °C por mais 15 minutos para inativação da enzima (Figura 10).

Figura 10 - Esquema representativo onde mostra a ação da enzima de purificação ExoSAP-IT.



Fonte: Adaptado de http://www.affymetrix.com/assets/78200_f1.pdf

Após a purificação, e com os mesmos iniciadores utilizados na reação de PCR, os produtos de PCR foram sequenciados em equipamento Hitachi 3500 Genetic Analyzer (AB Applied Biosystems®, Foster City/EUA), sendo a reação de sequenciamento preparada a partir do Kit BigDye® Terminator (AB Applied Biosystems®, Foster City/EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as reações foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores específicos de cada produto e 7 µl do produto de PCR purificado por precipitação, nas seguintes condições térmicas: um passo inicial de desnaturação a 96 °C por 60 segundos seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 1 segundo, ligação dos iniciadores a 50 °C por 5 segundos com rampa de alteração da temperatura de 1 °C/segundo, e extensão a 60 °C por 240 segundos. Posteriormente os

produtos marcados foram precipitados utilizando-se etanol/EDTA para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram ressuspensos em 10 µl de formamida e eletroinjetados. A montagem dos *contigs* e a análise da qualidade foram feitas por meio do pacote Phred/Phrap/Consed versão 26.0 (<http://www.phrap.org>) (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998). A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada utilizando-se o algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Todas as etapas do sequenciamento e análise das sequências obtidas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Protozoologia (www.proto.ufsc.br) e o Laboratório de Bioinformática da UFSC (www.bioinformatica.ufsc.br).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A confecção do banco de dados e a análise estatística foram realizadas com o auxílio do software SPSS versão 17.0[®]. Sumarizaram-se os dados como números absolutos e percentuais, no caso de variáveis nominais, e como mediana de valores máximo e mínimo no caso de variáveis numéricas. Quanto à expressão das mutações no gene *FLT3* (DIT e D835), se fez a sumarização de forma dicotômica (ausente ou presente).

Para analisar possíveis associações entre a presença de mutações no gene *FLT3* com as variáveis: gênero, expressão de CD34 e progressão; os pacientes foram divididos em grupos e analisados pelo teste de Chi-Quadrado. Variáveis numéricas como atividade sérica da enzima LDH, leucometria e porcentagem de blastos foram associadas com o grupo de interesse pelo teste Mann-Whitney. Foi considerado um nível de significância de 5% ($P < 0,05$) em todas as análises. A análise estatística foi realizada através do *software* SPSS (versão 17.0).

Para construção da curva de sobrevida utilizou-se o *software* MedCalc[®] versão 12.3.0.0 e a análise foi realizada através do método de Kaplan-Meier.

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES PARA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO NO GENE *NPM1*

5.1.1 Padronização da técnica de PCR para detecção da mutação no gene *NPM1*

Conforme citado anteriormente em Casuística e Métodos, a padronização da técnica de PCR para análise da presença de mutação no gene *NPM1* foi baseada no protocolo apresentado no estudo de Pazhakh et al. (2011), utilizando-se iniciadores previamente desenhados para este estudo pelo *software* Primer Select.

Para otimizar a reação, afim de reduzir interferentes que prejudicariam as etapas seguintes de purificação e sequenciamento, foram analisadas as seguintes variáveis:

- Concentração de $MgCl_2$: a concentração ideal selecionada que resultou em bandas mais intensas foi de 1,5 mM;

- Adição de cosolventes: segundo os testes realizados com os aditivos DMSO e glicerol, a utilização de 2% de glicerol na reação reduziu o número de bandas inespecíficas;

- Quantidade de DNA molde: a quantidade de DNA observada que resultou em bandas mais fortes no gel de agarose de foi de 100 ng .

Assim, as amostras foram submetidas à técnica de PCR de acordo com o protocolo padronizado para amplificação de um produto esperado de 568 pb (Tabela 2, Figura 11).

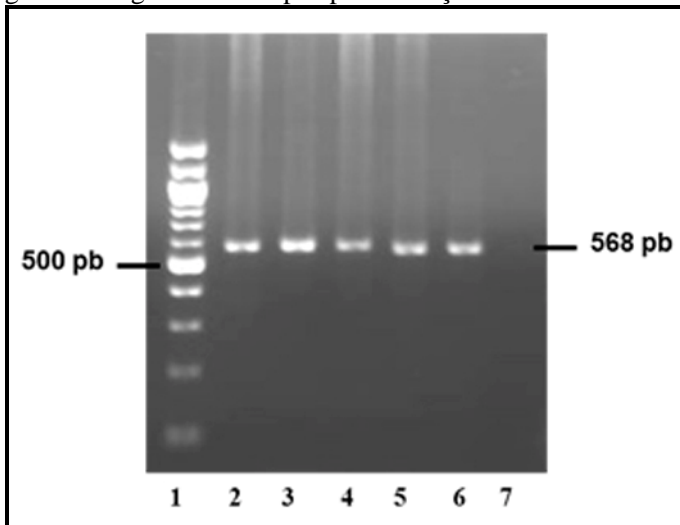
Tabela 2 - Volumes e concentrações padronizadas dos reagentes utilizados na reação de PCR para detecção da mutação *NPM1* (Continua).

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração</i>
H ₂ O	30,1 µL	qsp 50 µL
Tampão 10x	5,0 µL	1X
MgCl ₂ 50mM	2,0 µL	2 mM

Tabela 2 - Volumes e concentrações padronizadas dos reagentes utilizados na reação de PCR para detecção da mutação *NPM1* (Conclusão).

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração</i>
dNTP 25 mM	0,4 μ L	2 mM
Glicerol 50%	2,0 μ L	2%
Iniciador Sense 10 μ M	1,0 μ L	1 μ M
Iniciador Anti-Sense μ M	1,0 μ L	1 mM
Taq Polimerase 5 U/ μ L	0,5 μ L	2,5 U/ μ L
DNA molde	8,0 μ L	100 ng
Volume Final	50,0 μ L	-

Figura 11 - Gel representativo das bandas amplificadas correspondentes ao fragmento do gene *NPM1* após padronização da técnica.



Legenda: 1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2 a 6) Amostra clínicas; 7) Controle negativo da PCR.

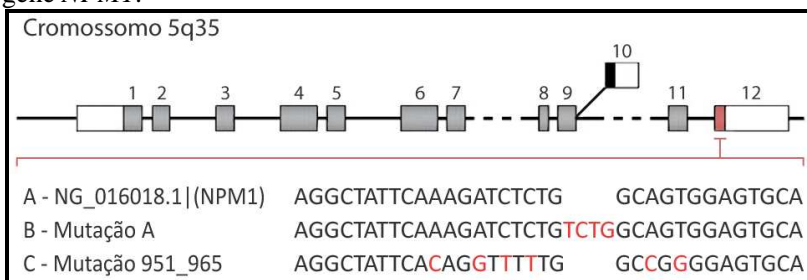
Fonte: A autora, 2015.

5.1.2 Sequenciamento

Os produtos amplificados de 568 pb foram sequenciados para análise de mutações no gene *NPM1*. As sequências obtidas foram analisadas pelo algoritmo Blastn (*Basic Local Alignment Search Tool*), a fim de verificar a identidade das sequências obtidas com o gene estudado. Todas as amostras apresentaram em torno de 99% de similaridade com a sequência do gene *NPM1* depositada no banco de dados *GenBank* (NCBI) registrada com o número NG016018.1.

Das 42 amostras analisadas, 39 (92,9%) apresentaram a sequência não mutada (*wild type*) do gene *NPM1*. As outras três amostras (7,1%) apresentaram diferentes pontos de mutação (Figura 12), que ainda não foram descritos em nenhum trabalho da literatura analisado, como pode ser observado na análise das sequências obtidas pela técnica de sequenciamento (Figura 13).

Figura 12 - Representação esquemática da nova mutação encontrada no gene *NPM1*.



Legenda: A) sequência padrão não mutada (*wild type*) obtida no GenBank (NG_016018.1); B) sequência referente a mutação do tipo A, inserção de quatro pares de base na posição 960; C) sequência das três amostras que apresentaram mutações não descritas no gene *NPM1*, entre a posição 951 e 965. As bases mutadas estão em vermelho; Todas as bases mostradas apresentaram qualidade de Phred ≥ 15 .

Fonte: A autora, 2015.

(um caso; 2,4%), LMA com t(8;21) (dois casos; 4,8%), leucemia bifenotípica (dois casos; 4,8), LLA-B tipo pré-B (um caso; 2,4%), LLA-B tipo comum (nove casos; 21,4%), LLA-T /linfoma linfoblástico T (dois casos; 4,8%), LLA tipo pró- T (dois casos; 4,8%).

Em relação a idade, os pacientes apresentaram uma mediana de 46 anos (15-88 anos) e uma média de 45,7. Para o grupo de pacientes diagnosticados com o subtipo LMA, a mediana foi de 46,5 anos, para o subtipo LLA a mediana foi de 41 anos e para o subtipo leucemia aguda bifenotípica (LBA), 61,5 anos. As características clínicas e laboratoriais apresentadas pelos pacientes está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LA no momento do diagnóstico (Continua).

<i>Parâmetros</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Gênero		
<i>Feminino</i>	15	35,7
<i>Masculino</i>	27	64,3
Subtipo de leucemia		
<i>LMA</i>	26	61,9
<i>LLA</i>	14	33,3
<i>LBA</i>	2	4,8
Idade (anos)		
<i>Mediana</i>	45,7	76,2
<i>Limites</i>	15 – 88	
CD34		
<i>Positivo</i>	29	69,0
<i>Negativo</i>	13	31,0
Leucometria (mm³)		
<i>Mediana</i>	8.820	
<i>Limites</i>	540 - 77.200	

Tabela 3 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LA no momento do diagnóstico (Conclusão).

<i>Parâmetros</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
LDH (U/L)		
<i>Mediana</i>	286,5	
<i>Limites</i>	61-6.500	
Blastos (%)		
<i>Mediana</i>	38,0	
<i>Limites</i>	0,0-97,0	

5.2.1 Descrição dos casos clínicos de pacientes que apresentaram a nova mutação no gene *NPM1*

Do total de 42 pacientes incluídos neste estudo, três (7,1%) apresentaram uma mutação no gene *NPM1*, porém diferente daquelas descritas na literatura, (item 5.1.2). Como o número de casos foi pequeno para fazer associações com outros parâmetros prognósticos, os casos foram resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LA que apresentaram a nova mutação no gene *NPM1* (Continua).

Parâmetros	<i>Paciente 1</i>	<i>Paciente 2</i>	<i>Paciente 3</i>
Gênero	Masculino	Feminino	Masculino
Idade	29	25	15
Diagnóstico	LMA	LLA-T	LLA-B
Subtipo	Monoblástica aguda	Tipo pró-T	Tipo comum
Progressão	Óbito sem remissão	Óbito sem remissão	Óbito sem remissão
Hemoglobina (g/dL)	9,5	8,3	7,9
Hematócrito (%)	28	25,4	20,5
Plaquetas (mm ³)	99.000	24.000	33.000

Tabela 4 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LA que apresentaram a nova mutação no gene *NPM1* (Conclusão).

Parâmetros	<i>Paciente 1</i>	<i>Paciente 2</i>	<i>Paciente 3</i>
Leucometria (mm ³)	5.190	177.200	36.390
Blastos (%)	52,2	95,0	-
LDH (U/L)	645	300	-
<i>FLT3</i> (DIT e D835)	Ausente	Ausente	Ausente

5.2.2 Análise da associação entre as mutações no gene *FLT3* com outros fatores prognósticos

Do total de 42 pacientes incluídos neste estudo cinco pacientes (11,9%) apresentaram a mutação do tipo *FLT3-DIT* e cinco pacientes (11,9%) apresentaram a mutação no gene *FLT3-D835*. Entre os pacientes analisados, um caso (2,4%) apresentou ambas as mutações *FLT3-DIT* e *FLT3-D835*.

Conforme apresentado na Tabela 5, a frequência das mutações no gene *FLT3* (DIT e D835) foi relacionada ao subtipo de leucemia. Pode-se observar que do total de pacientes diagnosticados com LMA (26 casos), cinco (19,2%) apresentaram mutação do tipo DIT e três (11,5%) do tipo D835. Dos casos diagnosticados com o subtipo LLA não houve nenhum caso positivo para a mutação *FLT3-DIT*. No entanto, um caso (7,1%) apresentou a mutação do tipo *FLT3-D835*. E ainda, um caso diagnosticado com o subtipo LBA, apresentou a mutação pontual D835. Estatisticamente, não houve correlação significativa entre a presença da mutação *FLT3* (DIT e D835) com o subtipo de LA. Entretanto, pode-se observar que a presença da mutação *FLT3* é mais prevalente em pacientes com LMA.

Além disso, relacionou-se a presença da mutação de acordo com o gênero dos pacientes, e verificou-se: 64,3% (27 casos) eram do gênero masculino e 35,7% (15 casos) do gênero feminino. A associação entre gênero e a presença ou ausência de mutação no gene *FLT3* (DIT e D835) não foi significativamente associada como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 5 - Distribuição do subtipo de LA de acordo com a presença das mutações *FLT3* (DIT e D835).

Mutação	<i>LMA</i>		<i>LLA</i>		<i>LBA</i>		<i>P</i>
	N	%	N	%	N	%	
<i>FLT3-DIT</i>							
<i>Presença</i>	5	19,2	0	0,0	0	0,0	0,200
<i>Ausência</i>	21	80,8	13	92,9	2	100,0	
<i>Inconclusivo</i>	0	0,0	1	7,1	0	0,0	
<i>FLT3-D835</i>							
<i>Presença</i>	3	11,5	1	7,1	1	50,0	0,337
<i>Ausência</i>	23	88,5	14	92,9	1	50,0	

Tabela 6 - Avaliação da presença ou ausência das mutações no gene *FLT3* (DIT e D835) de acordo com o gênero.

Mutação	<i>Feminino</i>		<i>Masculino</i>		<i>P</i>
	N	%	N	%	
<i>FLT3-DIT</i>					
<i>Presença</i>	2	13,3	3	11,1	1,000
<i>Ausência</i>	13	86,7	23	85,2	
<i>Inconclusivo</i>	0	0,0	1	3,7	
<i>FLT3-D835</i>					
<i>Presença</i>	0	0,0	5	18,5	0,142
<i>Ausência</i>	15	100,0	22	81,5	

Também foi investigada a associação entre a presença ou ausência das mutações do tipo *FLT3* (DIT e D835) com a idade, a leucometria, a porcentagem de blastos e a atividade sérica de LDH ao diagnóstico, pois estudos revelam que a avaliação de tais parâmetros no momento do diagnóstico são fatores prognósticos importantes, assim como a presença de mutações no gene *FLT3* (DIT e D835) (FATHI; CHEN, 2011).

Como pode ser observado na Tabela 7, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os fatores prognósticos, idade, percentual de blastos, leucometria, atividade de LDH e a presença da mutação *FLT3-DIT*. Porém, pode-se observar que a leucometria

(mediana de $27.450/\text{mm}^3$) nos pacientes que apresentavam a mutação está com valores três vezes maior em relação àqueles que não apresentaram a mutação. Ainda, tanto a atividade sérica de LDH, quanto a porcentagem de blastos também foram maiores nos pacientes com a mutação *FLT3-DIT*.

Em relação à análise da associação entre os fatores prognósticos, idade, leucometria, percentual de blastos e atividade de LDH, e a presença da mutação *FLT3-D835*, também não foi observado uma relação estatisticamente significativa, entretanto, na análise realizada entre a idade e a presença da mutação foi observado uma tendência de maior idade nos pacientes que apresentavam a mutação D835 (Tabela 8).

Tabela 7 - Associação entre os fatores prognósticos e a presença ou ausência das mutações do tipo *FLT3-DIT*.

Fatores prognósticos	Ausência de <i>FLT3-DIT</i>		Presença de <i>FLT3-DIT</i>		P
	Mediana	Limites	Mediana	Limites	
Idade (anos)	47,0	15,0-87,0	39,0	16,0-88,0	0,680
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8,3	0,4-177,2	27,4	2,8-73,5	0,407
Blastos (%)	37,5	0,0-95,0	50,0	23,0-97,00	0,142
LDH (U/L)	269,0	0,0-6.500,0	436,0	166,0-1.194,0	0,262

Tabela 8 - Associação entre os fatores prognósticos e a presença ou ausência das mutações do tipo *FLT3-D835*.

Fatores prognósticos	Ausência de <i>FLT3-D835</i>		Presença de <i>FLT3-D835</i>		P
	Mediana	Limites	Mediana	Limites	
Idade (anos)	45,0	15,0-88,0	67,0	25,0-76,0	0,078
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8,8	0,5-177,2	11,3	2,8-44,1	1,000
Blastos (%)	38,0	0,0-97,0	27,0	0,0-75,00	0,635
LDH (U/L)	273,0	61,0-6.500,0	349,5	118,0-5.189,0	0,967

Estudos relatam que a avaliação de alguns marcadores moleculares pela técnica de imunofenotipagem, como a expressão do

marcador CD34 tem demonstrado ser um fator de risco independente para estratificação das LMAs em pacientes adultos (ROCKOVA et al., 2011). Assim, foi avaliado se havia associação entre expressão de CD34 em células leucêmicas e a presença de mutação nos genes *FLT3*. Como pode ser visualizado na Tabela 9, não foi observada associação entre a presença da mutação no gene *FLT3* (DIT e D835) e a expressão de CD34 nos blastos leucêmicos (*DIT*: P=0,765 e *D835*: P=0,665). Contudo, o estudo demonstrou que entre os cinco pacientes que apresentaram a mutação do tipo *FLT3-DIT*, quatro expressaram o antígeno CD34, e o mesmo pode ser observado para a mutação *FLT3-D835*.

Tabela 9 - Análise da associação entre expressão de CD34 e a ausência ou presença das mutações no gene *FLT3* (DIT e D835).

Mutação	CD34 Positivo		CD34 Negativo		P
	N	%	N	%	
<i>FLT3-DIT</i>					
<i>Presença</i>	4	13,8	1	7,7	0,765
<i>Ausência</i>	24	82,8	12	92,3	
<i>Inconclusivo</i>	1	3,4	0	0,0	
<i>FLT3-D835</i>					
<i>Presença</i>	4	13,8	1	7,7	0,665
<i>Ausência</i>	25	86,2	12	92,3	

Como mencionado anteriormente, a análise das anormalidades citogenéticas em conjunto com as alterações moleculares, tem sido amplamente utilizada nas classificações de risco dos pacientes. Dessa forma, avaliamos a presença de associações entre as anormalidades cromossômicas $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q12)$ e a $t(9;22)(q34;q11.2)$ presentes nas amostras dos pacientes e as mutações no gene *FLT3*. Entretanto, essas translocações não foram encontradas simultaneamente a presença das mutações em estudo.

Além das alterações citogenéticas, também foi avaliado se havia associação entre a presença ou ausência de mutação no gene *FLT3* (DIT e D835) e a progressão clínica dos pacientes portadores de LA. Os pacientes foram divididos em quatro grupos: pacientes em remissão, pacientes em recidiva, pacientes que foram a óbito em remissão e pacientes que foram a óbito sem remissão. Como pode ser observado na

Tabela 10, os pacientes com a presença da mutação do tipo *FLT3-DIT* apresentaram significância estatística em relação a progressão clínica do paciente. Já para a mutação do tipo *FLT3-D835* a associação não foi significativa.

Tabela 10 - Análise da associação entre a progressão clínica dos pacientes e a ausência ou presença de mutações no gene *FLT3*.

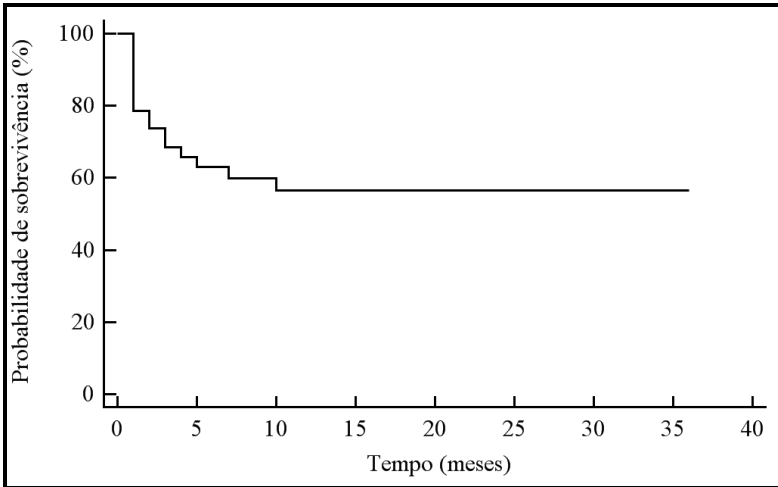
Progressão clínica dos pacientes									
Mutação	Óbito em remissão		Óbito sem remissão		Remissão		Recidiva		P
	N	%	N	%	N	%	N	%	
<i>FLT3-DIT</i>									
<i>Presença</i>	0	0,0	4	26,7	1	5,3	0	0,0	0,008*
<i>Ausência</i>	1	50,0	11	73,3	18	94,7	6	100,0	
<i>Inconclusivo</i>	1	50,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
<i>FLT3-D835</i>									
<i>Presença</i>	0	0,0	3	20,0	1	5,3	1	16,6	0,560
<i>Ausência</i>	2	100,0	12	80,0	18	94,7	5	85,7	

* Significância estatística ($p < 0,05$).

5.2.2.1 Análise de sobrevida

Na análise de todos os casos incluídos no estudo, a média observada em relação sobrevida global foi de 21,6 meses (IC 95%: 16,369 a 26,835), porém não foi possível estabelecer a mediana (Figura 14).

Figura 14 - Curva de sobrevida global de todos os pacientes incluídos neste estudo.

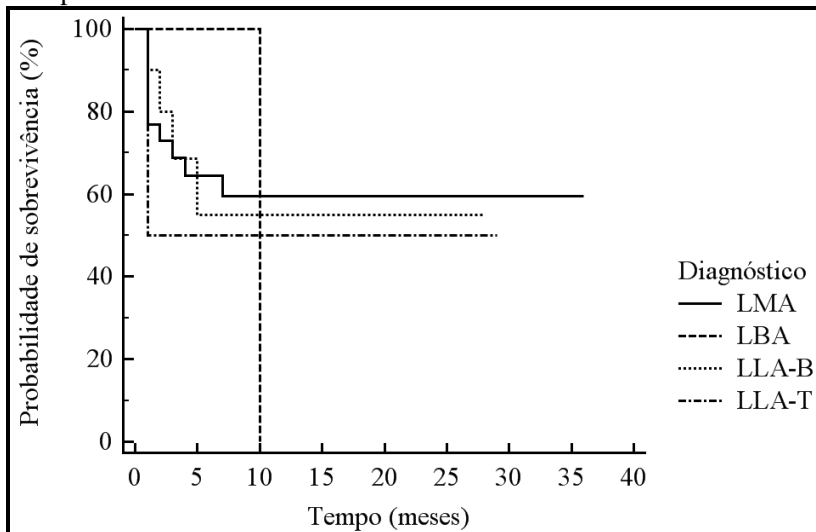


Fonte: A autora, 2015.

Os pacientes foram analisados de acordo com a sobrevida global e também com o subtipo de leucemia (Figura 15). A média de sobrevida dos pacientes com diagnóstico de LMA foi de 22,3 meses; para os pacientes com diagnóstico de LBA foi de 10,0 meses; para os pacientes com diagnóstico de LLA-B foi 17,2 meses e para os pacientes com diagnóstico de LLA-T foi 5,5 meses. O cálculo da mediana só foi possível para os casos de LBA e LLA-T (10,0 e 1,0 meses respectivamente). Na análise estatística foi observado que não há associação entre a sobrevida global e o subtipo de LA ($P=0,974$).

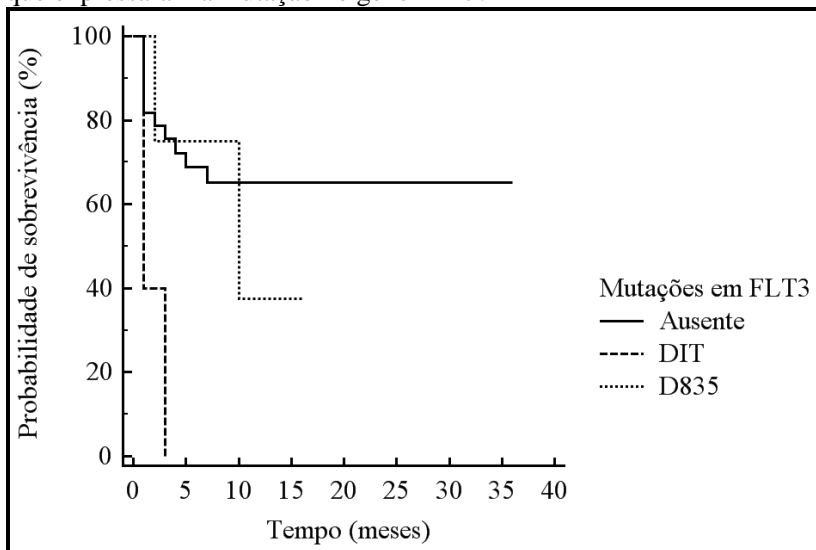
Entre os pacientes que apresentaram mutação do tipo *FLT3*, fez-se a análise subdividindo os grupos de acordo com o tipo de mutação de *FLT3-DIT* e *FLT3-D835*, cuja sobrevida global foi consideravelmente mais baixa ($P=0,002$) para os pacientes com mutação *FLT3-DIT* (média: 1,8 meses; mediana: 1,0 mês) em relação aqueles sem a presença da mutação no gene *FLT3* (média: 24,3 meses) (Figura 16).

Figura 15 - Curva de sobrevida global dos pacientes em relação ao subtipo de LA.



Fonte: A autora, 2015.

Figura 16 - Curva de sobrevida global dos pacientes portadores de LA que expressaram a mutação no gene *FLT3*.



Fonte: A autora, 2015.

6 DISCUSSÃO

As LAs compreendem um grupo de doenças heterogêneas que acometem o sistema hematopoiético e apresentam características clínicas e biológicas distintas. Entre elas as LMAs são o subtipo de leucemia mais comum em pacientes adultos, com mediana de idade de 66 anos e uma maior incidência em homens descendentes de europeus (PARIKH; JABBOUR; KOLLER, 2011; DORES et al., 2012). Por outro lado, o subtipo LPA tem predomínio em populações latinas e hispânicas, e é mais frequentemente diagnosticada em pacientes jovens (DORES et al., 2012). Estudos brasileiros realizados no Rio Grande do Sul e São Paulo apresentaram resultados onde a mediana de idade dos pacientes com diagnóstico de LA era de 42 e 43 anos, respectivamente, ou seja, inferior aquelas observadas em estudos internacionais (AZEVEDO, 2009; PEZZI et al., 2012). Nas LLAs o pico de incidência ocorre entre dois e cinco anos de idade e um segundo pico acima de 50 anos, com mediana de idade ao diagnóstico de 25 a 45 anos. Sua incidência é maior na população branca e do gênero masculino (CHAUHAN et al., 2012; PULTE et al., 2014; STOCK et al., 2013).

No presente estudo os pacientes diagnosticados com LMA apresentaram uma mediana de idade inferior (46,5 anos) a encontrada na literatura internacional (PARIKH; JABBOUR; KOLLER, 2011; DORES et al., 2012), que pode ser explicada devido ao alto número de casos classificados como LPA (10 casos, 23,8%), que acomete mais frequentemente os jovens (DORES et al., 2012). Porém, o resultado obtido neste estudo está de acordo ao encontrado em outros estudos brasileiros (AZEVEDO, 2009; PEZZI et al., 2012). A mediana de idade dos casos de LLA incluídos neste trabalho foi de 41,0 anos, dados que corroboram os encontrados na literatura (CHAUHAN et al., 2012; PULTE et al., 2014; STOCK et al., 2013).

Em relação ao gênero nossos dados estão de acordo com outros estudos, para os casos de LA, onde 64,3% dos pacientes pertencem ao gênero masculino, incluindo os casos de LLA (85,7%) (PARIKH; JABBOUR; KOLLER, 2011; DORES et al., 2012; STOCK et al., 2013). Entretanto, alguns estudos não observaram associação entre o gênero e o subtipo de leucemia (HWANG et al., 2004; AL-TONBARY et al., 2009).

No presente estudo foi investigada a presença das mutações no gene *FLT3* (DIT e D835) em pacientes com diagnóstico de LA e sua associação com o subtipo de leucemia. Vários trabalhos mostram que a mutação *FLT3-DIT* é mais frequente em pacientes portadores de LMA,

cerca de 15-35%, (KOTTARIDIS et al., 2001; FRÖHLING et al., 2002; XU et al., 2012; CARTER et al., 2012; CHAUHAN et al., 2012), do que em outras neoplasias hematológicas, como na LLA (10%) e SMD (5-10%) (KOTTARIDIS et al., 2001; WANG et al., 2010; CHAUHAN et al., 2012). Os resultados obtidos neste trabalho se assemelham aos relatados na literatura, a frequência da mutação *FLT3-DIT* em pacientes com LMA foi de 19,2% e não foram observados casos de LLA com a mutação.

Segundo dados da literatura, a frequência da mutação *FLT3-D835* em adultos portadores de LMA é de 5 a 10% (THIEDE et al., 2002; MESHINCHI et al., 2006) e é mais observada em casos com citogenética normal (11-14,3%) (LEVIS; SMALL, 2003). Resultados semelhantes foram observados neste estudo, onde foi detectado a mutação pontual D835 em três casos, o que representa 11,5% do total de pacientes portadores de LMA incluídos no estudo. Nos casos de LLA a frequência da mutação *FLT3-D835* diminui para 1-3% (THIEDE et al., 2002; MESHINCHI et al., 2006). Para os casos com diagnóstico de LLA, nossos resultados são divergentes aos citados na literatura, pois foi observada uma frequência de 7,1%, porém esse valor pode ser explicado devido a baixa casuística do estudo.

Segundo a classificação da OMS (2008), as características imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares, além de outros parâmetros como a leucometria, a idade e a porcentagem de blastos estão relacionados ao prognóstico, e contribuem para a estratificação das LAs (SWERDLOW et al., 2008). Por isso, foi analisado se a presença de mutação no gene *FLT3* (DIT e D835) estava associada com os outros fatores prognósticos nos pacientes portadores de LAs.

Em relação a idade, um estudo realizado por Stirewalt et al., (2001) relatou que a incidência de mutações *FLT3* aumenta com a idade, mas a presença dessa mutação parece ter menos impacto como fator prognóstico em pacientes com idade superior a 60 anos, possivelmente em função de outros fatores prognósticos adversos serem mais prevalentes. Por outro lado, alguns estudos demonstram que não há associação entre idade e a mutação no gene *FLT3* (DIT e D835) (LEVIS; SMALL, 2003; BAO et al., 2006). No presente estudo não observamos relação entre a idade do paciente e a presença ou ausência de mutação no gene *FLT3* (DIT e D835).

A leucometria, a atividade sérica de LDH e as anormalidades genéticas, assim como as mutações no gene *FLT3*, analisadas no momento do diagnóstico são importantes fatores prognósticos a serem considerados para a decisão terapêutica (STONE, 2009; BETZ; HESS,

2010). A associação entre a leucometria e as mutações no gene *FLT3* (DIT e D835) é controversa, enquanto alguns estudos relataram uma associação entre a alta contagem de leucócitos e a presença de mutação no gene *FLT3* (KOTTARIDIS et al., 2001; WANG et al., 2010), outros não mostraram a mesma associação em pacientes portadores de LMA (SCHLENK et al., 2008; KARABACAK et al., 2010). Como visto anteriormente, a presença da mutação do gene *FLT3-DIT* nas células leucêmicas confere vantagem de sobrevivência e aumento da proliferação celular (BETZ; HESS, 2010; KITAMURA et al., 2014). Essa informação vem ao encontro dos resultados de alguns estudos que encontraram associação significativa entre a presença de mutação no gene *FLT3* com a contagem global de leucócitos. Em nosso estudo essa relação não foi encontrada, mas pode-se observar que nos pacientes que apresentaram a mutação *FLT3-DIT* a leucometria apresentou-se mais elevada do que naqueles que não apresentaram a mutação.

Em pacientes com LA frequentemente observa-se maior atividade de LDH, a qual é considerada como fator prognóstico, pois a elevada atividade dessa enzima reflete aumento da massa tumoral (VARMA; VARMA, 2008). Um estudo conduzido por Peng et al. (2008) em adultos com LA e a presença da mutação *FLT3-DIT* mostrou que há associação entre a presença dessa anormalidade genética e o aumento da atividade sérica da LDH. Entretanto, essa mesma observação não foi notada em outro estudo realizado por Karabacak et al. (2010). Nos pacientes analisados no presente estudo não houve associação entre presença de mutação *FLT3* (DIT e D835) e a atividade da enzima LDH. Porém, pode-se observar que os pacientes com presença da mutação *FLT3-DIT* apresentaram maior atividade da enzima em relação aos pacientes sem a presença da mutação (mediana: 436 U/L e 265 U/L respectivamente).

Também foi avaliado se havia associação entre a presença da mutação no gene *FLT3* (DIT e D835) e o percentual de blastos nos pacientes com diagnóstico de LA, e constatou-se que não houve associação significativa. No entanto, assim como foi observado com a leucometria e com a atividade da enzima LDH os pacientes com mutação do tipo *FLT3-DIT* também apresentaram uma porcentagem maior de blastos no momento do diagnóstico.

Outro fator de relevância prognóstica é a expressão de CD34 nos blastos leucêmicos. Um estudo elaborado por Zhu et al. (2013) mostra que a expressão de CD34 nos blastos é um preditor de mau prognóstico, independente de *FLT3-DIT*. Ao contrário, outros estudos relatam que pacientes com a mutação *FLT3-DIT* possuem associação com a presença

desse marcador (PENG et al., 2008; STONE, 2009). Neste trabalho não foi observada associação entre a presença da mutação *FLT3* (DIT e D835) e a expressão do marcador CD34. Todavia, entre os cinco pacientes que apresentaram a mutação do tipo *FLT3-DIT* quatro pacientes expressavam o marcador CD34, do mesmo modo que apenas um entre os cinco pacientes com mutação *FLT3-D835* não expressou esse marcador.

Anormalidades cromossômicas são caracterizadas por translocações balanceadas, perda e ganho de cromossomos são peculiares às leucemias encontradas em mais de 65% dos casos (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002; PELLOSO, 2003). Alterações citogenéticas como a presença da t(15;17)(q22;q12) é considerada de prognóstico favorável, porém quando detectada em conjunto com uma outra anormalidade molecular o prognóstico pode ser diferente, como no caso da presença da t(15;17)(q22;q12) concomitante a presença da mutação *FLT3-DIT* onde o prognóstico passa a ser desfavorável (PASCHKA et al., 2006). Neste estudo não houve casos que apresentassem concomitantemente anormalidades cromossômicas e a presença de mutações no gene *FLT3* (DIT e D835). Entretanto, como dito anteriormente, no que se refere a pacientes com citogenética normal a detecção de marcadores moleculares também possui significância prognóstica, pois mesmo quando o significado destes parâmetros é independente de outros fatores prognósticos, esses podem ser incorporados em sistemas de pontuação que da mesma forma permitem definir e/ou ajustar os tratamentos de acordo com a situação específica do paciente (LIERSCH et al. 2014).

Vários estudos mostram a associação entre mutações no gene *FLT3* (DIT e D835) e a capacidade de atingir remissão completa. Alguns deles, conforme exposto anteriormente, demonstram que pacientes com mutação *FLT3-DIT* possuem maior propensão à morte e SLD, claramente associado à leucocitose apresentada por estes pacientes, conferindo a essa mutação uma característica de mau prognóstico (BALDUS et al., 2007; MRÓZEK et al., 2007; GALE et al., 2008). Matthews et al. (1991) sugerem que há uma relação inversa entre a taxa de remissão molecular e pacientes com a presença da mutação *FLT3-DIT*. Neste estudo observou-se que houve associação significativa entre a presença da mutação do tipo *FLT3-DIT* e a evolução da doença. Tais resultados evidenciaram que os pacientes portadores de LA que possuem a mutação do tipo *FLT3-DIT* apresentaram aumento no risco de morte ou maior propensão a recidiva. Entretanto, essa associação não foi observada nos pacientes portadores de LAs com a mutação *FLT3-*

D835. Outros estudos também não encontraram diferença significativa entre remissão completa ou SLD associadas a mutação do tipo *FLT3-D835* (YAMAMOTO et al., 2001; THIEDE et al., 2002; WANG et al., 2010).

Pela análise de Kaplan-Meier os casos analisados com a presença da mutação *FLT3-DIT* apresentaram uma taxa menor de SG em relação aos pacientes com a mutação pontual *D835* ou sem presença de mutação no gene *FLT3*. Resultados semelhantes também foram observados por outros pesquisadores (KOTTARIDIS et al., 2001; THIEDE et al., 2002; FRÖHLING et al., 2002; BIENZ et al., 2005), inclusive em estudos brasileiros como reportado por Lucena-Araujo et al., (2010).

A mutação no gene *NPM1* também é considerada um importante fator prognóstico, principalmente quando associada a mutações no gene *FLT3*. A mutação mais comum que acomete o gene *NPM1*, denominada de mutação do tipo-A, é preditiva de melhor resposta a terapia de indução e favorável SG, sendo assim, é considerada de prognóstico favorável quando detectada na ausência de mutações *FLT3*. Esse tipo específico de mutação acomete cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com LMA de cariótipo normal. Entretanto, estudos demonstram que pacientes que apresentam mutações do tipo não-A têm uma menor taxa de SG, o que sugere o impacto desfavorável desses marcadores moleculares (FALINI et al., 2005, KOH et al., 2009). Essas diferenças evidenciam a importância da determinação do tipo de mutação para definir o pronóstico correto do paciente. Em geral, diversos autores demonstraram que a presença das mutações conhecidas para o gene *NPM1* estão associadas ao aumento na leucometria, ao gênero feminino e ausência do marcador CD34 (FALINI et al., 2005; BOISSEL et al. 2005). No presente estudo reportamos a presença de uma nova mutação do tipo não-A detectada em três pacientes com diagnósticos distintos (LMA, LLA-B e LLA-T). Apesar do número pequeno de casos, evidenciou-se que nos três casos os pacientes apresentaram fatores prognósticos desfavoráveis, como o percentual do número de blastos, leucometria alta em dois dos três casos e foram a óbito antes da primeira remissão. Tais dados são sugestivos, pois essa mutação pode ser considerada de mau prognóstico, como as mutações no gene *NPM1* do tipo não-A. Entretanto, a avaliação prognóstica dessa nova mutação requer maior número de casos avaliados para a elucidação. Esses resultados mostram que diferentes mutações no gene *NPM1* podem não ser raras, o que esclarece a necessidade da avaliação das sequências complementares, além da detecção convencional de

mutação alvo, pois dessa forma outros tipos de mutações podem ser detectadas.

7 CONCLUSÕES

A compilação dos resultados encontrados nesse estudo permitiu concluir que:

1. Para a amplificação da região alvo do gene *NPM1*, a adição de 2% de glicerol, assim como quantidades maiores de DNA-molde (100ng) são necessárias para amplificação dos produtos de PCR com maior qualidade e intensidade das bandas.
2. Em três pacientes (7,1%) foi detectada a presença de novos pontos de mutação no gene *NPM1* ainda não descritos na literatura. Nos três casos os pacientes foram a óbito sem remissão.
3. A presença das mutações no gene *FLT3* (DIT e D835) foram mais frequentes em pacientes com o diagnóstico de LMA.
4. As mutações no gene *FLT3* (DIT e D835) não apresentaram associação com gênero.
5. A presença de anormalidades citogenéticas não foi encontrada em conjunto com a presença das mutações DIT e D835.
6. Os pacientes cuja mutação *FLT3-DIT* foi detectada, mostraram valores maiores em relação a leucometria, atividade da enzima LDH e porcentagem blastos.
7. A presença da mutação *FLT3-D835* não está associada aos demais parâmetros analisados (gênero, leucometria, atividade da enzima LDH, porcentagem de blastos, expressão de CD34, progressão clínica do paciente e SG), porém houve uma tendência de associação entre a presença da mutação e o aumento da idade.
8. Houve predomínio de expressão do marcador CD34 nos blastos dos pacientes que apresentaram mutações *FLT3* (DIT e D835).
9. A análise da progressão clínica do paciente mostrou associação positiva para os pacientes com a presença da mutação *FLT3-DIT*. Esses pacientes apresentaram um desfecho desfavorável,

entre os cinco casos onde a mutação foi detectada, quatro (80%) foram a óbito sem remissão.

10. Houve associação estatisticamente significativa entre os pacientes com a mutação do tipo *FLT3-DIT* e a diminuição da sobrevida, a análise mostrou que a SG foi consideravelmente mais baixa nesses pacientes.

A presença da mutação do tipo *FLT3-DIT* foi associada de forma positiva a uma pior progressão clínica do paciente e menor taxa de SG. Assim, os resultados encontrados sugerem que *FLT3-DIT* é um fator preditivo de prognóstico desfavorável, e deve ser incluído na avaliação do prognóstico dos pacientes portadores de LA no momento do diagnóstico. Entretanto, as mutações *FLT3-DIT* e *FLT3-D835* não demonstraram associação positiva com outros fatores prognósticos como leucometria, atividade da LDH, porcentagem de blastos e expressão de CD34, o que precisa ser confirmado com a análise de um maior número de casos. Além disso, a detecção de três pacientes com novos pontos de mutação no gene *NPM1* em uma casuística relativamente pequena, sugere que a presença de outras mutações ainda desconhecidas parece não ser rara, e, portanto, a análise deste gene deve ser realizada de forma ampla para que as possíveis implicações prognósticas dessas alterações sejam avaliadas.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar as análises com um número maior de amostras, e assim pesquisar detalhadamente a importância das mutações genéticas *FLT3* (DIT e D835) e *NPM1* como marcadores moleculares de diagnóstico diferencial, estratificação de prognóstico, detecção de DRM, bem como sua associação com outros fatores prognósticos, em portadores de LAs.
- Implementar a metodologia para detecção de mutações no gene *NPM1*, no Hospital Universitário (HU-UFSC), como parte da rotina laboratorial dos pacientes que receberem o diagnóstico de LA.
- Avaliar a importância biológica, clínica e prognóstica das novas mutações detectadas no gene *NPM1*.

REFERÊNCIAS

ABU-DUHIER, F. M.; GOODEVE, A. C.; WILSON, G. A.; GARI, M. A.; PEAKE, I. R.; REES, D. C.; VANDENBERGHE, E. A.; WINSHIP, P. R.; REILLY, J. T. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. **British journal of haematology**, v. 111, n. 1, p. 190-195, 2000.

AGNÈS, F.; SHAMOON, B.; DINA, C.; ROSNET, O.; BIRNBAUM, D.; GALIBERT, F. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. **Gene**, v. 145, n. 2, p. 283-288, 1994.

ALLEN, C.; ALLEN, C.; HILLS, R. K.; LAMB, K.; EVANS, C.; TINSLEY, S.; SELLAR, R.; O'BRIEN, M.; YIN, J. L.; BURNETT, A. K.; LINCH, D. C.; GALE, R. E. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 27, n. 9, p. 1891-1901, 2013.

AL-TONBARY, Y.; MANSOUR, A. K.; GHAZY, H.; ELGHANNAM, D. M.; ABD-ELGHAFAR, H. A. Prognostic significance of fetal-like tyrosine kinase 3 mutation in Egyptian children with acute leukaemia. **Int J Lab Hematol**, v. 31, n. 3, p. 320-326, 2009.

ANDERSSON, A.; JOHANSSON, B.; LASSEN, C.; MITELMAN, F.; BILLSTROM, R.; FIORETOS, T. Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. **Eur J Haematol**, v. 72, n. 5, p. 307-313, 2004.

APPELBAUM, F. R.; GUNDACKER, H.; HEAD, D. R.; SLOVAK, M. L.; WILLMAN, C. L.; GODWIN, J. E.; ANDERSON, J. E.; PETERSDORF, S. H. Age and acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3481-3485, 2006.

ARMSTRONG, S. A.; LOOK, A. T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **J of Clin Onc**, v. 23, n. 26, p. 6306-6315, 2005.

ASSELIN, B. L.; GAYNON, P.; WHITLOCK, J. A. Recent advances in acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: an expert panel discussion. **Current opinion in oncology**, v. 25, p. S1-S13, 2013.

AZEVEDO, M. C. Avaliação retrospectiva dos pacientes portadores de leucemia mielóide aguda tratados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre 1978 e 2007. 2009. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

BACHER, U.; HAFERLACH, C.; KERN, W.; HAFERLACH, T.; SCHNITTGER, S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. **Blood**, v. 111, n. 5, p. 2527-2537, 2008.

BAIN, B. J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2003.

BAIN, B. J. **Leukaemia diagnosis**. 4 ed. John Wiley & Sons, 2010.

BALDUS, C. D.; MARTUS, P.; BURMEISTER, T.; SCHWARTZ, S.; GOKBUGET, N.; BLOOMFIELD, C. D.; HOELZER, D.; THIEL, E.; HOFMANN, W. K. Low ERG and BAALC expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 24, p. 3739-3735, 2007.

BAO, L.; WANG, X.; RYDER, J.; JI, M.; CHEN, Y.; CHEN, H.; SUN, H.; YANG, Y.; DU, X.; KERZIC, P.; GROSS, S. A.; YAO, L.; LV, L.; FU, H.; LIN, G.; IRONS, R. D. Prospective study of 174 de novo acute myelogenous leukemias according to the WHO classification: subtypes, cytogenetic features and FLT3 mutations. **Eur J Haematol**, v. 77, n. 1, p. 35-45, 2006.

BASSAN, R.; GATTA, G.; TONDINI, C.; WILLEMZE, R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 50, n. 3, p. 223-261, 2004.

BASSAN, R.; HOELZER, D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of clinical oncology**, v. 29, n. 5, p. 532-543, 2011.

- BEITINJANEH, A.; JANG, S.; ROUKOZ, H.; MAJHAIL, N. S. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: a systematic review. **Leukemia research**, v. 34, n. 7, p. 831-836, 2010.
- BÉNÉ, M. C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunology letters**, v. 98, n. 1, p. 9-21, 2005.
- BÉNÉ, M. C.; NEBE, T.; BETTELHEIM, P.; BULDINI, B.; BUMBEA, H.; KERN, W.; LACOMBE, F.; LEMEZ, P.; MARINOV, I.; MATUTES, E.; MAYNADIÉ, M.; OELSCHLAGEL, U.; ORFAO, A.; SCHABATH, R.; SOLENTHALER, M.; TSCHURTSCHENTHALER, G.; VLADAREANU, A. M.; ZINI, G.; FAURE, G. C.; PORWIT, A. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. **Leukemia**, v. 25, n. 4, p. 567-574, 2011.
- BERTWISTLE, D.; SUGIMOTO, M.; SHERR, C. J. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 3, p. 985-996, 2004.
- BETZ, B. L.; HESS, J. L. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 134, n. 10, p. 1427-1433, 2010.
- BIENZ, M.; LUDWIG, M.; LEIBUNDGUT, E. O.; MUELLER, B. U.; RATSCHILLER, D.; SOLENTHALER, M.; FEY, M.F.; PABST, T. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 4, p. 1416-1424, 2005.
- BOISSEL, N.; RENNEVILLE, A.; BIGGIO, V.; PHILIPPE, N.; THOMAS, X.; CAYUELA, J. M.; TERRE, C.; TIGAUD, I.; CASTAIGNE, S.; RAFFOUX, E.; DE BOTTON, S.; FENAUX, P.; DOMBRET, H.; PREUDHOMME, C. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. **Blood**, v. 106, n. 10, p. 3618-3620, 2005.
- BOISSEL, N.; BOISSEL, N.; LEROY, H.; BRETHON, B.; PHILIPPE, N.; BOTTON, S.; AUVRIGNON, A.; RAFFOUX, E.; LEBLANC, T.; THOMAS, X.; HERMINE, O.; QUESNEL, B.; BARUCHEL, A.;

LEVERGER, G.; DOMBRET, H.; PREUDHOMME, C. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). **Leukemia**, v. 20, n. 6, p. 965-970, 2006.

BOONTHIMAT, C.; THONGNOPPAKHUN, W.; AUEWARAKUL, C. U. Nucleophosmin mutation in Southeast Asian acute myeloid leukemia: eight novel variants, FLT3 coexistence and prognostic impact of NPM1/FLT3 mutations. **Haematologica**, v. 93, n. 10, p. 1565-1569, 2008.

BUCHNER, T.; BERDEL, W. E.; HAFERLACH, C.; HAFERLACH, T.; SCHNITTGER, S.; MULLER-TIDOW, C.; BRAESS, J.; SPIEKERMANN, K.; KIENAST, J.; STAIB, P.; GRUNEISEN, A.; KERN, W.; REICHLER, A.; MASCHMEYER, G.; AUL, C.; LENGFELDER, E.; SAUERLAND, M. C.; HEINECKE, A.; WORMANN, B.; HIDDEMANN, W. Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 1, p. 61-9, 2009.

BURNETT, A. K. New induction and postinduction strategies in acute myeloid leukemia. **Curr Opin Hematol**, v. 19, n. 2, p. 76-81, 2012.

BYRD, J. C.; MRÓZEK, K., DODGE, R. K., CARROLL, A. J., EDWARDS, C. G., ARTHUR, D. C., PETTENATI, M. J.; PATIL, S. R.; MOORE, J. O.; STONE, R. M.; MAYER, R. J.; FELDMAN E. J.; DAVEY F. R.; SCHIFFER, C. A.; LARSON, R. A.; BLOOMFIELD, C. D. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4325-4336, 2002.

CAGNETTA, A. ADAMIAA, S.; ACHARYAA, C.; PATRONEB, F.; MIGLINOB, M.; NENCIONIB, A.; GOBBIB, M.; CEA, M. Role of genotype-based approach in the clinical management of adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **Leukemia research**, v. 38, n. 6, p. 649-659, 2014.

CAMMENGA, J. Gatekeeper pathways and cellular background in the pathogenesis and therapy of AML. **Leukemia**, v. 19, n. 10, p. 1719-1728, 2005.

CARTER, B. Z.; QIU, Y.; HUANG, X.; DIAO, L.; ZHANG, N.; COOMBES, K. R.; MAK, D. H.; KONOPLEVA, M.; CORTES, J.; KANTARJIAN, H. M.; MILLS, G. B.; ANDREEFF, M.; KORNBLAU, S. M. Survivin is highly expressed in CD34(+)38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML. **Blood**, v. 120, n. 1, p. 173-80, 2012.

CHAUHAN, P. S.; BHUSHAN, B.; SINGH, L. C.; MISHRA, A. K.; SALUJA, S.; MITTAL, V.; GUPTA, DK.; KAPUR, S. Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy. **Experimental and molecular pathology**, v. 92, n. 1, p. 44-49, 2012.

CHIARETTI, S.; ZINI, G.; BASSAN, R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 6, n. 1, 2014.

CORNELL, R. F.; PALMER, J. Adult acute leukemia. *Dis Mon*, v. 58, n. 4, p. 219-238, 2012.

DALAL, B. I.; MANSOOR, S.; MANNA, M.; PI, S.; SAURO, G. D.; HOGGE, D. E. Detection of CD34, TdT, CD56, CD2, CD4, and CD14 by flow cytometry is associated with NPM1 and FLT3 mutation status in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 12, n. 4, p. 274-279, 2012.

DEL VECHIO, L.; BRANDO, B.; LANZA, F.; ORTOLANI, C.; PIZZOLO, G.; SEMENZATO, G.; BASSO, G. Recommended reporting format for flow cytometry diagnosis of acute leukemia. **Haematologica**, v. 89, n. 5, p. 594-598, 2004.

DESCHLER, B.; LUBBERT, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. **Cancer**, v. 107, n. 9, p. 2099-2107, 2006.

DÖHNER, H.; ESTEY, E. H.; AMADORI, S.; APPELBAUM, F. R.; BÜCHNER, T.; BURNETT, A. K.; DOMBRET, H.; FENAUX, P.; GRIMWADE, D.; LARSON, R. A.; LO-COCO, F.; NAOE, T.;

- NIEDERWIESER, D.; OSSENKOPPELE, G. J.; SANZ, M. A.; SIERRA, J.; TALLMAN, M. S.; LÖWENBERG, B.; BLOOMFIELD, C. D. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v.115, p.453-474, 2010.
- DORES, G.; DEVESA, S. S.; CURTIS, R. E.; LINET, M. S.; MORTON, L. M. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. **Blood**, v. 119, n. 1, p. 34-43, 2012.
- EWING, B; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces usingPhred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.
- ESPARZA, S. D.; SAKAMOTO, K. M. Topics in pediatric leukemia—acute lymphoblastic leukemia. **Medscape General Medicine**, v. 7, n. 1, p. 23, 2005.
- ESTEY, E. H. Therapeutic Options For Acute Myelogenous Leukemia. **Cancer**. v. 92, n. 5, p. 1059-1073, 2001.
- FALINI, B.; MECUCCI, C.; TIACCI, E.; ALCALAY, M.; ROSATI, R.; PASQUALUCCI, L.; LA STARZA, R.; DIVERIO, D.; COLOMBO, E.; SANTUCCI, A.; BIGERNA, B.; PACINI, R.; PUCCIAMATINI, A.; LISO, A.; VIGNETTI, M.; FAZI, P.; MEANI, N.; PETTIROSSI, V.; SAGLIO, G.; MANDELLI, F.; LO-COCO, F.; PELICCI, P. G.; MARTELLI, M. F; GIMENA ACUTE LEUKEMIA WORKING PARTY. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. **N Engl J Med**, v. 352, n.3, p. 254-266, 2005.
- FALINI, B.; NICOLETTI, I.; MARTELLI, M. F.; MECUCCI, C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc + AML): biologic and clinical features. **Blood**, v.109, n. 3, p. 874-885, 2007.

FARIAS, M. G.; DE CASTRO, S. M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 2, p. 91-8, 2004.

FATHI, A. T.; CHEN, Y. -B. Treatment of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. **American journal of blood research**, v. 1, n. 2, p. 175, 2011.

FERRARA, F.; SCHIFFER, C. A. Acute myeloid leukaemia in adults. **The Lancet**, v. 381, n. 9865, p. 484-495, 2013.

FRÖHLING, S.; SCHLENK, R. F.; BREITRUCK, J.; BENNER, A.; KREITMEIER, S.; TOBIS, K.; DÖHNER, H.; DÖHNER, K.; AML STUDY GROUP ULM: ACUTE MYELOID LEUKEMIA. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. **Blood**, v.100, n. 13, p. 4372-80, 2002.

GABBIANELLI, M.; PELOSI, E.; MONTESORO, E.; VALTIERI, M.; LUCHETTI, L.; SAMOGGIA, P.; VITELLI, L.; BARBERI, T.; TESTA, U.; LYMAN, S.; PESCHLE, C. S. Lyman, and C. Peschle Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 1661-70, 1995.

GALE, R.; HILLS, R.; KOTTARIDIS, P. D.; SRIRANGAN, S.; WHEATLEY, K.; BURNETT, A. K.; LINCH, D. C. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. **Blood**, v. 106, n. 10, p. 3658-3665, 2005.

GALE, R. E.; GREEN, C.; ALLEN, C.; MEAD, A. J.; BURNETT, A. K.; HILLS, R. K.; LINCH, D. C.; MEDICAL RESEARCH COUNCIL ADULT LEUKAEMIA WORKING PARTY. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v.111, n. 5, p. 2776-2784, 2007.

GALE, R.; GREEN, C.; ALLEN, C.; MEAD, A. J.; BURNETT, A. K.; HILLS, R. K.; LINCH, D. C. The impact of FLT3 internal tandem

duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 111, n. 5, p. 2776-2784, 2008.

GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1532-1542, 2002.
GÖKBUGET, N.; HOELZER, D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. **ASH Education Program Book**, v. 2006, n. 1, p. 133-141, 2006.

GONFLONI, S.; WEIJLAND, A.; KRETZSCHMAR, J.; SUPERTI-FURGA, G. Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bidirectional regulation of Src. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 7, n. 4, p. 281-286, 2000.

GREAVES, M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Eur J Cancer**, v. 35, n. 14, p. 173-85, 1999.

GRIFFIN, J. D. Point mutations in the FLT3 gene in AML. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2193A-2193, 2001.

GRIMWADE, D.; WALKER, H.; OLIVER, F.; WHEATLEY, K.; HARRISON, C.; HARRISON, G.; REES, J.; HANN, I.; STEVENS, R.; BURNETT, A.; GOLDSTONE, A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. **Blood**, v.92, n. 7, p.2322-2333, 1998.

GRIMWADE, D.; WALKER, H.; HARRISON, G.; OLIVER, F.; CHATTERS, S.; HARRISON, C. J.; WHEATLEY, K.; BURNETT, A. K.; GOLDSTONE, A. H. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 1312-1320, 2001.

GRIMWADE, D. The changing paradigm of prognostic factors in acute myeloid leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 25, n. 4, p. 419-425, 2012.

GRISENDI, S.; MECUCCI, C.; FALINI, B.; PANDOLFI, P. P. Nucleophosmin and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 7, p. 493-505, 2006.

GROSSMANN, V.; SCHNITTGER, S., KOHLMANN, A., EDER, C., ROLLER, A., DICKER, F.; SCHMID, C.; WENDTNER, C. M.; STAIB, P.; SERVE, H.; KREUZER, K. A.; KERN, W.; HAFERLACH, T.; HAFERLACH, C. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 2963-2972, 2012.

HAFERLACH, C.; DICKER, F.; SCHNITTGER, S.; KERN, W.; HAFERLACH T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVH status and immunophenotyping. **Leukemia**, v. 21, n. 12, p. 2442-2451, 2007.

HALL, G. W. Childhood myeloid leukemias. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v.14, n. 1, 573-591, 2001.

HASSERJIAN, R. P. Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification. **International journal of laboratory hematology**, v. 35, n. 3, p. 358-366, 2013.

HAYAKAWA, F.; TOWATARI, M.; KIYOI, H.; TANIMOTO, M.; KITAMURA, T.; SAITO, H.; NAOE, T. Tandem-duplicated FLT3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. **Oncogene**, v.19, n. 5, p. 624 - 631, 2000.

HEEL, K.; TABONE, T.; RÖHRIG, K. J.; MASLEN, P. G.; MEEHAN, K.; GRIMWADE, L. F.; ERBER, W. N. Developments in the immunophenotypic analysis of haematological malignancies. **Blood reviews**, v. 27, n. 4, p. 193-207, 2013.

HEIDEL, F.; SOLEM, F. K.; BREITENBUECHER, F.; LIPKA, D. B.; KASPER, S.; THIEDE, M. H.; BRANDTS, C.; SERVE, H.; ROESEL, J.; GILES, F.; FELDMAN, E.; EHNINGER, G.; SCHILLER, G. J.; NIMER, S.; STONE, R. M.; WANG, Y.; KINDLER, T.; COHEN, P. S.; HUBER, C.; FISCHER, T. Clinical resistance to the kinase inhibitor

PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 293-300, 2006.

HOWLADER, N.; NOONE, A. M.; KRAPCHO, M.; GARSHELL, J.; MILLER, D.; ALTEKRUSE, S. F.; KOSARY, C. L.; YU, M.; RUHL, J.; TATALOVICH, Z.; MARIOTTO, A.; LEWIS, D. R.; CHEN, H. S.; FEUER, E. J.; CRONIN, K. A. SEER **Cancer Statistics Review**, 1975-2011. National Cancer Institute, Bethesda. Disponível em: <http://sser.cancer.gov/csr/1975_2011/>. Acesso em: 22 de janeiro de 2015.

HRUSAK, O.; PORWIT-MACDONALD, A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. **Leukemia**, v. 16, n. 7, p. 1233-1258, 2002.

HWANG, J. P.; LAM, T. P.; COHEN, D. S.; DONATO, M. L.; GERACI, J. M. Hematopoietic stem cell transplantation among patients with leukemia of all ages in Texas. **Cancer**, v. 101, p. 10, p.2230-2238, 2004.

INCA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2014: Incidência do Câncer no Brasil, 2014**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2015.

INTERMESOLI, T.; KRISHNAN, S.; MACDOUGALL, F.; JENNER, M.; LISTER, A.; ROHATINER A. Efficacy of an intensive post-induction chemotherapy regimen for adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia, given predominantly in the out-patient setting. **Annals of hematology**, v. 90, n. 9, p. 1059-1065, 2011.

JABBOUR, E. J.; FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M. Adult acute lymphoblastic leukemia. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 80, n. 11, p. 1517-1527. 2005.

JEON, Y.; SEO, S. W.; PARK, S.; PARK, S.; KIM, S. Y.; RA, E. K.; PARK, S. S.; SEONG, M. W. Identification of Two Novel NPM1 Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia. **Annals of laboratory medicine**, v. 33, n. 1, p. 60-64, 2013.

JULIUSSON, G.; ANTUNOVIC, P.; DEROLF, A.; LEHMANN, S.; MOLLGARD, L.; STOCKELBERG, D.; TIDEFELT, U.; WAHLIN, A.; HOGLUND, M. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. **Blood**, v. 113, n. 18, p. 4179-4187, 2009.

KARABACAK, B. H.; ERBEY, F.; BAYRAM, I.; YILMAZ, S.; ACIPAYAM, C.; KILINÇ, Y.; TANYELI, A. Fms-like tyrosine kinase 3 mutations in childhood acute leukemias and their association with prognosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 11, n. 4, p. 923-927, 2010.

KERN, W.; SCHNITTGER, S. Monitoring of acute myeloid leukemia by flow cytometry. **Current oncology reports**, v. 5, n. 5, p. 405-412, 2003.

KERSEY, J. H. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. **Blood**, v. 90, n. 11, p. 4243-4251, 1997.

KITAMURA, T.; INOUE, D.; OKOCHI-WATANABE, N.; KATO, N.; KOMENO, Y.; LU, Y.; ENOMOTO, Y.; DOKI, N.; UCHIDA, T.; KAGIYAMA, Y.; TOGAMI, K.; KAWABATA, K.C.; NAGASE, R.; HORIKAWA, S.; HAYASHI, Y.; SAIKA, M.; FUKUYAMA, T.; IZAWA, K.; OKI, T.; NAKAHARA, F.; KITAURA, J. The molecular basis of myeloid malignancies. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 90, n. 10, p. 389-404, 2014.

KIYOI, H.; NAOE, T.; NAKANO, Y.; YOKOTA, S.; MINAMI, S.; MIYAWAKI, S.; ASOU, N.; KURIYAMA, K.; JINNAI, I.; SHIMAZAKI, C.; AKIYAMA, H.; SAITO, K.; OH, H.; MOTOJI, T.; OMOTO, E.; SAITO, H.; OHNO, R.; UEDA, T. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 93, n. 7, p. 3074-3080, 1999.

KOH, Y.; PARK, J.; AHN, K. S.; KIM, I.; BANG, S. M.; LEE, J. H.; YOON, S. S.; SOON, L. D.; YIUL, L. Y.; PARK, S.; KIM, B. K. Different Clinical Importance of FLT3 Internal Tandem Duplications in AML According to FAB Classification: Possible Existence of Distinct Leukemogenesis Involving Monocyte Differentiation Pathway. **Ann Hematol**. v. 88, n. 11, p. 1089-1097, 2009.

KOTTARIDIS, P. D.; GALE, R. E.; FREW, M. E.; HARRISON, G.; LANGABEER, S. E.; BELTON, A. A.; WALKER, H.; WHEATLEY, K.; BOWEN, D. T.; BURNETT, A. K.; GOLDSTONE, A. H.; LINCH, D. C. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. **Blood**, v.98, n. 6, p.1752-1759, 2001.

KRUG, U.; ROLLIG, C.; KOSCHMIEDER, A.; HEINECKE, A.; SAUERLAND, M. C.; SCHAICH, M.; THIEDE, C.; KRAMER, M.; BRAESS, J.; SPIEKERMANN, K.; HAFERLACH, T.; HAFERLACH, C.; KOSCHMIEDER, S.; ROHDE, C.; SERVE, H.; WORMANN, B.; HIDDEMANN, W.; EHNINGER, G.; BERDEL, W. E.; BUCHNER, T.; MULLER-TIDOW, C. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2000-2008, 2010.

KUMAR, C. C. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. **Genes & cancer**, v. 2, n. 2, p. 95-107, 2011.

KURKI, S.; PELTONEN, K.; LATONEN, L.; KIVIHARJU, T. M.; OJALA, P. M.; MEEK, D.; LAIHO M. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. **Cancer Cell**, v.5, n. 5, p.465-475, 2004.

LACAYO, N. J.; MESHINCHI, S.; KINNUNEN, P.; YU, R.; WANG, Y.; STUBER, C. M.; DOUGLAS, L.; WAHAB, R.; BECTON, D. L.; WEINSTEIN, H.; CHANG, M. N.; WILLMAN, C. L.; RADICH, J. P.; TIBSHIRANI, R.; RAVINDRANATH, Y.; SIKIC, B. I.; DAHL, G. V. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2646-2654, 2004.

LAI, R; HIRSCH-GINSBERG, C. F.; BUESO-RAMOS, C. Pathologic diagnosis of acute lymphocytic leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 14, n. 6, p. 1209-1235, 2000.

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

LIANG, D. C.; SHIH, L. Y.; HUNG, I. J.; YANG, C. P.; CHEN, S. H.; JAING, T. H.; LIU, H. C.; WANG, L. Y.; CHANG, W. H. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 17, n. 5, p. 883-886, 2003.

LIBURA, M.; ASNAFI, V.; TU, A.; DELABESSE, E.; TIGAUD, I.; CYMBALISTA, F.; BENNACEUR-GRISCELLI, A.; VILLARESE, P.; SOLBU, G.; HAGEMEIJER, A.; BELDJORD, K.; HERMINE, O.; MACINTYRE, E. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. **Blood - New York**, v. 102, n. 6, p. 2198-2204, 2003.

LICÍNIO, M. A.; SANTOS-SILVA, M. C. Importance of detecting FLT3 and NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia - World Health Organization Classification 2008. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. 6, p. 476-481, 2010.

LICÍNIO, M.A.; SANTOS-SILVA, M.C. Análise da associação das mutações no gene FLT3 com outros fatores prognósticos em pacientes com diagnóstico de leucemia aguda. 2011. **Dissertação de Mestrado**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.

LIERSCH, R.; MÜLLER-TIDOW, C.; BERDEL W. E.; KRUG, U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults—biological significance and clinical use. **British journal of haematology**, v. 165, n. 1, p. 17-38, 2014.

LIESVELD, J. L.; LICHTMAN, M. A. Acute myelogenous leukemia. In: KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; PRCHAL, J. T. (Ed.). **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 2010. p. 1277–1399.

LOKEN, M. R.; ALONZO, T. A.; PARDO, L.; GERBING, R. B.; RAIMONDI, S. C.; HIRSCH, B. A.; HO, P. A.; FRANKLIN, J.; COOPER, T. M.; GAMIS, A. S.; MESHINCHI S. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group. **Blood**, v. 120, n. 8, p. 1581-1588, 2012.

LÖWENBERG, B.; DOWNING, J. R.; BURNETT, A. Acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 14, p. 1051-1062, 1999.

LÖWENBERG, B. Managing therapy in older adult patients with acute myeloid leukemia. **Seminars in hematology**. v. 38, n. 3, p. 10-16, 2001.

LUCENA-ARAÚJO, A. R.; SOUZA, D. L.; MORATO DE OLIVEIRA, F.; BENICIO, M. T.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; SANTANA LEMOS, B. A.; DOS SANTOS, G. A.; JACOMO, R. H.; DINARTESANTOS, A. R.; YAMAMOTO, M.; SILVA-JR, W. A.; DE LOURDES CHAUFFAILLE, M.; REGO, E. M. Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. **Ann Hematol**, v. 89, n. 2, p. 225-228, 2010.

LYMAN, S. D.; JACOBSEN, S. E. W. C-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. **Blood**, v. 91, n. 4, p. 1101-1134, 1998.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. Citogenética humana. Porto Alegre: **Artmed**, 2011.

MARCHESI, F.; ANNIBALI, O.; CERCHIARA, E.; TIRINDELLI, M. C.; AVVISATI, G. Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: A concise review. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 80, n. 3, p. 331-346, 2011.

MATTHEWS, W.; JORDAN, C. T.; WIEGAND, G. W.; PARDOLL, D.; LEMISCHKA, I. R. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1143-1152, 1991.

MCKENNA, H. J.; STOCKING, K. L.; MILLER, R. E.; BRASEL, K.; DE SMEDT, T.; MARASKOVSKY, E.; MALISZEWSKI, C. R.; LYNCH, D. H.; SMITH, J.; PULENDRAN, B.; ROUX, E. R.; TEEPE, M.; LYMAN, S. D.; PESCHON, J. J. Mice lacking FLT3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3489-3497, 2000.

MESHINCHI, S.; WOODS, W. G.; STIREWALT, D. L.; SWEETSER, D. A.; BUCKLEY, J. D.; TJOA, T. K.; BERNSTEIN, I. D.; RADICH, J. P. Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v.97, n.1, p.89-94, 2001.

MESHINCHI, S.; ALONZO, T. A.; STIREWALT, D. L.; ZWAAN, M.; ZIMMERMAN, M.; REINHARDT, D.; KASPERS, G. J.; HEEREMA, N. A.; GERBING, R.; LANGE, B. J.; RADICH, J. P. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. **Blood**, v. 108, n. 12, p.3654-3661, 2006.

MESHINCHI, S.; STIREWALT, D. L.; ALONZO, T. A.; BOGGON, T. J.; GERBING, R. B.; ROCNIK, J. L.; LANGE, B. J.; GILLILAND, D. G.; RADICH, J. P. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4930-4933, 2008.

MESHINCHI, S.; APPELBAUM, F. R. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 13, p. 4263-9, 2009.

MRÓZEK, K.; MARCUCCI, G.; PASCHKA, P.; WHITMAN, S.P.; BLOOMFIELD, C. D. Clinical relevance of mutations and gene expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? **Blood**, v.109, n. 2, p. 431-448, 2007.

MRÓZEK, K. Cytogenetic, molecular genetic and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. **Seminars in oncology**. v. 35, n. 4 p. 365-377. 2008.

MRÓZEK, K.; BLOOMFIELD, C. D. Acute myeloid leukemia with adverse cytogenetic risk. **Oncology**, v. 26, n. 8, p. 714, 2012.

NAOE, T.; KIYOI, H. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. **International journal of hematology**, v. 97, n. 2, p. 165-174, 2013.

NAOUM, P. C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 23, n. 2, p. 111-119, 2001.

NCCN – National Comprehensive Cancer Network – **Practice Guidelines in Oncology** – Acute Myeloid Leukemia – v.2.2014, 2014.

NCCN – National Comprehensive Cancer Network – **Practice Guidelines in Oncology** – Acute lymphoblastic Leukemia – v.1.2014, 2014.

NOGUERA, N. I.; BRECCIA, M.; DIVONA, M.; DIVERIO, D.; COSTA, V.; DE SANTIS, S.; AVVISATI, G.; PINAZZI, M. B.; PETTI, M. C.; MANDELLI, F.; LO COCO, F. Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. **Leukemia**, v. 16, n. 11, p. 2185-2189, 2002.

O'DONNELL, M. R.; ABOUD, C. N.; ALTMAN, J.; APPELBAUM, F. R.; ARBER, D. A.; ATTAR, E.; BORATE, U.; COUTRE, S. E.; DAMON, L. E.; GOORHA, S.; LANCET, J.; MANESS, L. J.; MARCUCCI, G.; MILLENSON, M. M.; MOORE, J. O.; RAVANDI, F.; SHAMI, P. J.; SMITH, B. D.; STONE, R. M.; STRICKLAND, S. A.; TALLMAN, M. S.; WANG, E. S.; NAGANUMA, M.; GREGORY, K. M. Acute myeloid leukemia. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 10, n. 8, p. 984-1021, 2012.

PARIKH, S. A.; JABBOUR, E.; KOLLER, C. A. Adult acute myeloid leukemia. In: KANTARJIAN, H. M.; WOLFF, R. A.; KOLLER, C. A. (Ed.). **The MD Anderson: Manual of Medical Oncology**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 2011. 1400 p.

PASCHKA, P.; MARCUCCI, G.; RUPPERT, A. S.; MRÓZEK, K.; CHEN, H.; KITTLES, R. A.; VUKOSAVLJEVIC, T.; PERROTTI, D.; VARDIMAN, J. W.; CARROLL, A. J.; KOLITZ, J. E.; LARSON, R. A.; BLOOMFIELD, C. D. CANCER AND LEUKEMIA GROUP B. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. **J Clin Oncol**, v.24, n. 24, p.3904-11, 2006.

PASCHKA, P.; DÖHNER, K. Core-binding factor acute myeloid leukemia: can we improve on HiDAC consolidation?. **ASH Education Program Book**, v. 2013, n. 1, p. 209-219, 2013.

PATEL, JAY P.; GÖNEN M.; FIGUEROA M. E.; FERNANDEZ, H.; SUN, Z.; RACEVSKIS, J.; VAN VLIERBERGHE, P.; DOLGALEV, I.; THOMAS, S.; AMINOVA, O.; HUBERMAN, K.; CHENG, J.; VIALE, A.; SOCCI, N. D.; HEGUY, A.; CHERRY, A.; VANCE, G.; HIGGINS, R. R.; KETTERLING, R. P.; GALLAGHER, R. E.; LITZOW, M.; VAN DEN BRINK, M. R.; LAZARUS, H. M.; ROWE, J. M.; LUGER, S.; FERRANDO, A.; PAIETTA, E.; TALLMAN, M. S.; MELNICK, A.; ABDEL-WAHAB, O.; LEVINE, R. L. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 12, p. 1079-1089, 2012.

PAZHAKH, V.; ZAKER, F.; ALIMOGHADDAM, K.; ATASHRAZM, F. Detection of nucleophosmin and FMS-like tyrosine kinase-3 gene mutations in acute myeloid leukemia. **Annals of Saudi medicine**, v. 31, n. 1, p. 45, 2011.

PELLOSO, L.A.F. Cariótipo em leucemia mielóide aguda: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, n. 2, p. 150-5, 2003.

PENG, H. L.; ZHANG, G. S.; GONG, F. J.; SHEN, J. K.; ZHANG, Y.; XU, Y. X.; ZHENG, W. L.; DAI, C. W.; PEI, M. F.; YANG, J. J. Fms-like tyrosine kinase (FLT) 3 and FLT3 internal tandem duplication in different types of adult leukemia: analysis of 147 patients. **Croatian medical journal**, v. 49, n. 5, p. 650-659, 2008.

PEZZI, A.; MORAES, L.; VALIM, V.; AMORIN, B.; MELCHIADES, G.; OLIVEIRA, F.; DA SILVA, M. A.; MATTE, U.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; BITTENCOURT, R.; DAUDT, L.; SILLA, L. DNMT3A mutations in patients with acute myeloid leukemia in South Brazil. **Advances in hematology**, v. 2012, 2012.

PUI, C. H.; RELLING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 15, p. 1535-1548, 2004.

PULLEN, J.; SHUSTER, J. J.; LINK, M.; BOROWITZ, M.; AMYLN, M.; CARROLL, A. J.; LAND, V.; LOOK, A. T.; MCINTYRE, B.; CAMITTA, B. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as

compared to those with B-precursor ALL. **A Pediatric Oncology Group (POG) study. Leukemia**, v. 13, n. 11, p. 1696-1707, 1999.

PULTE, D.; JANSEN, L.; GONDOS, A.; KATALINIC, A.; BARNES, B.; RESSING, M.; HOLLECZEK, B.; EBERLE, A.; BRENNER, H. Survival of adults with acute lymphoblastic leukemia in Germany and the United States. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85554, 2014.

RIVA, L.; LUZI, L.; PELICCI, P. G. Genomics of acute myeloid leukemia: the next generation. **Frontiers in oncology**, v. 2, n. 40, 2012.

ROCKOVA, V.; ABBAS, S.; WOUTERS, B. J.; ERPELINCK, C. A.; BEVERLOO, H. B.; DELWEL, R.; VAN PUTTEN, W. L.; LÖWENBERG, B.; VALK, P. J. Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. **Blood**, v. 118, n. 4, p. 1069-1076, 2011.

ROSNET, O.; SCHIFF, C.; PÉBUSQUE, M. J.; MARCHETTO, S.; TONNELLE, C.; TOIRON, Y.; BIRG, F.; BIRNBAUM, D. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. **Blood**, v. 82, n. 4, p. 1110-1119, 1993.

ROSNET, O.; BUHRING, H. J.; MARCHETTO, S.; RAPPOLD, I.; LAVAGNA, C.; SAINTY, D.; ARNOULET, C.; CHABANNON, C.; KANZ, L.; HANNUM, C.; BIRNBAUM, D. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. **Leukemia**, v. 10, n. 2, p. 238-48, 1996.

ROWE, J. M. Important milestones in acute leukemia in 2013. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 26, n. 3, p. 241-244, 2013.

SANDERS, M. A.; VALK, P. J. M. The evolving molecular genetic landscape in acute myeloid leukaemia. **Current opinion in hematology**, v. 20, n. 2, p. 79-85, 2013.

SCHAFFEL, R.; SIMÕES, B. P. Leucemia Linfoblástica Aguda Filadélfia positiva. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 30, n. 1, p. 52-58, 2008.

SCHLENK, R. F.; DÖHNER, K.; KRAUTER, J.; FRÖHLING, S.; CORBACIOGLU, A.; BULLINGER, L.; HABDANK, M.; SPÄTH, D.; MORGAN, M.; BENNER, A.; SCHLEGELBERGER, B.; HEIL, G.; GANSER, A.; DÖHNER, H.; GERMAN-AUSTRIAN ACUTE MYELOID LEUKEMIA STUDY GROUP. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 358, p. 1909-1918, 2008.

SCHLENK, R. F.; DÖHNER, H. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. **ASH Education Program Book**, v. 2013, n. 1, p. 324-330, 2013.

SCHOCH, C.; KERN, W.; SCHNITTGER, S.; HIDDEMANN, W.; HAFERLACH, T. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. **Leukemia**, v. 18, n. 1, p. 120-125, 2004.

SCHULTZ, K. R.; PULLEN, D. J., SATHER, H. N., SHUSTER, J. J., DEVIDAS, M., BOROWITZ, M. J.; CARROLL, A. J.; HEEREMA, N. A.; RUBNITZ, J. E.; LOH, M. L.; RAETZ, E. A.; WINICK, N. J.; HUNGER, S. P.; CARROLL, A. W.; GAYNON, P. S.; CAMITTA, B. M. Risk-and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). **Blood**, v. 109, n. 3, p. 926-935, 2007.

SEKERES, M. A.; STONE, R. M.; ZAHRIEH, D.; NEUBERG, D.; MORRISON, V., DE ANGELO D. J.; GALINSKY, I.; LEE, S. J. Decision-making and quality of life in older adults with acute myeloid leukemia or advanced myelodysplastic syndrome. **Leukemia**, v. 18, n. 4, p. 809-816, 2004.

SEVILLA, D. W.; COLOVAI, A. I.; EMMONS, F. N.; BHAGAT, G.; ALOBEID, B. Hematogones: a review and update. **Leukemia & lymphoma**, v. 51, n. 1, p. 10-19, 2010.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2014**. CA: a cancer journal for clinicians, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

SMALL, D. FLT3 mutations: biology and treatment. **ASH Education Program Book**, v. 2006, n. 1, p. 178-184, 2006.

SMITH, M. A.; SEIBEL, N. L.; ALTEKRUSE, S. F.; RIES, L. A.; MELBERT, D. L.; O'LEARY, M.; SMITH, F. O.; REAMAN, G. H. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 15, p. 2625-2634, 2010.

SMITH, M.L.; HILLS, R.K.; GRIMWADE, D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. **Blood reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-51, 2011.

STIREWALT, D. L.; KOPECKY, K. J.; MESHINCHI, S.; APPELBAUM, F. R.; SLOVAK, M. L.; WILLMAN, C. L.; L. RADICH, J. P. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, n. 11, p.3589-95, 2001.

STIREWALT, D.; RADICH, J. P. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. **Cancer**, v. 3, p. 650-65, 2003.

STOCK, W.; JOHNSON, J. L.; STONE, R. M.; KOLITZ, J. E.; POWELL, B. L.; WETZLER, M.; WESTERVELT, P.; MARCUCCI, G.; DEANGELO, D. J.; VARDIMAN, J. W.; MCDONNELL, D.; MRÓZEK, K.; BLOOMFIELD, C. D.; LARSON, R. A. Dose intensification of daunorubicin and cytarabine during treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 119, n. 1, p. 90-98, 2013.

STONE, R. M.; O'DONNELL, M. R., SEKERES, M. A. **Acute myeloid leukemia. Hematology**, v. 2004, p. 98-132, 2004.

STONE, R. M. Prognostic factors in AML in relation to (ab)normal karyotype. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v.22, n. 4, p.523-8, 2009.

SUZUKI, T.; KIIYOI, H.; OZEKI, K.; TOMITA, A.; YAMAJI, S.; SUZUKI, R.; KODERA, Y.; MIYAWAKI, S.; ASOU, N.; KURIYAMA, K.; YAGASAKI, F.; SHIMAZAKI, C.; AKIYAMA, H.; NISHIMURA, M.; MOTOJI, T.; SHINAGAWA, K.; TAKESHITA, A.; UEDA, R.; KINOSHITA, T.; EMI, N.; NAOE, T. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 106, n. 8, p. 2854, 2005.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4. Geneva: WHO Press, 2008.

SWIRSKY, D. M.; RICHARDS, S. J. Laboratory diagnosis of acute myeloid leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2001.

TAKEMURA, M.; OHOKA, F.; PERPELESCU, M.; OGAWA, M.; MATSUSHITA, H.; TAKABA, T.; AKIYAMA, T.; UMEKAWA, H.; FURUICHI, Y.; COOK, P. R.; YOSHIDA, S. Phosphorylation-dependent migration of retinoblastoma protein into the nucleolus triggered by binding to nucleophosmin/B23. **Experimental cell research**, v. 276, n. 2, p. 233-241, 2002.

THIEDE, C.; STEUDEL, C.; MOHR, B.; SCHAICH, M.; SCHÄKEL, U.; PLATZBECKER, U.; WERMKE, M.; BORNHÄUSER, M.; RITTER, M.; NEUBAUER, A.; EHNINGER, G.; ILLMER, T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. **Blood**, v.99, n. 12, p. 4326-35, 2002.

THIEDE, C.; KOCH, S.; CREUTZIG, E.; STEUDEL, C.; ILLMER, T.; SCHAICH, M.; EHNINGER G. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4011-4020, 2006.

TSIMBERIDOU, A-M.; KANTARJIAN, H. M.; WEN, S.; KEATING, M. J.; O'BRIEN, S.; BRANDT, M.; PIERCE, S.; FREIREICH, E. J.; MEDEIROS, L. J.; ESTEY, E. Myeloid sarcoma is associated with superior event free survival and overall survival compared with acute myeloid leukemia. **Cancer**, v. 113, n. 6, p. 1370-1378, 2008.

UCKUN, F. M.; SENSEL, M. G.; SUN, L.; STEINHERZ, P. G.; TRIGG, M. E; HEEREMA, N. A. Sather HN, Reaman G. H., Gaynon P. S. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 91, n. 3, p. 735-746, 1998.

VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, Richard D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2292-2302, 2002.

VARDIMAN, J. W.; THIELE, J.; ARBER, D. A.; BRUNNING, R. D.; BOROWITZ, M. J.; PORWIT, A.; HARRIS, N. L.; LE BEAU, M. M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; TEFFERI, A.; BLOOMFIELD, C. D. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, 2009.

VARMA, N.; VARMA, S. Proliferative indices, cytogenetics, immunophenotype and other prognostic parameters in myelodysplastic syndromes. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 97-101, 2008.

VOGELSTEIN, B; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature medicine**, v. 10, n. 8, p. 789-799, 2004.

WANG, W.; WANG, X. Q.; XU, X. P.; LIN, G. W. Prevalence and prognostic significance of FLT3 gene mutations in patients with acute leukaemia: analysis of patients from the Shanghai Leukaemia Cooperative Group. **J Int Med Res**, v. 38, n. 2, p. 432-442, 2010.

WEISS, A.; SCHLESSINGER, J. Switching signals on or off by receptor dimerization. **Cell**, v. 94, n. 3, p. 277-280, 1998.

WESOLOWSKI, R.; COTTA, C. V.; KHAN, G.; POHLMAN, B.; SWEETENHAM, J. Successful treatment of Hodgkin lymphoma and acute leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 51, n. 1, p. 153-156, 2010.

WHITMAN, S.P.; ARCHER, K.J.; FENG, L.; BALDUS, C.; BECKNELL, B.; CARLSON, B.D.; CARROLL, A.J.; MROZEK, K.; VARDIMAN, J.W.; George, S.L. Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3 A Cancer and Leukemia Group B Study. **Cancer Research**, v. 61, n. 19, p. 7233-7239, 2001.

WHITMAN, S. P.; RUPPERT, A. S.; RADMACHER, M. D.; MRÓZEK, K.; PASCHKA, P.; LANGER, C.; BALDUS, C. D.; WEN, J.; RACKE, F.; POWELL, B. L.; KOLITZ, J. E.; LARSON, R. A.;

CALIGIURI, M. A.; MARCUCCI, G.; BLOOMFIELD, C. D. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1552-1559, 2008.

XU, Y.Y.; GAO, L.; DING, Y.; SUN, J. Z.; WANG, N.; WANG, L. L.; YU, L. Detection and clinical significance of FLT3-ITD gene mutation in patients with acute myeloid leukemia. **Journal of experimental hematology**, v. 20, n. 6, p. 1312-1315, 2012.

YAMAMOTO, Y.; KIYOI, H.; NAKANO, Y.; SUZUKI, R.; KODERA, Y.; MIYAWAKI, S.; ASOU, N.; KURIYAMA, K.; YAGASAKI, F.; SHIMAZAKI, C.; AKIYAMA, H.; SAITO, K.; NISHIMURA, M.; MOTOJI, T.; SHINAGAWA, K.; TAKESHITA, A.; SAITO, H.; UEDA, R.; OHNO, R.; NAOE, T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2434-39, 2001.

YIN, J. A.; O'BRIEN, M. A.; HILLS, R. K.; DALY, S. B.; WHEATLEY, K.; BURNETT, A. K. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. **Blood**, v. 120, n. 14, p. 2826-2835, 2012.

ZANICHELLI, M. A.; COLTURATO, V. R.; SOBRINHO, J. Indicações em transplante de células-tronco hematopoéticas em pacientes adultos com leucemia linfóide aguda. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 32, n. 1, p. 54-60, 2010.

ZHANG, S.; BROXMEYER, H. E. FLT3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 277, n. 1, p. 195-199, 2000.

ZHANG, Y.; ZHANG, M.; YANG, L.; XIAO, Z. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Leukemia research**, v. 31, n. 1, p. 109-111, 2007.

ZHU, H. H.; LIU, Y. R.; JIANG, H.; LU, J.; QIN, Y. Z. JIANG, Q.; BAO, L.; RUAN, G. R.; JIANG, B.; HUANG, X. CD34 expression on

bone marrow blasts is a novel predictor of poor prognosis independent of FLT3-ITD in acute myeloid leukemia with the NPM1-mutation. **Leukemia research**, v. 37, n. 6, p. 624-630, 2013.

ZIMMERMANN, C.; YUEN, D.; MISCHITELLE, A.; MINDEN, M. D.; BRANDWEIN, J. M.; SCHIMMER, A.; GAGLIESE, L.; LO, C.; RYDALL, A.; RODIN, G. Symptom burden and supportive care in patients with acute leukemia. **Leukemia research**, v. 37, n. 7, p. 731-736, 2013.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo (Continua).

Caso	1	2	3	4	5	6
Idade	29	58	48	26	19	58
Gênero	M	M	M	M	F	M
Material	SP	SP	SP	MO	MO	MO
Diagnóstico	LMA monoblástica	LLA-B comum	LLA-B comum	LPA	LPA	LMA mirlomocítica
Leucometria (mm³)	5.190	13.530	142.340	17.060	2.000	2.020
Blastos (%)	52,0	85,6	89,9	23,0	0,06	42,5
LDH (U/L)	645	472	3.197	NR	143	265
CD34	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos
<i>FLT3-DIT</i>	Neg	Inc	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>FLT3-D835</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>NPM1</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Progressão	OSR	OER	OSR	REM	REM	OER

APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo (Continuação).

Caso	7	8	9	10	11	12
Idade	87	37	48	41	76	44
Gênero	F	M	M	M	M	F
Material	SP	MO	MO	MO	MO	MO
Diagnóstico	LPA	LLA-T	LLA-B pré B	LPA	LMA mielomonocítica	LPA
Leucometria (mm³)	20.690	7.710	1.060	540	44.160	14.890
Blastos (%)	37,0	15,0	0,0	6,0	17,0	7,8
LDH (U/L)	70	401	61	142	349	490
CD34	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos
<i>FLT3-DIT</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>FLT3-D835</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
<i>NPM1</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Progressão	OSR	REM	REM	REM	OSR	REC

APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo (Continuação).

Caso	13	14	15	16	17	18
Idade	25	18	59	39	67	54
Gênero	F	M	F	M	M	F
Material	SP	MO	MO	MO	MO	MO
Diagnóstico	LLA-T	LMA com t(8;21)	LPA	LMA sem maturação	LBA	LMA sem maturação
Leucometria (mm³)	177.200	4.090	1.630	25.370	3.820	1.860
Blastos (%)	95,0	60,4	26,1	27,0	27,0	43,0
LDH (U/L)	300	227	229	1.194	118	163
CD34	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg
<i>FLT3-DIT</i>	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
<i>FLT3-D835</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
<i>NPM1</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Progressão	OSR	REC	REM	OSR	OSR	REM

APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo (Continuação).

Caso	19	20	21	22	23	24
Idade	73	74	35	47	62	30
Gênero	M	F	M	F	M	M
Material	MO	MO	MO	MO	MO	SP
Diagnóstico	LMA	LMA	LLA pró T	LLA-B comum	LMA monocítica	LLA-B comum
Leucometria (mm³)	29.450	6,750	87.940	8.820	2.270	3.330
Blastos (%)	50,0	64,9	67,0	49,0	4,0	18,7
LDH (U/L)	435	412	6500	567	218	190
CD34	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos
<i>FLT3-DIT</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>FLT3-D835</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>NPM1</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Progressão	OSR	REC	REM	OSR	OSR	REM

APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo (Continuação).

Caso	25	26	27	28	29	30
Idade	25	48	62	45	50	17
Gênero	M	F	F	F	F	M
Material	MO	MO	SP	MO	SP	MO
Diagnóstico	LLA-B comum	LMA com maturação	LMA com maturação	LPA	LPA	LLA-B comum
Leucometria (mm³)	11.360	4.500	3.520	1.610	56.540	3.760
Blastos (%)	75,0	26,0	38,0	38,0	86,0	0,0
LDH (U/L)	5.189	159	335	259	304	141
CD34	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg
<i>FLT3-DIT</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>FLT3-D835</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>NPM1</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Progressão	OSR	REC	REM	OSR	OSR	REM

APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo (Continuação).

Caso	31	32	33	34	35	36
Idade	56	15	38	50	67	31
Gênero	M	M	F	M	M	M
Material	MO	MO	SP	MO	MO	MO
Diagnóstico	LBA	LLA-B comum	LPA	LMA monoblástica	LLA pró T	LMA monocítica
Leucometria (mm³)	68.000	36.390	23.340	2.810	69.070	53.300
Blastos (%)	82,0	0,0	87,0	0,0	48,0	14,0
LDH (U/L)	681	NR	1.838	136	391	NR
CD34	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg
<i>FLT3-DIT</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>FLT3-D835</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>NPM1</i>	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
Progressão	OSR	REC	REM	OSR	OSR	REM

APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo (Continuação).

Caso	37	38	39	40	41	42
Idade	16	20	45	69	88	24
Gênero	M	M	M	M	F	F
Material	SP	MO	SP	MO	SP	SP
Diagnóstico	LPA	LMA com t(8;21)	LLA-B comum	LLA-B comum	LMA sem maturação	LMA
Leucometria (mm³)	73.540	25.680	51.120	NR	2.880	NR
Blastos (%)	97,0	68,0	17,0	NR	23,0	96,0
LDH (U/L)	437	273	148	NR	166	NR
CD34	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
<i>FLT3-DIT</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos
<i>FLT3-D835</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>NPM1</i>	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
Progressão	OSR	REC	REM	REM	REM	OSR

APÊNDICE A – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda incluídos no presente estudo (Conclusão).

Caso	37	38	39	40	41	42
Idade	16	20	45	69	88	24
Gênero	M	M	M	M	F	F
Material	SP	MO	SP	MO	SP	SP
Diagnóstico	LPA	LMA com t(8;21)	LLA-B comum	LLA-B comum	LMA sem maturação	LMA
Leucometria (mm³)	73.540	25.680	51.120	NR	2.880	NR
Blastos (%)	97,0	68,0	17,0	NR	23,0	96,0
LDH (U/L)	437	273	148	NR	166	NR
CD34	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
<i>FLT3-DIT</i>	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos
<i>FLT3-D835</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>NPM1</i>	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
Progressão	OSR	REC	REM	REM	REM	OSR

APÊNDICE B – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, sob número de registro 212/2009.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

CERTIFICADO

Nº 205

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regulamento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

APROVADO

PROCESSO: 212/09

FR- 272635

TÍTULO: Investigação da importância das mutações no GENE FLT3 (DIT E D835) e no GENE NPM1 para diagnóstico e prognóstico de pacientes com leucemia mieloide aguda.

AUTOR: Maria Cláudia S. da Silva e Marley A. Lício.

DPTO.: CCS/UFSC

FLORIANÓPOLIS, 27 de julho de 2009.

Coordenador do CEPSH/UFSC - Prof.ª Washington Portela de Souza

APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes do HU/UFSC.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Investigação da importância das mutações no gene FLT3 (DIT e D835) e no gene NPM1 para o diagnóstico e prognóstico de pacientes com leucemia mieloide aguda.

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como suas informações serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com o seu médico, para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

QUAL OBJETIVO DESTA PESQUISA E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

Este estudo será realizado no Laboratório de Pesquisa de Oncologia Experimental e Hemopatias, situado no Hospital Universitário (HU-UFSC) e a pesquisadora envolvida é a aluna do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O objetivo principal desta pesquisa é aprimorar o diagnóstico e prognóstico de Leucemias Mielóides Agudas.

EU TENHO QUE PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Mesmo que o(a) senhor(a) não queira participar do estudo, o senhor(a) não terá nenhuma desvantagem, inclusive em relação ao tratamento médico e aos cuidados que o(a) senhor(a) tenha direito de receber. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR?

A pesquisa será feita a partir de uma amostra de sangue enviada até nós pelo seu(a) médico(a) hematologista. Sendo assim, não haverá nenhum contato pessoal (do tipo avaliação física ou entrevistas efetuadas pela pesquisadora), pois será feita apenas a análise da sua amostra sanguínea afim de investigação diagnóstica.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Você não irá sentir nenhum constrangimento pois não haverá avaliação física ou entrevista, apenas análise da sua amostra de sangue. O único desconforto será a coleta da amostra de sangue, sendo que este procedimento é extremamente comum e necessário para o acompanhamento e tratamento de patologias.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS DADOS PESSOAIS DO SENHOR(A) SERÃO UTILIZADOS?

Informo que seus dados serão mantidos sob sigilo absoluto e privado, de posse somente pelo pesquisador e orientador desta pesquisa. Também não serão tiradas fotos, nem realizadas filmagens. E a divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão. A divulgação das informações no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa, sendo que o(a) senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Espera-se, com esta pesquisa, reduzir os problemas envolvidos no diagnóstico e prognóstico de leucemias mielóides agudas com a padronização de um exame laboratorial. Pode ser que o(a) senhor(a) não tenha nenhum benefício com o estudo. Entretanto, as informações que obtivermos poderão nos ajudar a diagnosticar outras pessoas vítimas da mesma doença.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva
Telefone: 3721- 8146

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa, secretária Cássia Cristofolini
Telefone: (48) 3331-1497

Eu, (nome do paciente ou responsável legal em letras de forma).....
.....recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa.

Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo.

Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos ser utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura

Nome da pessoa que aplicou este termo

Data/...../.....

Assinatura do paciente

Nome do paciente

Data/...../.....

Assinatura da testemunha imparcial

Nome da testemunha imparcial

Data .../.../.....

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Para a família de pacientes menores de 18 anos)

Título da pesquisa: Investigação da importância das mutações no gene FLT3 (DIT e D835) e no gene NPM1 para o diagnóstico e prognóstico de pacientes com leucemia mielóide aguda.

O(a) Senhor(a), em nome do seu.....(informar o grau de parentesco e nome do paciente) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita, como as informações do seu (informar o grau de parentesco e nome do paciente) serão usadas, o que o estudo envolve e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir e se desejar, discuta com sua família e com um médico, para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

QUAL OBJETIVO DESTA PESQUISA E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

Este estudo será realizado no Laboratório de Pesquisa de Oncologia Experimental e Hemopatias, situado no Hospital Universitário (HU-UFSC) e a pesquisadora envolvida é a aluna do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O objetivo principal desta pesquisa é aprimorar o diagnóstico e prognóstico de Leucemias Mielóides Agudas.

É OBRIGATÓRIO PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se seu(informar o grau de parentesco do paciente) irá ou não participar. Mesmo que o(a) senhor(a) não queira participar do estudo, o senhor(a) não terá nenhuma desvantagem. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para retirar seu.....(informar o grau de parentesco do paciente) do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência.

O QUE ACONTECERÁ SE EU ASSINAR ESSE TERMO?

A pesquisa será feita a partir de uma amostra de sangue do seu (informar o grau de parentesco do paciente), enviada até nós pelo médico(a) hematologista. Sendo assim, não haverá nenhum contato pessoal (do tipo avaliação física ou entrevistas efetuadas pela pesquisadora), pois será feita apenas a análise da sua amostra sanguínea do seu(informar o grau de parentesco do paciente) afim de investigação diagnóstica e prognóstica.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Seu(informar o grau de parentesco do paciente) não irá sentir nenhum constrangimento pois não haverá avaliação física ou entrevista, apenas análise da amostra de sangue. O único desconforto será a coleta da amostra, sendo que este procedimento é extremamente comum e necessário para o acompanhamento e tratamento de patologias.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS DADOS PESSOAIS SERÃO UTILIZADOS?

Informo que os dados do seu (informar o grau de parentesco do paciente) serão mantidos sob sigilo absoluto e privado, de posse somente pelo pesquisador e orientador desta pesquisa. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão. A divulgação das informações no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa, sendo que o(a) senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração.

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

Espera-se, com esta pesquisa, reduzir os problemas envolvidos no diagnóstico e prognóstico de leucemias mielóides agudas com a padronização de um exame laboratorial. Pode ser que o seu

.....(informar o grau de parentesco do paciente) não tenha nenhum benefício com o estudo. Entretanto, as informações que obtivermos poderão nos ajudar a diagnosticar outras pessoas vítimas da mesma doença.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto: Maria Cláudia Santos da Silva
Telefone: 3721-8146

Se tiver dúvidas sobre seus direitos, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisa, secretária Cássia Cristofolini
Telefone: (48) 3331-1497

Eu, (nome do familiar responsável em letras de forma).....

..... recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre a participação do meu (informar o grau de parentesco do paciente) nesta pesquisa.

Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo.

Ao assinar este termo de consentimento, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos serem utilizados conforme descrito neste termo de consentimento. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura

Nome da pessoa que aplicou este termo

Data .../.../.....

Assinatura do paciente/responsável

Nome do paciente/responsável

Data .../.../.....

Assinatura da testemunha imparcial

Nome da testemunha imparcial

Data .../.../.....