

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Aleide Santos de Melo Lima**

**Estudo de alterações moleculares e sua relação com dados  
clínico-laboratoriais em pacientes adultos com leucemia  
mieloide aguda**

**Recife  
2013**

**Aleide Santos de Melo Lima**

**Estudo de alterações moleculares e sua relação com dados  
clínico-laboratoriais em pacientes adultos com leucemia  
mieloide aguda**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

**Coorientadores:** Profa. Dra. Cíntia Gonsalves de Faria Machado

Dr. Antônio Roberto Lucena-Araújo

**Recife**

**2013**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Lima, Aleide Santos de Melo**

**Estudo de alterações moleculares e sua relação com dados clínico-laboratoriais em pacientes adultos com leucemia mieloide aguda/ Aleide Santos de Melo Lima– Recife: O Autor, 2013.**

**97 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra**

**Coorientadores: Cíntia Gonsalves de Faria Machado e Antônio**

**Roberto Lucena-Araújo**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,  
Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2013.**

**Inclui bibliografia**

- 1. Leucemia 2. Genética molecular 3. Pacientes I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orientador) II. Machado, Cíntia Gonsalves de Faria (coorientadora) III. Lucena-Araújo, Antônio Roberto (coorientador) IV. Título**

**616.99419 CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2013- 254**

**Aleide Santos de Melo Lima**

**Estudo de alterações moleculares e sua relação com dados  
clínico-laboratoriais em pacientes adultos com leucemia  
mieloide aguda**

**Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Profa. Dra. Maria Tereza Cartaxo**  
**Universidade de Pernambuco**

---

**Profa. Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

---

**Dr. Aderson da Silva Araújo**  
**Fundação Hemope**

**Recife**  
**2013**

**Dedico este trabalho à minha mãe, Ivaneide Maria Santos de Melo, meu exemplo de mãe e mulher, a pessoa responsável por tudo que sou e por estar onde estou.**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à minha mãe, Ivaneide Maria Santos de Melo, que com muita dedicação e com todas as dificuldades cuidou da minha educação, procurando dar sempre a mais do que podia. Mãe, muito obrigada, tudo que conquistei até hoje na minha vida foi graças à senhora!

Ao meu orientador, o Prof. Marcos André Cavalcanti Bezerra, um profissional admirável que está sempre preocupado com o crescimento dos alunos, que me orientou não somente para o mestrado, mas para a minha vida profissional. Ele me mostrou, com muita sabedoria, o mundo da Hematologia e me fez encantar por esse mundo. Além de ser um grande amigo! Muito obrigada pela amizade, pela confiança, pelas oportunidades e, claro que não poderia esquecer, pelas broncas!

Ao Dr. Antônio Roberto Lucena-Araújo, pela co-orientação (e porque não falar orientação) desse trabalho, sempre disposto a ajudar e colaborar. Muito obrigada por todas as broncas e “puxões de orelha”, que foram muito importantes para o meu crescimento acadêmico! À Dra. Cíntia Gonsalves de Faria Machado, também pela co-orientação, pela amizade e confiança em mim depositada.

A todos do Laboratório de Hemoglobinopatias da Fundação Hemope, pela amizade, apoio e colaboração, pelas discussões sobre as pesquisas e pelos momentos de diversão e festa. Em especial à Betânia, uma grande amiga com quem divido as alegrias da minha vida profissional e pessoal, que me dá força nos momentos difíceis e que sempre esteve “quebrando a cabeça” comigo para desvendar os problemas da Biologia Molecular. Agradeço em especial, também, a Adônis Peres que me deu apoio na bancada quando precisei me ausentar por

problemas pessoais, e a Carlson Júnior que, além de me auxiliar na bancada, me ajudou com a tradução do meu resumo.

Às funcionárias do Laboratório de Imunofenotipagem, Maria Amélia e Ana Elita, pela ajuda e atenção.

Ao Prof. Dr. Eduardo Rego e à funcionária Ana Silvia, do Laboratório de Hematologia do Hospital Universitário de Ribeirão Preto, por terem gentilmente me recebido em seu laboratório para o treinamento que foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

À Mariana Rezende, pelos controles e reagentes cedidos para o desenvolvimento de diversas técnicas desse trabalho.

A todos os meus amigos e familiares que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, mas em especial:

Ao meu pai, José Carlos de Lima e à minha avó Aleide Lins Santos, que é mais que uma avó é uma segunda mãe. Ela que sempre estava presente na minha vida, sempre preocupada com a minha educação. Obrigada pelas palavras de conforto nos momentos de preocupação com este trabalho!

Aos meus irmãos Caio Gabriel e Daniel Santos de Melo Lima pela paciência de conviver comigo, pelo apoio que sempre me deram e por todo amor que sempre demonstraram por mim. Amo muito vocês!

A Sandro Santiago Santos, que mesmo não estando mais ao meu lado, foi muito importante na minha vida, me incentivando na minha vida profissional, foi o meu apoio em muitos momentos de estresse com essa dissertação. Obrigada pelo seu companheirismo, pelo apoio e incentivo na minha vida profissional e por tudo que acrescentou em minha vida.

E a Deus por ter me dado a oportunidade de viver e estar aqui!

## Resumo

Marcadores moleculares, como mutações nos genes *FLT3* e *NPM1*, são ferramentas úteis para a avaliação prognóstica de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) e, até o momento, não tinham sido estudadas em pacientes com LMA no Estado de Pernambuco. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo caracterizar pacientes adultos com LMA diagnosticados na Fundação HEMOPE de acordo com achados clínico-laboratoriais e as mutações nos genes *FLT3* e *NPM1*. Foram incluídos 115 pacientes com LMA *de novo* (15 com leucemia promielocítica aguda (LPA) e 100 com outros subtipos LMA). As frequências das mutações *FLT3*/ITD, *FLT3*/TKD e *NPM1* nos pacientes não-LPA foram de 22%, 2% e 24%, respectivamente. Nos pacientes com LPA, a frequência foi de 40% e 6,7% para as mutações *FLT3*/ITD e *NPM1*, respectivamente, não sendo diagnosticado nenhum caso com mutação *FLT3*/TKD. As mutações *FLT3*/ITD e no *NPM1* foram relacionadas com alta contagem de leucócitos ( $p=0,021$ ;  $p=0,012$ ) e mutações no *NPM1* foram mais frequentes em pacientes com mais de 60 anos ( $p=0,01$ ) e no grupo de cariótipo normal ( $p=0,008$ ). Não foi observada diferença nas sobrevidas global (SG) e livre de doença (SLD) e nas taxas de remissão completa (TRC) e de recaída (TR) entre os grupos com e sem mutação *FLT3*/ITD e no *NPM1* quando avaliados os pacientes não-LPA; entretanto, pacientes LPA com mutação *FLT3*/ITD apresentaram menores TRC, SG e SLD. Os resultados comprovam o valor preditivo da mutação *FLT3*/ITD para um curso clínico desfavorável na LPA do adulto, enquanto que, para os pacientes não-LPA, as mutações *FLT3*/ITD e no *NPM1*, aparentemente, não apresentaram o mesmo impacto prognóstico.

**Palavras-chave:** LMA; LPA; *FLT3*; *NPM1*; prognóstico.



## Abstract

Currently, molecular markers, such as *FLT3* and *NPM1* genes were described as useful tools for prognosis evaluation of patients with AML, and until now never were studied in patients with AML in the state of Pernambuco. Our goal was to characterize adult patients diagnosed with AML in Hemope Foundation using clinical-laboratorial and *FLT3* and *NPM1* gene mutations findings. In this study 115 patients with AML *de novo* were included (15 with APL and 100 with other subtypes of AML). The frequencies of *FLT3*/ITD, *FLT3*/TKD and *NPM1* in non-APL patients were 22%, 2.0% and 24%, respectively. Furthermore, in patients with APL were detected *FLT3*/ITD mutation in 40% of the cases, and one patient with *NPM1* mutation; however *FLT3*/TKD mutation was not found. In addition, *FLT3*/ITD and *NPM1* mutations were related with a high account of leukocytes ( $p=0,021$ ;  $p=0,012$ ). Furthermore, *NPM1* mutations were more frequent in patients above 60 years old ( $p=0.01$ ) and normal karyotype ( $p=0.008$ ). No differences were found for overall survival (OS), disease-free survival (DFS), complete remission rate (CRR) and relapse rate (RR) between the groups without *FLT3*/ITD and *NPM1* mutations in non-APL patients; however, patients with APL and *FLT3*/ITD mutation presented lower CRR, OS and DFS. In conclusion, our results showed the importance of *FLT3*/ITD mutation detection for an unfavorable clinic course of adults with AML. However, non-APL patients, who have *FLT3*/ITD and *NPM1* mutations, do not seem to have the same prognosis; nevertheless, these last results do not diminish the importance of these markers for patients with AML.

**Key words:** AML; APL; *FLT3*; *NPM1*; prognosis

## Lista de Ilustrações

Ítem	Pág.
<b>Quadro 1:</b> Classificação da Organização Mundial de Saúde de 2008 para as leucemias mieloides agudas.	9
<b>Quadro 2:</b> Estratificação de risco proposta pelo grupo <i>European LeukemiaNet</i> para subtipos de LMA, segundo critérios citogenéticos e moleculares.	13
<b>Figura 1:</b> Desenho esquemático do receptor de tirosina quinase FLT3 mostrando seus domínios e as regiões onde ocorrem as mutações ITD e TKD.	15
<b>Figura 2:</b> Desenho esquemático mostrando a estrutura do gene e os tipos mais comuns de mutações no éxon 12 do gene <i>NPM1</i> e a estrutura da proteína NPM normal e mutada.	22
<b>Figura 3:</b> Digestão, com a endonuclease de restrição <i>EcoRV</i> , do produto da amplificação para a pesquisa da mutação <i>FLT3</i> -TKD.	35
<b>Figura 4:</b> Eletroforese em gel de agarose a 4% do produto da PCR para a mutação <i>FLT3</i> -ITD.	36
<b>Figura 5:</b> Eletroforese em gel de agarose a 4% do produto da PCR para detecção de mutações no gene <i>NPM1</i> .	36
<b>Figura 6:</b> Eletroferograma da genotipagem para a mutação <i>FLT3</i> -ITD. (A) Paciente sem a mutação <i>FLT3</i> -ITD com presença de apenas um pico representando o alelo selvagem. (B) Paciente com a mutação <i>FLT3</i> -ITD com a presença de dois picos, o primeiro representando	37

o alelo selvagem e o segundo, o alelo mutante.

**Figura 7:** Eletroferograma da genotipagem para a mutação no gene *NPM1*. (A) Paciente sem a mutação no gene *NPM1* com presença de apenas um pico representando o alelo selvagem. (B) Paciente com a mutação no gene *NPM1* com a presença de dois picos, o primeiro representando o alelo selvagem e o segundo, o alelo mutante. 38

**Quadro 3:** Sequência dos primers utilizados nas reações para amplificar as regiões de fusão dos rearranjos *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11*. 43

**Figura 8:** (a) Diagrama esquemático da estrutura éxon/intron dos genes *AML1* e *ETO*, que estão envolvidos na t(8;21)(q22;q22). A orientação do centrômero (cen) e telômero (tel), numeração dos éxons e as regiões de quebra estão indicadas. (b) Diagrama esquemático do transcrito *AML1/ETO* com o éxon 5 do gene *AML1* fusionado ao éxon 2 do gene *ETO*. 44

**Figura 9:** (a) Diagrama esquemático da estrutura éxon/intron dos genes *PML* e *RARA*, que estão envolvidos na t(15;17)(q22;q21). A orientação do centrômero (cen) e telômero (tel), numeração dos éxons e as regiões de quebra estão indicadas. (b) Diagrama esquemático dos três tipos de transcrito *PML/RARA*, relacionado com as diferentes regiões de quebra do gene *PML*. 45

**Figura 10:** (a) Diagrama esquemático da estrutura éxon/intron do gene *MYH11*, que está envolvido na inv(16)(p13;q22). A orientação do centrômero (cen) e telômero (tel), numeração dos éxons e as regiões de quebra estão indicadas. (b) Diagrama esquemático dos 10 diferentes tipos de transcrito *CBFB/MYH11*. 46

**Figura 11:** Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida. 59

<b>Figura 12:</b> Sobrevida livre de doença (SLD) dos 52 pacientes não LPA incluídos na análise de sobrevida.	60
<b>Figura 13:</b> (a) Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo a mutação <i>FLT3</i> /ITD. (b) Sobrevida livre de doença (SLD) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo a mutação <i>FLT3</i> /ITD.	61
<b>Figura 14:</b> (a) Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo o <i>status</i> do gene <i>NPM1</i> . (b) Sobrevida livre de doença (SLD) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo o <i>status</i> do gene <i>NPM1</i> .	62
<b>Figura 15:</b> (a) Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo os genótipos ITD/ <i>NPM1</i> . (b) Sobrevida livre de doença (SLD) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo os genótipos ITD/ <i>NPM1</i> .	63
<b>Figura 16:</b> Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não LPA incluídos na análise de sobrevida dos dois grupos: ITD <sup>+</sup> / <i>NPM1</i> <sup>wt</sup> e outros genótipos (ITD <sup>-</sup> / <i>NPM1</i> <sup>wt</sup> , ITD <sup>+</sup> / <i>NPM1</i> <sup>mut</sup> e ITD <sup>-</sup> / <i>NPM1</i> <sup>mut</sup> ).	64
<b>Figura 17:</b> (a) Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida dos dois grupos: ITD <sup>-</sup> / <i>NPM1</i> <sup>mut</sup> e outros genótipos (ITD <sup>-</sup> / <i>NPM1</i> <sup>wt</sup> , ITD <sup>+</sup> / <i>NPM1</i> <sup>mut</sup> e ITD <sup>+</sup> / <i>NPM1</i> <sup>wt</sup> ).	65
<b>Figura 18:</b> (a) Sobrevida global (SG) dos 11 pacientes com LPA incluídos na análise de sobrevida. (b) Sobrevida livre de doença (SLD) dos 11 pacientes com LPA incluídos na análise de sobrevida.	66
<b>Figura 19:</b> (a) Sobrevida global (SG) dos 11 pacientes LPA incluídos na análise de sobrevida segundo a mutação <i>FLT3</i> /ITD. (b) Sobrevida livre de doença (SLD) dos 11	67

pacientes LPA incluídos na análise de sobrevida segundo a mutação *FLT3*/ITD.

## Lista de Tabelas

Ítem	Pág.
<b>Tabela 1:</b> Sequência dos primers e enzima utilizados nas reações para pesquisa das mutações <i>FLT3</i> -ITD, <i>FLT3</i> -TKD e <i>NPM1</i> .	33
<b>Tabela 2:</b> Composição da reação para amplificação das mutações no gene <i>FLT3</i> .	33
<b>Tabela 3:</b> Composição da reação para amplificação das mutações no gene <i>NPM1</i> .	34
<b>Tabela 4:</b> Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões específicas do gene <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> .	35
<b>Tabela 5:</b> Tamanho dos fragmentos amplificados no PCR convencional e na digestão com <i>EcoRV</i> (RFLP) para as mutações <i>FLT3</i> /TKD, <i>FLT3</i> /ITD no gene <i>NPM1</i> .	35
<b>Tabela 6:</b> Sequência dos primers utilizados na reação para amplificar parte do gene da $\beta$ -actina.	41
<b>Tabela 7:</b> Características clínico-hematológicas dos 115 pacientes com LMA observadas ao diagnóstico.	48
<b>Tabela 8:</b> Frequência dos subtipos FAB diagnosticados entre os 100 pacientes com LMA.	49
<b>Tabela 9:</b> Frequência do risco citogenético e das alterações citogenéticas encontradas nos pacientes com LMA.	52
<b>Tabela 10:</b> Frequência das mutações <i>FLT3</i> -ITD e <i>NPM1</i> por subtipo FAB dos 100 pacientes não-LPA.	53
<b>Tabela 11:</b> Comparação das variáveis clínicas, hematológicas e genéticas dos 100	55

pacientes não-LPA de acordo com o status das mutações *FLT3*/ITD e do gene *NPM1*.

**Tabela 12:** Frequência dos diferentes genótipos ITD/*NPM1* dos 100 pacientes não-LPA incluídos no estudo. 56

**Tabela 13:** Comparação das variáveis clínicas, hematológicas e genéticas dos 100 pacientes não LPA de acordo com os genótipos ITD/*NPM1*. 57

**Tabela 14:** Comparação das variáveis clínicas e hematológicas dos 15 pacientes LPA de acordo com o *status* da mutação *FLT3*/ITD. 58

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
FAB	Franco-Americano-Britânico
FLT3	Tirosino-quinase 3 relacionado ao FMS
ITD	Duplicação <i>in tandem</i> (do inglês <i>internal tandem duplication</i> )
TKD	Domínio tirosino-quinase (do inglês <i>tyrosine kinase domain</i> )
NPM1	Nucleofosmina 1 (do inglês <i>nucleophosmin 1</i> )
IDH	Índice de desenvolvimento humano
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
TRC	Taxa de remissão completa
TR	Taxa de recaída
HC/UFGM	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
INCA	Instituto Nacional do Câncer
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
F	Feminino
M	Masculino / Molaridade
RT	Transcrição reversa (do inglês <i>reverse transcription</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i> )



RFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição (do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i> )
ml	Mililitro
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
pmol	Picomol
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
kb	Kilobase
pH	Potencial hidrogeniônico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
μM	Micromolar
ng	Nanograma
°C	Grau Celsius
Δt	Tempo
pb	Par de base
RPM	Rotações por minuto
μl	Microlitro
mM	Milimolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
LMA-CN	Leucemia mieloide aguda com cariótipo normal
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
FL	Ligante do FLT3 (do inglês FLT3 <i>ligand</i> )
CD	Grupo de diferenciação (do inglês <i>cluster of differentiation</i> )

G	Guanina
T	Timina
C	Citosina
A	Adenina
NES	Sinal de exportação nuclear (do inglês <i>nuclear export signal</i> )
NLS	Sinal de localização nuclear (do inglês <i>nuclear localization signal</i> )
DRM	Doença residual mínima
HEMOPE	Hemocentro de Pernambuco
UNILABE	Unidade de laboratórios especializados
MO	Medula óssea
SP	Sangue periférico
Ara-C	Arabinosil citosina
ATRA	Ácido all-transretinoico
RC	Remissão completa
KS	Kolmogorov-smirnov
DN	Distribuição normal
Hb	Hemoglobina
g	Grama
dl	Decilitro
NPM1 <sup>wt</sup>	Alelo <i>NPM1</i> selvagem
NPM1 <sup>mut</sup>	Alelo <i>NPM1</i> mutado
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (do inglês <i>platelet-derived growth factor receptor</i> )

## Sumário

Resumo

Abstract

Lista de ilustrações

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 Leucemia Mielóide Aguda	3
2.2 Fisiopatogenia da LMA	4
2.3 Diagnóstico e classificação da LMA	6
2.4 Fatores prognósticos na LMA	9
2.5 Mutações no gene <i>FLT3</i> na LMA	14
2.6 Mutações no gene <i>NPM1</i> na LMA	19
2.7 Panorama da LMA no Brasil	24
3. Objetivos	26
4. Material e Métodos	27
4.1 Casuística, tipo, local e período do estudo	27
4.2 Variáveis	27
4.3 Análise hematológica e clínica	28
4.4 Análise molecular	30
4.5 Aspectos éticos	47

4.6 Análise estatística	47
5. Resultados	48
5.1 Caracterização de todos os pacientes	48
5.2 Frequência e caracterização dos 100 pacientes não-LPA de acordo com o <i>status</i> dos genes <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i>	52
5.3 Frequência e caracterização dos 15 pacientes LPA de acordo com o <i>status</i> dos genes <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i>	57
5.4 Análise de sobrevida para os 100 pacientes não-LPA	59
5.5 Análise de sobrevida dos 100 pacientes não LPA segundo o <i>status</i> dos genes <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i>	60
5.6 Análise de sobrevida geral dos 11 pacientes LPA e de acordo com o <i>status</i> da mutação <i>FLT3/ITD</i>	65
6. Discussão	68
7. Conclusões	78
8. Referências Bibliográficas	79
9. Anexos	90
10. Currículo Lattes atualizado	92

## 1. Introdução

As leucemias mieloides agudas (LMA) são mais frequentes em adultos do que em crianças e resultam do acúmulo de células progenitoras hematopoéticas mieloides na medula óssea. Estas células interferem na hematopoese normal, podendo escapar para o sangue periférico e infiltrar outros órgãos, como o fígado, baço e pele.

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos estimou uma incidência anual de 3,6 casos de LMA para cada 100.000 habitantes, o que a torna uma doença relativamente rara. No Brasil, a incidência de LMA é desconhecida, uma vez que o Instituto Nacional do Câncer (INCA) relata apenas dados referentes às leucemias em geral. Para o ano de 2012, o INCA estimou a ocorrência de 8,5 novos casos de leucemias para cada 100.000 habitantes. Em um estudo realizado no Hospital de Hematologia de Pernambuco, em 2011, instituição onde foi realizado o presente estudo, a LMA correspondeu a 41% de todos os casos de leucemias agudas e crônicas, recebidos no período de 1997 a 2007.

A estratificação de risco para a avaliação prognóstica das LMA é de extrema importância, uma vez que permite prever a evolução clínica dos pacientes e assim direcioná-los para o protocolo terapêutico mais adequado. Vários fatores são importantes para determinar o prognóstico dos pacientes: idade, contagem de leucócitos e de blastos ao diagnóstico, dificuldade de obter remissão completa, resultados de citogenética e outros. Recentemente, marcadores moleculares, como mutações nos genes *FLT3* e *NPM1*, têm se mostrado ferramentas úteis para a avaliação prognóstica, principalmente no que

diz respeito aos pacientes de cariótipo normal. Neste grupo o prognóstico ainda não é totalmente conhecido, provavelmente devido à sua heterogeneidade molecular e de responsividade ao tratamento.

Mutações *FLT3*/ITD estão presentes entre 20 a 30% dos pacientes com LMA e indicam pior prognóstico tanto em pacientes adultos como em pediátricos. Enquanto que há ainda algumas controvérsias quanto ao papel prognóstico das mutações *FLT3*/TKD para os pacientes com LMA, que são detectadas em 8 a 12% dos pacientes com esta doença. Já as mutações no gene *NPM1* são as mais frequentes na LMA, ocorrendo em aproximadamente 35% dos pacientes. Vários estudos demonstram que mutações neste gene reservam um bom prognóstico aos pacientes com LMA.

O número de pesquisas relacionadas as LMA no Brasil tem aumentado. No entanto, ainda se sabe muito pouco sobre a epidemiologia da LMA no nosso país e, menos ainda, sobre a ocorrência de anormalidades citogenéticas e moleculares. As mutações nos genes *FLT3* e *NPM1*, até então, não foram estudadas no estado de Pernambuco em pacientes adultos com LMA. Sabendo-se que as mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* interferem no prognóstico do paciente e, portanto, no seu desfecho clínico, o objetivo desse trabalho foi estudar as mutações nesses genes em pacientes com LMA diagnosticados na Fundação Hemope. Este estudo possibilitará a implantação das técnicas na rotina de diagnóstico da Unidade de Laboratórios Especializados da Fundação Hemope e no Laboratório Central do CCB da UFPE para pacientes com LMA atendidos no Hospital das Clínicas-UFPE, contribuindo para o tratamento dos pacientes com LMA no Estado de Pernambuco.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1. Leucemia mieloide aguda**

As leucemias mieloides agudas (LMA) constituem um heterogêneo grupo de doenças clonais do tecido hematopoético que se caracterizam por um bloqueio na maturação e por uma proliferação anormal de precursores mieloides. Essas células se acumulam na medula óssea (MO), podendo escapar para o sangue periférico (SP) e infiltrar outros órgãos, como fígado, baço e pele. Consequentemente, pacientes com LMA frequentemente se apresentam com um quadro de anemia, neutropenia, plaquetopenia e presença de células imaturas no SP. (Estey, 2013).

A LMA é o tipo mais comum das leucemias agudas (LA) do adulto, em contraste, apresenta uma baixa frequência na infância, correspondendo à cerca de 20% dos casos (Deschler e Lübbert, 2006; Puumala *et al.*, 2013). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos estimou uma incidência anual de 3,6 casos de LMA para cada 100.000 habitantes, o que a torna uma doença relativamente rara. Contudo apresenta representatividade para a pesquisa por ser uma doença de curso rápido e de alta mortalidade. Esse mesmo instituto estimou uma sobrevida global em cinco anos de 23,4% para pacientes americanos acompanhados entre 2002 e 2008 (Howlader *et al.*, 2012).

No Brasil, a incidência de LMA é desconhecida, uma vez que o Instituto Nacional do Câncer (INCA) relata apenas dados referentes às leucemias em geral. Para o ano de 2012, o INCA estimou a ocorrência de 8,5 novos casos de leucemias para cada 100.000 habitantes (INCA, 2011). Em um estudo realizado no Hospital de Hematologia de Pernambuco, em 2011, instituição onde foi

realizado o presente estudo, a LMA correspondeu a 41% de todos os casos de leucemias diagnosticados no período de 1997 a 2007 (Carvalho *et al.*, 2011).

## **2.2. Fisiopatogenia da LMA**

Apesar de não se conhecer inteiramente a fisiopatogênese da LMA, estudos epidemiológicos sugerem que fatores genéticos, ambientais e ocupacionais estejam envolvidos nesse mecanismo (Sandler e Ross, 1997; Belson *et al.*, 2007).

Mais de 300 translocações e/ou inversões cromossômicas já foram descritas e estão envolvidas na fisiopatogenia dessa doença (Velloso *et al.*, 2011). Translocações cromossômicas na LMA dão origem a genes de fusão no local das quebras cromossômicas, com isso, os éxons dos genes envolvidos se tornam justapostos e formam um único gene de fusão, que dá origem a uma nova proteína híbrida com características únicas. Os alvos mais frequentes desses eventos na LMA são genes que codificam fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento hematopoético normal, que, depois da recombinação, dão origem a genes híbridos que codificam proteínas de fusão com funções aberrantes, resultando em perda da função e bloqueio da diferenciação (Look, 1997; Alcalay *et al.*, 2001).

Os parceiros desses genes envolvidos nas translocações da LMA codificam para proteínas que são muito mais heterogêneas em termos de função. A contribuição desses parceiros para o potencial leucemogênico das proteínas de fusão ainda não é tão claro. Entretanto sua presença parece ser fundamental para ao menos alguns dos efeitos biológicos dessas proteínas, muitos deles tem funções fisiológicas associadas com a regulação do ciclo celular e da apoptose (Look, 1997; Alcalay *et al.*, 2001). Em modelos murinos, nenhum dos rearranjos



estudados se mostrou suficiente para o desenvolvimento da LMA, sugerindo que atuem juntamente com outras classes de mutações para culminar na transformação leucêmica (Grisolano *et al.*, 1997; He *et al.*, 1997; Higuchi *et al.*, 2002).

Há aproximadamente uma década, Gilliland e Griffin apresentaram um modelo para o processo leucemogênico da LMA, chamado de “*two hit model*”. Segundo este modelo, o desenvolvimento da LMA é considerado um processo multipasso que requer a colaboração de pelo menos duas classes de mutações. Este modelo compreende as mutações de classe I, que ativam vias de transdução de sinal e conferem vantagem proliferativa às células hematopoiéticas, e as mutações de classe II, que afetam fatores de transcrição e primariamente impedem a diferenciação hematopoiética. Mutações que afetam os genes *FLT3*, *KIT* e os da família *RAS* são consideradas mutações de classe I, enquanto que aberrações cromossômicas como t(8;21), inv(16) e t(15;17), que geram, respectivamente, os rearranjos gênicos *RUNX1/RUNX1T1* (também denominado *AML1/ETO*), *CBFB/MYH11* e *PML/RARA*, juntamente com as mutações nos genes *RUNX1*, *CEBPA* e *MLL* são consideradas dentro da classe II. De acordo com esse modelo, o acúmulo de mutações de classe I e II culminaria no desenvolvimento de progenitores hematopoéticos transformados, capazes de propagar o fenótipo leucêmico (Gilliland e Griffin, 2002).

Nos últimos anos, tem sido identificado diversas novas mutações em genes, tais como *NPM1*, *TET2*, *IDH1/2* e *DNMT3A*, na LMA. Essas mutações são chamadas de mutações “não classificadas”, uma vez que não se encaixam nos mecanismos de ação das classes I e II ou ainda por algumas delas não terem seu papel totalmente compreendido no desenvolvimento desta doença. Com a

identificação de novas aberrações genéticas, novas associações entre as mutações “não classificadas” e as mutações de classe I e II foram descobertas. Essas observações indicam que as mutações “não classificadas” podem seguir dentro de diversas subcategorias. Com isso, vê-se a necessidade de caracterizar essas novas mutações para compreender a fisiopatogenia da LMA e, ainda, para poder ampliar o modelo “*two hit*” proposto em 2002 (Takahashi, 2011).

### **2.3. Diagnóstico e classificação da LMA**

O diagnóstico de LMA é usualmente fácil quando são realizados o estudo da medula óssea, os testes citoquímicos e a imunofenotipagem. Entretanto, muitas vezes o diagnóstico só é confirmado após o estudo citogenético ou de rearranjo dos genes, como é o caso da Leucemia Promielocítica Aguda com t(15;17)(q22;q21) (Heerema-Mckenney e Arber, 2009; Bullinger e Armstrong, 2010)

O diagnóstico da LMA é feito a partir da observação do quadro clínico agudo, que se caracteriza por anemia, sangramento, geralmente do tipo purpúrico devido à plaquetopenia, e febre às vezes sem foco infeccioso, devido à neutropenia. Pode haver infiltração leucêmica em outros órgãos que geralmente causam hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia de gengivas e dor óssea e, menos frequentemente, infiltração de pele e comprometimento do sistema nervoso central. No hemograma ao diagnóstico é frequente encontrar anemia, plaquetopenia, neutropenia e presença de mieloblastos. Para o diagnóstico é necessário, ainda, ter uma contagem de 20% ou mais de blastos mieloides na medula óssea, de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS). Além do hemograma e do mielograma, a citoquímica e a

imunofenotipagem são essenciais para demonstrar a diferenciação mielóide dos blastos, auxiliando no diagnóstico e na classificação do subtipo de LMA (Bullinger e Armstrong, 2010; Estey, 2012).

A LMA representa um grupo heterogêneo de leucemias que diferem quanto à sua biologia, curso clínico e prognóstico, o que tem motivado o estabelecimento de uma classificação (Heerema-Mckenney e Arber, 2009; Bullinger e Armstrong, 2010). A primeira classificação foi realizada em 1976 pelo grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) que categorizou seis subtipos de LMA (M1 a M6) e foi baseada estritamente nos aspectos morfológicos e citoquímicos do clone leucêmico (Bennett *et al.*, 1976). Essa classificação foi revisada em 1985 pela FAB, dando origem a uma classificação que passou a incluir dois novos subtipos, M0 e M7, aos seis subtipos já existentes, cujo diagnóstico passou a incluir o uso de marcadores imunofenotípicos (Bennett *et al.*, 1985, 1991). A classificação FAB para as LMA leva em consideração apenas as características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas do clone leucêmico, objetivando a determinação da linhagem e do grau de maturação das células blásticas.

Apesar de sua importância, a classificação FAB tornou-se obsoleta por não incorporar os achados citogenéticos e moleculares relevantes à fisiopatologia da doença, ficando limitada no significado biológico, prognóstico e terapêutico. Por isso, em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou uma classificação para as LMA que passava a incorporar os achados citogenéticos e, com isso, introduziu uma correlação prognóstica importante (Heerema-Mckenney e Arber, 2009). Nesta classificação, as LMA foram divididas em quatro categorias: LMA com anormalidades genéticas repetitivas, LMA com displasia de múltiplas

linhagens, LMA associada a tratamento prévio e LMA não categorizada nos itens anteriores, esta última que se baseou na classificação FAB (Vardiman *et al.*, 2002).

Esse sistema logo se tornou insatisfatório, pois em cerca de 50% dos casos não é possível identificar nenhuma anormalidade citogenética, sendo esse grupo definido como citogeneticamente normal (LMA-CN). Neste grupo, são identificadas uma série de anormalidades genéticas submicroscópicas, como mutações ou alterações de expressão em alguns genes, que estão associados à leucemogênese e à resposta clínica ao tratamento. Esses marcadores, juntamente com as alterações cromossômicas, ajudam a caracterizar melhor os casos de LMA e refinam a estratificação de risco dos pacientes. Dentre esses marcadores, os mais estudados são as mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* (Andersson *et al.*, 2004; Falini *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006; Mroczek *et al.*, 2007; Grimwade *et al.*, 2010; Velloso *et al.*, 2011; Rockova *et al.*, 2012).

Diante disso, a OMS revisou a classificação de 2001 e, em 2008, lançou um novo sistema, que corresponde ao atualmente utilizado. Essa classificação destacou a importância de se associar os achados citogenéticos aos moleculares no diagnóstico e categorização dos subtipos, incluindo duas entidades provisórias caracterizadas pela presença de mutações genéticas (LMA com mutação no gene *NPM1* e LMA com mutação no gene *CEBPA*). Além disso, ampliou o número de subtipos com translocações cromossômicas recorrentes, refinou o diagnóstico de LMA associado à mielodisplasia e passou a classificar separadamente as proliferações mielóides relacionadas à Síndrome de Down (Quadro 1) (Swerdlow *et al.*, 2008; Vardiman *et al.*, 2009).

**Quadro 1:** Classificação da Organização Mundial de Saúde de 2008 para as leucemias mieloides agudas

*LMA com anormalidades genéticas repetitivas*

LMA com t(8;21)(q22;q22); (RUNX1-RUNX1T1)

LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16) (p13.1;q22); (CBFB-MYH11)

Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); (PML-RARA)

LMA com t(6;9)(p23;q34); (DEK-NUP214)

LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2); (RPN1-EVI1)

LMA com t(1;22)(p13;q13); (RBM15-MKL1)

Subtipo provisório: LMA com mutação *NPM1*

Subtipo provisório: LMA com mutação *CEBPA*

*LMA relacionada com mudanças mielodisplásicas*

*Neoplasma mielóide relacionado à terapia*

*LMA não categorizado nos itens anteriores*

LMA com diferenciação mínima

LMA sem maturação

LMA com maturação

Leucemia mielomonocítica aguda

Leucemia monoblástica e monocítica aguda

Leucemias eritróides agudas

Leucemia eritróide pura

Eritroleucemia, mielóide/eritróide

Leucemia megacarioblástica aguda

Leucemia basofílica aguda

Pan-mielose aguda com mielofibrose

*Sarcoma mielóide*

*Proliferações mielóides relacionadas à Síndrome de Down*

Mielopoese anormal transiente

LMA relacionada com a Síndrome de Down

Fonte: Adaptado de Vardiman *et al.*, 2009

## 2.4. Fatores prognósticos na LMA

Os fatores prognósticos podem ser subdivididos entre aqueles relacionados às características do paciente e à sua condição de saúde geral e

aqueles relacionados às características do clone leucêmico. Os fatores do primeiro grupo são particularmente relevantes na predição da mortalidade relacionada ao tratamento e torna-se mais importante com o aumento da idade do paciente. Já os do segundo grupo são preditivos da resistência à terapia convencional (Dohner *et al.*, 2010).

Em relação aos fatores relacionados às características do paciente, a idade tem sido descrita como o fator mais importante. O prognóstico tende a piorar com a idade muitas vezes a despeito de outros fatores importantes, como citogenética, genética molecular ou subtipo de LMA. Além disso, pacientes idosos apresentam uma incidência maior de outros fatores de pior prognóstico, tais como a ocorrência simultânea de comorbidades, maior frequência de alterações citogenéticas de alto risco e leucemia secundária (Appelbaum *et al.*, 2006; Juliusson *et al.*, 2009).

Os fatores prognósticos relacionados à LMA incluem a contagem de leucócitos, a existência de história prévia de síndrome mielodisplásica ou neoplasia mieloproliferativa e a terapia citotóxica prévia para outras desordens. A hiperleucocitose (convencionalmente definida como uma contagem de leucócitos superior a  $50\text{--}100 \times 10^9/\text{L}$  no sangue periférico) tem sido associada a um prognóstico desfavorável devido a elevada morte precoce e ao alto risco de recaída (Dutcher *et al.*, 1987; Greenwood *et al.*, 2006). A hiperleucocitose está presente em cerca de cinco a 18% dos pacientes adultos com LMA e é considerada um fator de risco para a morte precoce em 20 a 40% dos pacientes (Porcu *et al.*, 2000). Além desses fatores, as alterações citogenéticas e moleculares detectadas no clone leucêmico são de grande importância para a avaliação prognóstica (Dohner *et al.*, 2010).

Numerosas alterações citogenéticas recorrentes estruturais ou numéricas tem sido identificadas. Muitas dessas alterações não somente são marcadores diagnósticos para especificar subtipos de LMA, mas também constituem fatores prognósticos independentes para prever a remissão completa, o risco de recaída e a sobrevida global. Por esse motivo, a análise citogenética tem sido veementemente recomendada por grupos colaborativos multicêntricos e agências regulatórias. De acordo com os achados citogenéticos três grupos prognósticos foram definidos: 1. prognóstico favorável, que inclui a  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22)$  ou  $t(15;17)(q22;q21)$ ; 2. prognóstico adverso, que inclui  $inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26)$ , translocações balanceadas envolvendo 11q23,  $t(6;9)(p23;q34)$ ,  $t(1;22)(p13;q13)$  e cariótipo complexo; 3. Prognóstico intermediário, que inclui aqueles sem alterações citogenéticas (LMA-CN) e os pacientes com LMA portando alguma anormalidade citogenética que não seja considerada no grupo de risco favorável ou desfavorável, totalizando cerca de 60% de todos os casos de LMA (Mrózek *et al.*, 2001; Vardiman *et al.*, 2009).

O grupo de LMA-CN corresponde a 40-50% dos casos de LMA e apresenta um prognóstico obscuro, devido à heterogeneidade nas alterações moleculares subjacentes e na responsividade ao tratamento (Grimwade *et al.*, 2010). De fato, várias mutações foram descritas nesse grupo e apresentam impacto no prognóstico desses pacientes, dentre elas, as mais bem estudadas são as mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* (Andersson *et al.*, 2004; Mrozek *et al.*, 2007; Rockova *et al.*, 2011; Velloso *et al.*, 2011). Mesmo sendo conhecidas algumas alterações moleculares responsáveis pela heterogeneidade desse grupo, ainda são necessários mais estudos para conhecer melhor o papel prognóstico dessas mutações e a natureza das alterações genéticas subjacentes,

auxiliando na escolha de abordagens terapêuticas adaptadas e com maiores chances de sucesso (Falini *et al.*, 2010a).

O grupo *European LeukemiaNet*, em 2010, propôs uma estratificação que levava em consideração o prognóstico conferido por seus cariótipos e, nos casos de LMA-CN, pelo prognóstico conferido pelas mutações *FLT3/ITD* e nos genes *CEBPA* e *NPM1*. As modificações mais importantes em relação aos demais esquemas previamente publicados, diz respeito à inclusão dos rearranjos do gene *MLL* no grupo de prognóstico adverso [exceto a *t(9;11)(p22;q23)*] e do cariótipo normal com *NPM1* mutado e sem *FLT3-ITD* e cariótipo normal com *CEBPA* mutado no grupo de prognóstico favorável (Quadro 2) (Dohner *et al.*, 2010). O refinamento da estratificação do prognóstico dos pacientes de cariótipo normal é particularmente importante devido ao fato de representarem cerca de 40-50% dos casos e de sua responsividade à terapia ser caracteristicamente heterogênea.

Para pacientes adultos com idade inferior a 60 anos essa categorização é primariamente utilizada para guiar o protocolo terapêutico a ser escolhido após a primeira remissão. Os pacientes de grupo de risco favorável são os que mais se beneficiam da quimioterapia convencional como terapia pós-remissão, uma vez que não tem sido observada nenhuma vantagem quando esses pacientes são tratados com o transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) autólogo ou alogeneico (Schlenk *et al.*, 2004; Yanada *et al.*, 2005; Koreth *et al.*, 2009).

Para os pacientes do grupo de risco intermediário a terapia convencional tem sido amplamente utilizada por grupos cooperativos, mas para alguns pacientes foram observado resultados insatisfatórios. Foi demonstrado que o TCTH alogeneico pode ser uma opção atrativa para aqueles pacientes do grupo intermediário que apresentam altas chances de recaída, em particular para os que



apresentam a mutação *FLT3*/ITD (Schlenk *et al.*, 2008; Dohner *et al.*, 2010). Já para os pacientes do grupo de risco adverso, é considerado que o tratamento de escolha para a terapia pós-remissão deva ser o TCTH alogeneico, uma vez que eles em nada se beneficiam com a quimioterapia convencional (Yanada *et al.*, 2005; Koreth *et al.*, 2009).

**Quadro 2:** Estratificação de risco proposta pelo grupo *European LeukemiaNet* para subtipos de LMA, segundo critérios citogenéticos e moleculares.

<b>Grupo genético</b>	<b>Subtipo</b>
Favorável	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3</i> -ITD (cariótipo normal) <i>CEBPA</i> mutado (cariótipo normal)
Intermediário I	<i>NPM1</i> mutado com <i>FLT3</i> /ITD (cariótipo normal) <i>NPM1</i> <sup>wt</sup> com <i>FLT3</i> /ITD (cariótipo normal) <i>NPM1</i> <sup>wt</sup> sem <i>FLT3</i> /ITD (cariótipo normal)
Intermediário II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> Anormalidades citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas
Adverso	inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranjado -5 ou del(5q); -7; abnl(17p); cariótipo complexo*

\*Definido como três ou mais alterações cromossômicas na ausência de uma das translocações ou inversões recorrentes designados pela OMS, isto é, t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) ou t(3;3). Fonte: Adaptado de Dohner *et al.*, 2010.

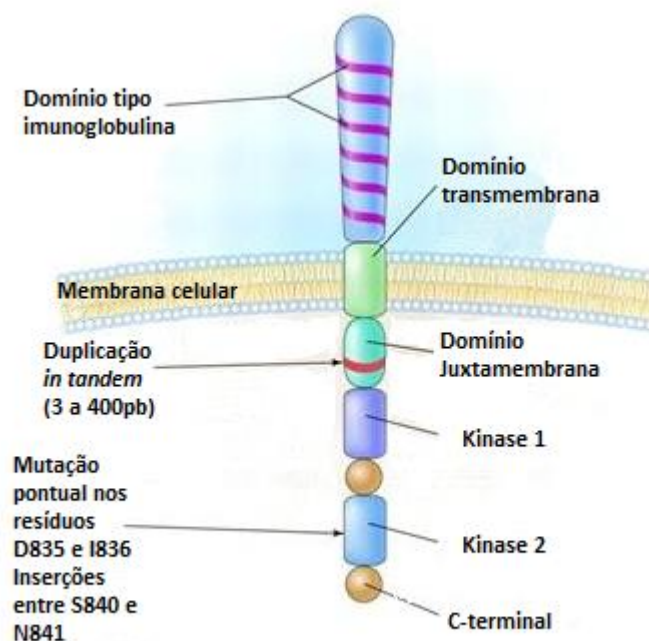
## 2.5. Mutações no gene *FLT3* na LMA

O FLT3 é um receptor tirosina quinase classe III, composto por cinco domínios extracelulares do tipo imunoglobulina: um domínio transmembrana, um domínio juxtamembrana e dois domínios tirosina quinase intracelulares, unidos por um domínio de inserção de quinases (Figura 1). Faz parte da mesma família de outros receptores tirosina quinase envolvidos na hematopoese, como o KIT, o FMS e o PDGFR. Está normalmente expresso nas células progenitoras hematopoéticas, incluindo células CD34+ com altos níveis de expressão do CD117 (c-KIT), desaparecendo à medida que as células se diferenciam (Agnes *et al.*, 1994; Gilliland e Griffin, 2002).

Este receptor tem um papel importante na hematopoese normal: o FL (ligante do FLT3), ao se ligar ao FLT3, leva a uma ativação do seu domínio quinase, desencadeando uma cascata de sinalização celular envolvida na proliferação e sobrevivência celular (Whitman *et al.*, 2001; Gilliland e Griffin, 2002; Levis *et al.*, 2005). Está expresso, em altos níveis, em 70 a 100% dos casos de LMA, e em alta porcentagem dos casos de leucemia linfoblástica aguda, mas pode estar presente também na leucemia mielóide crônica na crise blástica (Gilliland e Griffin, 2002).

Mutações no gene *FLT3*, localizado no cromossomo 13q12, são das alterações somáticas as mais frequentes na LMA, ocorrendo em aproximadamente 1/3 dos pacientes (Small, 2006; Heerema-Mckenney e Arber, 2009). Já foram descritos dois tipos de mutações do gene *FLT3* que ocorrem na LMA: duplicação interna *in tandem* (*FLT3/ITD*), que pode variar de 3 a 400 pb na região que codifica a região de juxtamembrana; e mutação pontual no domínio de tirosina quinase (*FLT3/TKD*) envolvendo, mais frequentemente, os resíduos

D835/I836 do segundo domínio de tirosina quinase (Figura 1). Ambas as mutações levam à ativação constitutiva do FLT3, na ausência do seu ligante, provocando uma grande e descontrolada proliferação celular, estando essas mutações, por tanto, envolvidas no processo leucemogênico (Gilliland e Griffin, 2002; Colovic *et al.*, 2007; Whitman *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011).



**Figura 1:** Desenho esquemático do receptor de tirosina quinase FLT3 mostrando seus domínios e as regiões onde ocorrem as mutações ITD e TKD. Fonte: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/vol106/issue10/images/large/zh80220587080001.jpeg> (modificado).

Nakao e colaboradores reportaram pela primeira vez a presença de duplicações internas *in tandem* (ITD), no domínio de juxtamembrana do *FLT3* na LMA, em 1996. Eles notaram que 17% dos pacientes com LMA apresentavam a mutação *FLT3*/ITD. Desde então, ela vem sendo bastante estudada e tem se mostrado uma das anormalidades genéticas mais frequentes na LMA, ocorrendo

em torno de 20%, e a que tem maior importância prognóstica (Nakao *et al.*, 1996; Small, 2006; Singh *et al.*, 2011). As mutações ITD são mais frequentes na LMA com t(15;17) e na LMA com cariótipo normal. São mais frequentemente detectadas na LMA *de novo* do que na LMA secundária e mais em adultos do que em crianças. Tem sido relacionada, também, com alta contagem de leucócitos no sangue periférico e de blastos na medula óssea e sangue periférico. (Kiyoi *et al.*, 1999; Meshinchi *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2004; Colovic *et al.*, 2007; Mukda *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011).

A presença de mutações ITD indica pior prognóstico tanto em pacientes adultos quanto em crianças (Small, 2006; Singh *et al.*, 2011). Estudos tem demonstrado que a presença de mutações *FLT3*/ITD ao diagnóstico prediz um resultado ruim em relação à quimioterapia de indução. Grande parte dos pacientes tendem a apresentar uma resistência maior à quimioterapia em relação aos pacientes com o genótipo selvagem, desta forma estes pacientes apresentam uma dificuldade maior de obter a remissão completa (RC). Além disso, pacientes com *FLT3*/ITD apresentam maior risco de recaídas e de morte precoce e redução da sobrevida livre de doença (SLD) e da sobrevida global (SG) (Andersson *et al.*, 2004; Colovic *et al.*, 2007; Mrózek *et al.*, 2007; Beitinjane *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2012; Kutny *et al.*, 2012). Essas mutações, também, demonstraram ser um fator prognóstico independente para a SG e duração da remissão completa na LMA-CN (Frohling *et al.*, 2002) e em casos não selecionados (Gale *et al.*, 2008).

A proporção do alelo mutante *FLT3*/ITD em relação ao total de alelos *FLT3* também se mostrou um importante fator prognóstico. Segundo Gale *et al.*, 2008, essa proporção não teve impacto na habilidade de obter a remissão completa, mas foi um fator prognóstico importante para a sobrevida, com o

agravamento significativo da SG e do risco de recaída com o aumento da quantidade de cópias do alelo mutante. Whitman *et al.*, 2001 também relatou que a perda do alelo selvagem é um fator prognóstico desfavorável, em que pacientes  $FLT3^{ITD/-}$  apresentaram SG e SLD significativamente inferiores em relação aos pacientes com o genótipo heterozigoto  $FLT3^{WT/ITD}$ .

A sequência inserida na região de juxtamembrana leva a ativação constitutiva do domínio quinase rompendo a interação auto-inibidora entre o domínio juxtamembrana e a alça de ativação, que normalmente estabiliza a quinase na sua conformação inativa. Acredita-se, por tanto, que o aumento do comprimento da sequência duplicada poderia influenciar na capacidade desta interação, podendo levar a níveis progressivamente crescentes de ativação do receptor com o aumento do tamanho da sequência duplicada (Gale *et al.*, 2008). Entretanto, os estudos de impacto do comprimento do ITD sobre o desfecho clínico tem sido controverso, um estudo demonstrou uma pior sobrevida em pacientes com um comprimento maior (Stirewalt *et al.*, 2006) que não foi confirmado por outros (Ponziani *et al.*, 2006; Gale *et al.*, 2008).

As mutações *FLT3*/TKD foram descobertas primeiramente por Abu-Duhier e colaboradores e Yamamoto e colaboradores, de forma independente, em 2001. São mutações pontuais *missense* que acometem mais frequentemente os resíduos D835/I836 do segundo domínio de tirosina quinase. Essas mutações levam a ativação constitutiva do receptor, assim como as mutações ITD. A mutação mais frequente, que ocorre em 50% dos casos, consiste de uma substituição do nucleotídeo G por T do resíduo D835, resultando em uma mudança do aminoácido aspartato por tirosina (D835Y). Substituições menos frequentes neste resíduo são a D835V, D835H, D835E e D835N. Duas dessas

mutações, a D835Y e D835E, já foram encontradas em conjunto em um mesmo paciente (Abu-duhler *et al.*, 2001; Yamamoto, *et al.*, 2001). Há ainda, mutações menos frequentes que envolvem outros resíduos, entre elas a Y842C, K662Q e V592A (Baldus *et al.*, 2007; Whitman *et al.* 2008).

A mutação *FLT3*/TKD ocorre aproximadamente entre 8 a 12% dos pacientes com LMA e já foi descrita nas síndromes mielodisplásicas e na leucemia linfóide aguda. Yamamoto *et al.* (2001) descreveram que essas mutações foram mais frequentes no subtipo M5, mas não encontraram correlação com outros dados do hemograma ou mielograma e ainda não observaram impacto dessas mutações na sobrevida global (SG), sobrevida livre de doença (SLD) ou taxa de remissão completa (TRC) dos pacientes. Andersson *et al.* (2004) também não observaram diferenças quanto a evolução clínica entre os pacientes com e sem mutação *FLT3*/TKD. Entretanto, Whitman *et al.* (2008) observaram uma redução da sobrevida livre de doença nos pacientes com a mutação em relação aos pacientes com genótipo *FLT3* selvagem.

É importante destacar que o fato de Yamamoto e colaboradores (2001) não terem encontrado diferença na SG, SLD e TRC entre os pacientes com e sem mutação TKD, por si só, não é capaz de indicar que essas mutações não tem um efeito no curso clínico da doença, uma vez que a frequência de pacientes com a mutação incluídos no estudo foi baixa, apenas 4%. Além disso, eles demonstraram que se as mutações TKD não são consideradas na análise, as mutações ITD, por si só, não são fator prognóstico ruim para a SLD. Entretanto, se mutações TKD são consideradas, o grupo com mutações ITD e TKD tem uma SLD significativamente menor do que o grupo selvagem.

No Brasil, os poucos trabalhos publicados envolvendo a pesquisa de mutações *FLT3*/TKD tem demonstrado uma baixa frequência dessas mutações. Lucena-Araújo *et al.* (2010) analisando 169 pacientes brasileiros com LMA encontrou uma frequência de 0,6%. Um trabalho envolvendo pacientes brasileiros com LPA encontrou uma frequência de 2,8% para esta mutação (Chauffaille *et al.*, 2010). Outro estudo brasileiro analisando casos de LMA pediátricos, demonstrou uma frequência de 3,8% da mutação *FLT3*/TKD (Emereciano *et al.*, 2004).

## **2.6. Mutações no gene *NPM1* na LMA**

O gene *NPM1* está localizado no cromossomo 5q35, contém 12 éxons e é o responsável por codificar a proteína nucleofosmina (NPM), também conhecida como B23, NO38 ou numatrina. Esta fosfoproteína é predominantemente encontrada no nucléolo das células, mas se desloca rapidamente entre o núcleo e o citoplasma e apresenta numerosas funções. Dentre essas funções, serve como chaperona para ambos ácidos nucleicos e proteínas, é essencial para o desenvolvimento embrionário, aparece para modular diversas funções moleculares como a biogênese ribossomal e a estabilidade genômica e tem papel importantíssimo na estabilização e ativação das proteínas p53 e ARF. Portanto, podemos dizer que a proteína NPM apresenta grande importância na regulação da síntese de proteínas, do crescimento celular e da apoptose (Grummitt *et al.*, 2008; Falini *et al.*, 2011; Lindström, 2011).

O gene *NPM1* está envolvido em diversas translocações associadas a neoplasias hematológicas, estando fusionado com outros genes como: o *RARA* na leucemia promielocítica aguda (Redner *et al.*, 1996), o *ALK* em linfoma

anaplásico de grandes células (Morris *et al.*, 1994) e o *MLF1* na rara LMA/mielodisplasia com t(3;5) (Falini *et al.*, 2007). Entretanto, as alterações genéticas mais comumente encontradas neste gene na LMA são as mutações do tipo *frame-shift* que ocorrem no éxon 12 e que afetam cerca de um terço dos pacientes adultos com LMA *de novo* (Falini *et al.*, 2005, 2007)

A presença de mutações no gene *NPM1* na LMA foram primeiramente descritas por Falini *et al.* em 2005. Eles demonstraram que o gene *NPM1* estava mutado no éxon 12, resultando em localização citoplasmática aberrante da proteína codificada nos blastos leucêmicos. Eles demonstraram que mutações no éxon 12 do gene *NPM1* estavam presentes em 35% dos pacientes adultos com LMA, tornando este gene o mais frequentemente mutado nesta doença. Já foram descritas 55 mutações diferentes no éxon 12 que levam à localização citoplasmática aberrante da proteína nas células leucêmicas. A mutação mais comum no éxon 12 é a do tipo A, que consiste de uma duplicação em tandem TCTG nas posições 956 a 959 da sequência de referência (*accession number* no GenBank NM\_002520), e corresponde a 75-80% dos casos de LMA com *NPM1* mutado em adultos (Figura 2). Estas mutações ocorrem em todos os subtipos de LMA, sendo mais recorrente nas LMA com cariótipo normal e com componente monocítico (LMA M4 ou M5) e sua incidência é maior em adultos (31,4%, aproximadamente) do que em crianças (7,5%, aproximadamente), aumentando com a idade (Gale *et al.*, 2008; Rau e Brown, 2009; Braoudaki *et al.*, 2010; Haslam *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

A proteína NPM selvagem apresenta, em sua estrutura, dois domínios chamados de sinal de exportação nuclear (NES), um deles na região N-terminal, e são responsáveis por exportar a proteína NPM do núcleo para o citoplasma.

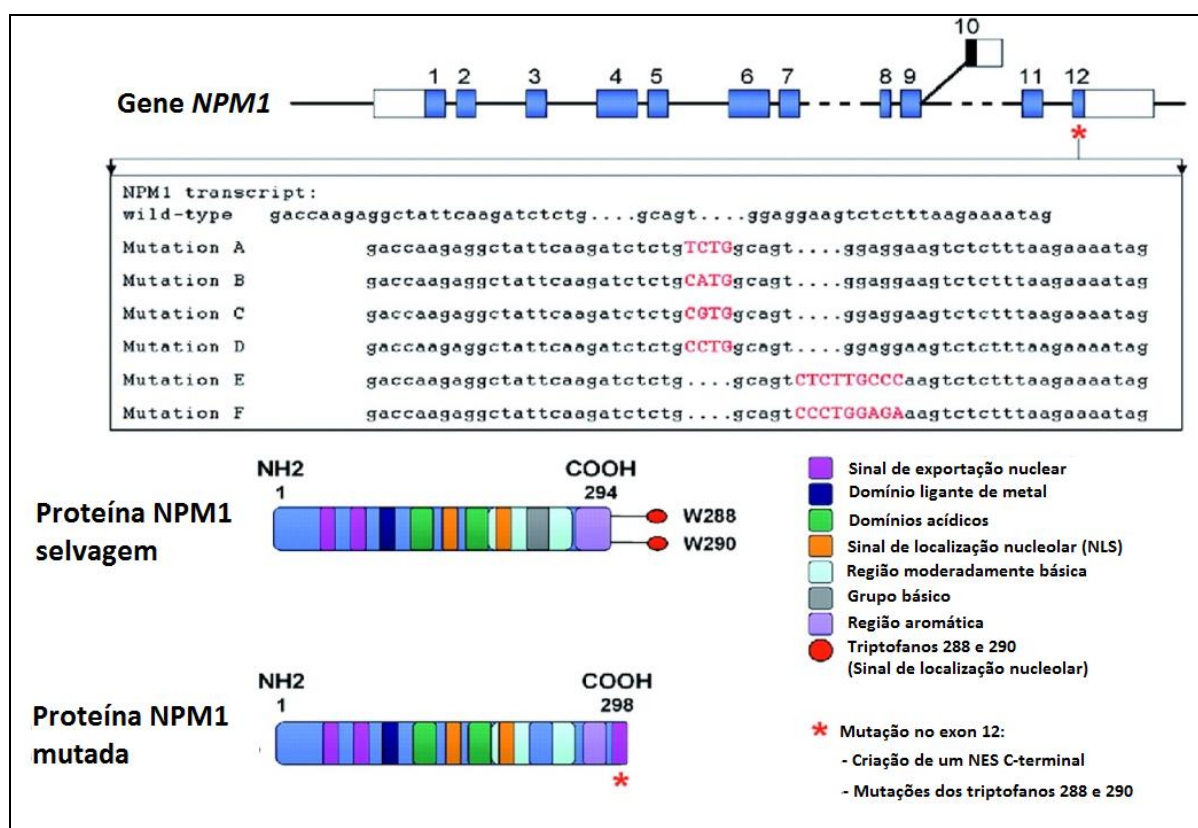


Apresenta também um domínio chamado de sinal de localização nucleolar (NLS), na região C-terminal, que dirige o NPM do citoplasma para o núcleo e o mantém no nucléolo. Nas células normais, a atividade do domínio NLS é predominante sobre a atividade dos domínios NES, fazendo com que a proteína seja mais abundante no núcleo (Nishimura *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Bolli *et al.*, 2007). As mutações no éxon 12 codificam uma proteína mutante que apresenta um novo domínio NES na região C-terminal associado, ou não, a alterações no domínio NLS devido a mutações nos resíduos 288 e 290 de triptofano. Ambas as alterações são cruciais para a localização citoplasmática aberrante da proteína NPM. Os papéis biológicos desempenhados por essa proteína sugerem que interferências em suas funções são capazes de perturbar de maneira crítica o rígido controle da proliferação celular e, assim, contribuir para a tumorigênese (Falini *et al.*, 2006; Rau e Brown, 2009).

Os pacientes com o gene *NPM1* mutado tendem a apresentar alta contagem de blastos, leucócitos e plaquetas e há ainda uma maior frequência no sexo feminino. Apesar do envolvimento de múltiplas linhagens, a expressão do CD34 é baixa/ausente, sugerindo que a célula de origem seja um progenitor relativamente diferenciado (Falini *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2012).

Vários estudos têm demonstrado que mutações no gene *NPM1* reservam um bom prognóstico aos pacientes, eles tendem a apresentar uma taxa de remissão completa significativamente mais alta, maior sobrevida livre de doença e maior sobrevida global em relação aos pacientes sem a mutação. Este impacto no desfecho dos pacientes com LMA tem se revelado ainda mais importante quando avaliado apenas os pacientes com cariótipo normal (Dohner *et al.*, 2005; Falini *et*

*al.*, 2005; Schnittger *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006; Haferlach *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2012).



**Figura 2:** Desenho esquemático mostrando a estrutura do gene e os tipos mais comuns de mutações no éxon 12 do gene *NPM1* e a estrutura da proteína NPM normal e mutada. Fonte: <http://www.haematologica.org/content/vol95/issue4/images/large/95529.fig1.jpeg> (modificada).

Em quatro grandes estudos europeus envolvendo mais de 1000 pacientes LMA com cariótipo normal (Dohner *et al.*, 2005; Schnittger *et al.*, 2005; Verhaak *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006), foi identificado um subgrupo de pacientes com um prognóstico favorável, o grupo com *NPM1* mutado e ausência de *FLT3*/ITD. Notavelmente, pacientes LMA jovens com mutações *NPM1* e sem *FLT3*/ITD mostraram uma probabilidade de SG em 5 anos de 60%, aproximadamente. Comparando pacientes que receberam transplante com aqueles que não receberam, o grupo de pacientes com esse prognóstico favorável *NPM1*+/ITD-

não se beneficiou do transplante de células tronco alogeneico (Dohner *et al.*, 2005).

As mutações *NPM1* parecem identificar uma entidade distinta na LMA, cujas características clínicas e biológicas não são significativamente influenciadas por aberrações cromossômicas concomitantes (Haferlach *et al.*, 2009). Diante disso e da importância dessas mutações para o prognóstico dos pacientes com LMA, a OMS em 2008 propôs classificar os pacientes com mutações nesse gene em um subtipo específico, colocando-a como uma entidade provisória (Swerdlow *et al.*, 2008).

Mutações no gene *NPM1* são estáveis e seu desaparecimento na recaída é raro, somando-se essa propriedade à sua alta prevalência, mutações no gene *NPM1* aparecem como alvos ideais para pesquisa de doença residual mínima (DRM) (Bacher *et al.*, 2009, 2011; Grimwade *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que o estudo isolado de mutações no gene *NPM1* para avaliação prognóstica e decisão terapêutica nos casos de LMA com cariótipo normal não é suficiente, uma vez que essa mutação está frequentemente (40%, aproximadamente) associada a *FLT3/ITD* (Rau e Brown, 2009). Vários autores tem defendido uma classificação prognóstica dependendo do padrão mutacional do paciente em prognóstico favorável, intermediário e desfavorável. Aqueles pacientes que apresentam *FLT3/ITD+* e *NPM1-* são classificados como prognóstico desfavorável, aqueles com *FLT3/ITD+* e *NPM1+* ou *FLT3/ITD-* e *NPM1-* são classificados como prognóstico intermediário e aqueles com *FLT3/ITD-* e *NPM1+* são classificados com prognóstico favorável. Baseado nessa classificação alguns autores propõem um direcionamento terapêutico diferente

para cada grupo, a fim de proporcionar melhor desfecho para esses pacientes (Mrózek *et al.*, 2007; Gale *et al.*, 2008; Haslam *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

## **2.7. Panorama da LMA no Brasil**

Poucos são os trabalhos publicados no Brasil que avaliam o desfecho clínico de pacientes com LMA. Entretanto, os poucos trabalhos publicados a esse respeito têm demonstrado uma realidade alarmante principalmente quando se compara os resultados de estudos brasileiros com aqueles publicados nos EUA e Europa. No Brasil, um trabalho desenvolvido com pacientes adultos com LMA *de novo* atendidos no Hospital Universitário de Campinas apresentou uma sobrevida global em 5 anos de 27% (Pagnano *et al.*, 2000) e um trabalho que envolveu pacientes com LMA atendidos no Hospital das Clínicas de Porto Alegre mostrou uma sobrevida global em 5 anos de 17% (Capra *et al.*, 2007), enquanto que em países desenvolvidos, a sobrevida global em 5 anos está em torno de 40% (Moore *et al.*, 2005; Petersdorf *et al.*, 2007; Burnett *et al.*, 2011; Büchner *et al.*, 2012).

Apesar dos trabalhos publicados no Brasil, pouco se sabe sobre a frequência e o real valor prognóstico das alterações genéticas detectadas em LMA *de novo* em adultos. Os estudos brasileiros referentes a essas questões determinaram a prevalência de marcadores genéticos isoladamente (Krum *et al.*, 2009; Lucena-Araújo *et al.*, 2010; De Mello *et al.*, 2012) e alguns poucos é que avaliaram seu impacto sobre a evolução clínica dos pacientes (Lucena-Araújo *et al.*, 2010; Mello *et al.*, 2012). Essa discrepância se torna ainda mais evidente quando se pesquisa por dados demográficos. Muito pouco se sabe sobre o

quadro geral da LMA na região nordeste e menos ainda sobre o panorama das alterações genéticas nesta doença, em especial em Pernambuco. Estimou-se para o ano de 2012, um total de 330 novos casos de LMA para o Estado de Pernambuco, sendo desses 160 homens e 170 mulheres, o que corresponde a uma frequência de 3,62 casos novos para 100 mil homens e 3,69 casos novos para 100 mil mulheres (INCA, 2011).

As mutações no gene *FLT3* e *NPM1*, até então, ainda não haviam sido estudadas no estado de Pernambuco em pacientes adultos com LMA *de novo*. Sabendo-se que essas mutações inferem no prognóstico do paciente, e podem auxiliar na escolha do protocolo de tratamento, podendo aumentar as chances de sucesso, justifica-se a necessidade do desenvolvimento de estudos envolvendo mutações nesses genes para pacientes com LMA no Estado de Pernambuco.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Geral

Caracterizar pacientes com leucemia mielóide aguda diagnosticados na Fundação HEMOPE de acordo com achados clínico-laboratoriais e das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* observados ao diagnóstico.

#### 3.2 Específicos

1. Determinar a frequência das mutações ITD e TKD do gene *FLT3* e mutações no gene *NPM1* em pacientes com LMA diagnosticados na Fundação HEMOPE;
2. Correlacionar a presença das mutações ITD e TKD do gene *FLT3* e mutações no gene *NPM1* com dados demográficos e clínico-laboratoriais: gênero, faixa etária, subtipos de LMA, resultados de cariótipo encontrados e dados do hemograma e mielograma;
3. Avaliar o significado prognóstico das mutações ITD e TKD do gene *FLT3* e das mutações no gene *NPM1* levando-se em consideração os seguintes critérios: sobrevida global, sobrevida livre de doença e taxas de remissão completa e de recaída.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Casuística, tipo, local e período do estudo

O estudo é do tipo coorte e com comparação de grupos internos. Foi realizado nas Unidades de Hematologia Clínica e Laboratórios Especializados da Fundação HEMOPE (UNILABE) e Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Foram incluídos no estudo 115 pacientes adultos, de ambos os sexos e portadores de LMA *de novo*, diagnosticados no período de março de 2010 a outubro de 2012. Estes pacientes foram diagnosticados e acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE, Recife-PE.

Pacientes com LMA secundária à neoplasia mieloproliferativa/mielodisplásica foram excluídos, assim como os que não apresentavam todos os dados clínico-laboratoriais necessários para este estudo, por motivo de transferência para outras unidades de saúde.

### 4.2. Variáveis

As variáveis analisadas ao diagnóstico foram: idade; sexo; subtipos de LMA com base em critérios FAB e OMS; dados do hemograma (leucometria, contagem de plaquetas e níveis de hemoglobina); percentual de blastos na medula óssea (MO); achados citogenéticos; rearranjos moleculares *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11*; as mutações ITD e TKD do gene *FLT3* e mutações no gene *NPM1*. Para a análise de sobrevida, foram avaliadas a

sobrevida global (SG), a sobrevida livre de doença (SLD) e as taxas de remissão completa (TRC) e de recaída (TR).

### **4.3. Análise hematológica e clínica**

#### **4.3.1. Coleta de dados e das amostras**

As variáveis de idade, sexo, os diferentes subtipos de LMA, dados do hemograma, percentual de blastos na medula óssea, achados citogenéticos e a avaliação do seguimento dos pacientes foram obtidas através de consulta ao prontuário do paciente.

O material utilizado na pesquisa foi o mesmo encaminhado aos laboratórios de rotina e não foi feita nenhuma coleta adicional nos pacientes. Para a pesquisa das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* e dos genes de fusão *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11* era dado preferência ao aspirado medula óssea (MO), mas nos casos em que não havia MO disponível para as análises, utilizava-se a amostra de sangue periférico (SP).

#### **4.3.2. Diagnóstico e classificação de LMA**

O diagnóstico de LMA foi estabelecido com base nos critérios referendados pela OMS, sendo efetuado a partir de análise morfológica, citoquímica e imunofenotípica dos blastos da medula óssea e pelos achados citogenéticos. Quando havia suspeita clínica e citológica de LPA era realizada a pesquisa do rearranjo molecular *PML/RARA*. Para os casos não-LPA foi realizada a pesquisa dos rearranjos moleculares *CBFB/MYH11* e *RUNX1/RUNX1T1* (Vardiman et al., 2002). Devido ao baixo número de pacientes com o cariótipo determinado, optou-se por usar a classificação FAB para LMA.



#### **4.3.3. Tratamento realizado**

Os pacientes incluídos na análise de sobrevida, com exceção dos pacientes LPA, receberam quimioterapia intensiva, seguindo o protocolo de tratamento “3+7” convencional, consistindo em: 1. Indução de remissão: um ou dois ciclos de daunorrubicina 60 mg/m<sup>2</sup>/dia por três dias (D1 a D3), associado de Ara-C 100 ou 150 mg/m<sup>2</sup>/dia em infusão contínua por 7 dias (D1 a D7) e 2. Consolidação e intensificação: dois ou três ciclos de altas doses de Ara-C 3g/m<sup>2</sup>/d.

Os pacientes com LPA, na terapia de indução, receberam doses de 45 mg/m<sup>2</sup>/dia de ácido all-transretinóico (ATRA) por via oral a partir do primeiro dia da suspeita, fracionada em duas doses. O tratamento com ATRA foi contínuo até a remissão completa (RC) ou pelo prazo máximo de 90 dias em caso de persistência de promielócitos atípicos na medula óssea. Daunorrubicina 60 mg/m<sup>2</sup>/dia também foi administrada nesses pacientes nos dias 2, 4, 6 e 8 de tratamento, por infusão endovenosa e no caso de pacientes com mais de 70 anos, a dose foi a mesma, entretanto foi administrada nos dias 2, 4 e 6. Após a terapia de indução, os pacientes que alcançaram a remissão completa foram submetidos à terapia de consolidação de risco adaptada, sendo o risco estabelecido com a observação da contagem de leucócitos e plaquetas (Jácomo *et al.*, 2008).

#### **4.3.4. Desfecho**

Os pacientes vivos foram censurados em fevereiro de 2013, os demais, cujo seguimento foi perdido, foram censurados na última data em que sabidamente estavam vivos. Sobrevida global (SG) refere-se ao tempo compreendido entre o diagnóstico e o óbito/censura. Sobrevida livre de doença

(SLD) é o tempo entre a remissão completa e o primeiro evento (recaída ou óbito) ou censura. A taxa de remissão completa correspondeu ao percentual de pacientes que conseguiram obter a remissão completa após um ou dois ciclos de quimioterapia de indução. A taxa de recaída foi determinada como o percentual de pacientes que obtiveram remissão completa e recaíram. A remissão completa (RC) foi atestada para os pacientes com aspirados de medula óssea normocelulares, contendo <5% de blastos leucêmicos e com evidências de maturação normal dos outros elementos, após a terceira semana pós final da indução.

#### **4.3.5. Critérios de inclusão e exclusão para a análise de sobrevida**

Foram incluídos na análise de sobrevida os pacientes que receberam tratamento com terapia de intenção curativa, de acordo com o protocolo previamente mencionado. Foram excluídos da análise de sobrevida os pacientes que receberam tratamento paliativo ou que foram tratados em outros hospitais.

Como a LPA tem características próprias e tratamento diferenciado, a análise de sobrevida dos pacientes LPA foi realizada separadamente dos pacientes não-LPA.

### **4.4. Análise molecular**

#### **4.4.1. Coleta de material**

As amostras foram constituídas, prioritariamente, de 2 mL do aspirado de MO, em tubos contendo EDTA e, em casos onde não foi possível obter a MO, foram coletados 4 mL de SP, em tubos contendo EDTA, após consentimento informado (Anexo 1).

#### 4.4.2. Extração do DNA genômico

Para o estudo das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* a extração do DNA genômico a partir do SP ou MO foi realizada pela técnica de fenol-clorofórmio modificada (Davis *et al.*, 1986).

A amostra de SP ou MO foi submetida à lise dos eritrócitos em que foi adicionada, aos 4mL de SP ou 2 mL do aspirado de medula óssea, uma solução de lise ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M), seguindo-se para a centrifugação a 2.200 rpm por 10 min e desprezando o sobrenadante após a centrifugação. A seguir, a solução denominada TKM1 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 100 $\mu\text{L}$  de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 2.200 rpm por 10 minutos e posteriormente o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, o precipitado de leucócitos.

Para a lise dos leucócitos, foram adicionados ao precipitado de leucócitos 400 $\mu\text{L}$  da solução TKM2 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25  $\mu\text{L}$  de SDS 10% e incubado à 55°C durante 30 minutos. Após esse período, 180 $\mu\text{L}$  de NaCl 5M foram adicionados e a solução foi mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtubo de 1mL, adicionando-se a ele, um volume igual de fenol e de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1), seguido de homogeneização, centrifugação (12.000 rpm por 5 minutos) e transferência do sobrenadante para outro microtubo de 1mL.

A mistura de clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada ao novo microtubo com o sobrenadante da última separação, seguiu-se com a

homogeneização do material, centrifugação (12.000 rpm por 5 minutos) e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1mL. Neste novo microtubo foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,3 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1%.

#### **4.4.3. Pesquisa das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1***

Para a pesquisa das mutações *FLT3*/ITD e *NPM1* foi realizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction* - PCR) convencional, seguido de eletroforese em gel de agarose. Para a análise da mutação *FLT3*/TKD foi realizada Reação em Cadeia da Polimerase seguido da análise de Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), utilizando a enzima de restrição *EcoRV*, como previamente descrito por Whitman *et al.*, 2008.

Na análise das mutações *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD e *NPM1* a PCR foi realizada com a utilização da enzima Taq DNA Polimerase (0,025U), primers (200nM) (Tabela 1), dNTP's (0,2mM), MgCl<sub>2</sub> (2mM), tampão 10x e água (Tabela 2 e 3). As reações foram submetidas à amplificação em termociclador sob as seguintes condições:

1. Para a mutação *FLT3*-ITD: 94°C por 4 minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; e extensão final de 72°C por 5 minutos (Tabela 4).

2. Para a mutação *FLT3*-TKD: 94°C por 4 minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 40 segundos, 72°C por 30 segundos; e extensão final de 72°C por 5 minutos (Tabela 4).

3. Para a mutação no *NPM1*: 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; e extensão final de 72°C por 7 minutos (Tabela 4).

**Tabela 1:** Sequência dos *primers* e enzima utilizados nas reações para pesquisa das mutações *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD e *NPM1*

<b>Primers</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência</b>	<b>Enzima</b>
<i>FLT3</i> -ITD	Forward	5' GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC 3'	-
	Reverse	5' CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC 3'	
<i>FLT3</i> -TKD	Forward	5' CCGCCAGGAACGTGCTTG 3'	EcoRV
	Reverse	5' GCAGCCTCACATTGCCCC 3'	
<i>NPM1</i>	Forward	5' GTGGTAGAATGAAAAATAGAT 3'	-
	Reverse	5' CTTGGCAATAGAACCTGGAC 3'	

**Tabela 2:** Composição da reação para amplificação das mutações no gene *FLT3*.

<b>Componentes</b>	<b>Volumes (<math>\mu</math>l)</b>
Tampão (10x)	5,0
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,0
dNTP's (10mM)	1,0
<i>Primer Sense</i> (10 $\mu$ M)	1,0
<i>Primer Antisense</i> (10 $\mu$ M)	1,0
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/ $\mu$ l)	0,25
DNA (200 ng)	1,0
dH <sub>2</sub> O	38,75
<b>Volume Final (<math>\mu</math>l)</b>	<b>50,0</b>

**Tabela 3:** Composição da reação para amplificação das mutações no gene *NPM1*.

<b>Componentes</b>	<b>Volumes (µl)</b>
Tampão (10x)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5
dNTP's (10mM)	0,5
<i>Primer Sense</i> (10 µM)	0,3
<i>Primer Antisense</i> (10 µM)	0,3
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/µl)	0,25
DNA (200 ng)	0,5
dH <sub>2</sub> O	19,15
<b>Volume Final (µl)</b>	<b>25</b>

Para a mutação *FLT3*-TKD, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta, com objetivo de analisar a qualidade da amplificação, para posterior digestão dos fragmentos da PCR utilizando endonuclease de restrição. Atestada a qualidade da amplificação, os produtos de PCR foram então submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *EcoRV*. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio (Figura 3). O tamanho dos fragmentos amplificados e dos fragmentos obtidos após a digestão está listado na tabela 5.

Para as mutações *FLT3*-ITD e *NPM1*, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio (Figura 4 e 5, respectivamente). O tamanho dos fragmentos amplificados nas reações para as mutações *FLT3*-ITD e *NPM1* está listado na tabela 5.

**Tabela 4:** Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões específicas do gene *FLT3* e *NPM1*.

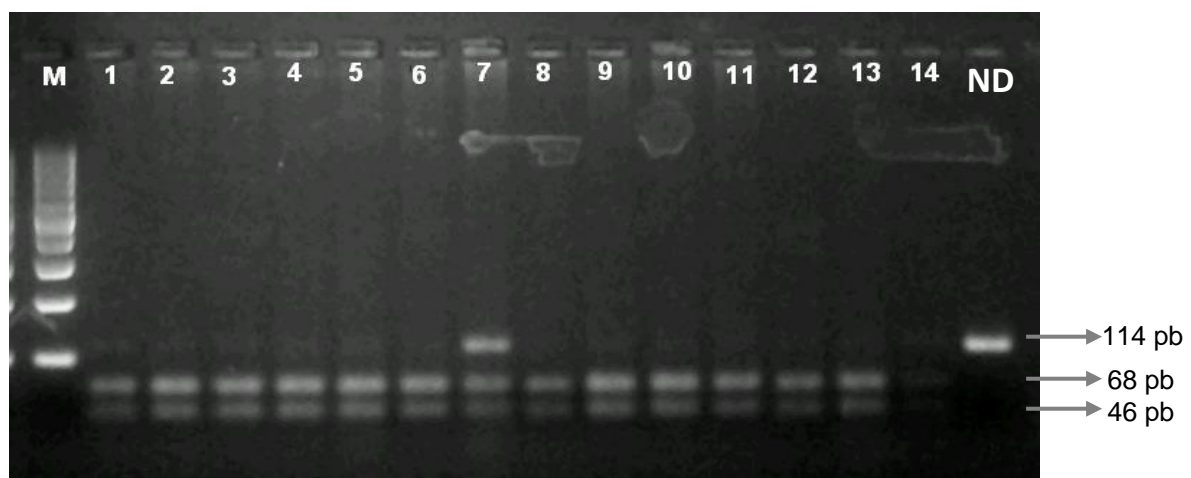
Mutação	Desnaturação		40 ciclos						Extensão	
	inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Final	
	T	$\Delta t$	T	$\Delta t$	T	$\Delta t$	T	$\Delta t$	T	$\Delta t$
	(°C)		(°C)		(°C)		(°C)		(°C)	
<i>FLT3</i> -ITD	94	4'	94	1'	52	30"	72	30"	72	5'
<i>FLT3</i> -TKD	94	4'	94	1'	55	40"	72	30"	72	5'
<i>NPM1</i>	94	10'	94	30"	56	1'	72	2'	72	7'

$\Delta t$ = tempo

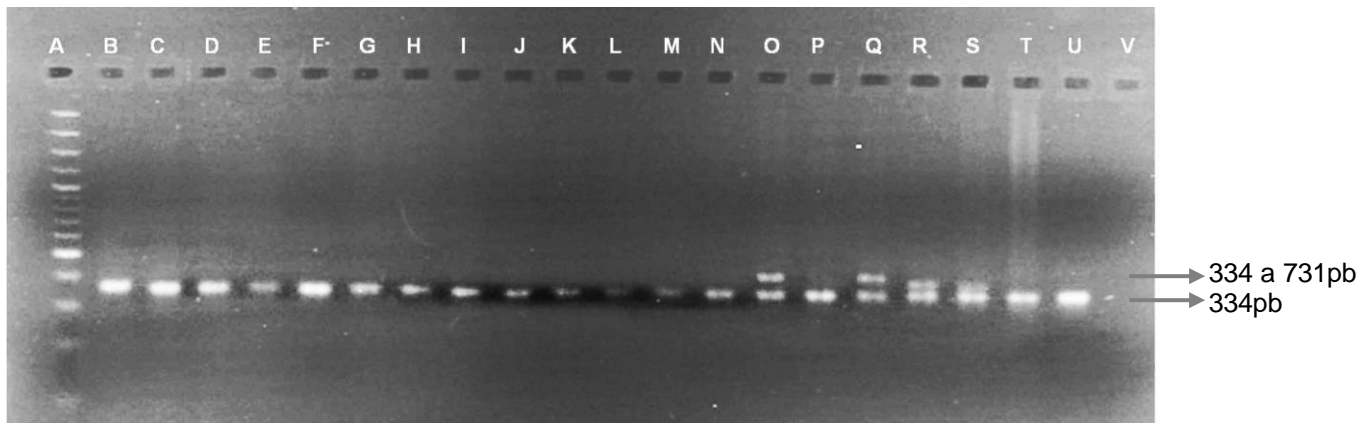
**Tabela 5:** Tamanho dos fragmentos amplificados no PCR convencional e na digestão com *EcoRV* (RFLP) para as mutações *FLT3*/TKD, *FLT3*/ITD no gene *NPM1*.

Mutação		PCR	Digestão com <i>EcoRV</i>
<i>FLT3</i> -TKD	N	114 pb	68 e 46 pb
	M	114 pb	114, 68 e 46 pb
<i>FLT3</i> -ITD	N	331 pb	-
	M	Variável	-
<i>NPM1</i>	N	294 pb	
	M	298 pb	

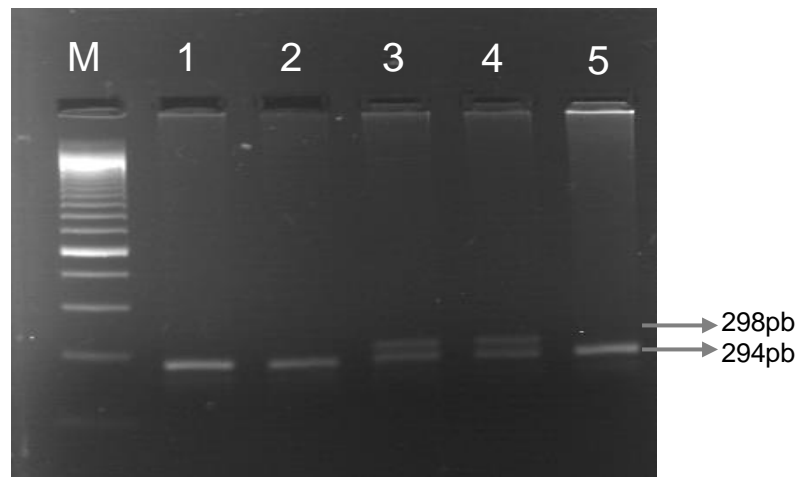
N (normal); M (mutante); Pares de bases (pb).



**Figura 3:** Digestão, com a endonuclease de restrição *EcoRV*, do produto da amplificação para a pesquisa da mutação *FLT3*-TKD. (7) Paciente com presença da mutação *FLT3*-TKD. (1-6 e 8-14) Pacientes sem a mutação *FLT3*-TKD. (M) marcador 100pb; (ND) não digerido.



**Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose a 4% do produto da PCR para a mutação *FLT3*-ITD. (A) Marcador. (B a N, P, T e U) Pacientes negativos para a mutação. (O, Q, R e S) Pacientes positivos para a mutação. (V) Branco.



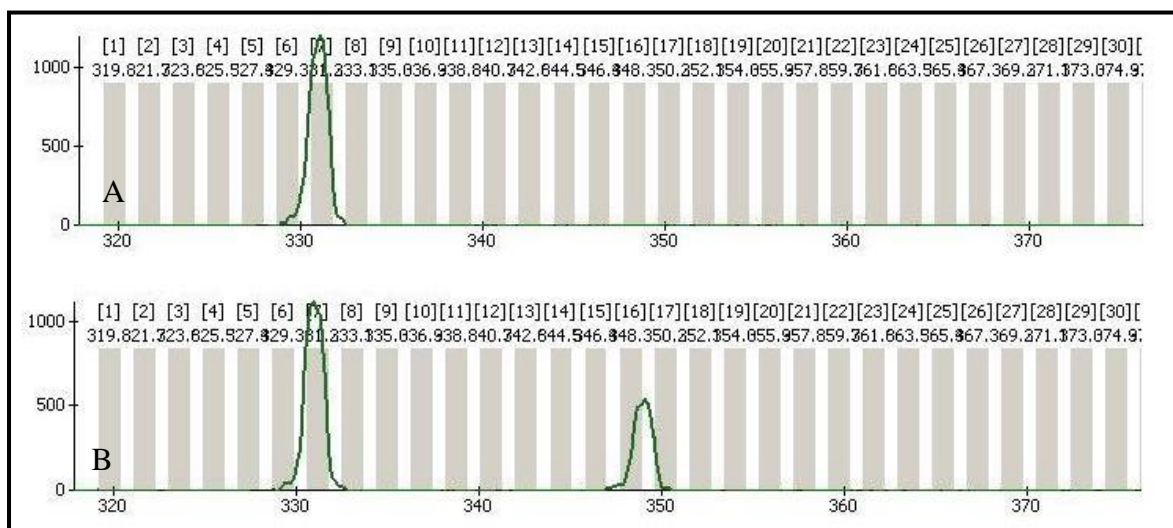
**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose a 4% do produto da PCR para detecção de mutações no gene *NPM1*. (M) Marcador. (1, 2 e 5) pacientes negativos para mutações no gene *NPM1* negativo. (3 e 4) pacientes com presença de mutação no gene *NPM1*.

Para confirmar os resultados obtidos após a eletroforese em gel de agarose, para as mutações *FLT3*/ITD e no gene *NPM1*, foi realizada a técnica de genotipagem utilizando o equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare - Amersham) e analisadas pelo software Fragment Profiler v1.2. As amostras foram amplificadas nas seguintes condições de reação: 0,5µl de DNA genômico; 120mM do primer *FLT3* sense marcado com fluoróforo HEX e 120mM do primer *FLT3* antisense não marcado (Tabela 1); 240mM de primer *NPM1* sense marcado com

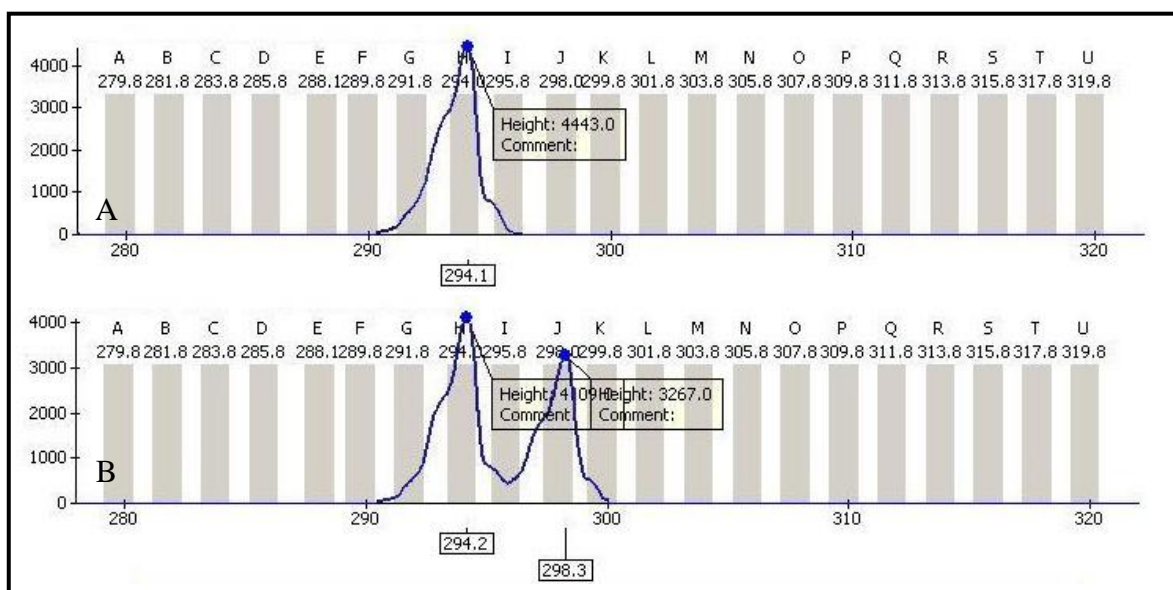


fluoróforo FAM e 240mM do primer *NPM1* antisense não marcado (Tabela 1); tampão 10X; 3mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTP's; 0,05U de taq polimerase e água. Condições de ciclagem: desnaturação inicial 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 1 minuto; e 72°C por 2 minutos. Extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR marcados foram diluídos 40x em água. Em seguida, 2µl de cada diluição foi distribuída em placa de 96 poços previamente preparada com uma mistura contendo 7,75µl de Genotyping Loading Solution (0,1% de Tween 20 em H<sub>2</sub>O) + 0,25µL de MegaBACE Size standards ET550-R, perfazendo um volume final de 10µl. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos antes de serem colocadas no equipamento. Os eletroferogramas obtidos após a corrida no equipamento estão mostrados nas figuras 6 e 7.



**Figura 6:** Eletroferograma da genotipagem para a mutação *FLT3*-ITD. **(A)** Paciente sem a mutação *FLT3*-ITD com presença de apenas um pico representando o alelo selvagem. **(B)** Paciente com a mutação *FLT3*-ITD com a presença de dois picos, o primeiro representando o alelo selvagem e o segundo, o alelo mutante.



**Figura 7:** Eletroferograma da genotipagem para a mutação *NPM1*. **(A)** Paciente sem a mutação no gene *NPM1* com presença de apenas um pico representando o alelo selvagem. **(B)** Paciente com a mutação no gene *NPM1* com a presença de dois picos, o primeiro representando o alelo selvagem e o segundo, o alelo mutante.

#### 4.4.4. Análise dos rearranjos *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11*

O PCR para a análise desses genes de fusão está baseado no desenho de primers que se anelam em sítios opostos ao ponto de quebra e região de fusão dos genes, de forma que os produtos de PCR contêm a sequência de fusão tumor-específica. Em muitos tipos de aberrações cromossômicas com genes de fusão, os pontos de quebra em diferentes pacientes estão espalhados em 10 kb de nucleotídeos ou mais, distâncias que são difíceis de serem cobertas por PCR utilizando DNA na rotina laboratorial. Com isso, vemos que os pontos de quebra ao nível de DNA devem ser determinados para cada paciente em individual, a fim de realizar análises de PCR sensíveis e confiáveis. No entanto, esses genes de fusão são transcritos em RNAm (Ácido ribonucleotídeo mensageiro) de fusão, que podem servir como alvo após PCR-RT (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) para obtenção de cDNA (DNA complementar). Dessa forma, para análise desses genes de fusão, é realizada PCR-RT seguido de Nested-

PCR, na tentativa de aumentar a sensibilidade e especificidade do teste (Dongen *et al.*, 1999).

#### 4.4.4.1. Extração de RNA total

Para a análise dos rearranjos *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11* também foi extraído RNA total das amostras de MO ou SP. O RNA total das amostras de MO e/ou SP dos pacientes foi extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), que consiste numa solução monofásica à base de fenol e isotiocianato de guanidina, que deriva de uma modificação do método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (Chomczynski e Sacchi, 1987).

As amostras de MO e/ou SP foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos para separar as células do plasma, que foi descartado. O precipitado celular foi transferido para um tubo tipo Falcon de 50 mL, estéril e livre de RNase, em que foram acrescentados 35 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos, composto de 9 partes de cloreto de amônio e 1 parte de bicarbonato de amônio, seguindo-se uma incubação em gelo por 20 minutos. O lisado celular foi então centrifugado a 3.000 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de leucócitos foi finalmente ressuspensionado em 1 mL de salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffer Saline - PBS) [1x]. A partir dessa ressuspensão foram feitas alíquotas em tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL, livres de RNase, aos quais foi adicionado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), numa proporção de 3 partes de Trizol para 1 parte de células. Nessa etapa, se faz necessária uma homogeneização com o auxílio de pipeta, em que o Trizol promove a lise dos leucócitos e dissolve os componentes celulares, enquanto mantém a integridade do RNA.

Após um período de incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, foram acrescentados 200 µl de clorofórmio (MERCK, EUA) aos tubos, seguindo-se agitação intensa em vórtex por 15 segundos, incubação por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 15 minutos. A adição do clorofórmio, seguida de centrifugação, separa a solução em uma fase orgânica e outra aquosa, sendo esta última a fase em que o RNA total permanece exclusivamente. Esta fase aquosa foi então transferida para tubos novos de 1.5 mL livres de RNase e o RNA total foi precipitado com 500 µl de álcool isopropílico. Após centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 10.000 x g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* posto para secar à temperatura ambiente. Finalmente, o *pellet* foi ressuscitado em água destilada e deionizada, tratada com o inibidor de RNase dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (SIGMA, EUA), o RNA foi quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e conservado em freezer -80°C até o momento do uso.

#### *4.4.4.2. Síntese da primeira fita de DNA complementar*

Uma vez extraído e quantificado, o RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) com o kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, EUA). As reações ocorreram em volumes de 25 µl, contendo um micrograma de RNA total, 2.5 µl de 10x RT Buffer, 1 µl de 25x dNTP mixture, 2.5 µl 10x Random Primers, 1.25 µl de MultiScribe RT (50U/µl), 0.65 µl de RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega, EUA) e H<sub>2</sub>O deionizada tratada com DEPC 0,1% (SIGMA, EUA) suficiente para completar o volume final. As reações ocorreram durante 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 segundos a 85°C.

#### 4.4.4.3. PCR para amplificação do gene da $\beta$ -actina

Para avaliar a eficiência da síntese de cDNA, as amostras foram submetidas à PCR para amplificação de um gene constitutivamente expresso, que codifica a  $\beta$ -actina, uma proteína estrutural básica do citoesqueleto. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 6. As reações ocorreram em um volume de 25  $\mu$ l, contendo: 2  $\mu$ l de cDNA, 1X PCR Buffer (Invitrogen, EUA), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen, EUA), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, EUA), 5 pmol de cada primer, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, EUA) e água destilada suficiente para completar o volume final. Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 5 minutos, seguindo-se 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; por fim, uma extensão a 72°C por 10 minutos (Noguera *et al.*, 2005). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

**Tabela 6:** Sequência dos *primers* utilizados na reação para amplificar parte do gene da  $\beta$ -actina

<b>Primer</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência</b>
B-actina F	Forward	5'AAGAGAGGCATCCTCACCCCT3'
B-actina R	Reverse	5'TACATGGCTGGGGTGTTGAA3'

#### 4.4.4.4. Análise dos rearranjos *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11*

Uma vez atestada a qualidade do cDNA, seguiu-se para a análise dos rearranjos *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11*. Para o estudo desses rearranjos foi realizado *Nested-PCR*, em 2 ciclos, segundo Dongen *et al.* (1999). As sequências dos *primers* utilizados estão listados no quadro 3 e as figuras 8, 9

e 10 são desenhos esquemáticos que representam a posição e o sentido dos *primers* utilizados para as análises dos rearranjos *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11*, respectivamente. Para qualquer um dos rearranjos citados e para ambos os ciclos do *Nested-PCR*, as reações seguiram as mesmas condições. As reações ocorreram em um volume de 50 µl, contendo: 2 a 3 µl de cDNA (no caso do segundo ciclo do *Nested-PCR* é aplicado de 2 a 3 µl do produto do primeiro ciclo de PCR), 1X PCR Buffer (Invitrogen, EUA), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen, EUA), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, EUA), 5 pmol de cada primer, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, EUA) e água destilada suficiente para completar o volume final. Inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 30 segundos, seguindo-se 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos; não sendo necessária extensão final. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

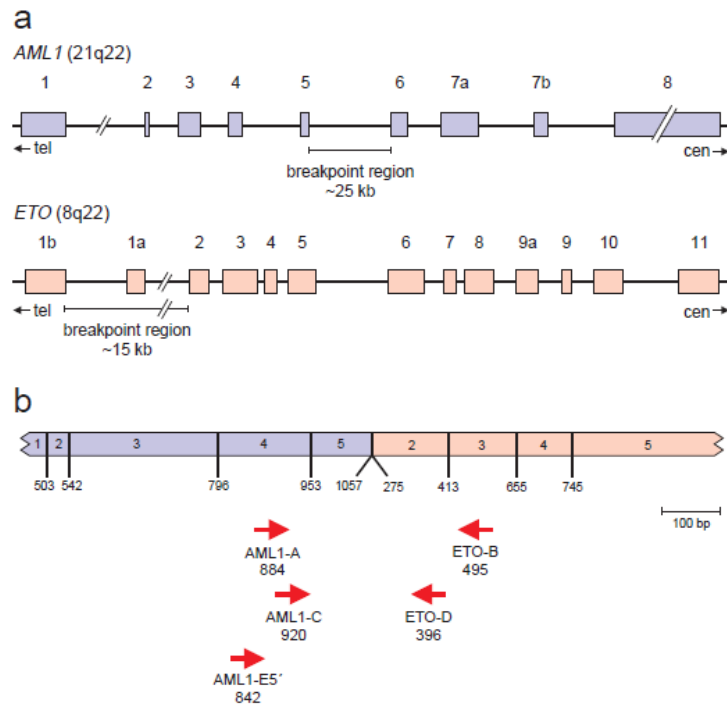
**Quadro 3:** Sequência dos *primers* utilizados nas reações para amplificar as regiões de fusão dos rearranjos *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11*

<b>Rearranjo</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Ciclo</b>
<i>PML/RARA</i>	PML-A1	5'-CAGTGTACGCCTTCTCCATCA-3'	1º
	PML-A2	5'-CTGCTGGAGGCTGTGGAC-3'	2º
	RARA-B	5'-GCTTGTAGATGCGGGGTAGA-3'	1º e 2º
	PML-C1	5'-TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG-3'	1º
	PML-C2	5'-AGCGCGACTACGAGGAGAT-3'	2º
	RARA-D	5'-CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT-3'	1º e 2º
	RARA-E3'	5'-GCCCACTTCAAAGCACTTCT-3'	1º*
<i>RUNX1/RUNX1T1</i>	AML1-A	5'-CTACCGCAGCCATGAAGAACC-3'	1º
	ETO-B	5'-AGAGGAAGGCCCATTTGCTGAA-3'	1º
	AML1-C	5'-ATGACCTCAGGTTTGTCTCGGTCG-3'	2º
	ETO-D	5'-TGAAGTGGTTCTTGGAGCTCCT-3'	2º
	AML1-E5'	5'-TGGCTGGCAATGATGAAACTACT-3'	1º**
<i>CBFB/MYH11</i>	CBFB-A	5'-GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG-3'	1º e 2º
	MYH11-B1	5'-TGAAGCAACTCCTGGGTGTC-3'	1º
	MYH11-B2	5'-TCCTCTTCTCCTCATTCTGCTC-3'	2º
	CBFB-C	5'-GGGCTGTCTGGAGTTTGATG-3'	1º e 2º
	MYH11-D1	5'-TCCCTGTGACGCTCTCAACT-3'	1º
	MYH11-D2	5'-CTTGAGCGCCTGCATGTT-3'	2º
	CBFB-E5'	5'-CAGGGAGAACAGCGACAAACA-3'	1º***

\* Este primer é utilizado no 1º ciclo associado aos primers PML-C1 e PML-C2.

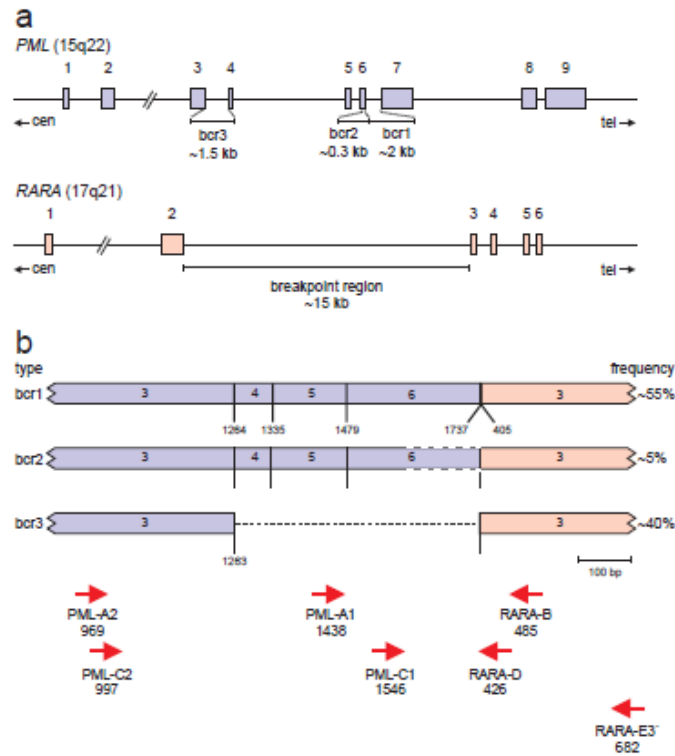
\*\* Este primer é utilizado no 1º ciclo associado ao primer ETO-D.

\*\*\* Este primer é utilizado no 1º ciclo associado aos primers MYH11-D1 e MYH11-D2.

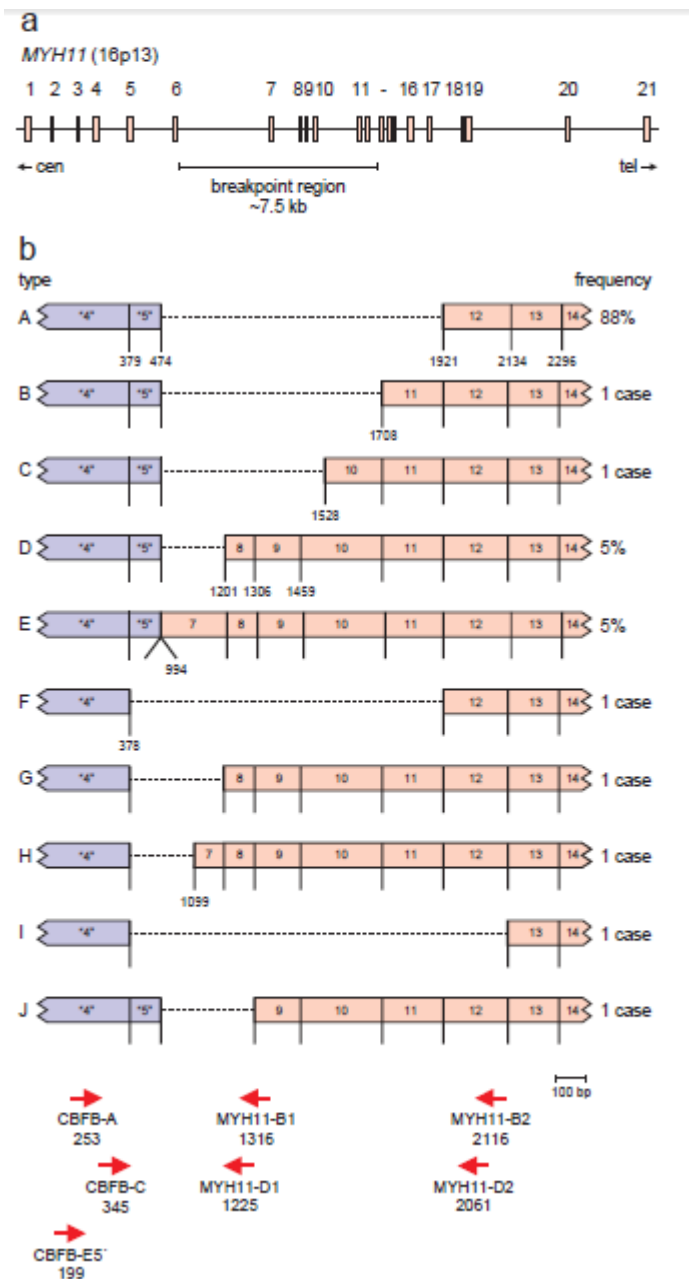


**Figura 8:** (a) Diagrama esquemático da estrutura éxon/intron dos genes *AML1*(*RUNX1*) e *ETO* (*RUNX1T1*), que estão envolvidos na t(8;21)(q22;q22). A orientação do centrômero (cen) e telômero (tel), numeração dos éxons e as regiões de quebra estão indicadas. (b) Diagrama esquemático do transcrito *AML1/ETO* com o éxon 5 do gene *AML1* fusionado ao éxon 2 do gene *ETO*. As setas indicam a posição relativa de cada primer. No primeiro ciclo do *Nested-PCR* são utilizados os pares A+B e E5'+D e no segundo ciclo o par C+D (que é o segundo ciclo de PCR para o amplificado com o par A+B). Fonte: Dongen *et al.* (1999).





**Figura 9:** (a) Diagrama esquemático da estrutura éxon/intron dos genes *PML* e *RARA*, que estão envolvidos na t(15;17)(q22;q21). A orientação do centrômero (cen) e telômero (tel), numeração dos éxons e as regiões de quebra estão indicadas. (b) Diagrama esquemático dos três tipos de transcrito *PML/RARA*, relacionado com as diferentes regiões de quebra do gene *PML*. As setas indicam a posição relativa de cada primer. No primeiro ciclo do *Nested-PCR* são utilizados os pares A1+B, A2+B, C1+E3' e C2+E3'; no segundo ciclo são utilizados os pares C1+D (que é o segundo ciclo de PCR para o amplificado com o par A1+B) e C2+D (que é o segundo ciclo de PCR para o amplificado com o par A2+B). Fonte: Dongen *et al.* (1999).



**Figura 10:** (a) Diagrama esquemático da estrutura éxon/intron dos genes *MYH11*, que está envolvido na inv(16)(p13;q22). A orientação do centrômero (cen) e telômero (tel), numeração dos éxons e as regiões de quebra estão indicadas. (b) Diagrama esquemático dos 10 diferentes tipos de transcrito *CBFB/MYH11*. Os diferentes tipos de transcritos são causados por pontos de quebra em diferentes íntrons do gene *MYH11*. As setas indicam a posição relativa de cada primer. No primeiro ciclo do *Nested-PCR* são utilizados os pares A+B1, A+B2 e E5'+D1 e E5'+D2; no segundo ciclo são utilizados os pares C+D1 (que é o segundo ciclo de PCR para o amplificado com o par A+B1) e C+D2 (que é o segundo ciclo de PCR para o amplificado com o par A+B2). Fonte: Dongen *et al.* (1999).

#### **4.5. Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Hemope (006/2010) (Anexo 2). Todos os pacientes envolvidos foram orientados sobre a proposta do projeto e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

#### **4.6. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS Statistics 19.0. As variáveis contínuas, inicialmente, foram submetidas ao teste de Kolmogorov-smirnov (KS), a fim de analisar se a variável apresentava distribuição normal (DN). Para as variáveis que apresentaram DN, a comparação entre os grupos propostos foi realizada utilizando o teste T não pareado. Para as variáveis que não apresentavam DN, a comparação entre os grupos propostos foi realizada utilizando o teste Mann-Whitney. Para comparar as diferenças das variáveis contínuas entre os diferentes genótipos *ITD/NPM1* foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos propostos utilizando-se o teste  $\chi^2$  ou o teste exato de Fisher. As probabilidades estimadas, a média e a mediana para sobrevida global e sobrevida livre de doença foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e o teste log-rank foi utilizado para comparar as diferenças entre as curvas de sobrevida. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 5. Resultados

### 5.1. Caracterização de todos os pacientes LMA

Nesta seção estão incluídos os resultados da caracterização de todos os 115 pacientes LMA, incluindo os pacientes com Leucemia Promielocítica Aguda. A tabela 7 apresenta as principais características clínico-hematológicas dos pacientes observadas ao diagnóstico. A mediana de idade dos pacientes foi de 49,9 anos (18 a 87,8) e a prevalência em relação ao gênero foi de 52/63 (masculino/feminino).

**Tabela 7:** Características clínico-hematológicas dos 115 pacientes com LMA observadas ao diagnóstico

<b>Idade, anos (intervalo)</b>	49,9* (18-87,8)
<b>Gênero M:F</b>	52:63***
<b>Leucócitos x10<sup>9</sup>/L (intervalo)</b>	57,5** (0,49-285,7)
<b>Plaquetas x10<sup>9</sup>/L (intervalo)</b>	70,1** (6,0-652,0)
<b>Blastos na MO, % (intervalo)</b>	65,5** (20-98)
<b>Hb, g/dL (intervalo)</b>	8,1** (3,6-13,8)

M: masculino/ F: feminino/ Hb: hemoglobina/ MO: medula óssea

\* Valor corresponde à mediana

\*\* Valores correspondem à média

\*\*\* Valores correspondem à frequência absoluta

Durante o período da pesquisa, foram diagnosticados 115 casos de LMA, sendo, destes, 15 casos (13%) de LPA, todos positivos para o rearranjo *PML/RARA*. Como a LPA tem características próprias e tratamento diferenciado, na análise de frequência e correlação das mutações dos genes *FLT3* e *NPM1*

com as variáveis clínico-hematológicas e no estudo de sobrevida, esses casos serão analisados separadamente dos outros casos de LMA. A tabela 8 apresenta a frequência dos subtipos FAB, o subtipo mais frequente foi o M2 (33,9%) seguido do M4 (22,6%), não sendo diagnosticado nenhum caso de M7 (Tabela 8).

**Tabela 8:** Frequência dos subtipos FAB diagnosticados entre os 100 pacientes com LMA

<b>M0</b>	10,4%* (12**)
<b>M1</b>	8,7%* (10**)
<b>M2</b>	33,9%* (39**)
<b>M3</b>	13%* (15**)
<b>M4</b>	22,6%* (26**)
<b>M5</b>	9,6%* (11**)
<b>M6</b>	1,7%* (2**)

\* Valores correspondem à frequência relativa

\*\* Valores correspondem à frequência absoluta

A análise citogenética não foi realizada em 65 pacientes por não haver solicitação médica. Dos outros 50 pacientes em que a análise citogenética foi realizada, 22 (44%) pacientes apresentaram cariótipo normal, 16 (32%) cariótipo alterado e 12 (24%) tiveram resultado inconclusivo devido ao pequeno número ou ausência de metáfases. Dos pacientes com cariótipo alterado, cinco apresentaram cariótipo complexo; três apresentaram a t(8;21)(q22;q22), sendo que desses, 2 apresentaram outras alterações citogenéticas associadas a essa translocação; 2 apresentaram a inv (16), sendo que um apresentou a trissomia do 22 associada a essa translocação; um apresentou del(11q23); um apresentou a

inv(9)(p12q13); um apresentou a t(5;11)(q35;p13) e três apresentaram outras alterações numéricas (Tabela 9).

A análise molecular para os rearranjos *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11* foi realizada em 56 pacientes não-LPA, enquanto que a pesquisa do rearranjo *PML/RARA* foi realizada para os 15 pacientes com suspeita clínica e citológica de LPA. O rearranjo *PML/RARA* foi positivo em todos os pacientes com suspeita de LPA. A frequência do rearranjo *RUNX1/RUNX1T1*, levando-se em consideração todos os subtipos, foi de 16%, desses um era subtipo M4 e oito subtipo M2. Levando-se em consideração apenas os pacientes com o subtipo M2, em que foi realizada a pesquisa do rearranjo *RUNX1/RUNX1T1* (27 pacientes), a frequência foi de 29,6%. O *CBFB/MYH11* foi detectado em quatro pacientes, desses um paciente era subtipo M1 e os outros três eram subtipo M4, com uma frequência de 7,1%, quando avaliados todos os subtipos. Entretanto, tomando apenas os pacientes com o subtipo M4, em que foi realizada a análise do rearranjo *CBFB/MYH11* (13 pacientes), a frequência passa para 23%.

A tabela 9 mostra a estratificação de risco citogenético, em que os resultados da análise citogenética são associados à análise molecular dos rearranjos gênicos *RUNX1/RUNX1T1*, *CBFB/MYH11* e *PML/RARA*. Dos 115 pacientes deste trabalho, só foi possível determinar o risco citogenético em 58 pacientes: oito pacientes tiveram seu risco determinado pela análise citogenética associada a análise molecular, 30 somente pela análise citogenética e 20 somente pela análise molecular. Dos outros 57 pacientes em que não foi possível determinar o risco citogenético: em 30 pacientes não foi realizada nem a citogenética e nem a análise molecular dos rearranjos gênicos *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11*; em um, a citogenética foi realizada, mas foi inconclusiva pelo

baixo número ou ausência de metáfases, e ainda foi negativo para os dois rearranjos gênicos estudados; em quatro, a análise citogenética foi realizada, mas foi inconclusiva, e nesses não foram realizadas as pesquisas dos rearranjos moleculares *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11*; e em 22 pacientes a análise citogenética não foi realizada e ainda foram negativos para ambos os rearranjos moleculares.

Dos 58 pacientes que tiveram seu risco citogenético determinado, 30 pacientes (51,7%) foram incluídos no grupo de risco favorável, 22 pacientes (38%) foram incluídos no grupo de risco intermediário e seis (10,3%) no grupo de risco adverso. Dos 22 pacientes que apresentaram cariótipo normal pela análise citogenética convencional, um foi positivo para o rearranjo molecular *RUNX1/RUNX1T1*, um para o *CBFB/MYH11* e dois para o *PML/RARA*, e, portanto, não foram mais considerados LMA-CN. Dessa forma, 18 pacientes não apresentaram alteração cromossômica detectada por análise citogenética convencional ou por biologia molecular, de forma que a frequência de pacientes LMA-CN foi de 31,2%. Um paciente havia apresentado, pela análise citogenética, apenas alterações numéricas (monossomia do cromossomo 8 e trissomia do 11) entretanto, pela análise molecular, ele foi positivo para o rearranjo *RUNX1/RUNX1T1*, sendo incluído dentro do grupo de risco favorável (Tabela 9).

**Tabela 9:** Frequência do risco citogenético e das alterações citogenéticas encontradas nos pacientes com LMA

Risco citogenético/molecular	N (%)
Risco Indeterminado	57 (49,6%*)
Risco Determinado	58 (50,4%*)
Risco Favorável	30 (51,7%**)
<i>t(8;21)(q22;q22); RUNX1/RUNX1T1</i>	10 (17,2%**)
<i>inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ/MYH11</i>	5 (8,6%**)
<i>t(15;17)(q22;q12); PML/RARA</i>	15 (25,9%**)
Risco Intermediário	22 (38%**)
<i>Cariótipo normal</i>	18 (31,2%**)
<i>inv(9)(p12;q13)</i>	1 (1,7%**)
<i>t(5;11)(q35;p13)</i>	1 (1,7%**)
<i>+4</i>	1 (1,7%**)
<i>+8</i>	1 (1,7%**)
Risco Adverso	6 (10,3%**)
<i>del(11q23)</i>	1 (1,7%**)
<i>Cariótipo complexo</i>	5 (8,6%**)

\* Frequência relativa calculada levando-se em consideração os 115 pacientes incluídos no estudo.

\*\* Frequência relativa calculada levando-se em consideração os 58 pacientes em que foi possível determinar o risco citogenético.

## 5.2. Frequência e caracterização dos 100 pacientes não-LPA de acordo com o *status* dos genes *FLT3* e *NPM1*

Das mutações no gene *FLT3*, as mutações *FLT3*-ITD foram as que apresentaram maior frequência, sendo detectadas em 22% dos pacientes (22/100), enquanto que as mutações *FLT3*-TKD apresentaram uma baixa frequência, de apenas 2% (2/100).



As mutações *FLT3*-ITD foram detectadas em todos os subtipos FAB com exceção do M6. Não houve diferença entre os grupos com e sem mutação *FLT3*-ITD quanto à frequência dos subtipos FAB ( $p=0,782$ ) (Tabela 10). Quanto à análise citogenética dos pacientes *FLT3*-ITD<sup>+</sup>: em 14 pacientes não foi possível determinar o cariótipo, por não ter sido realizada ou por resultado inconclusivo devido ao baixo número ou ausência de metáfases; cinco apresentaram cariótipo normal e os outros dois apresentaram trissomias, uma do cromossomo 4 e a outra do cromossomo 8. Não foi possível determinar o cariótipo dos dois pacientes com mutação *FLT3*-TKD, sendo um do subtipo FAB M2 e o outro do subtipo M4.

**Tabela 10:** Frequência das mutações *FLT3*-ITD e *NPM1* por subtipo FAB dos 100 pacientes não-LPA.

Mutação	Subtipo						p-value
	M0	M1	M2	M4	M5	M6	
<b><i>FLT3</i>-ITD<sup>+</sup></b>	1 (4,6%)	3 (13,6%)	9 (40,9%)	6 (27,3%)	3 (13,6%)	0	0,782*
<b><i>FLT3</i>-ITD<sup>-</sup></b>	11 (14,1%)	7 (9%)	30 (38,5%)	20 (25,6%)	8 (10,2%)	2 (2,6%)	
<b><i>NPM1</i><sup>mut</sup></b>	0	4 (16,7%)	7 (29,1%)	9 (37,5%)	4 (16,7%)	0	0,104*
<b><i>NPM1</i><sup>wt</sup></b>	12 (15,8%)	6 (7,9%)	32 (42,1%)	17 (22,4%)	7 (9,2%)	2 (2,6%)	

\* Calculado pelo teste  $\chi^2$

A presença de mutações *FLT3*-ITD foi relacionada com alta contagem de leucócitos no sangue periférico ( $p= 0,021$ ), os pacientes *FLT3*-ITD<sup>+</sup> apresentaram uma média de leucócitos de  $92,9 \times 10^9/L$ , contra  $53,5 \times 10^9/L$  da média de leucócitos dos pacientes *FLT3*-ITD<sup>-</sup>. Em relação às outras variáveis clínicas e

hematológicas analisadas, não foi encontrada diferença entre os grupos *FLT3*-ITD<sup>+</sup> e *FLT3*-ITD<sup>-</sup> (Tabela 11).

Mutações no gene *NPM1* foram detectadas em 24% (24/100) dos pacientes. Entre os pacientes com cariótipo normal, grupo no qual as mutações no *NPM1* são mais frequentemente observadas, elas foram detectadas em 35,3% (6/17) dos pacientes.

As mutações no gene *NPM1* foram detectadas em todos os subtipos FAB com exceção dos subtipos M0 e M6. Em 54,2% dos pacientes com o gene *NPM1* mutado (*NPM1*<sup>mut</sup>) foi observado comprometimento da linhagem monocítica (M4/M5), entretanto não houve diferença entre os grupos com e sem a mutação no gene *NPM1* quanto a frequência dos subtipos FAB ( $p=0,104$ ) (Tabela 10). Quanto ao cariótipo, seis pacientes apresentaram cariótipo normal, um apresentou o rearranjo *RUNX1/RUNX1T1* e 17 não tiveram seu cariótipo determinado por não ter sido realizada a análise citogenética ou por resultado inconclusivo devido ao baixo número/ausência de metáfases.

As mutações no gene *NPM1* foram mais frequentes no grupo de cariótipo normal ( $p=0,008$ ) e em pacientes com mais de 60 anos ( $p=0,01$ ), além disso, estiveram relacionadas com alta contagem de leucócitos ( $p=0,012$ ), sendo a média de leucócitos dos pacientes *NPM1*<sup>mut</sup> e pacientes sem a presença de mutações no gene *NPM1* (*NPM1*<sup>wt</sup>) de  $84,8 \times 10^9/L$  e  $54,9 \times 10^9/L$ , respectivamente (Tabela 11). As demais variáveis clínicas e laboratoriais investigadas não apresentaram diferença entre os grupos *NPM1*<sup>mut</sup> e *NPM1*<sup>wt</sup>.

**Tabela 11:** Comparação das variáveis clínicas, hematológicas e genéticas dos 100 pacientes não-LPA de acordo com o status das mutações *FLT3*/ITD e do gene *NPM1*.

	<i>FLT3</i> /ITD <sup>+</sup>	<i>FLT3</i> /ITD <sup>-</sup>	<i>p</i>	<i>NPM1</i> <sup>mut</sup>	<i>NPM1</i> <sup>wt</sup>	<i>P</i>
<b>Gênero (M/F) n=100***</b>	9/13	37/41	0,587 <sup>a</sup>	10/14	36/40	0,625 <sup>a</sup>
<b>Idade (anos) n=100**</b>	50,8	53,1	0,650 <sup>b</sup>	59,0	50,5	0,227 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(18,2-81,6)	(18-87,8)		(24,9-88,1)	(18-87,8)	
<b>Hb (g/dl) n=100*</b>	8,2	8,04	0,527 <sup>b</sup>	8,1	8,1	0,940 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(5,8-13,8)	(3,6-13,5)		(5,6-13,8)	(3,6-13,5)	
<b>Leuc (x10<sup>9</sup>/L) n=100*</b>	92,9	53,5	<b>0,021<sup>c</sup></b>	84,8	54,9	<b>0,012<sup>c</sup></b>
<b>Intervalo</b>	(1,5-242,0)	(0,4-285,7)		(1,8-242,5)	(0,4-285,7)	
<b>Plaq (x10<sup>9</sup>/L) n=100*</b>	66,2	77,6	0,693 <sup>c</sup>	99,7	67,2	0,190 <sup>c</sup>
<b>Intervalo</b>	(10,0-194,0)	(6,0-652,0)		(10,0-652,0)	(6,0-404,0)	
<b>Blastos (%) n=100*</b>	67,1	60,7	0,315 <sup>b</sup>	66,4	60,8	0,757 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(27-97)	(20-96)		(27-97)	(20-96)	
<b>Grupo etário n=100</b>			0,921 <sup>a</sup>			<b>0,010<sup>a</sup></b>
<b>≤ 60 anos****</b>	59,1	60,3		37,5	67,1	
<b>&gt; 60 anos****</b>	40,9	39,7		62,5	32,9	
<b>Risco citogenético n=42</b>			0,759 <sup>d</sup>			0,110 <sup>d</sup>
<b>Favorável****</b>	30	37,5	-	14,3	40	-
<b>Intermediário****</b>	60	46,9	-	85,7	42,9	-
<b>Adverso****</b>	10	15,6	-	0,0	17,1	-
<b>Cariótipo normal/Outros</b>			1,0 <sup>d</sup>			<b>0,008<sup>d</sup></b>
<b>Cariótipo normal****</b>	40	40,6	-	85,7	31,4	-
<b>Outros****</b>	60	59,4	-	14,3	68,6	-

M=masculino / F=feminino / Hb=hemoglobina / Leuc=Leucócitos / Plaq=Plaquetas  
 \*valores referentes à média / \*\*valores referentes à mediana / \*\*\*valores referentes à frequência absoluta / \*\*\*\*valores referentes à frequência relativa em %  
<sup>a</sup> calculado pelo teste X<sup>2</sup> / <sup>b</sup> calculado pelo Teste t não-pareado / <sup>c</sup> calculado pelo teste de Mann-Whitney / <sup>d</sup> calculado pelo teste exato de Fisher

A tabela 12 mostra a frequência dos diferentes genótipos ITD<sup>-</sup>/*NPM1*<sup>wt</sup>, ITD<sup>-</sup>/*NPM1*<sup>mut</sup>, ITD<sup>+</sup>/*NPM1*<sup>wt</sup> e ITD<sup>+</sup>/*NPM1*<sup>mut</sup>. Dos pacientes positivos para a mutação *FLT3*/ITD, sete também apresentaram mutações no gene *NPM1*. Das

variáveis investigadas, houve diferença entre os genótipos para a leucometria ( $p=0,01$ ), em que pacientes  $ITD^+/NPM1^{mut}$  apresentaram maior leucometria, com média de leucócitos de  $113 \times 10^9/L$ , em relação aos outros genótipos. Além disso, o genótipo  $ITD^-/NPM1^{mut}$  demonstrou ser mais frequente no grupo de cariótipo normal, em relação aos outros genótipos ( $p=0,032$ ) (Tabela 13).

**Tabela 12:** Frequência dos diferentes genótipos  $ITD/NPM1$  dos 100 pacientes não-LPA incluídos no estudo.

Genótipos	Frequência absoluta (%)
$ITD^-/NPM1^{wt}$	61 (61%)
$ITD^-/NPM1^{mut}$	17 (17%)
$ITD^+/NPM1^{wt}$	15 (15%)
$ITD^+/NPM1^{mut}$	7 (7%)

**Tabela 13:** Comparação das variáveis clínicas, hematológicas e genéticas dos 100 pacientes não LPA de acordo com os genótipos ITD/*NPM1*.

	ITD <sup>-</sup> / <i>NPM1</i> <sup>wt</sup>	ITD <sup>-</sup> / <i>NPM1</i> <sup>mut</sup>	ITD <sup>+</sup> / <i>NPM1</i> <sup>wt</sup>	ITD <sup>+</sup> / <i>NPM1</i> <sup>mut</sup>	<i>P</i>
<b>Gênero (M/F) n=100***</b>	30/31	7/10	6/9	3/4	0,884 <sup>a</sup>
<b>Idade (anos) n=100**</b>	51,4	59,1	47	59	0,224 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(18-87,8)	(21,8-85,4)	(18,2-81,6)	(24,4-74,4)	
<b>Hb (g/dl) n=100*</b>	8,0	7,9	8,0	8,6	0,967 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(3,6-13,5)	(5,6-10,6)	(5,8-9,9)	(5,8-13,8)	
<b>Leuc (x10<sup>9</sup>/L) n=100*</b>	47,9	73,1	83,5	113,0	<b>0,01<sup>b</sup></b>
<b>Intervalo</b>	(0,4-285,7)	(1,8-166,1)	(1,5-211,2)	(16,5-242,5)	
<b>Plaq (x10<sup>9</sup>/L) n=100*</b>	65,3	121,4	75,1	47,0	0,118 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(6,0-404,0)	(23,0-252,0)	(18,0-194,0)	(10,0-94,0)	
<b>Blastos (%) n=100*</b>	60	64	65	72	0,481 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(20-96)	(27-95)	(36-93)	(27-97)	
<b>Risco citogenético n=42</b>					0,257 <sup>a</sup>
<b>Favorável****</b>	44,5	0	25	50	-
<b>Intermediário****</b>	37	100	62,5	50	-
<b>Adverso****</b>	18,5	0	12,5	0	-
<b>Cariótipo normal/Outros</b>					<b>0,032<sup>a</sup></b>
<b>Cariótipo normal****</b>	29,6	100	37,5	50	-
<b>Outros****</b>	70,4	0	62,5	50	-

M=masculino / F=feminino / Hb=hemoglobina / Leuc=Leucócitos / Plaq=Plaquetas

\*valores referentes à média / \*\*valores referentes à mediana / \*\*\*valores referentes à frequência absoluta / \*\*\*\*valores referentes à frequência relativa em %

<sup>a</sup>calculado pelo teste X<sup>2</sup> / <sup>b</sup>calculado pelo teste de Kruskal-Wallis

### 5.3. Frequência e caracterização dos 15 pacientes LPA de acordo com o *status* dos genes *FLT3* e *NPM1*

A mediana de idade dos pacientes LPA foi de 32,2 anos (18,4 a 53,7) e a prevalência em relação ao gênero foi de 6/9 (masculino/feminino).

Mutações *FLT3*/ITD foram detectadas em 40% dos pacientes LPA (6/15), enquanto que a mutação *FLT3*/TKD não foi detectada em nenhum dos 15 pacientes LPA e apenas um paciente (6,7%) apresentou mutação no gene *NPM1*.

Devido à baixa frequência de mutação no gene *NPM1* e da ausência de casos *FLT3*/TKD<sup>+</sup>, as análises estatísticas para avaliar as diferenças das variáveis entre os grupos analisados foi realizada apenas para as mutações *FLT3*/ITD. Não foi observada diferença entre os grupos *FLT3*/ITD<sup>+</sup> e *FLT3*/ITD<sup>-</sup> em nenhuma das variáveis analisadas: mediana de idade, gênero, média de leucócitos, hemoglobina e plaquetas no sangue periférico e percentual de blastos na medula óssea (Tabela 14).

**Tabela 14:** Comparação das variáveis clínicas e hematológicas dos 15 pacientes LPA de acordo com o *status* da mutação *FLT3*/ITD.

	<i>FLT3</i> /ITD <sup>+</sup>	<i>FLT3</i> /ITD <sup>-</sup>	<i>P</i>
<b>Gênero (M/F)</b> <sup>***</sup>	3/3	3/6	0,622 <sup>a</sup>
<b>Idade (anos)</b> <sup>**</sup>	28,6	33,9	0,464 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(18,4-53,7)	(20,5-50,0)	
<b>Hb (g/dl)</b> <sup>*</sup>	7,7	9,1	0,238 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(6,5-9,4)	(6,7-12,2)	
<b>Leucócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b> <sup>*</sup>	34,4	22,2	0,356 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(6,9-83,5)	(0,6-73,5)	
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b> <sup>*</sup>	32,2	40,7	0,150 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(8,0-50,0)	(9,0-104,0)	
<b>Blastos (%)</b> <sup>*</sup>	89,5	87,9	0,541 <sup>b</sup>
<b>Intervalo</b>	(82-98)	(81-95)	

M=masculino / F=feminino / Hb=hemoglobina

\*valores referentes à média

\*\*valores referentes à mediana

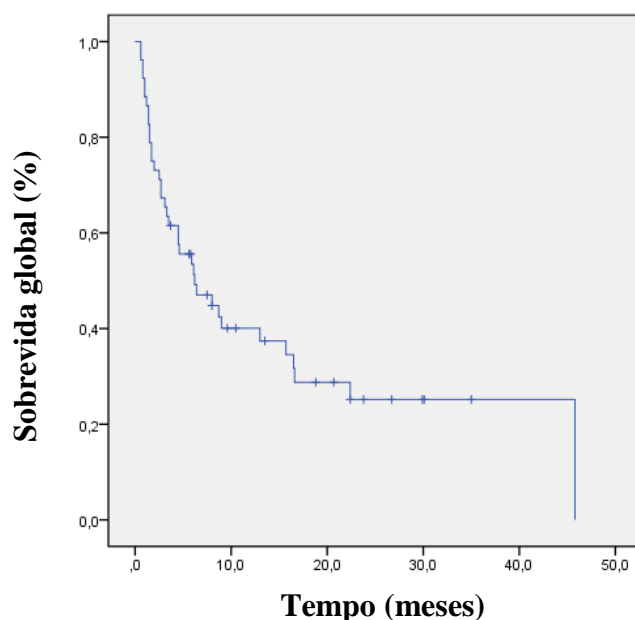
\*\*\*valores referentes à frequência absoluta

<sup>a</sup>calculado pelo teste de exato de Fisher / <sup>b</sup>calculado pelo teste T não pareado

#### 5.4. Análise de sobrevida para todos os 100 pacientes não-LPA

Na análise de sobrevida, foram incluídos 52 dos 100 pacientes diagnosticados com LMA *de novo* deste estudo, sendo excluídos os pacientes que receberam tratamento paliativo ou que foram tratados em outros hospitais. A mediana de seguimento do estudo foi de 16,2 meses, e foi estabelecida considerando-se apenas os pacientes que estavam vivos na data de censura (Shuster, 1991).

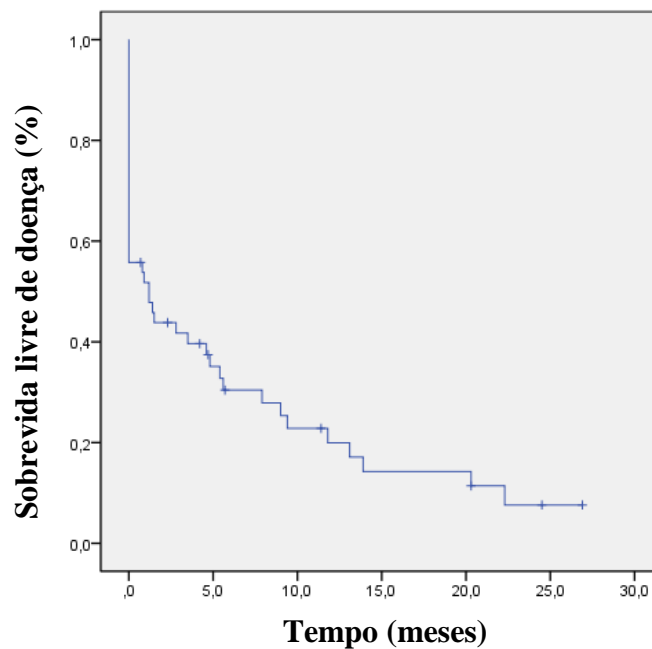
A SG média estimada foi de 16,1 meses (IC95%:10,8-21,5) e a mediana de 6,2 meses (IC95%:1,8-10,5). A SG estimada em 4 anos foi de 25%. Houve uma elevada mortalidade precoce, em que, até o primeiro mês, 17,3% já haviam falecido (Figura 11). As causas de morte precoce foram por sepse ou hemorragia devido à aplasia após a quimioterapia de indução.



**Figura 11:** Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida.

A SLD média estimada foi de 6 meses (IC95%: 3,5-8,5) e a mediana de 1,2 meses (IC95%: 0-2,9) (Figura 12). A SLD estimada em 4 anos foi de 7,6%. A

taxa de remissão completa foi de 51,9% e dos 27 pacientes que adquiriram remissão completa com a quimioterapia convencional, 15 (55%) alcançaram apenas com um ciclo de indução. A taxa de recaída foi de 70,4%.



**Figura 12:** Sobrevida livre de doença (SLD) dos 52 pacientes não LPA incluídos na análise de sobrevida.

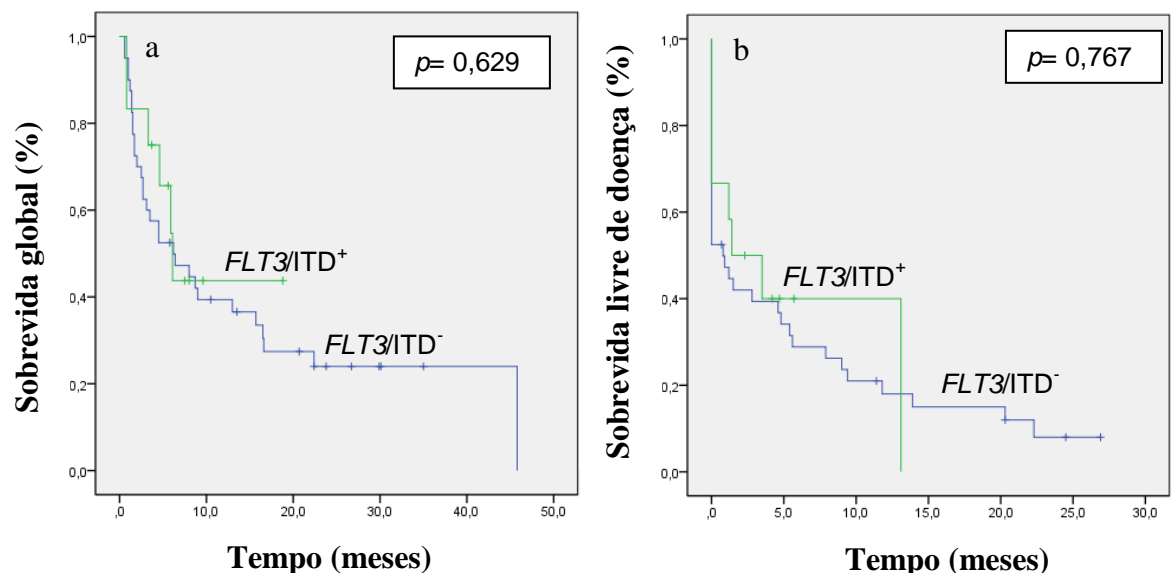
### **5.5. Análise de sobrevida dos 52 pacientes não-LPA segundo o status dos genes *FLT3* e *NPM1***

Dos 52 pacientes incluídos na análise de sobrevida, 12 (23%) foram positivos para *FLT3*/ITD, 10 (19,2%) foram positivos para mutações no gene *NPM1* e nenhum foi positivo para *FLT3*/TKD. Pacientes positivos para ambas as mutações *FLT3*/ITD e no gene *NPM1* foram dois.

A SG média estimada dos pacientes *FLT3*/ITD<sup>+</sup> foi menor do que a dos pacientes *FLT3*/ITD<sup>-</sup>, de 10,3 e 15,6 meses respectivamente, entretanto essa



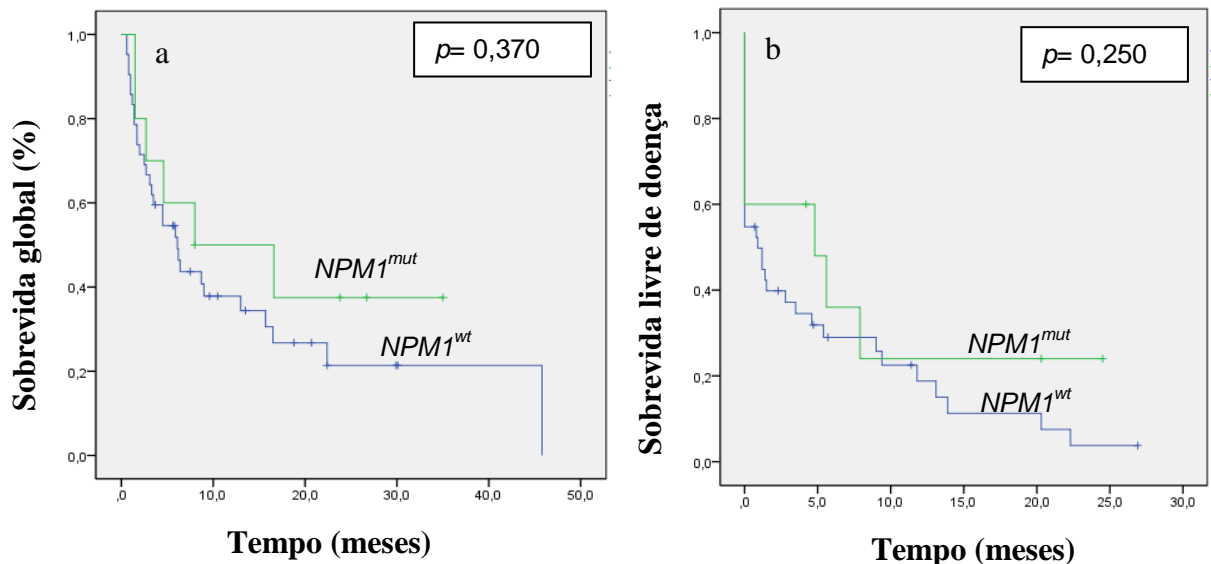
diferença não foi significativa ( $p=0,629$ ) (Figura 14). Em relação à SLD, também não foi encontrado diferença entre os grupos  $FLT3/ITD^+$  e  $FLT3/ITD^-$  ( $p=0,767$ ), que apresentaram SLD média de 5,83 e 5,8 meses respectivamente (Figura 13). Também não foi encontrada diferença em relação à taxa de remissão completa ( $p=0,612$ ) e taxa de recaída ( $p=0,633$ ) entre os grupos  $FLT3/ITD^+$  e  $FLT3/ITD^-$ , que apresentaram TRC de 58,3% e 50%, respectivamente, e TR de 57,1% e 75%, respectivamente.



**Figura 13: (a)** Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo a mutação  $FLT3/ITD$ . **(b)** Sobrevida livre de doença (SLD) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo a mutação  $FLT3/ITD$ .

A SG média dos pacientes  $NPM1^{mut}$  foi maior do que a dos pacientes  $NPM1^{wt}$ , de 17,0 e 14,7 meses respectivamente, entretanto não houve diferença entre esses grupos ( $p=0,370$ ). O mesmo foi observado com a SLD, em que a SLD média dos pacientes  $NPM1^{mut}$  foi maior do que a dos pacientes  $NPM1^{wt}$ , de 8,0 e 5,3 meses, respectivamente, entretanto essa diferença não foi comprovada estatisticamente ( $p=0,250$ ) (Figura 14). Também não houve diferença entre a TRC

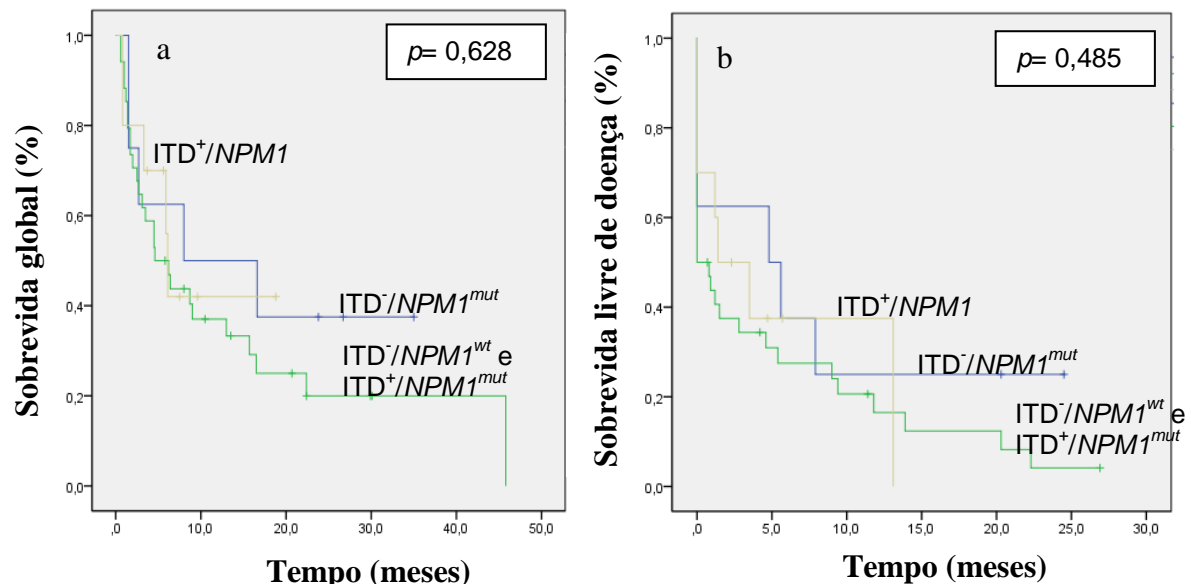
( $p=0,892$ ) e a TR ( $p=0,099$ ) entre os grupos  $NPM1^{mut}$  e  $NPM1^{wt}$ , que apresentaram TRC de 50% e 52,4%, respectivamente, e TR de 40% e 77,3%, respectivamente. Uma vez que é relatado na literatura que o impacto das mutações no gene  $NPM1$  no prognóstico de pacientes LMA é mais importante no grupo de LMA-CN (Dohner *et al.*, 2005; Falini *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006; Haferlach *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2012), analisamos as variáveis de SG e SLD entre os grupos  $NPM1^{wt}$  e  $NPM1^{mut}$  apenas entre os pacientes LMA-CN e ainda assim não foi observado diferença entre os dois grupos ( $p= 0,359$  e  $p=0,128$ , respectivamente).



**Figura 14: (a)** Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo o *status* do gene  $NPM1$ . **(b)** Sobrevida livre de doença (SLD) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo o *status* do gene  $NPM1$ .

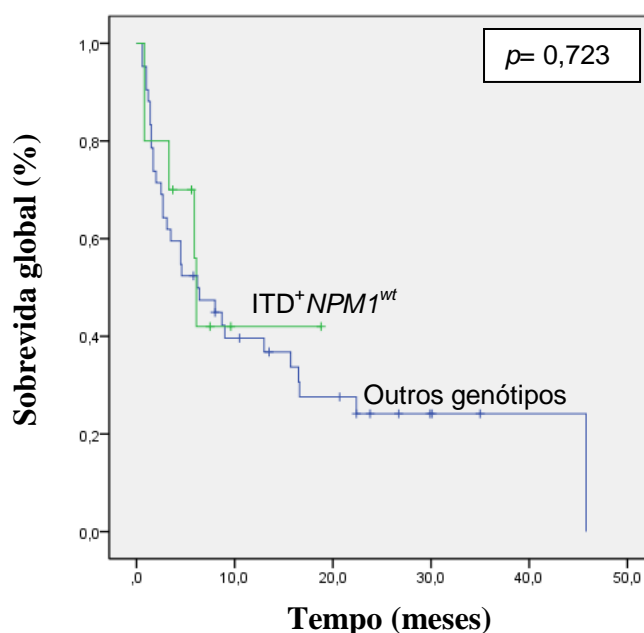
A classificação atual da OMS recomenda avaliar as mutações  $NPM1$  associadas às mutações  $FLT3/ITD$ , uma vez que essas mutações estão frequentemente (40%) associadas (Rau e Brown, 2009). Portanto, avaliamos a diferença das SG e SLD média e das taxas de recaída e de remissão completa de

três grupos: 1.  $ITD^{-}/NPM1^{mut}$ , 2.  $ITD^{+}/NPM1^{mut}$  e  $ITD^{-}/NPM1^{wt}$  e 3.  $ITD^{+}/NPM1^{wt}$ . Pacientes  $ITD^{-}/NPM1^{mut}$  apresentaram SG média de 16,9 meses, pacientes  $ITD^{+}/NPM1^{mut}$  e  $ITD^{-}/NPM1^{wt}$  apresentaram média de 14,2 meses e pacientes  $ITD^{+}/NPM1^{wt}$  apresentaram média de 10 meses ( $p=0,628$ ). Também não houve diferença para a SLD média entre esses grupos ( $p=0,485$ ): pacientes  $ITD^{-}/NPM1^{mut}$  apresentaram SLD média de 8,4 meses, pacientes  $ITD^{+}/NPM1^{mut}$  e  $ITD^{-}/NPM1^{wt}$  apresentaram média de 5,1 meses e pacientes  $ITD^{+}/NPM1^{wt}$  apresentaram média de 5,6 meses (Figura 15). A TRC e a TR também não foram diferentes entre os grupos avaliados ( $p=0,851$  e  $p=0,560$ , respectivamente). Pacientes  $ITD^{-}/NPM1^{mut}$  apresentaram TRC e TR de 50%, ambas, já os pacientes  $ITD^{+}/NPM1^{mut}$  e  $ITD^{-}/NPM1^{wt}$  apresentaram TRC e TR de 50 e 76,4%, respectivamente, enquanto pacientes  $ITD^{+}/NPM1^{wt}$  apresentaram TRC e TR de 60 e 66,7%.



**Figura 15:** (a) Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo os genótipos  $ITD/NPM1$ . (b) Sobrevida livre de doença (SLD) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida segundo os genótipos  $ITD/NPM1$ .

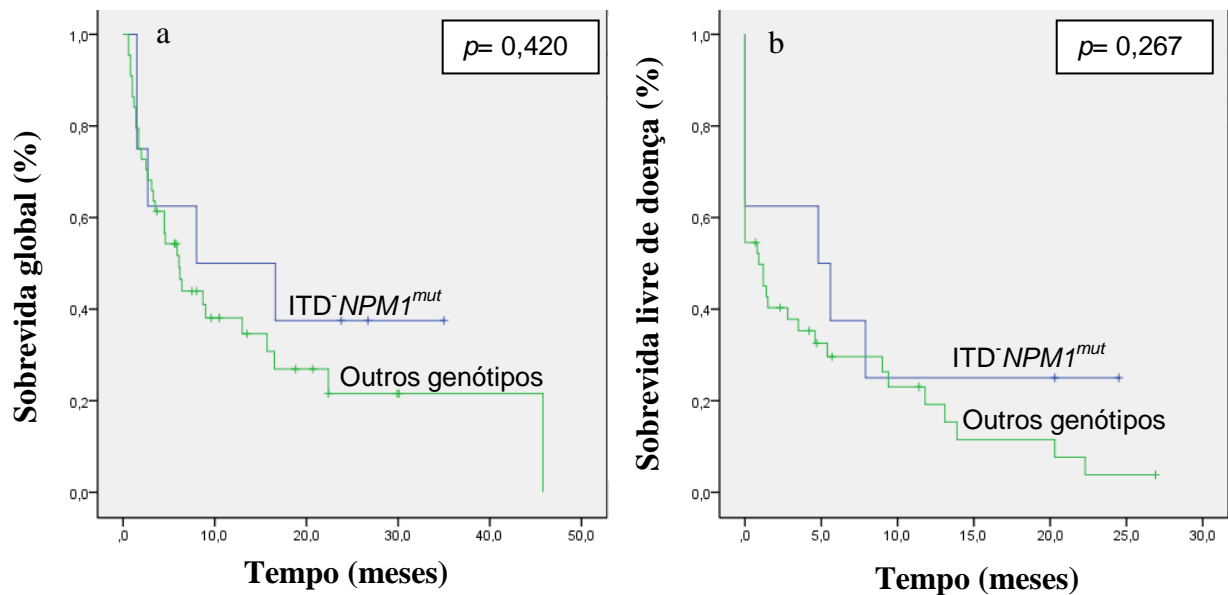
Como a SG dos pacientes  $ITD^+/NPM1^{wt}$  foi inferior a dos outros dois grupos, avaliamos esta variável levando em consideração o grupo  $ITD^+/NPM1^{wt}$  *versus* os outros genótipos e ainda assim não foi encontrada diferença entre esses dois grupos ( $p=0,723$ ). Pacientes  $ITD^+/NPM1^{wt}$  apresentaram SG média de 10 meses, enquanto que os outros genótipos apresentaram SG média de 15,7 meses (Figura 16).



**Figura 16:** Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não LPA incluídos na análise de sobrevida dos dois grupos:  $ITD^+/NPM1^{wt}$  e outros genótipos ( $ITD^-/NPM1^{wt}$ ,  $ITD^+/NPM1^{mut}$  e  $ITD^-/NPM1^{mut}$ ).

Uma vez que a SG e a SLD dos pacientes  $ITD^-/NPM1^{mut}$  foi superior aos outros dois grupos e a taxa de recaída foi inferior a taxa dos outros genótipos, avaliamos a diferença dessas variáveis entre dois grupos:  $ITD^-/NPM1^{mut}$  e outros genótipos ( $ITD^-/NPM1^{wt}$ ,  $ITD^+/NPM1^{mut}$  e  $ITD^+/NPM1^{wt}$ ). A SG e a SLD foram maiores no grupo  $ITD^-/NPM1^{mut}$  em relação aos outros genótipos, entretanto essas diferenças permaneceram sem significância estatística ( $p= 0,420$  e  $p= 0,267$ ): o grupo  $ITD^-/NPM1^{mut}$  apresentou SG e SLD média de 16,9 e 8,4 meses

respectivamente, enquanto que os outros genótipos apresentaram SG e SLD média de 14,9 e 5,4 meses respectivamente (Figura 17). A taxa de recaída do grupo  $ITD^-/NPM1^{mut}$  foi inferior, com 50% dos pacientes recaindo após a remissão, em relação aos outros genótipos, que apresentaram TR de 73,9%, mas ainda assim não foi observada diferença entre os grupos ( $p= 0,558$ ).



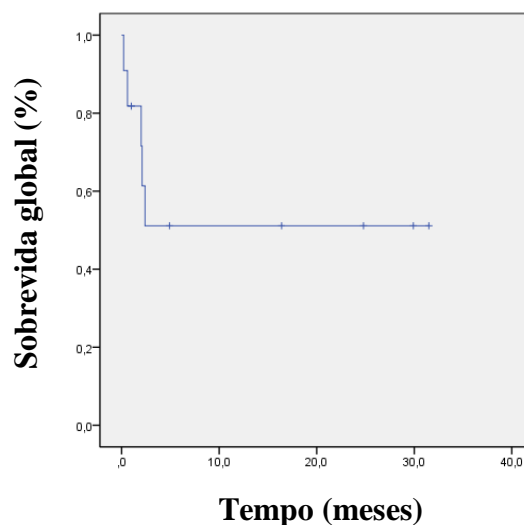
**Figura 17:** (a) Sobrevida global (SG) dos 52 pacientes não-LPA incluídos na análise de sobrevida dos dois grupos:  $ITD^-/NPM1^{mut}$  e outros genótipos ( $ITD^-/NPM1^{wt}$ ,  $ITD^+/NPM1^{mut}$  e  $ITD^+/NPM1^{wt}$ ).

## 5.6. Análise de sobrevida geral dos 11 pacientes LPA e de acordo com o *status* da mutação *FLT3/ITD*

Na análise de sobrevida foram incluídos 11 dos 15 pacientes LPA, uma vez que os outros quatro pacientes foram transferidos para tratamento em outros hospitais e, por tanto, excluídos das análises.

A remissão completa foi alcançada em 81,8% (9/11) dos pacientes. Cinco pacientes foram a óbito no período do estudo: dois (18,2%) foram a óbito durante o tratamento de indução, um por Síndrome do ATRA e o outro por infecção do

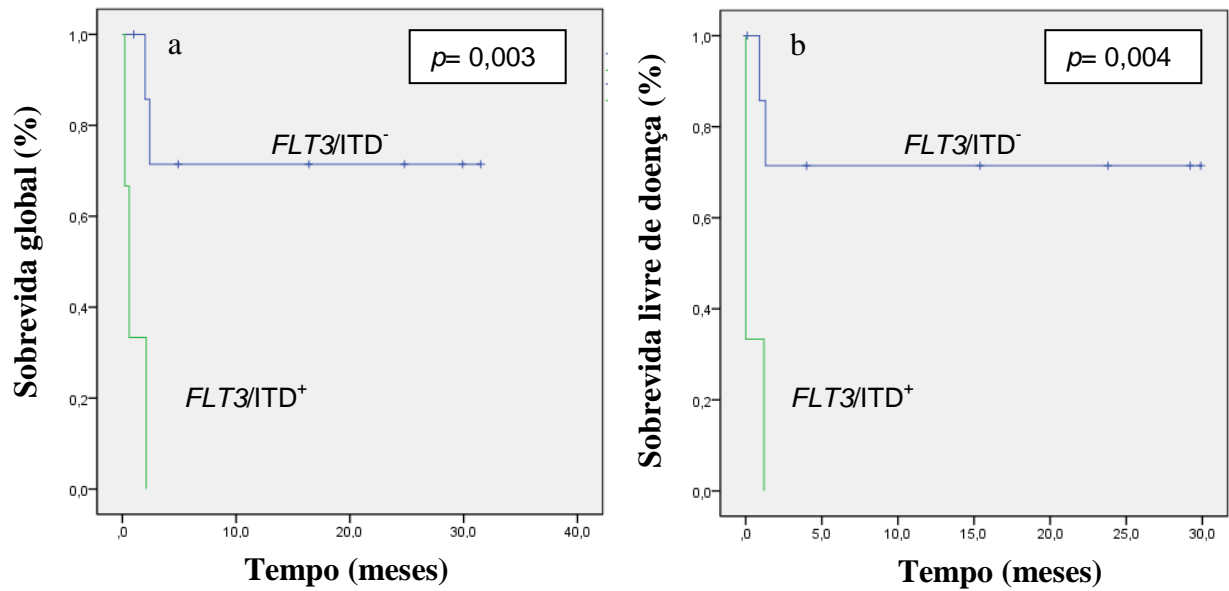
trato respiratório e hemorragia pulmonar, e os outros três foram a óbito logo após a indução, dois por choque séptico e um por hemorragia decorrentes da aplasia medular. A mediana de seguimento do estudo foi de 20,6 meses e os seis pacientes, que alcançaram a RC, não apresentaram recaída morfológica ou molecular, pelo menos até a data da censura desse estudo. A média da SG foi de 16,8 meses (IC95%: 7,5-26,1) e a taxa de SG em dois anos foi de 51,1% (Figura 18).



**Figura 18: (a)** Sobrevida global (SG) dos 11 pacientes com LPA incluídos na análise de sobrevida.

Dos 11 pacientes incluídos na análise de sobrevida, três apresentaram mutação *FLT3/ITD*. Pacientes *FLT3/ITD*<sup>+</sup> apresentaram uma baixa SG em relação aos pacientes sem a mutação ( $p=0,003$ ), pacientes positivos apresentaram SG de 0,9 meses e pacientes *FLT3/ITD*<sup>-</sup> de 23,1 meses. Houve diferença estatística entre os grupos *FLT3/ITD*<sup>+</sup> e *FLT3/ITD*<sup>-</sup>, também, para a SLD ( $p=0,004$ ): pacientes positivos para essa mutação apresentaram SLD média de 0,4 meses, enquanto que pacientes negativos de 21,7 meses (Figura 19). Todos os pacientes sem a mutação *FLT3/ITD* alcançaram a remissão completa, enquanto que apenas

33,3% (1/3) dos pacientes *FLT3*/ITD<sup>+</sup> conseguiram alcançar a remissão completa ( $p=0,05$ ).



**Figura 19: (a)** Sobrevida global (SG) dos 11 pacientes LPA incluídos na análise de sobrevida segundo a mutação *FLT3*/ITD. **(b)** Sobrevida livre de doença (SLD) dos 11 pacientes LPA incluídos na análise de sobrevida segundo a mutação *FLT3*/ITD.

## 6. Discussão

O presente estudo caracterizou os pacientes com LMA *de novo* diagnosticados na fundação Hemope de acordo com dados clínico-laboratoriais e com o status dos gene *FLT3* e *NPM1*. Foi observada uma maior frequência do subtipo FAB M2, o que está de acordo com a maioria dos achados da literatura (Kiyoi *et al.*, 1999; Appelbaum *et al.*, 2006; Thiede *et al.*, 2006; Bacher *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Fasan *et al.*, 2013). No Brasil, entretanto, Rego e colaboradores (2003) relataram uma diferença na frequência dos subtipos FAB entre as cidades de Campinas e Teresina. Os nossos resultados estão de acordo com o relatado em Teresina, que é uma cidade do Nordeste brasileiro, a mesma região onde foi desenvolvido o nosso estudo, enquanto que discorda do relatado em Campinas - cidade que faz parte de outra região brasileira, o Sudeste - que demonstrou ter uma maior frequência do subtipo M4. As diferenças na composição étnica e de fatores ambientes podem explicar as diferenças nas frequências do subtipo FAB entre as regiões Nordeste e Sudeste.

A LPA apresentou uma frequência de 13% entre os 115 pacientes com LMA *de novo* do estudo, um valor próximo do relatado no Brasil. Segundo Lorand-Metze (2003), em todos os estudos brasileiros, exceto em um estudo realizado em Terezina (PI) que relatou uma frequência de 7,8%, referem uma frequência em torno de 20% para LPA, enquanto a literatura mundial refere uma frequência de 5 a 8%. Isso parece ser uma característica dos países de origem latina, pois trabalhos desenvolvidos com pacientes mexicanos (Ruiz-Arguelles *et al.*, 1997), com pacientes latinos de diversos países (Douer *et al.*, 2003) e com pacientes da Espanha (Sierra *et al.*, 2006) apresentaram frequência em torno de 17 a 30%.



As frequências dos rearranjos moleculares *RUNX1/RUNX1T1* e *CBFB/MYH11* estão de acordo com os relatos da literatura. O rearranjo *RUNX1/RUNX1T1* é detectado, pela técnica de PCR-RT, em cerca de 8 a 14% de todas as LMA *de novo* e em torno de 25% nas LMA M2 (Andrieu *et al.*, 1996; Langabeer *et al.* 1997a; Mitterbauer *et al.*, 1998), valores muito próximos do encontrado nesse trabalho. O mesmo acontece com o rearranjo *CBFB/MYH11*, que pela mesma técnica, é detectado em torno de 10% de todas as LMA *de novo* (Langabeer *et al.* 1997b), concordando com os 8% relatado no nosso estudo.

Os nossos resultados demonstraram uma realidade alarmante quanto à caracterização e o desfecho clínico dos pacientes com LMA, representado pelo baixo número de pacientes com risco citogenético determinado e a baixa sobrevida global e livre de doença e taxa de remissão completa e a alta taxa de recaída, comparadas com outras regiões do Brasil e com países desenvolvidos (Feneaux *et al.*, 1999; Krum *et al.*, 2009; Lucena-Araújo *et al.*, 2010; Mrozek *et al.*, 2012; Pezzi *et al.*, 2012; Ades *et al.*, 2013).

Apenas 50,4% dos pacientes tiveram seu risco citogenético determinado, o que, além de limitar as análises de sobrevida, prejudica o tratamento dos pacientes. Isso porque a citogenética é uma das ferramentas mais importantes para avaliação prognóstica e a partir dela pode-se fazer a orientação do protocolo terapêutico a ser seguido, sendo, por esse motivo, veementemente recomendada por grupos colaborativos multicêntricos e agências regulatórias como ferramenta para a estratificação de risco (Mrózek *et al.*, 2001, 2012; Vardiman *et al.*, 2009; Dohner *et al.*, 2010). Isso se torna ainda mais alarmante quando vemos que trabalhos desenvolvidos tanto no Sul e Sudeste do Brasil como em países desenvolvidos demonstram que o risco citogenético é determinado em cerca de

80 a 90% dos casos (Krum et al., 2009; Lucena-Araújo et al., 2010; Mrozek et al., 2012; Pezzi et al., 2012).

Dos pacientes com risco citogenético determinado, a maior frequência foi do grupo de risco favorável, seguido do risco intermediário e, por fim, o risco adverso. Este resultado está em desacordo com trabalhos americanos e de países europeus, que têm demonstrado maior frequência do grupo de risco intermediário, seguido do risco favorável e, em menor frequência, o risco adverso (Colovic et al., 2007; Koh et al., 2009; Appelbaum et al., 2006; Mrozek et al., 2012), entretanto, está de acordo com outro trabalho brasileiro que avaliou 169 pacientes com LMA (Lucena-Araújo et al., 2010). O grupo LMA-CN representou 31,2% dos pacientes, valor que está de acordo com a literatura geral, que relata uma frequência em torno de 40% entre as LMA *de novo* (Grimwade et al., 2010).

O desfecho clínico desfavorável dos pacientes não-LPA demonstrado nesse estudo também tem sido relatado por outros trabalhos brasileiros (Pagnano et al., 2000; Rego et al., 2003; Capra et al., 2007) e é contrastante com os melhores resultados obtidos em países desenvolvidos (Moore et al., 2005; Petersdorf et al., 2007; Burnett et al., 2011). Enquanto demonstramos uma alta mortalidade precoce e uma SG e SLD estimada em quatro anos de 25% e 7,6%, respectivamente, e uma TRC e TR de 55% e 70,4%, respectivamente, países desenvolvidos tem demonstrado uma SG e SLD estimada em cinco anos em torno de 40-60% e 30%, respectivamente, e TRC e TR em torno de 70% e 20%, respectivamente (Moore et al., 2005; Petersdorf et al., 2007; Burnett et al., 2011).

O desfecho clínico dos pacientes com LPA do nosso estudo foi mais favorável, sendo observada uma taxa de remissão completa de 81,8%, semelhante ao relatado na literatura, inclusive de países desenvolvidos, que

demonstram uma TRC entre 80 e 99% (Pagnano *et al.*, 2000; Feneaux *et al.*, 1999; Ades *et al.*, 2013; Rego *et al.*, 2013). A taxa de morte durante a indução foi de 18,2%, de acordo com o relatado em outros trabalhos brasileiros, que demonstraram uma taxa de 15% a 32% (Jácomo *et al.*, 2007; Rego *et al.*, 2013), entretanto inferior a de países desenvolvidos, que demonstram uma taxa entre 5 a 10% (Feneaux *et al.*, 1999; Adés *et al.*, 2010; Sanz *et al.*, 2010; Adés *et al.*, 2013). Houve, entretanto, uma baixa sobrevida global, com taxa de SG em dois anos de 51,1%, em contraste à SG estimada em 2 a 7 anos dos países desenvolvidos, que gira em torno de 80% (Feneaux *et al.*, 1999; Ades *et al.*, 2013). Vale ressaltar, entretanto, que o número de pacientes com LPA incluídos no estudo de sobrevida foi pequeno, apenas 11, o que limita a análise estatística.

Por se tratarem de unidades públicas de saúde em um país em desenvolvimento, é inevitável discutir a influência de fatores socioeconômicos e relativos aos recursos disponíveis sobre esse desfecho negativo do tratamento de pacientes com LMA. Sabe-se que dentre os diversos fatores que possam vir a interferir num determinado tratamento, o tempo do diagnóstico e as condições oferecidas são de grande importância e estão relacionados às condições socioeconômicas de um país. Fagundes *et al.* (2006) avaliando pacientes LMA tratados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFGM) encontraram baixa SG e alta mortalidade precoce e discutiram a cerca da associação entre o desfecho desfavorável e os menores índices de desenvolvimento humano (IDH) do Brasil em relação aos países desenvolvidos, que são estabelecidos em função dos critérios de longevidade, escolaridade e padrões habitacionais. Diante desse quadro desfavorável do tratamento e

acompanhamento dos pacientes com LMA no Brasil, vê-se a necessidade de iniciativas colaborativas multicêntricas para tentar reverter esse quadro.

Entre os pacientes LMA não-LPA, mutações *FLT3*/ITD foram detectadas em 22% dos pacientes e está de acordo com trabalhos estrangeiros (Whitman *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2004; Colovic *et al.*, 2007; Gale *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011; Rockova *et al.*, 2011) e brasileiros (Krum *et al.*, 2009; Lucena-Araújo *et al.*, 2010), que relatam uma frequência entre 17 e 28%.

Pacientes LPA apresentaram uma alta frequência (40%) de mutações *FLT3*/ITD, valor que está de acordo com o relatado em estudos europeus, que demonstram uma frequência em torno de 32 a 38% (Kainz *et al.*, 2002; Noguera *et al.*, 2002; Callens *et al.*, 2005; Kuchenbauer *et al.*, 2005; Beitinjane *et al.*, 2010). Entretanto, este resultado está em desacordo com um trabalho brasileiro desenvolvido com pacientes da cidade de Campinas-SP, que demonstrou uma frequência dessas mutações de apenas 10,5% entre os pacientes LPA (De Mello *et al.*, 2012).

Mutações no *NPM1* também apresentaram concordância com a literatura, foram as mais frequentes e estiveram presentes em 24% dos pacientes não-LPA, de acordo com os 27 a 30% relatado na literatura (Falini *et al.*, 2005, 2007; Park *et al.*, 2011; Rockova *et al.*, 2011). Mutações no gene *NPM1* são mais frequentemente observadas no grupo de LMA-CN, neste grupo apresentam uma frequência em torno de 40% (Falini *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006; Pratcorona *et al.*, 2013), valor semelhante ao encontrado neste trabalho (35,3%).

Mutação no gene *NPM1* foi detectada em apenas um paciente LPA (6,7%). Trabalhos desenvolvidos na Alemanha (Oelschlaegel *et al.*, 2009), na Coreia (Hong *et al.*, 2011), na China (Yin *et al.*, 2013) e no Brasil (De Mello *et al.*,

2012) tem demonstrado a ausência da detecção dessas mutações em pacientes LPA, entretanto, um trabalho desenvolvido na Índia (Ghosh *et al.*, 2012) relatou uma frequência de 32,6% das mutações *NPM1* em pacientes LPA.

A baixa frequência da mutação *FLT3*/TKD entre os pacientes LMA, relatado em nosso estudo, está discordante da literatura estrangeira, que relata uma frequência em torno de 8 a 12% entre os pacientes com LMA (Small, 2006; Whitman *et al.*, 2008). Porém, estudos brasileiros tem demonstrado uma baixa frequência dessa mutação, de 0,6 a 3,8%, entre os pacientes com LMA *de novo* (Emereciano *et al.*, 2008; Chauffaille *et al.*, 2010; Lucena-Araújo *et al.*, 2010). Isso sugere que a nossa população possa, de fato, apresentá-las em menor frequência como consequência de background genético diferenciado.

De todas as variáveis analisadas para os pacientes não-LPA, as mutações *FLT3*/ITD foram relacionadas, somente, com alta contagem de leucócitos ( $p= 0,021$ ), o que está de acordo com a literatura (Kiyoi *et al.*, 1999; Andersson *et al.*, 2004; Meshinchi *et al.*, 2006; Colovic *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011), entretanto, as mutações *FLT3*/ITD estão frequentemente associadas, também, com alta porcentagem de blastos na MO e no SP (Meshinchi *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011) e tendem a apresentar maior frequência no grupo LMA-CN (Schnittger *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2011), o que não foi descrito neste trabalho.

Não foi observada diferença entre os grupos *FLT3*/ITD<sup>+</sup> e *FLT3*/ITD<sup>-</sup> em nenhuma das variáveis analisadas, quando estudados os pacientes LPA. Um trabalho brasileiro (De Mello *et al.*, 2012) e um americano (Singh *et al.*, 2010), analisando um pequeno número de pacientes LPA, também não encontraram diferença para as mesmas variáveis do nosso estudo entre os grupos com e sem

mutações *FLT3*/ITD. Entretanto, a literatura relata que mutações *FLT3*/ITD estão relacionadas com alta contagem de leucócitos, em pacientes LPA (Noguera *et al.*, 2002; Callens *et al.*, 2005; Gale *et al.*, 2005; Beitinjane *et al.*, 2010).

As mutações no gene *NPM1* foram mais frequentes no grupo de cariótipo normal ( $p=0,008$ ), em relação aos outros achados citogenéticos, e em pacientes com mais de 60 anos ( $p=0,01$ ) e estiveram relacionadas com alta contagem de leucócitos ( $p=0,012$ ), o que tem sido constantemente reafirmado na literatura (Dohner *et al.*, 2005; Falini *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006; Falini *et al.*, 2007; Haferlach *et al.*, 2009). Não foi encontrada relação com outras variáveis estudadas, entretanto, Dohner *et al.* (2005), Thiede *et al.* (2006) e Falini *et al.* (2007) observaram que as mutações *NPM1* estavam relacionadas, também, com alta contagem de blastos na MO e que apresentavam maior prevalência no sexo feminino.

A frequência do genótipo ITD<sup>+</sup>/*NPM1*<sup>mut</sup>, entre os pacientes não-LPA, foi inferior ao relatado na literatura, apenas 7% dos pacientes apresentaram ambas as mutações, enquanto que a maioria dos trabalhos relatam uma frequência em torno de 20 a 30% (Baldus *et al.*, 2007; Falini *et al.*, 2007; Haslam *et al.*, 2010).

Pacientes LPA com mutações *FLT3*/ITD demonstraram piores SG média, SLD média e TRC em relação aos pacientes *FLT3*/ITD<sup>-</sup>. Diversos autores relataram que pacientes com LPA *FLT3*/ITD<sup>+</sup> apresentaram piores SG e SLD em relação aos pacientes sem a mutação, mas que não houve diferença entre as TRC, enquanto que o nosso estudo demonstrou pior TRC nos pacientes com a mutação (Au *et al.*, 2004; Callens *et al.*, 2005; Kuchenbauer *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010). Vale ressaltar, entretanto, que o presente estudo apresenta algumas

limitações, como baixo número de pacientes envolvidos e baixo tempo de seguimento.

Mesmo com essas limitações, nosso estudo reforça a ideia do efeito negativo das mutações *FLT3*/ITD no desfecho dos pacientes LPA. Enquanto a maioria dos pacientes com LPA têm uma excelente sobrevida devido à terapia LPA específica, 20-30% dos pacientes ainda recaem ou deixam de atingir a remissão completa. Nos últimos anos foram aplicados protocolos de tratamento incorporando a terapia risco adaptada usando contagem de leucócitos e plaquetas, no momento do diagnóstico, como uma ferramenta de estratificação do risco. Atualmente, mutações *FLT3*/ITD tem se mostrado ferramentas úteis para a estratificação de risco para os pacientes LPA, mas se o *status* das mutações *FLT3*/ITD pode ser incorporado em algoritmos de terapia de risco adaptada, essa é uma pergunta que precisa ser respondida em ensaios clínicos prospectivos (Beitinjane et al., 2010).

Em relação aos pacientes não-LPA, entretanto, as mutações *FLT3*/ITD não demonstraram impacto nas SG, SLD, TRC e TR. Haslan et al. (2010), analisando um pequeno número de pacientes em um curto tempo de seguimento, também não encontraram diferença estatística para a SG dos pacientes com e sem mutação *FLT3*/ITD. Contudo, a literatura tanto brasileira quanto estrangeira constantemente reafirma a implicação negativa das mutações *FLT3*/ITD no desfecho dos pacientes LMA (Meshinchi et al., 2006; Colovic et al., 2007; Lucena-Araujo et al., 2009; Beitinjane et al., 2010; Ghosh et al., 2012; Kutny et al., 2012). Além de estar constantemente relacionada com baixa SG, alguns autores tem relatado a associação de mutações *FLT3*/ITD com morte precoce (Kutny et al.,

2012), baixa taxa de remissão completa (Colovic *et al.*, 2007) e baixa sobrevida livre de doença (Meshinchi *et al.*, 2006).

À semelhança das mutações *FLT3*/ITD, mutações no gene *NPM1* também não apresentaram impacto no prognóstico de pacientes não-LPA, uma vez que, não foram observadas diferença na SG, SLD, TRC e TR entre os grupos com e sem a mutação. Diversos autores têm demonstrado que mutações no gene *NPM1* estão relacionadas com uma SG e SLD maior do que a dos pacientes sem mutações quando avaliado os pacientes LMA-CN, mas que não apresentam diferenças nas SG e SLD na LMA não selecionada (Dohner *et al.*, 2005; Schnittger *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006; Haferlach *et al.*, 2009). Por isso, avaliamos a SG entre os grupos com e sem a mutação no gene *NPM1* entre as LMA-CN e, também, não foi observado diferença entre as SG e SLD. Wang *et al.* (2010) analisando apenas 76 pacientes LMA-CN, também não encontrou diferença estatística para a SG entre esses grupos.

Avaliamos o prognóstico dos pacientes não-LPA de acordo com o *status* dos genótipos ITD/*NPM1*, mas também não foi observada diferença quanto ao desfecho clínico entre os genótipos analisados. Esses resultados estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Haslam *et al.* (2010), que analisou apenas 44 pacientes com LMA e também não encontraram diferença na SG entre os grupos de genótipos ITD/*NPM1*. Entretanto, vale ressaltar que alguns autores relatam que aqueles pacientes que apresentam *FLT3*/ITD<sup>+</sup> e *NPM1*<sup>wt</sup> tem pior SG, do que aqueles com *FLT3*/ITD<sup>+</sup> e *NPM1*<sup>mut</sup> ou *FLT3*/ITD<sup>-</sup> e *NPM1*<sup>wt</sup> e piores ainda do que aqueles com *FLT3*/ITD<sup>-</sup> e *NPM1*<sup>mut</sup> (Mrózek *et al.*, 2007; Gale *et al.*, 2008). Diversos autores têm demonstrado, ainda, que mutações no gene *NPM1* na ausência de *FLT3*/ITD são um fator prognóstico independente favorável para a



remissão completa, SLD e SG em relação aos outros genótipos (Dohner *et al.*, 2005; Schnittger *et al.*, 2005; Thiede *et al.*, 2006).

A análise das mutações *FLT3*/ITD e *NPM1* em associado tem se mostrado uma ferramenta importante para o prognóstico de pacientes com LMA e é considerada uma análise mínima para a decisão do protocolo terapêutico a ser seguido (Baldus *et al.*, 2007; Dohner *et al.*, 2010; Kutny *et al.*, 2012). Pacientes com mutações *FLT3*/ITD e sem mutações no gene *NPM1* se beneficiam com um transplante alogeneico realizado durante a primeira remissão completa, enquanto que pacientes *NPM1*<sup>mut</sup> e sem mutações *FLT3*/ITD parecem não se beneficiar com o transplante alogeneico, sendo indicado, nesses casos, apenas a quimioterapia convencional (Schlenk *et al.*, 2008).

O fato de as mutações *FLT3*/ITD e *NPM1* não terem apresentado importância no prognóstico dos pacientes LMA não-LPA do nosso estudo não diminui a importância desses marcadores para a avaliação prognóstica da LMA. Esse fato pode ser decorrente do baixo tempo de seguimento do estudo, com mediana de 16,2 meses, do baixo número de pacientes, apenas 52, e da deficiente caracterização citogenética. Vale ressaltar que a pesquisa de mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* tem se mostrado uma ferramenta útil para a estratificação de risco de pacientes com LMA, apresentado destaque na pesquisa, na prática clínica e nas agências regulatórias (Dohner *et al.*, 2010; Kutny *et al.*, 2012). A deficiente caracterização citogenética e o pior desfecho dos pacientes com LMA da nossa instituição demonstra, ainda, a importância de se investir na melhoria da assistência dada a esses pacientes e a necessidade de iniciativas colaborativas multicêntricas a fim de melhorar o quadro da LMA no Brasil e, em especial, no nosso Estado.

## 7. Conclusões

1. As frequências das mutações *FLT3*/ITD e no gene *NPM1* na LMA estão de acordo com a literatura.
2. A baixa frequência das mutações *FLT3*/TKD na LMA é semelhante ao relatado na literatura brasileira, mas está em desacordo com estudos de países desenvolvidos.
3. As mutações *FLT3*/ITD e no gene *NPM1* estão relacionadas com alta contagem de leucócitos e, além disso, mutações no gene *NPM1* são mais frequentes em pacientes com mais de 60 anos e no grupo de cariótipo normal.
4. Os resultados comprovam o valor preditivo da mutação *FLT3*/ITD para um curso clínico desfavorável na LPA do adulto, entretanto, para os pacientes não-LPA, as mutações *FLT3*/ITD e no gene *NPM1*, aparentemente, não apresentaram o mesmo impacto prognóstico.
5. Os resultados mostraram um pior desfecho dos pacientes em relação aos países desenvolvidos, chamando a atenção para a necessidade de iniciativas colaborativas na tentativa de reverter esse quadro.

## 8. Referências Bibliográficas

- Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT (2001) Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 113: 983-988
- Adès L, Chevret S, Raffoux E, Guerci-Bresler A, Pigneux A, Vey N, Lamy T, Huguet F, Vekhoff A, Lambert JF *et al.* (2013) Long term follow up of European APL 2000 trial, evaluating the role of cytarabine combined with ATRA and daunorubicin in the treatment of non elderly APL patients. *Am J Hematol* doi: 10.1002/ajh.23451. [Epub ahead of print]
- Adès L, Guerci A, Raffoux E, Sanz M, Chevallier P, Lapusan S, Recher C, Thomas X, Rayon C, Castaigne S (2010) Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience. *Blood* 115: 1690-1696
- Agnès F, Shamoon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D e Galibert F (1994) 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* 145: 283-288
- Alcalay M, Orleth A, Sebastiani C, Meani N, Chiaradonna F, Casciari C, Scirpi MT, Gelmetti V, Riganelli D, Menucci S (2001) Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene* 20: 5680-5694
- Andersson A, Johansson B, Lassen C, Mitelman F, Billström R e Fioretos T (2004) Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. *European Journal of Haematology* 72: 307–313
- Andrieu V, Radford-Weiss I, Troussard X, Chane C, Valensi F, Guesnu M, Haddad E, Viguier F, Dreyfus F, Varet B *et al.* (1996) Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. *Br J Haematol* 92: 855-865
- Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, Anderson JE e Petersdorf SH (2006) Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 107: 3481-3485
- Au WY, Fung A, Chim CS, Lie AK, Liang R, Ma ES, Chan CH, Wong KF, Kwong YL (2004) FLT-3 aberrations in acute promyelocytic leukaemia: clinicopathological associations and prognostic impact. *Br J Haematol* 125: 463-469
- Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. (2008) Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. *Blood* 111: 2527-2537
- Bacher U, Badbaran A, Fehse B, Zabelina T, Zander AR, Kröger N (2009) Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 37: 135-142
- Bacher U, Haferlach T, Fehse B, Schnittger S, Kröger N (2011) Minimal residual disease diagnostics and chimerism in the post-transplant period in acute myeloid leukemia. *ScientificWorldJournal* 11: 310-319
- Baldus CD, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD (2007) Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected

- by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol.* 137: 387-400
- Beitinjaneh A, Jang S, Roukoz H, Majhail NS (2010) Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: A systematic review. *Leuk Res* 34: 831–836.
- Belson M, Kingsley B e Holmes A (2007) Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environ Health Perspect* 115: 138-145
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR e Sultan C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33: 451-458
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick Hr E Sultan C (1985) Criteria for the Diagnosis of Acute Leukemia of Megakaryocyte Lineage (M7): A Report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 460-462
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR e Sultan C (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 78: 325-329
- Bolli N, Nicoletti I, De Marco MF, Bigerna B, Pucciarini A, Mannucci R, Martelli MP, Liso A, Mecucci C, Fabbiano F (2007) Born to be exported: COOH-terminal nuclear export signals of different strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin leukemic mutants. *Cancer Res* 67: 6230-6237
- Braoudaki M, Papathanassiou C, Katsibardi K, Tourkadoni N, Karamolegou K, Tzortzatou-Stathopoulou F (2010) The frequency of NPM1 mutations in childhood acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 3: 41
- Büchner T, Schlenk RF, Schaich M, Döhner K, Krah R, Krauter J, Heil G, Krug U, Sauerland MC, Heinecke A (2012) Acute Myeloid Leukemia (AML): different treatment strategies versus a common standard arm--combined prospective analysis by the German AML Intergroup. *J Clin Oncol* 30: 3604-3610
- Bullinger L e Armstrong SA (2010) HELP for AML: Methylation Profiling Opens New Avenues. *Cancer Cell* 17: 1-3
- Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell NH, Yin JA, Hunter A, Goldstone AH, Wheatley K (2011) Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *J Clin Oncol* 29: 369-377
- Callens C, Chevret S, Cayuela JM, Cassinat B, Raffoux E, de Botton S, Thomas X, Guerzi A, Fegueux N, Pigneux A *et al.* (2005) Prognostic implication of FLT3 and Ras gene mutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL Group. *Leukemia* 19:1153–1160
- Capra M, Vilella L, Pereira WV, Coser VM, Fernandes MS, Schilling MA, Almeida D, Gross M, Leite M, Hellwig T *et al.* (2007) Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia between 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. *Leuk Lymphoma* 48: 2381-2386
- Carvalho QGS, Pedrosa WA e Sebastião QP (2011) Leucemia mieloide aguda versus ocupação profissional: perfil dos trabalhadores atendidos no Hospital de Hematologia de Recife. *Rev Esc Enferm USP*, 45(6):1446-51
- Chauffaille ML, Borri D, Proto-Siqueira R, Moreira ES, Alberto FL (2008) Acute promyelocytic leukemia with t(15;17): frequency of additional clonal

- chromosome abnormalities and FLT3 mutations. *Leuk Lymphoma* 49: 2387-2389
- Chomczynski P e Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem* 162: 156-159
- Colovic N, Tosic N, Aveic S, Djuric M, Milic N, Bumbasirevic V, Colovic M, Pavlovic S (2007) Importance of early detection and follow-up of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 86: 741-747
- Davis LG, Dibner MD and Battey JF (1986) *Basic Method in Molecular Biology*. Elsevier, Londres, 388pp
- De Lourdes Chauffaille M, Borri D, Proto-Siqueira R, Moreira ES, Alberto FL (2008) Acute promyelocytic leukemia with t(15;17): frequency of additional clonal chromosome abnormalities and FLT3 mutations. *Leuk Lymphoma.* 49: 2387-2389.
- De Mello MR, Albuquerque DM, Pereira-Cunha FG, Albanez KB, Pagnano KB, Costa FF, Metze K, Lorand-Metze I (2012) Molecular characteristics and chromatin texture features in acute promyelocytic leukemia. *Diagn Pathol* 7:75
- Deschler B e Lübbert M (2006) Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 107: 2099-2107
- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H (2005) Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106: 3740-3746
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA *et al.* (2010) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115: 453-474
- Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F *et al.* (1999) Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13: 1901–1928
- Douer D (2003) The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 16: 357-367
- Dutcher JP, Schiffer CA e Wiernik PH (1987) Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: impact on remission rate and duration, and survival. *J Clin Oncol* 5: 1364-1372.
- Emerenciano M, Menezes J, Vasquez ML, Zalcborg I, Thuler LC, Pombo-de-Oliveira MS (2008) Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia. *Leuk Lymphoma* 49: 2291-2297
- Estey EH (2012) Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 87: 89-99
- Estey EH (2013) Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* 88: 318-327
- Fagundes EM, Rocha V, Glória AB, Clementino NC, Quintão JS, Guimarães JP, Pedroso ER, Viana MB (2006) De novo acute myeloid leukemia in adults younger than 60 years of age: socioeconomic aspects and treatment results in a Brazilian university center. *Leuk Lymphoma* 47: 1557-1564

- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A *et al.* (2005) Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J of Med* 352: 254-266
- Falini B, Martelli MP, Bolli N, Bonasso R, Ghia E, Pallotta MT, Diverio D, Nicoletti I, Pacini R, Tabarrini A *et al.* (2006) Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 108: 1999-2005
- Falini B, Albiero E, Bolli N, De Marco MF, Madeo D, Martelli M, Nicoletti I, Rodeghiero F (2007) Aberrant cytoplasmic expression of C-terminal-truncated NPM leukaemic mutant is dictated by tryptophans loss and a new NES motif. *Leukemia*. 21: 2052-2054
- Falini B, Tiacci E, Martelli MP, Ascani S e Pileri SA. (2010) New classification of acute myeloid leukemia and precursor-related neoplasms: changes and unsolved issues. *Discov Med* 10: 281-292
- Falini B, Martelli MP, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E, Haferlach T (2011) Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood* 117: 1109-1120
- Fasan A, Alpermann T, Haferlach C, Grossmann V, Roller A, Kohlmann A, Eder C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S (2013) Frequency and prognostic impact of CEBPA proximal, distal and core promoter methylation in normal karyotype AML: a study on 623 cases. *PLoS One* 8(2): e54365. doi: 10.1371/journal.pone.0054365
- Fenaux P, Chastang C, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Archimbaud E, Fey M, Rayon C, Huguet F, Sotto JJ (1999) A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 94: 1192-1200
- Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, Racevskis J, Dewald GW, Ketterling RP, Bennett JM *et al.* (2009) Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 361: 1249-1259
- Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K; (2002) 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* 100: 4372-4380
- Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF, Nugent E, Mills KI, Wheatley K, Solomon E *et al.* (2005) Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 106: 3768-3776
- Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC (2008) 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* 111: 2776-2784
- Ghosh K, Swaminathan S, Madkaikar M, Gupta M, Kerketta L, Vundinti B (2012) FLT3 and NPM1 mutations in a cohort of AML patients and detection of a novel mutation in tyrosine kinase domain of FLT3 gene from Western India. *Ann Hematol* 91: 1703-1712
- Gilliland DG e Griffin JD (2002) The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100: 1532-1542

- Greenwood MJ, Seftel MD, Richardson C, Barbaric D, Barnett MJ, Bruyere H, Forrest DL, Horsman DE, Smith C, Song K *et al.* (2006) Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 47: 1245-1252.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ e Burnett AK (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 116: 354-365.
- Grisolano JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ (1997) Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* 89: 376-387
- Grummitt CG, Townsley FM, Johnson CM, Warren AJ, Bycroft M (2008) Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 283: 23326-23332
- Haerlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, Testoni N, Rege-Cambrin G, Santucci A, Vignetti M (2009) AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood* 114: 3024-3032
- Haslam K, Chadwick N, Kelly J, Browne P, Vandenberghe E, Flynn C, Conneally E, Langabeer SE (2010) Incidence and significance of FLT3-ITD and NPM1 mutations in patients with normal karyotype acute myeloid leukaemia. *Ir J Med Sci* 179: 507-510
- He LZ, Tribioli C, Rivi R, Peruzzi D, Pelicci PG, Soares V, Cattoretti G e Pandolfi PP (1997) Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 5302-5307
- Heerema-Mckenney A e Arber DA (2009) Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 23: 633-654
- Higuchi M, O'brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ e Downing JR (2002) Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 1: 63-74
- Hong SD, Kim YK, Kim HN, Lee SR, Ahn JS, Yang DH, Lee JJ, Lee IK, Shin MG, Kim HJ (2011) Treatment outcome of all-trans retinoic acid/anthracycline combination chemotherapy and the prognostic impact of FLT3/ITD mutation in acute promyelocytic leukemia patients. *Korean J Hematol* 46: 24-30
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z *et al* (2012) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Disponível em: <[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2009\\_pops09/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/)> Acessado em janeiro de 2012
- Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2011) Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 118p
- Jácomo RH, Figueiredo-Pontes LL e Rego EM (2008) Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da Leucemia Promielocítica Aguda. *Rev Assoc Med Bras* 54: 82-89

- Jácomo RH, Melo RA, Souto FR, de Mattos ER, de Oliveira CT, Fagundes EM, Bittencourt HN, Bittencourt RI, Bortolheiro TC, Paton EJ (2007) Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines. *Haematologica* 92: 1431-1432
- Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A e Höglund M (2009) Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*, 113: 4179-4187
- Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzingen I, Sperr W, Le T, Weltermann A, Fonatsch C, Haas OA, Mannhalter C, Lechner K, Jaeger U (2002) Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol J* 3: 283-289
- Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C *et al.* (1999) Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 93: 3074-3080
- Koh Y, Park J, Ahn KS, Kim I, Bang SM, Lee JH, Yoon SS, Soon Lee D, Yiul Lee Y *et al.* (2009) 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* 88: 1089-1097
- Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, Wadleigh M, DeAngelo DJ, Stone RM, Sakamaki H *et al.* (2009) Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*. 30: 2349-2361
- Krum EA, Yamamoto M e Chauffaille Mde L (2009) Prevalence of FMS-like tyrosine kinase 3/internal tandem duplication (FLT3/ITD+) in de novo acute myeloid leukemia patients categorized according to cytogenetic risk. *Sao Paulo Med J* 127: 23-27
- Kuchenbauer F, Schoch C, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S (2005) Impact of FLT3 mutations and promyelocytic leukaemia-breakpoint on clinical characteristics and prognosis in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 130:196–202
- Kutny MA, Moser BK, Laumann K, Feusner JH, Gamis A, Gregory J, Larson RA, Powell BL, Stock W, Willman CL *et al.* (2012) FLT3 mutation status is a predictor of early death in pediatric acute promyelocytic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 59: 662-667.
- Langabeer SE, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Wheatley K, Swirsky D, Goldstone AH, Linch DC (1997a) Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. MRC Adult Leukaemia Working Party. *Br J Haematol* 99: 925-958
- Langabeer SE, Walker H, Gale RE, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC (1997b) Frequency of CBF beta/MYH11 fusion transcripts in patients entered into the U.K. MRC AML trials. *Br J Haematol* 96: 736-739
- Levis M, Murphy KM, Pham R, Kim KT, Stine A, Li L, McNiece I, Smith BD, Small D (2005) Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells. *Blood*. 106: 673-680



- Lindström MS (2011) NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem Res Int* 2011:195209 doi: 10.1155/2011/195209. Epub 2010 Oct 5.
- Look AT (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278: 1059-1064
- Lorand-Metze I (2003) The treatment of Acute Myeloid Leukemia in Brazil: how far have we already advanced and what can we improve? *Rev Bras Hematol Hemoter* 25: 1-2
- Lucena-Araujo AR, Souza DL, Morato de Oliveira F, Benicio MT, Figueiredo-Pontes LL, Santana-Lemos BA, dos Santos GA, Jacomo RH, Dinarte-Santos AR, Yamamoto M, Silva-Jr WA, de Lourdes Chauffaille M, Rego EM (2010) Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 89:225-228
- Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, Bernstein ID, Radich JP (2001) Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 97: 89-94
- Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL, Zwaan M, Zimmerman M, Reinhardt D, Kaspers GJ, Heerema NA, Gerbing R, Lange BJ *et al.* (2006) Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 108: 3654-3661
- Mitterbauer M, Kusec R, Schwarzingen I, Haas OA, Lechner K, Jaeger U (1998) Comparison of karyotype analysis and RT-PCR for AML1/ETO in 204 unselected patients with AML. *Ann Hematol* 76: 139-143
- Moore JO, George SL, Dodge RK, Amrein PC, Powell BL, Kolitz JE, Baer MR, Davey FR, Bloomfield CD, Larson RA, Schiffer CA (2005) Sequential multiagent chemotherapy is not superior to high-dose cytarabine alone as postremission intensification therapy for acute myeloid leukemia in adults under 60 years of age: Cancer and Leukemia Group B Study 9222. *Blood*. 105: 3420-3427
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263: 1281-1284
- Mrozek K, Heinonen K e Bloomfield CD (2001) Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14: 19-47
- Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP e Bloomfield CD (2007) 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* 109: 431-448
- Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, Metzeler KH, Schwind S, Wu YZ, Kohlschmidt J (2012) Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 30: 4515-4523
- Mukda E, Pintaraks K, Sawangpanich R, Wiangnon S, Pakakasama S (2011) FLT3 and NPM1 gene mutations in childhood acute myeloblastic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 12: 1827-1831
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S (1996) Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10: 1911-1918

- Nishimura Y, Ohkubo T, Furuichi Y, Umekawa H (2002) Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 2239-2242
- Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, Avvisati G, Pinazzi MB, Petti MC, Mandelli F *et al.* (2002) 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* 16: 2185-2189
- Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, Lavorgna S, Divona M, Buccisano F, Amadori S, Mecucci C, Falini B, Lo-Coco F (2005) Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 19: 1479-1482
- Oelschlaegel U, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Kroschinsky F, Illmer T, Ehninger G, Thiede C (2009) HLA-DRneg patients without acute promyelocytic leukemia show distinct immunophenotypic, genetic, molecular, and cytomorphic characteristics compared to acute promyelocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 76: 321-327
- Pagnano KB, Traina F, Takahashi T, Oliveira GB, Rossini MS, Lorand-Metze I, Vigorito AC, Miranda EC, De Souza CA (2000) Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. *Sao Paulo Med J.* 118: 173-178
- Park SH, Chi HS, Min SK, Cho YU, Jang S, Park CJ, Lee JH, Lee JH, Lee KH, Im HJ, Seo JJ. (2011) Prognostic significance of the FLT3 ITD mutation in patients with normal-karyotype acute myeloid leukemia in relapse. *Korean J Hematol* 46: 88-95.
- Petersdorf SH, Rankin C, Head DR, Terebello HR, Willman CL, Balcerzak SP, Karnad AB, Dakhil SR, Appelbaum FR (2007) Phase II evaluation of an intensified induction therapy with standard daunomycin and cytarabine followed by high dose cytarabine for adults with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study (SWOG-9500). *Am J Hematol* 82: 1056-1062
- Pezzi A, Moraes L, Valim V, Amorin B, Melchiades G, Oliveira F, da Silva MA, Matte U, Pombo-de-Oliveira MS, Bittencourt R, *et al.* (2012) DNMT3A Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia in South Brazil. *Adv Hematol* 2012:697691. doi: 10.1155/2012/697691
- Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, Leoni F, Ciolli S, Guglielmelli P, Antonioli E, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM (2006) The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 20: 2074-2076
- Porcu P, Cripe LD, Ng EW, Bhatia S, Danielson CM, Orazi A e McCarthy LJ (2000) Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: a review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leuk Lymphoma* 39: 1-18
- Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, Escoda L, Guàrdia R, Queipo de Llano MP, Salamero O (2013) Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood* 121: 2734-2738
- Puumala SE, Ross JA, Aplenc R, Spector LG (2013) Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 60: 728-733.

- Rau R e Brown P (2009) Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* 27: 171-181
- Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ (1996) The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* 87: 882-886
- Rego EM, Kim HT, Ruiz-Argüelles GJ, Undurraga MS, Uriarte Mdel R, Jacomo RH, Gutiérrez-Aguirre H, Melo RA, Bittencourt R, Pasquini R, *et al.* (2013) Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. *Blood* 121: 1935-1943
- Rego MF, Pinheiro GS, Metze K, Lorand-Metze I (2003) Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 36: 331-337
- Rockova V, Abbas S, Wouters BJ, Erpelinck CA, Beverloo HB, Delwel R, van Putten WL, Löwenberg B e Valk PJ (2011) Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. *Blood* 118: 1069-1076
- Ruiz-Argüelles GJ (1997) Promyelocytic leukemia in Mexican Mestizos. *Blood* 89: 348-349
- Sandler, DP e Ross, JA (1997) Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol* 24: 3-16
- Santos FP, Jones D, Qiao W, Cortes JE, Ravandi F, Estey EE, Verma D, Kantarjian H, Borthakur G (2011) Prognostic Value of FLT3 Mutations Among Different Cytogenetic Subgroups in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer* 117: 2145–2155
- Sanz MA, Montesinos P, Rayón C, Holowiecka A, de la Serna J, Milone G, de Lisa E, Brunet S, Rubio V, Ribera JM (2010) Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia based on all-trans retinoic acid and anthracycline with addition of cytarabine in consolidation therapy for high-risk patients: further improvements in treatment outcome. *Blood* 115: 5137-5146
- Schlenk RF, Benner A, Krauter J, Buchner T, Sauerland C, Ehninger G, Schaich M, Mohr B, Niederwieser D, Krah R *et al.* (2004) Individual Patient Data–Based Meta-Analysis of Patients Aged 16 to 60 Years With Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *American Society of Clinical Oncology* 22: 3741-3750
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A *et al.* (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358: 1909-1918
- Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, Schneider S, Dufour A, Benthous T, Mellert G, Zellmeier E, Bohlander SK, Feuring-Buske M *et al.* (2009) NPM1 but not FLT3-ITD mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 113: 5250-5253
- Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T *et al.* (2002) Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and

- usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100: 59-66
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B (2005) Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 106: 3733-3739
- Sierra M et al. (2006) Geographic differences in the incidence of cytogenetic abnormalities of acute myelogenous leukemia (AML) in Spain. *Leuk Res* 30: 943-948
- Singh H, Werner L, Deangelo D, Ballen K, Amrein P, Wadleigh M, Neuberg D, Fox E, Stone R, Attar E. (2010) Clinical outcome of patients with acute promyelocytic leukemia and FLT3 mutations. *Am J Hematol* 85: 956-957
- Singh H, Asali S, Werner LL, DeAngelo DJ, Ballen KK, Amrein PC, Wadleigh M, Galinsky I, Neuberg DS, Fox EA, Stone RM, Attar EC (2011) Outcome of older adults with cytogenetically normal AML (CN-AML) and FLT3 mutations. *Leuk Res* 35: 1611-1615
- Small D (2006) FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 178-184
- Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP (2006) Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 107: 3724-3726
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (2008) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4<sup>a</sup> edição. IARC Press, Lyon, 110–141p
- Takahashi S (2011) Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 4:36 doi: 10.1186/1756-8722-4-36
- Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A *et al.* (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99: 4326-4335
- Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M e Ehninger G. (2006) Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107: 4011-4020
- Vardiman JW, Harris NL e Brunning RD (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100:2292-2302
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E e Tefferi A (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114: 937-951
- Velloso EDRP, Motta CHAS, Furtado JB, Bacal NS, Silveira PAA, Moyses CB, Sitnik R e Pinho JRR. (2011) Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies. *Einstein* 9:184-189
- Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ (2005) Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 106: 3747-3754

- Vidriales MB, Orfao A, González M, Hernández JM, López-Berges MC, García MA, Cañizo MC, Caballero MD, Macedo A, Landolfi C *et al.* (1993) Expression of NK and lymphoid-associated antigens in blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 7: 2026-2029.
- Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW (2005) Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol* 7: 823-830
- Wang L, Xu WL, Meng HT, Qian WB, Mai WY, Tong HY, Mao LP, Tong Y, Qian JJ, Lou YJ *et al.* (2010) FLT3 and NPM1 mutations in Chinese patients with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *J Zhejiang Univ Sci B* 11: 762-770
- Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL *et al.* (2001) 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 Res* 61: 7233-7239
- Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL *et al.* (2008) 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* 111: 1552-1559
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kidera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C *et al.* (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 97: 2434-2439
- Yanada M, Matsuo K, Emi N e Naoe T. (2005) Efficacy of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Depends on Cytogenetic Risk for Acute Myeloid Leukemia in First Disease Remission. *Cancer* 103: 1652-1658
- Yin J, Sun AN, Tian XP, Tian H, Wang RX, Yang Z, Wang XL, Wu DP, Qiu HY, Pan JL (2013) Clinical significance of common leukemia gene mutations in patients with acute promyelocytic leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 21: 39-44

## 9. Anexos

### Anexo 1

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: “Estudo de alterações moleculares e sua relação com dados clínico-laboratoriais em pacientes adultos com Leucemia Mielóide Aguda do Estado de Pernambuco”

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo-assinado, dou meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário do trabalho de Aleide Santos de Melo Lima cujo título está supracitado. A pesquisa está sob a orientação do pesquisador Prof. Dr. Marcos Andre Cavalcanti Bezerra, membro da Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE).

Assinando este Termo de Consentimento, estou ciente que:

O objetivo da pesquisa é avaliar a presença de alterações nos genes FLT3, NPM1 e CEBPA em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) diagnosticados na Fundação Hemope.

Serão coletados 5ml de sangue para a avaliação do hemograma e análise de DNA. O sangue será obtido por punção venosa, utilizando agulhas e seringas descartáveis e, desta forma, o único risco que posso sofrer é da formação de um pequeno hematoma que pode se formar devido a coleta, não havendo nenhuma outra complicação para mim.

Obtive todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a minha participação no referido trabalho. Se assim desejar e, por qualquer motivo, estou ciente de que tal fato não irá alterar a qualidade nem os meus direitos quanto ao meu atendimento;

Todas as medidas serão tomadas para assegurar a confidencialidade;

Estou livre para interromper a qualquer momento a minha participação e privacidade de meus dados pessoais.

Os resultados gerais obtidos através da pesquisa serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluída sua publicação na literatura científica especializada e apresentação em eventos científicos.



Recife,        /        /        .

\_\_\_\_\_  
Pesquisador  
**Aleide Santos de Melo Lima:** 3182-4711/8835-8596  
**Marcos André Cavalcanti Bezerra:** 3182-4711/9138-9556

\_\_\_\_\_  
Voluntário (Nome e RG)

Impressão  
digital

## Anexo 2

	<b>Comitê de Ética em Pesquisa</b> Av. Joaquim Nabuco, 171 Graças Recife-PE CEP: 52011.900- Tel.: (81) 3182-4771 E-mail: cep.hemope@gmail.com	 GOVERNO DE Pernambuco SECRETARIA DE SAÚDE
---	---	---

### 1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL: Nº. 006/2010

**Título do Projeto:** Investigação de mutações do gene FLT3 na leucemia mielóide aguda.

**Instituição Solicitante:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco -HEMOPE.

**Pesquisador:** Marcos André Cavalcanti Bezerra, PhD.

**Identidade:** 5867375 **CPF:** 987.061.525-20 **Telefone:** 81- 3182-4711

**Endereço:** Rua. Antônio Celso Uchoa Cavalcanti , Graças- Recife – PE – CEP:52050-002.

**Co-Orientadora:** Cíntia Gonsalves de Faria Machado, PhD.

**Orientada:** Aleide Santos de Melo Lima

**Local de Desenvolvimento do Projeto:** Hospital de Hematologia- UNILABE- Laboratório de Hemoglobinopatias.

**Finalidade:** Bolsa de Fixação Técnica da FACEPE.

### 2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

**Objetivo Geral:** Avaliar a presença das mutações ITD e D835 do gene FLT3 em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA) diagnosticados na Fundação Hemope.

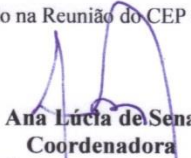
**Objetivos Específicos:** Realizar a padronização das técnicas de biologia molecular para detecção das mutações ITD e D835 do gene FLT3; Avaliar a presença das mutações do gene FLT3 de acordo com os subtipos de LMA e Avaliar a presença das mutações do gene FLT3 de acordo com sexo e faixa etária (adulto jovem e idoso).

**3 - PARECER DO RELATOR:** O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no **Parecer nº. 006/2010**, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

### 4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- **Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.**

Homologado na Reunião do CEP de 16/8/2010

  
**Ana Lúcia de Sena**  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE

## **10. Curriculum vitae (Lattes) a partir de 2011**

### **Formação acadêmica/titulação**

- 2011** Mestrado em Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Investigação de mutações nos genes FLT3 e NPM1 na Leucemia Mielóide Aguda  
Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
- 2006 - 2010** Graduação em Biomedicina.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Avaliação de isolectinas de semente de *Cratylia mollis* como marcadores histoquímicos de tecidos do colo uterino humano  
Orientador: Profª Drª Maria Tereza dos Santos Correia

### **Formação complementar**

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Curso de Práticas Hematológicas.  
Escola Brasileira de Hematologia, EBH, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Calibração, compensação e marcação celular.  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Brasil

### **Atuação profissional**

#### **1. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - HEMOPE**

##### **Vínculo institucional**

- 2010 - Atual** Vínculo: Estagiária Nível Superior , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 30, Regime: Parcial
- 2009 - 2009** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário - Análises Clínicas , Carga horária: 20, Regime: Parcial

#### **2. Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco - HC-UFPE**

##### **Vínculo institucional**



**2010 - Atual**      Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Técnico de laboratório , Carga horária: 40, Regime: Integral

### **3.      Faculdades Integradas de Patos - FIP**

#### **Vínculo institucional**

**2012 - 2012**      Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento funcional: Professora  
Curso: Pós-Graduação em Hematologia , Carga horária: 12,  
Regime: Parcial

### **4.      Centro de Capacitação Educacional - CCE**

#### **Vínculo institucional**

**2011 - 2011**      Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor de pós-graduação , Carga horária: 25, Regime: Parcial

### **5.      Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP**

#### **Vínculo institucional**

**2011 - 2011**      Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 64, Regime: Integral

### **6.      Faculdade Integrada Tiradentes - FITS**

#### **Vínculo institucional**

**2011 - 2011**      Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor de pós-graduação , Carga horária: 40, Regime: Integral

## **Produção**

### **Produção bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. Silva, Rafael Ramos da, Araújo, Aderson da Silva, Albuquerque, Dulcinéia Martins de, Costa, Fernando Ferreira, Machado, Cíntia Gonsalves de Faria, Bezerra, Marcos Andre Cavalcanti, Santos, Magnun Nueldo Nunes dos, Domingues Hatzlhofer, Betânia Lucena, **Lima, Aleide Santos de Melo**, Fertrin, Kleber Yotsumoto

JAK2 V617F Mutation Prevalence in Myeloproliferative Neoplasms in Pernambuco, Brazil. Genetic Testing and Molecular Biomarkers (Online). , v.XX, p.120203074333006 - , 2012.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. Lima, A.S.M., QUINTAS, A., JUNIOR, C. H., FALCAO, D. A., Hatzlhofer, BLD, Neves, M.A.B., Araújo, A.S., Machado, Cíntia Gonsalves de Faria, Lucena-Araújo, AR, Bezerra, M.A.C.

Estudo de alterações genéticas e sua relação com dados clínico-laboratoriais em pacientes adultos com leucemia mieloide aguda da Fundação Hemope In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2012. v.34.

2. HIRATA, O. A., Medeiros, F.S., Araújo, N.B., Lima, A.S.M., Anjos, A.C., Araújo, F.A.R., Melo, A. L., Hatzlhofer, BLD, Bezerra, M.A.C., Araújo, A.S.

Polimorfismo G463A no gene da mieloperoxidase e sua associação com os quadros infecciosos em pacientes com anemia falciforme In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2012. v.34.

3. FALCAO, D. A., MELLO, K. H. L., PIMENTEL, R. F., Melo, M.F., Neves, M.A.B., Brito, A.E., Larrazábal, B.R., **Lima, A.S.M.**, Bezerra, M.A.C., Machado, C.G.F.

Antígenos aberrantes na LLA do adulto e presença do BCR/ABL In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2011, 2011, São Paulo.

**Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso).** , 2011. v.33. p.164 - 164

4. PIMENTEL, R. F., Larrazábal, B.R., **Lima, A.S.M.**, FALCAO, D. A., MELLO, K. H. L., Melo, M.F., Neves, M.A.B., Hatzlhofer, BLD, Bezerra, M.A.C., Machado, C.G.F.

Deteção da mutação JAK2 V617F em síndromes mielodisplásicas In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2011, 2011, São Paulo.

**Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso).** , 2011. v.33. p.284 - 284

5. **Lima, A.S.M.**, Larrazábal, B.R., QUINTAS, A., FALCAO, D. A., MELLO, K. H. L., Brito, A.E., Neves, M.A.B., Netto, J.M.F., Bezerra, M.A.C., Machado, C.G.F.

Diagnóstico das Leucemias Mielóides Agudas na Fundação Hemope In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2011, 2011, São Paulo.

**Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso).** , 2011. v.33. p.169 - 169

6. Araújo, PM, Oliveira, CMC, **Lima, A.S.M.**, Andrade, SB, Buhr, IM

Sensibilização por anti-Jkb decorrente de mola hidatiforme: Relato de caso In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2011, 2011, São Paulo.

**Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso).** , 2011. v.33. p.367 - 367

### **Apresentação de trabalho e palestra**

1. **Lima, A.S.M.**

**Aula teórico-prática em Imunohematologia laboratorial na Disciplina de Exames Hematológicos I para o Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco,** 2013. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

2. **Lima, A.S.M.**

**Aula teórico-prática em Imunohematologia laboratorial na Disciplina de Exames Hematológicos I para o Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco,** 2012. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

3. **Lima, A.S.M.**

**Aula teórico-prática em Imunohematologia laboratorial na Disciplina de Exames Hematológicos I para o Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco,** 2011. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

### **Produção técnica**

#### **Demais produções técnicas**

1. Bezerra, M.A.C., **Lima, A.S.M.**, Hatzlhofer, BLD

**III Curso de de extensão em Hematologia Laboratorial,** 2013. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. Bezerra, M.A.C., Domingues Hatzlhofer, Betânia Lucena, **Lima, A.S.M.**

**I Curso de extensão em Hematologia Laboratorial,** 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

3. Bezerra, M.A.C., **Lima, A.S.M.**, Hatzlhofer, BLD

**II Curso de extensão em Hematologia laboratorial,** 2012. (Extensão, Curso de curta duração

ministrado)

## **Orientações e Supervisões**

### **Orientações e supervisões**

#### **Orientações e supervisões concluídas**

#### **Orientação de outra natureza**

1. ADÔNIS SOARES PERES QUINTAS. **INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE FLT3 NA LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA**. 2012. Orientação de outra natureza (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

## **Eventos**

### **Eventos**

#### **Participação em eventos**

1. Apresentação Oral no(a) **II Simpósio de Citometria de Fluxo**, 2011. (Simpósio)  
Diagnóstico das Leucemias Agudas na Fundação Hemope.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2011**, 2011. (Congresso)  
Diagnósticos das Leucemias Agudas na Fundação Hemope.

## **Bancas**

### **Bancas**

#### **Participação em banca de trabalhos de conclusão**

#### **Graduação**

1. Bezerra, M.A.C., FALCAO, D. A., ARAUJO, A. R. L., ARAUJO, R. F. F., **Lima, A.S.M.**  
Participação em banca de TAUANE MATHIAS PEREIRA. **ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE BMP6 EM PACIENTES COM OSTEONECROSE PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME**, 2013  
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

2. Hatzlhofer, BLD, FALCAO, D. A., ARAUJO, A. R. L., ARAUJO, R. F. F., **Lima, A.S.M.**

Participação em banca de OHANNA AZEVÊDO HIRATA. **Polimorfismo G-463A no gene da mieloperoxidase e sua associação com os quadros infecciosos em pacientes com anemia falciforme**, 2013

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

3. Bezerra, Marcos Andre Cavalcanti, Domingues Hatzlhofer, Betânia Lucena, Araújo, A.S., Lucena-Araújo, AR, **Lima, A.S.M.**

Participação em banca de Igor de Farias Gomingos. **Características Moleculares de Pacientes com Anemia Falciforme e Acidente Vascular Cerebral**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

4. Bezerra, M.A.C., Hatzlhofer, BLD, Ferreira, GA, **Lima, Aleide Santos de Melo**

Participação em banca de Erika Ketlem Gomes Trindade. **Pesquisa da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em alunos da UFPE**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

5. Bezerra, Marcos Andre Cavalcanti, Hatzlhofer, BLD, Ferreira, GA, **Lima, Aleide Santos de Melo**

Participação em banca de Maria Lima Sitonio. **Pesquisa de hemoglobinas variantes S e C em estudantes da Universidade Federal de Pernambuco**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco