

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Marley Aparecida Licínio

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DAS MUTAÇÕES NO GENE FLT3
COM OUTROS FATORES PROGNÓSTICOS EM PACIENTES
COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA AGUDA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Cláudia
Santos da Silva

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L711a Licínio, Marley Aparecida

Análise da associação das mutações no gene FLT3 com outros fatores prognósticos em pacientes com diagnóstico de leucemia aguda [dissertação] / Marley Aparecida Licínio ; orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva. - Florianópolis, SC, 2011.

188 p.: tabs., quadros

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Leucemia aguda - Prognóstico. 3. Mutações no gene. I. Silva, Maria Cláudia Santos da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

"Análise da associação das mutações no gene FLT3 com outros fatores prognósticos em pacientes com diagnóstico de leucemia aguda"

POR

Marley Aparecida Licínio

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

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Fabiana Aidar Fermino (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Celso Spada (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC – Orientadora)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 17 de fevereiro de 2011.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Pedro e Márcia, por serem
exemplos de determinação, de objetividade,
de garra e de perseverança!
E pelo ambiente familiar de amor, de apoio e de incentivo!

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar minha mente, o que auxiliou em minhas escolhas durante o período de graduação e de mestrado! E por todas as coisas boas que me foram proporcionadas até este momento de minha vida!

Aos pacientes e seus familiares, por suas células, pois, sem eles, não seria possível a realização deste trabalho! Sei que muitos não estão mais entre nós, mas contribuíram para o crescimento científico! Fiquem com Deus!

Aos meus pais, Pedro e Márcia, meus eternos professores do real sentido da vida! Ensinarão-me, e até hoje me ensinam, a ser uma pessoa de boa índole e a sempre ir à busca de um futuro digno! Obrigada pela amizade, pelo amor, pelo carinho e pelo conforto em todas as horas! Amo muito vocês!

Ao meu irmão Marcos, pelo carinho, pela amizade e pelo companheirismo, principalmente nesses últimos cinco meses. Amo você, mano!

Ao meu noivo Mauro, pelo amor, pela amizade, pelo companheirismo, pelo incentivo, pela compreensão e pela paciência durante esses anos. Você soube me apoiar nos dias mais cansativos, sempre me trazendo momentos de alegrias! Amo muito você!

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva, pelos importantes ensinamentos, tanto científicos quanto pessoais, pela oportunidade, pela amizade, pela atenção, pelo apoio, pela preocupação e pela dedicação. Aprendi muito com você!

À Prof^a Dr^a Maria Luiza Bazzo, pela disponibilidade e otimismo!

Ao pessoal do laboratório, Ana, Arthur, Chris Coelho, Chris Nogueira, Gabriela, Eduardo, Elenise, Haíra, Juliana, Karina, Letícia, Luciana, Mariana, Michelle, Simone, Susie, Toni e Vanessa, pela amizade e pelos vários momentos de angústias ou de descontração que passamos juntos! Cada um sabe o carinho que tenho por vocês! Em especial, quero agradecer a quatro pessoas: a Aline, por seu companheirismo, amizade e cumplicidade e pelos momentos na cultura celular; a Graciele, a Manoela e a Pâmela, pela ajuda nas corridas de eletroforese, pelas extrações de DNA e também pelos momentos na cultura celular! Serei eternamente grata!

Às minhas amigas “irmãs”, Carol, Fláh, Fran e Lisi, pelo apoio, pelo companheirismo e pela sólida amizade que construímos, a qual, tenho certeza, será para sempre! Amo vocês, amigas!

Às minhas amigas do coração, Carol, Jú e Mari, pelo apoio, pelo companheirismo e pelo incentivo! Tenho certeza de que nossa amizade será eterna! Amo vocês, amigas!

À Prof^ª Dr^ª Joanita Ângela Gonzaga Del Moral, pelo auxílio e disposição.

À Prof^ª Dr^ª Rosemeri Maurici da Silva, pela ajuda na análise estatística.

À Prof^ª Marcilda, pela disponibilidade na revisão gramatical e pelas sugestões de melhorias para o trabalho.

À Mariana pela correção do *abstract*.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC, aos médicos do HU/UFSC e do HIJG, pelo encaminhamento das amostras e pela estrutura necessária à realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório DNA/UDESC, Prof. Dr. Altamir, Prof^ª. Ediane e Prof^ª Dr^ª Jaqueline, pelo apoio e incentivo!

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, que ofereceu condições para mais uma etapa da minha formação.

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

Enfim, a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a execução deste trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade!

Muito Obrigada!

"A melhor de todas as coisas é aprender.
O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e a força podem falhar,
mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre."

(Louis L. Amour)

RESUMO

As leucemias agudas (LAs) constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas, proveniente de mutações que podem ocorrer em diferentes fases da diferenciação de células precursoras, o que a caracteriza como uma doença altamente heterogênea. De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide, publicada em 2008, para um diagnóstico mais preciso e estratificação de prognóstico de pacientes com LA, devem-se pesquisar mutações nos genes FLT3. Fisiologicamente, o receptor FLT3 participa da regulação da apoptose, da proliferação, de sobrevivência e da diferenciação celular. Quando o gene FLT3 sofre mutação, dá origem a um produto final modificado, ou seja, gera um receptor com alterações estruturais. A presença de mutações nesse gene é de prognóstico desfavorável, e a análise das mutações no gene FLT3 tem sido considerada como um fator de prognóstico relevante na decisão terapêutica de pacientes com LA. Dessa forma, é de extrema importância a análise das mutações no gene FLT3 (duplicação interna em *tandem* – DIT – e mutação pontual D835) como marcadores moleculares de prognóstico em pacientes com LA. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar a importância das mutações no gene FLT3 (DIT e D835) como marcadores moleculares para o prognóstico de pacientes com suspeita clínica de LA, antes da primeira terapia, atendidos, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010, pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) e pelo Serviço de Oncologia do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), ambos situados em Florianópolis, Santa Catarina. Para tanto, encaminharam-se as amostras de medula óssea (MO) ou de sangue periférico (SP) ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) para investigação das mutações no gene FLT3 utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR). Dividiram-se os pacientes em dois grupos: pacientes com idade superior a 16 anos e pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos. Para a análise estatística das variáveis numéricas, utilizou-se o teste *t* de *Student* e, para as variáveis nominais, o teste do *qui quadrado*. Para os dois tipos de variáveis analisados, o nível de significância determinado foi de 5% ($P < 0,05$). Os resultados mostraram que a mutação FLT3-DIT foi mais incidente em indivíduos com LMA com idade igual ou inferior a 16 anos, enquanto nos

indivíduos com LLA com idade superior a 16 anos a mutação FLT3-DIT foi rara. Quanto à mutação FLT3-D835, foi rara em indivíduos com idade superior a 16 anos. Constatou-se que as mutações no gene FLT3 (DIT e D835) não têm associação com os seguintes fatores prognósticos: idade, leucometria, níveis de LDH e marcação para CD34, como também para o gênero. A DIT no gene FLT3 parece anular o efeito de prognóstico favorável da t(15;17), além de parecer ter associação com vantagem de proliferação celular, mesmo em indivíduos com LPA. Houve uma associação estatisticamente significativa entre a DIT no gene FLT3 e a ausência de remissão e óbito em pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos. Esses resultados sugerem que a presença de FLT3-DIT é um fator de prognóstico desfavorável e independente, pois não possuiu relação com outros fatores prognósticos, devendo ser considerado como um marcador molecular no prognóstico de pacientes com suspeita clínica de LA e importante para a decisão terapêutica.

Palavras-chave: Leucemia aguda; Mutações no gene FLT3; Fatores prognósticos na leucemia aguda.

ABSTRACT

Analysis of the association of mutations in the FLT3 gene with other prognostic factors in patients diagnosed with acute leukemia

Acute leukemias (ALs) are a group of malignancies characterized by uncontrolled proliferation of hematopoietic cells, which are originated from mutations that can occur at different stages of differentiation of precursor cells, characterizing it as a highly heterogeneous disease. According to the classification of the World Health Organization (WHO) for malignancies of lymphoid and hematopoietic system, published in 2008, for a more precise diagnosis and prognostic stratification of patients with AL, the mutations in FLT3 gene should be investigated. Physiologically, the FLT3 receptor participates in the regulation of apoptosis, proliferation, survival and cell differentiation. When the FLT3 gene is mutated, it originates a modified final product, which means it generates a receptor with structural changes. The presence of mutations in this gene is an unfavorable prognosis, and the analysis of mutations in FLT3 gene has been considered an important prognostic factor in deciding the treatment of patients with AL. Thus, the analysis of mutations in FLT3 (internal tandem duplication - ITD - and D835 point mutation) is extremely important as molecular markers in the prognosis of patients with AL. Therefore, the purpose of this study was to investigate the importance of mutations in FLT3 gene (D835 and ITD) as molecular markers for prognosis of patients with clinical suspicion of AL, before the first therapy, who attended the Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) and the Serviço de Oncologia do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), both located in Florianópolis, Santa Catarina, in the period from January 2009 to December 2010. To this end, the samples of bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) were forwarded to the Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) for the investigation of FLT3 gene mutations using the polymerase chain reaction (PCR). The patients were divided into two groups: patients aged more than 16 years and patients aged 16 years or less. For statistical analysis of numerical variables, we used the *Student* t-test and for nominal variables, the *chi* square. For both types of variables analyzed, the level of significance was set at 5% ($P < 0.05$). The results showed that the mutation FLT3-ITD was more common in patients with AML aged 16 years or less, while in patients

with ALL aged more than 16 years, FLT3 mutation-ITD was rare. In the same way, the FLT3-D835 mutation was rare in individuals older than 16 years. It was found that mutations in the FLT3 gene (ITD and D835) are not associated with the following prognostic factors: age, WBC count, LDH levels and marking for CD34 and sex. The ITD in the FLT3 gene seems to nullify the effect of favorable prognosis of t(15;17) and seems to be associated with cell proliferation advantage, even in patients with ALL. There was a statistically significant association between the ITD in the FLT3 gene and the absence of remission and death of patients aged 16 years or less. These results suggest that the presence of FLT3-ITD is an unfavorable and independent prognostic factor since it did not seem to have a relationship with other prognostic factors. For this reason, it should be considered as a molecular marker for the prognosis of patients with clinical suspicion of AL and as an important factor in therapeutic decision.

Keywords: Acute leukemia; FLT3 gene mutations; Prognostic factors in acute leukemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Recomendações moleculares para pacientes com LMA conforme a estratificação de risco.....	48
Figura 2	Vias de transdução de sinal do receptor FLT3.....	52
Figura 3	Gel representativo da amplificação da PCR para a DIT no gene FLT3.....	71
Figura 4	Gel representativo da padronização do número de ciclos para a detecção da DIT no gene FLT3.....	72
Figura 5	Gel representativo da amplificação da PCR para a mutação pontual D835 no gene FLT3.....	72
Figura 6	Gel representativo da digestão enzimática após PCR para a mutação D835 no gene FLT3.....	73
Figura 7	Gel representativo da padronização do número de ciclos para a detecção da mutação D835 no gene FLT3.....	73
Figura 8	Gel representativo da padronização do número de unidade da enzima Eco RV para a digestão da região codificante D835 no gene FLT3.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação para as LMAs e neoplasias relacionadas.....	34
Quadro 2	Classificação para as LLLA-B.....	35
Quadro 3	Expressão de marcadores citoplasmáticos e de superfície celular avaliados no diagnóstico de LMA.....	37
Quadro 4	Classificação imunofenotípica das LLAs de linhagem B.....	38
Quadro 5	Classificação imunofenotípica das LLAs de linhagem T.....	38
Quadro 6	Classificação do prognóstico baseado no grau de risco conforme as anormalidades cariotípicas presentes na LMA, segundo Grimwade et al. (1998), Slovak et al. (2000) e Marcucci et al. (2005).....	43
Quadro 7	Classificação do prognóstico baseado no grau de risco conforme as anormalidades cariotípicas presentes nas LLAs, segundo diferentes grupos de pesquisa.....	45
Quadro 8	Influência das mutações moleculares no prognóstico de pacientes com LMA.....	47
Quadro 9	Marcadores moleculares no prognóstico da LMA.....	49
Quadro 10	Marcadores moleculares significativos no prognóstico de LLA.....	50
Quadro 11	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção da DIT no gene FLT3.....	64
Quadro 12	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção da mutação D835 no gene FLT3.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Amostras com diagnóstico de LA que foram submetidas à investigação das mutações no gene FLT3, de acordo com o gênero e a faixa etária....	75
Tabela 2	Avaliação da ausência ou da presença da mutação no gene FLT3 do tipo DIT nos pacientes com diagnóstico de LA, de acordo com a faixa etária e a classificação da LA.....	76
Tabela 3	Classificação em subcategorias das LA submetidas à investigação da ausência ou da presença da DIT no gene FLT3 nos indivíduos com idade igual ou inferior a 16 anos.....	77
Tabela 4	Análise da associação da mutação no gene FLT3 do tipo D835 nos pacientes com diagnóstico de LA, de acordo com a faixa etária e a classificação da LA.....	78
Tabela 5	Análise da associação das amostras com diagnóstico de LA que foram submetidas à investigação das mutações no gene FLT3, de acordo com o gênero e a faixa etária do paciente.....	79
Tabela 6	Valores médios da idade, da leucometria, da porcentagem de blastos e dos níveis de LDH dos pacientes com LA, de acordo com a faixa etária e a ausência ou a presença da DIT no gene FLT3.....	81
Tabela 7	Valores médios de leucometria, da porcentagem de blastos e dos níveis de LDH nos indivíduos com idade igual ou inferior a 16 anos com LA, de acordo com a ausência ou a presença da mutação D835 no gene FLT3.....	83
Tabela 8	Análise da associação das amostras com diagnóstico de LA que foram submetidas à investigação das mutações no gene FLT3, de acordo com a marcação para CD34 e a faixa etária do paciente.....	84

Tabela 9	Análise da associação de anormalidades genéticas nos pacientes com diagnóstico da LMA com a ausência ou a presença da DIT no gene FLT3.....	85
Tabela 10	Análise da associação da progressão da doença nos pacientes, após seis meses do diagnóstico de LA, com a ausência ou a presença da mutação do gene FLT3 do tipo DIT.....	85
Tabela 11	Análise da associação da progressão da doença nos pacientes, após seis meses do diagnóstico da LA, com a ausência ou a presença da mutação D835 no gene FLT3.....	86
Tabela 12	Análise da associação da resposta à terapia de pacientes com diagnóstico da LA com a ausência ou a presença das mutações no gene FLT3.....	87
Tabela 13	Análise da associação do desfecho final dos pacientes com diagnóstico de LA com a ausência ou a presença das mutações no gene FLT3.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Crom	Cromossomo
DE	Domínio extracelular
DEPC	Dietil pirocarbonato
DIT	Duplicação interna em <i>tandem</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DPT-MLL	Duplicação parcial em <i>tandem</i> MLL
DRC	Duração da remissão completa
DTM	Domínio transmembrana
EGIL	<i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> de fluorescência
FL	Ligante
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
FLT3-D835	Mutação pontual no gene FLT3
FLT3-DIT	Mutação do tipo DIT no gene FLT3
FLT3-TKD	Mutação pontual no gene FLT3
HIJG	Hospital Infantil Joana de Gusmão
HU-UFSC	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JM	Justamembrana
LA	Leucemia aguda
LDH	Lactato desidrogenase
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda do tipo B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda do tipo T
LLLA-B	Leucemia/linfoma linfoblástica B
LLLA-T	Leucemia/linfoma linfoblástica T
LMA	Leucemia mieloide aguda
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
LPA	Leucemia promielocítica aguda
MAPK	<i>Mitogen-activated Kinase protein</i>
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MO	Medula óssea

NA	Não avaliado
Neg	Negativo
NPM	Nucleofosmina
OER	Óbito em remissão
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSR	Óbito sem remissão
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI ₃	<i>Phosphatidilinositol 3</i>
PI ₃ K	<i>Phosphatidilinositol 3-Kinase</i>
Pos	Positivo
pRb	Proteína retinoblastoma
RET	Remissão em tratamento
RT-PCR	Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase
RTQ	Receptor de membrana tirosina-quinase
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLR	Sobrevida livre de recidiva
SP	Sangue periférico
STAT5	<i>Signal transducers and activators of Transcription 5</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA.....	25
CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA.....	31
1.1 LEUCEMIAS AGUDAS.....	33
1.1.1 Classificação.....	33
1.1.2 Diagnóstico.....	35
1.1.2.1 Avaliação clínica.....	35
1.1.2.2 Dados morfológicos.....	36
1.1.2.3 Imunofenotipagem.....	36
1.1.2.4 Alterações cromossômicas.....	39
1.1.3 Prevalência.....	40
1.1.4 Tratamento.....	40
1.1.5 Fatores prognósticos.....	41
1.1.5.1 Idade.....	41
1.1.5.2 Leucometria.....	42
1.1.5.3 Cariótipo.....	42
1.1.5.4 Marcadores imunofenotípicos relacionados com anormalidades citogenéticas.....	46
1.1.5.5 Marcadores moleculares.....	47
<i>1.1.5.5.1 Mutações no gene FLT3.....</i>	<i>50</i>
OBJETIVOS.....	57
OBJETIVO GERAL.....	59
Objetivos específicos.....	59
CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LA....	63
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	63
2.3 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DA DIT NO GENE FLT3.....	64
2.3.1 Padronização do número de ciclos para a PCR para a detecção da DIT no gene FLT3...	65
2.4 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DA MUTAÇÃO D835 NO GENE FLT3.....	65
2.4.1 Padronização do número de ciclos para a PCR para a detecção da mutação D835 no gene FLT3.....	67

2.4.2	Padronização do número de unidades da enzima Eco RV para a digestão da região codificante D835 que compreende a sequência GATA no gene FLT3.....	67
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
	CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	69
3.1	PCR PARA A DETECÇÃO DA DIT NO GENE FLT3.....	71
3.1.1	Número de ciclos para a PCR para a detecção da DIT no gene FLT3.....	71
3.2	PCR PARA A DETECÇÃO DA MUTAÇÃO D835 NO GENE FLT3.....	72
3.2.1	Número de ciclos para a PCR para a detecção da mutação D835 no gene FLT3.....	73
3.2.2	Número de unidades da enzima Eco RV para a digestão da região codificante D835 que compreende a sequência GATA no gene FLT3.....	74
3.3	ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO.....	74
	CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO.....	89
	CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS.....	103
	APÊNDICES.....	129
	Apêndice 1: Aceite da Publicação: <i>Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda - Classificação OMS 2008</i> na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.....	131
	Apêndice 2: Publicação: <i>Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda - Classificação OMS 2008</i> – Artigo aceite em 18/03/2010 para publicação na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.....	135
	Apêndice 3: Dados dos pacientes submetidos à investigação das mutações no gene FLT3.....	153
	ANEXOS.....	163
	Anexo 1: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do UFSC, sob número de registro 212/2009.	165
	Anexo 2: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HIJG, sob número de registro 075/2008...	169

Anexo 3: Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes do HU/UFSC.....	175
Anexo 4: Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes do HIJG.....	185

JUSTIFICATIVA

A integridade de um determinado tecido, assim como a sua função, é conferida por um equilíbrio estabelecido entre a proliferação celular e a apoptose. Esse balanceamento é mantido por meio de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular (FERREIRA & ROCHA, 2004), conhecido como homeostase celular, o qual está presente no desenvolvimento pré e pós-natal de todos os mamíferos (CAMPISI & SEDIVY, 2009). Entretanto, a desregulação da homeostase pode resultar em processos degenerativos de tecidos específicos, tais como doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson e glaucoma) e, frequentemente, o câncer (GOLUBNITSCHAJA, 2007).

Os mecanismos de transformação neoplásica de uma célula normal compreendem uma série de eventos genéticos e moleculares que afetam a proliferação e a diferenciação celular, as quais ainda não foram elucidadas. Nesse sentido, estudos científicos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de esclarecer os complexos mecanismos de regulação molecular que envolvem a proliferação neoplásica e o seu controle. Aliado a esse contexto, é crescente a preocupação dos órgãos governamentais no que se refere a uma gestão com recursos financeiros disponíveis para o planejamento, a execução e a avaliação das estratégias do controle das neoplasias (INCA, 2009).

Desse modo, a prevenção e o controle do câncer estão entre os mais importantes desafios científicos e de saúde pública. Exemplo disso é a Política Nacional de Atenção Oncológica, incorporada pela Portaria de nº 2.048, de 3 de setembro de 2009, que propõe, para o Brasil, um abrangente controle do câncer e determina várias metas, desde ações voltadas à prevenção e ao tratamento até assistência de alta complexidade integradas em redes de atenção oncológica, com o intuito de reduzir a incidência e a mortalidade por câncer (BRASIL, 2010).

Diante do contexto mencionado, é necessário que haja continuidade em investimentos na execução de ações para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS) (INCA, 2009).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte, tendo sido, em 2007, responsável pelo óbito de 7,9 milhões de habitantes no mundo, o que correspondeu a 13% de todos os óbitos (WHO, 2010). Nesse mesmo

ano, em torno de 72% das mortes por câncer ocorreram em países de baixa e média renda, o que demonstra a necessidade de investimentos para um diagnóstico rápido e preciso dessa doença em países subdesenvolvidos. A perspectiva é que o número global de mortes por câncer aumente 45% (11,5 milhões de mortes) até 2030, em decorrência do aumento da população e do envelhecimento (WHO, 2010).

No Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte da população, o que representa, aproximadamente, 17% dos óbitos de razão conhecida. As estimativas brasileiras para o ano de 2010, que também serão válidas para o ano de 2011, apontam a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer, dos quais 236.240 para o gênero masculino e 253.030 para o gênero feminino. A distribuição regional desses casos novos de câncer ocorre de maneira heterogênea entre estados, capitais e regiões do país. As regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas de incidência de câncer, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas e a região Centro-Oeste apresenta um padrão intermediário. Os tipos de neoplasias mais frequentes são: câncer de mama; câncer de próstata; câncer de traquéia, brônquio e pulmão; câncer de cólon e reto; câncer de estômago; câncer de colo de útero; câncer de cavidade oral; câncer de esôfago; leucemia e melanoma. Para o estado de Santa Catarina, no ano de 2010, eram esperados 9.580 novos casos de câncer e desses, 360 novos casos de leucemia¹ (INCA, 2009).

As leucemias compreendem um grupo heterogêneo de doenças hematopoiéticas malignas que são divididas em leucemias agudas e crônicas e cada uma delas subdivididas em mielóides e linfóides. Segundo a classificação da OMS para neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide, proposta em 2008, para um diagnóstico correto e preciso das leucemias agudas, deve-se fazer uma análise da apresentação clínica do paciente e correlacioná-la com os resultados de morfologia, de citoquímica, de imunofenotipagem, de citogenética e de mutações genéticas das células anormais (SWERDLOW et al., 2008).

Vários subtipos de leucemias apresentam alterações genéticas específicas (SCANDURA et al., 2002) que perturbam a homeostase do organismo e podem provocar proliferação celular descontrolada, bloqueio na diferenciação celular e/ou desregulação da apoptose (morte celular programada) (CHEN et al. 2007). A apoptose desempenha um

¹ Até o momento da redação da dissertação não existiam dados se essa previsão se concretizou

papel crucial na homeostase do sistema hematopoiético (SPECK & GILLILAND, 2002; ZHIVOTOVSKY & ORRENIUS, 2006), razão pela qual é exigido um controle rigoroso na produção dos leucócitos para que ocorra uma efetiva proteção contra possíveis infecções (SPECK & GILLILAND, 2002). Assim, o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da leucemia e a exploração de novas estratégias terapêuticas são elementos fundamentais para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com leucemia (SCANDURA et al., 2002).

Nas últimas duas décadas, investigações clínicas e experimentais demonstraram que alterações moleculares contribuem para o desenvolvimento da leucemia aguda (LA) e que essas alterações comprometem a funcionalidade das proteínas quinases e dos reguladores da transcrição gênica (CHEN et al., 2010; STAVROPOULOU, BRAULT e SCHWALLER, 2010). Desse modo, as mutações genéticas são reconhecidas como importantes marcadores de prognóstico em neoplasias hematológicas, sendo indicada, para as leucemias mieloides agudas (LMAs), a pesquisa das mutações nos genes CEBP α , FLT3, c-KIT, RAS, NPM1 (VARDIMAN et al., 2009; CHEN, ODENIKE & ROWLEY, 2010), CBF, MLL, GATA1, PU.1 (STAVROPOULOU, BRAULT & SCHWALLER, 2010), Runx1 e WT1 (VARDIMAN et al., 2009). Já, para as leucemias linfoblásticas agudas (LLAs), é recomendada a investigação de alterações nos seguintes genes: PAX5, IKAROS, EBF1, LEF1, TCF3 (CHEN, ODENIKE e ROWLEY, 2010), FLT3, RAS, BCR-ABL, MLL, GATA1, E2A (STAVROPOULOU, BRAULT & SCHWALLER, 2010).

Diante desses conhecimentos, a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN, 2009), descreve que a pesquisa das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 é indicada para todos os pacientes menores que 60 anos, portadores de LA. Com isso, a investigação dessas mutações é de extrema relevância para esses pacientes (SWERDLOW et al., 2008).

Assim, considerando o exposto acima, neste trabalho será avaliada a importância das mutações no gene FLT3 como marcadores moleculares para o prognóstico de pacientes com suspeita clínica de LA, antes da primeira terapia.

1.1 LEUCEMIAS AGUDAS

As leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea (MO) e/ou nos tecidos linfoides, as quais, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos (SWERDLOW et al., 2008). A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfoides ou mieloides, o que a caracteriza, sob os aspectos biológico e morfológico, como uma doença heterogênea. Por constituírem um grupo heterogêneo de doenças, as leucemias diferem quanto à etiologia, à patogênese, ao prognóstico e à resposta ao tratamento (PUI & EVANS, 1998; BAIN, 2003).

1.1.1 Classificação

O estabelecimento de um diagnóstico preciso e indicativo de prognóstico, baseado na análise de fatores clínicos, biológicos, genéticos e moleculares, é um dos motivos do sucesso terapêutico em pacientes com LAs (SWERDLOW et al., 2008). O fato de a leucemia ser uma doença genética faz com que a identificação das alterações nas células blásticas seja imprescindível para a identificação de subgrupos de pacientes com características clínicas distintas que orientam o tratamento, a estratificação do prognóstico e a monitoração da resposta terapêutica (RUBNITZ & PUI, 1999). Assim sendo, em 2008, a OMS estabeleceu novos critérios para o diagnóstico de LA, no qual são considerados a origem e a linhagem celular, o estágio de maturação e o tipo de anormalidade citogenética ou molecular envolvida na patogênese da doença. A partir desses critérios, a OMS propôs uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide, a qual estabeleceu sete subcategorias para as LMAs, como está representado no Quadro 1 (SWERDLOW et al., 2008).

LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes

LMA com t(8;21)(q22,q22); Runx1-RUNX1T1

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

LPA* com t(15;17)(q22,q12); PML-RARA

LMA com t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL

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

LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2);
RPN1-EVI1

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

Entidade provisória: LMA com mutação NPM1

Entidade provisória: LMA com mutação CEBPA

LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia

Neoplasias mieloides associadas ao tratamento

LMA não categorizada nos itens anteriores

LMA com mínima diferenciação

LMA sem maturação

LMA com maturação

Leucemia mielomonocítica

Leucemia monoblástica/monocítica

Leucemia eritroide aguda

Leucemia eritroide pura

Eritroleucemia, eritroide/mieloide

Leucemia megacarioblástica

Leucemia basofílica

Panmielose aguda com mielofibrose

Sarcoma mioelide

Proliferação mioelide relacionada com síndrome de Down

Mielopoiese transitória anormal

Leucemia mioelide associada com síndrome de Down

Neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitoides

Quadro 1: Classificação para as LMAs e neoplasias relacionadas.

Fonte: Adaptado de Swerdlow et al. (2008).

*Leucemia promielocítica aguda

Segundo a classificação da OMS de 2008, as LLAs foram subdivididas em duas categorias: Leucemia/linfoma linfoblástica T (LLLA-T) e Leucemia/linfoma linfoblástica B (LLLA-B). Essa última

categoria foi subdividida em duas subcategorias, conforme consta no Quadro 2 (SWERDLOW et al., 2008).

<p>Leucemia/linfoma linfoblástica B associada a anormalidades genéticas recorrentes</p> <p>Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1</p> <p>Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(v;11q23), rearranjo MLL</p> <p>Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(12;21)(p13;q22)TEL-AML1(ETV6Runx1)</p> <p>Leucemia/linfoma linfoblástica B com hiperdiploidia</p> <p>Leucemia/linfoma linfoblástica B com hipodiploidia</p> <p>Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(5;14)(q31,q32) IL3-CMI</p> <p>Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1</p> <p>Leucemia/linfoma linfoblástica B, não categorizada nos itens anteriores</p>
--

Quadro 2: Classificação para as LLLA-B.

Fonte: Adaptado de Swerdlow et al. (2008).

1.1.2 Diagnóstico

Os critérios de diagnóstico para a LA, segundo a classificação da OMS de 2008, envolvem a análise das características clínicas, os dados morfológicos, citoquímicos, imunofenotípicos e genéticos (SWERDLOW et al., 2008).

1.1.2.1 Avaliação clínica

Na avaliação clínica dos pacientes com LA, frequentemente podem ser encontrados sintomas, como: febre (relacionada com a susceptibilidade às infecções devido à neutropenia, ou até mesmo, a citocinas liberadas pelas células neoplásicas); fadiga e palidez (associadas à anemia); e desordens hemorrágicas, como sangramento gengival (provenientes da plaquetopenia). Esses achados estão

associados à proliferação descontrolada das células leucêmicas, ocorrendo uma inibição na produção das células sanguíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas (BASSAN et al., 2004).

1.1.2.2 Dados morfológicos

Na classificação apresentada no Quadro 1, a LMA é determinada pela presença de 20% ou mais de mieloblastos no sangue periférico (SP) e/ou na MO. Porém, em alguns casos específicos, nos quais a LMA está associada a anormalidades genéticas recorrentes, como, por exemplo, leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17)(q22,q12) (Quadro 1), o diagnóstico é feito independentemente da contagem de mieloblastos (SWERDLOW et al., 2008; WEINBERG et al., 2009). Em contrapartida, o diagnóstico da LLA é confirmado mediante a presença de 25% ou mais de linfoblastos na MO. No entanto, quando o paciente apresenta menos de 20% de linfoblastos na MO e nenhuma evidência de massa extramedular, mas apresenta associação com anormalidades genéticas recorrentes (Quadro 2), também é diagnosticado com LLA (VARDIMAN et al., 2009).

1.1.2.3 Imunofenotipagem

Apenas a análise morfológica por microscopia óptica não é suficiente para distinguir o blasto de origem linfoide do blasto de origem mieloide. Por essa razão, atualmente, a ferramenta para o correto diagnóstico e classificação da LA, a fim de determinar a linhagem dos blastos, é a análise multiparamétrica por citometria de fluxo (imunofenotipagem). Além disso, a partir da análise imunofenotípica, podem-se detectar perfis antigênicos aberrantes, assim como a existência de doença residual mínima (DRM). Entretanto, a determinação da porcentagem de blastos por esse método, ou seja, por meio da avaliação percentual de células CD34+ (marcador de célula imatura), não é substituinte da avaliação morfológica, pois nem todos os blastos leucêmicos expressam CD34 (VARDIMAN et al., 2009).

A expressão de determinados marcadores celulares, como o CD34, o CD13, o CD33, entre outros, caracteriza o diagnóstico de LMA (Quadro 3) (DÖHNER et al., 2010).

Expressão dos marcadores	
Marcadores de células imaturas	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Marcadores granulocíticos	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, MPOc
Marcadores monocíticos	CD11c, CD14, CD64, CD4, CD11b, CD36
Marcadores megacariocíticos	CD41, CD61, CD42
Marcadores eritroides	CD235a

Quadro 3: Expressão de marcadores citoplasmáticos e de superfície celular avaliados no diagnóstico de LMA.

Fonte: Adaptado de Döhner et al. (2010).

A LLA-B é caracterizada pela expressão de uma variedade de antígenos que incluem, entre outros: PAX-5, CD10, CD19, CD22c, CD22s, CD79, Ig (Quadro 4). Em algumas situações, o CD20, marcador de células maduras B, pode ser expresso parcialmente, fracamente ou ser totalmente negativo nos linfoblastos leucêmicos de LLA-B. Alguns marcadores de células progenitoras podem ser expressos nesses blastos leucêmicos, como o CD34 e TdT (SWERDLOW et al., 2008). A maioria dos casos de LLA-B pode apresentar expressão de um ou vários antígenos mieloides, na maioria das vezes CD13 e CD33; e mais raramente a expressão de CD11b e CD15 (ONCIU, 2009). Nessa direção, o *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL) elaborou, utilizando como base o perfil imunofenotípico das células leucêmicas, uma classificação para LLA-B, na qual estabelece, de forma sintética, marcadores específicos para a diferenciação dos subtipos de LLA-B, como pode ser observado no Quadro 4 e no Quadro 5 (BÉNÉ et al., 1995).

Classificação LLA-B	Expressão dos antígenos			
	CD79, CD19, CD22c, CD22s	CD10	μc	Ig*
B-I (LLA pró-B)	+	-	-	-
B-II (LLA B comum)	+	+	-	-
B-III (LLA pré-B)	+	+	+	-
B-IV (LLA B madura)	+	+	+	+

Quadro 4: Classificação imunofenotípica das LLAs de linhagem B.

Fonte: Adaptado Béné et al. (1995).

* Ig – Imunoglobulina

A expressão dos antígenos CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD34, HLA-DR e TDT é utilizada para determinar a LLA-T. O padrão de expressão de alguns desses antígenos é usado para subclassificar as LLA-T (Quadro 5) (BÉNÉ et al. 1995; SWERDLOW et al., 2008).

Subtipo LLA-T	Expressão dos antígenos										
	CD1a	CD2	CD3c	CD3s	CD4	CD5	CD7	CD8	CD34	HLA-DR	TDT
T-I (Pró-T)	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
T-II (Pré-T)	-	+	+	-	-	±	-	-	±	±	+
T-III (Cortical T)	+	+	+	-	±	±	+	+	-	-	+
T-IV (Medular T)	-	+	+	+	±	±	+	±	-	-	+

Quadro 5: Classificação imunofenotípica das LLAs de linhagem T.

Fonte: Adaptado de Béné et al. (1995) e Swerdlow et al. (2008).

Em algumas situações, a LLA-T pode apresentar negatividade para o TDT (FABER et al., 2000), assim como o HLA-DR e CD34, que

podem dificultar o diagnóstico das LLA-T. As células leucêmicas da LLA-T também podem expressar, de forma aberrante, antígenos mieloides, como CD11b, CD13, CD15 e CD33, e, raramente, o CD117 (COUSTAN-SMITH et al., 2009). Certos imunofenótipos, como a ausência de expressão de CD1a e de CD8, marcação fraca para CD5 e positividade para CD117, CD34, HLA-DR, CD13, CD33 e CD11b, parecem estar associados a uma resposta desfavorável à terapia, inclusive com chances de recaída e falha na indução da remissão (ONCIU, 2009).

1.1.2.4 Alterações cromossômicas

Embora a maioria das anormalidades cromossômicas possa ser detectada por análise citogenética de rotina, em alguns casos, quando existem rearranjos submicroscópicos, são mais facilmente detectados pela transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e/ou a hibridização *in situ* de fluorescência (FISH). Tais alterações podem ser exemplificadas como: a fusão FIP1L1-PDGFR α encontrada em algumas neoplasias mieloides associada com eosinofilia (COOLS et al., 2003); e a anormalidade ETV6-Runx1 que pode estar presente na LLA-B, que possui prognóstico relevante e deve sempre ser pesquisada em LLA-B infantil, bem como a presença de BCR-ABL em pacientes com LLA com qualquer idade (VARDIMAN et al., 2009).

Nos dias atuais, as mutações genéticas são reconhecidas, cada vez mais, como importantes marcadores de prognóstico em neoplasias linfoides e mieloides. Essas mutações incluem, entre outras, as ocorridas nos genes NPM1, CEBP α , FLT3, Runx1, c-KIT e WT1 (VARDIMAN et al., 2009), para as LMAs; e nos genes FLT3, RAS, MLL, GATA1 e E2A, para as LLAs (STAVROPOULOU, BRAULT & SCHWALLER, 2010). A descoberta de tais mutações genéticas foi crucial para a compreensão da leucemogênese, em muitos casos, com citogenética normal, dado que essas alterações interferem em fatores de transcrição celular, o que pode levar a uma maturação deficiente, além de favorecer a produção de proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal necessárias para a proliferação e/ou sobrevivência do clone neoplásico (FALINI et al.; 2005; MRÓZEK & BLOOMFIELD, 2006; FALINI et al., 2007; MRÓZEK et al., 2007; SCHLENK et al., 2008).

1.1.3 Prevalência

A LA é uma doença que acomete os indivíduos independente da faixa etária, do gênero, da etnia e da categoria socioeconômica (HWANG et al., 2004). Em crianças, a LA mais frequente é a LLA, enquanto que pacientes adultos são mais acometidos pela LMA (PUI & EVANS, 2006). Os fatores etiológicos das LAs parecem ser diferentes em adultos e em crianças (LINABERY & ROSS, 2008). Acredita-se que não haja uma única causa para o surgimento da LA, mas, sim, uma combinação de fatores que envolvem a interação genética e a ambiental.

Os principais fatores relacionados com o surgimento da LA em crianças são: predisposição genética; resposta desregulada aos agentes infecciosos (principalmente na LLA-B) e radiação ionizante durante o primeiro trimestre de gravidez, que pode levar às alterações cromossômicas intrauterinas (EDEN, 2010). Já em adultos, os possíveis fatores associados com a LA são relacionados à radiação ionizante e a determinados produtos químicos, como benzeno e agentes citotóxicos, principalmente para a LMA (SWERDLOW et al., 2008).

1.1.4 Tratamento

Os protocolos de tratamento para LA resultam, hoje, em taxas de sobrevivência maiores que 80% em pacientes pediátricos com LLA, enquanto menos da metade das crianças com LMA são curadas (PUI & EVANS, 2006). Em adultos, embora os índices de remissão em casos de LMA sejam na ordem de 50 a 80%, a maioria desses pacientes sofre recidiva, o que resulta em elevadas taxas de mortalidade (SHIPLEY & BUTERA, 2009). Esse contexto torna necessárias novas estratégias de tratamento, não apenas para melhorar a sobrevida, mas também a qualidade de vida desses pacientes. Uma das estratégias atuais de terapia é avaliar o prognóstico do paciente com o intuito de determinar qual a melhor protocolo terapêutico que deve ser administrado. Cabe destacar que novos tratamentos oncológicos, ainda em estudos, são fundamentados nas recentes alterações genéticas descobertas, pois estão intimamente ligadas ao prognóstico (STAVROPOULOU, BRAULT & SCHWALLER, 2010).

Desse modo, vê-se a importância dos estudos que pesquisam mutações moleculares nos pacientes com LA, com o intuito de

considerar tais alterações para instituição de protocolo terapêutico diferenciado para cada paciente (NCCN, 2009).

1.1.5 Fatores prognósticos

Segundo os critérios atuais de diagnóstico da OMS para LA, as alterações citogenéticas e moleculares são os principais fatores para avaliação do prognóstico de LMA e de LLA. Além disso, a expressão de alguns antígenos é preditiva para o prognóstico, como, por exemplo, a expressão de CD56 em pacientes com LPA está associada ao desenvolvimento de sarcoma granulocítico, o que a caracteriza como de prognóstico desfavorável (TALLMAN et al., 1993).

Atualmente, a idade do paciente e a citogenética, no momento do diagnóstico, são considerados os dois principais fatores para avaliação do prognóstico (FRÖHLING et al., 2006). Outros fatores importantes incluem: leucemia relacionada à terapia ou desordens hematológicas antecedentes; falha na resposta na primeira indução à terapia; e elevada carga tumoral ao diagnóstico, conforme determinação pela contagem de leucócitos e pelos níveis de lactato desidrogenase (LDH) (STONE, 2009).

1.1.5.1 Idade

Em geral, pacientes com idade avançada estão associados a um prognóstico desfavorável para a LMA (HEINEMANN & JEHN, 1991). Os pacientes com idade superior a 60 anos, quando comparados aos com idade inferior a essa, têm menores taxas de resposta à primeira indução do tratamento, maiores índices de mortalidade, menor sobrevida livre de doença (SLD) e menor sobrevida global (SG). Ademais, os pacientes mais idosos tendem a ter mais comorbidades (STONE, 2009), alta frequência de alterações citogenéticas desfavoráveis e níveis significativos de proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR) (STONE, 2009; SMITH, HILLS & GRIMWADE, 2011).

Para as LLAs, a idade inferior a seis meses (PIETERS et al., 2007) ou superior a 60 anos, é descrita com indicativo de prognóstico desfavorável (ROWE, 2010).

1.1.5.2 Leucometria

A contagem de leucócitos no momento do diagnóstico é um fator de prognóstico relevante para todos os pacientes com LA (ROWE et al., 2005). É considerado como de prognóstico desfavorável a leucometria superior a $30.000/\text{mm}^3$ para pacientes com LLA-B; a $100.000/\text{mm}^3$ para LLA-T (HUNAULT et al., 2004; ROWE et al., 2005; ROWE, 2010); e a $10.000/\text{mm}^3$ para pacientes com LMA (SANTAMARIA et al., 2008).

1.1.5.3 Cariótipo

Várias anormalidades cromossômicas estão presentes na LA, o que a caracteriza como uma doença altamente heterogênea. Estudos em pacientes jovens com LMA demonstram que 45% deles possuem cariótipo normal e apresentam taxa de SG de cinco anos (BLOOMFIELD et al., 1998; GRIMWADE et al., 1998). Stone (2009) relata que em torno de 15% dos pacientes com LMA possuem anormalidade cariotípica favorável, como as que envolvem o cromossomo 15 e 17 [t(15, 17)] ou inv(16), dos quais 65% apresentam taxas de sobrevida de cinco anos. Outros 15% têm características de prognóstico desfavorável – deleção do cromossomo 7, deleção do 5q ou mais de três anormalidades cromossômicas – com taxa de sobrevida em cinco anos entre 10% a 15%. Algumas outras alterações cromossômicas – trissomia 8, 11q23 e trissomia 21 – e o cariótipo normal fazem parte do grupo que apresenta prognóstico intermediário (STONE, 2009).

O Quadro 6 permite observar que a classificação dos grupos de risco é variável de acordo com os centros de pesquisa que os determinam. Como pode ser visto nessa tabela, Marcucci et al. (2005) consideram pacientes com del(7q) de risco intermediário, enquanto a mesma deleção, segundo o grupo de Slovak et al. (2000), se enquadra na categoria de risco desfavorável. O mesmo ocorre com a del(5q), que é descrita, por Grimwade et al. (1998), como risco desfavorável e, por Marcucci et al. (2005), como risco intermediário. Essa variação na classificação dos grupos de risco é indicativo de que a estratificação do grau de risco embasada nas anormalidades cromossômicas torna-se difícil, além de que nem todos os pacientes com LMA apresentam alterações citogenéticas (STOVE, 2009).

Categoria de Risco	Grimwade et al. (1998)	Slovak et al. (2000)	Marcucci et al. (2005)
Favorável	inv(16)	inv(16)	inv(16)
	t(16;16)	del(16q)	del(9q)
	t(8;21)	t(16;16)	t(16;16)
	t(15;17)	t(8;21) sem del(9q) ou cariótipo complexo t(15;17)	t(8;21)
Intermediário	Cariótipo normal	Cariótipo normal	Cariótipo normal
	+21	-Y	-Y
	+22		+21
	abn(11q23)		+11
	del(7q)	del(12p)	+13
	del(9q)	Trissomia 6	del(5q)
	Trissomia 8		del(7q)
	Todas as outras anormalidades	Trissomia 8	del(11q)
Desfavorável	-5	-5	-7
	-7	-7	+8 ou outra
	abn(3q)	abn(3q)	adição
		abn(9q)	inv(3)
		abn(11q)	t(3;3)
		abn(17p)	t(11;19)
		abn(20q)	t(6;11)
		abn(21q)	
	del(5q)		
≥ 5 aberrações	del(7q)	≥ 3	
	t(6;9)	aberrações	
	t(9;22)	t(6;9)	

Quadro 6: Classificação do prognóstico baseado no grau de risco conforme as anormalidades cariotípicas presentes na LMA, segundo Grimwade et al. (1998), Slovak et al. (2000) e Marcucci et al. (2005).

Fonte: Adaptado de Stone (2009).

A exemplo do que ocorre com as alterações cromossômicas presentes em LLAs, dependendo do grupo que investiga tais anormalidades, essas podem ser associadas aos grupos de prognóstico favorável ou intermediário. A $t(1;19)$, por exemplo, pelo grupo de Szczepański, Harrison e Van Dongen (2010), é considerada como de prognóstico favorável e, pelo grupo de Pullarkat et al. (2008), de prognóstico desfavorável. As outras anormalidades associadas ao prognóstico das LLAs, de acordo com a citogenética, estão representadas no Quadro 7.

Categoria de Risco	Pullarkat et al. (2008)	Rowe (2010)	Szczepański, Harrison e Van Dongen (2010)
Favorável	Alta hiperdiploidia (51-65 crom.*)	Alta hiperdiploidia (51-65 crom.*) del(9p)	Alta hiperdiploidia (51-65 crom.*) t(1;19)
Intermediário	Cariótipo normal del(9p) Rearranjo MLL t(10;11) Baixa hiperploídia (47-50 crom.*) Tetraploidia (>80) Outras alterações		Cariótipo normal Rearranjo MLL t(10;11)
Desfavorável	Cariótipo complexo t(1;19) t(4;11) t(8;14) Baixa hipodiploidia (30-39 crom.*)	Cariótipo complexo t(9;22) t(4;11) t(8;14) Baixa hipodiploidia	Cariótipo complexo t(9;22) Hipodiploidia (≤44 crom.*)

Quadro 7: Classificação do prognóstico baseado no grau de risco conforme as anormalidades cariotípicas presentes nas LLAs, segundo diferentes grupos de pesquisa.

Fonte: Adaptado de Pullarkat et al. (2008), Rowe (2010), Szczepański, Harrison e Van Dongen (2010).

* Crom. – cromossomos

1.1.5.4 Marcadores imunofenotípicos relacionados com anormalidades citogenéticas

Como já descrito anteriormente, a imunofenotipagem é uma importante ferramenta para classificação das LAs (DIGIUSEPPE, 2007). Além disso, o conhecimento de determinados marcadores imunofenotípicos indica certas alterações citogenéticas que auxiliam na determinação do prognóstico (CRAIG & FOON, 2008).

A LMA com $t(8;21)(q22,q22)$ frequentemente expressa o CD19 e, às vezes, o TdT (KUSSICK et al., 2004) ou outros marcadores linfóides, como o CD7 e o CD56 (KITA et al., 1992; BAER et al., 1997), além de apresentar a expressão para marcadores de células precursoras (CD34, CD117 e HLA-DR) (FAN et al., 2010). Entretanto, os pacientes com LMA que possuem a $inv(16)$ muitas vezes expressam o CD2, marcador de linhagem T (ADRIAANSEN et al., 1993). Por outro lado, indivíduos com LPA com $t(15;17)(q22,q12)$ comumente apresentam os fenótipos CD34 e HLA-DR negativos ou parcialmente positivos; CD11b e CD15 negativos; CD13 heterogêneo; e CD117 e CD33 positivos. Contudo, a negatividade de CD34 e HLA-DR possui relação com o cariótipo normal em pacientes com LMA, além de existir uma associação desse perfil imunofenotípico com a mutação no gene FLT3 do tipo duplicação interna em *tandem* (DIT) (KUSSICK et al., 2004). Os pacientes que possuem mutação no gene NPM1 geralmente têm alta expressão de CD33, porém com ausência ou baixa expressão de CD34 (FALINI et al., 2005).

Em pacientes com LLA-B, a marcação positiva para CD9, CD10 e CD19 e a marcação negativa para CD20 e CD34 são tipicamente associadas à presença da $t(1;19)(q23;p13)$ (BOROWITZ et al., 1993). Já a $t(4;11)(q21,q23)$ é frequentemente encontrada em LLA-B, com negatividade para CD10 e CD24 e positividade para CD15 (DIGIUSEPPE, 2007).

Cabe salientar que, mesmo diante das informações de que os perfis imunofenotípicos possam ter associação com anormalidades citogenéticas presentes em LA, a imunofenotipagem não substitui a pesquisa das mesmas (CRAIG & FOON, 2008).

1.1.5.5 Marcadores moleculares

Existem algumas anormalidades citogenéticas que são classificadas como de risco favorável, como, por exemplo, a inv(16). Porém, a presença de determinadas mutações genéticas, como no gene c-KIT, pode anular as características de cariótipo favorável existente (PASCHKA et al., 2006). Isso explica o porquê da heterogeneidade existente na classificação dos grupos de risco baseada nos critérios citogenéticos. Da mesma forma, há uma variabilidade entre os pacientes com cariótipo normal que apresentam determinadas mutações que conferem a eles prognóstico favorável e entre aqueles com cariótipo normal cujas mutações lhes atribuem um prognóstico desfavorável (Quadro 8) (FRÖHLING et al., 2005; MRÓZEK & BLOOMFIELD, 2006; MRÓZEK et al., 2007).

Impacto para o paciente	Anormalidade molecular	Efeito no prognóstico
Desfavorável	Mutação FLT3-DIT	DRC*, SG e SLD significativamente curta
	Duplicação parcial em <i>tandem</i> MLL	DRC, SG e SLD significativamente curta
	Superexpressão BAALC	SG significativamente curta e maior incidência cumulativa de recaída
Favorável	Mutação CEBP α	DRC e SG
	Mutação NPM1 (FLT3-DIT negativo)	significativamente longa SG, SLD e SLR** significativamente melhor

Quadro 8: Influência das mutações moleculares no prognóstico de pacientes com LMA.

Fonte: Adaptado de Fröhling et al. (2005), Mrózek e Bloomfield (2006), Mrózek et al. (2007) e Stone (2009).

*DRC – duração da remissão completa; **SLR – sobrevida livre de recidiva

De acordo com o Quadro 8, os pacientes com LMA que possuem a mutação FLT3-DIT ou a duplicação parcial em *tandem* MLL (DPT-MLL) apresentam DRC, SG e SLD significativamente curtas, o que confere a esses indivíduos um prognóstico desfavorável (STONE,

2009). Entretanto, pacientes com a mutação no gene $CEBP\alpha$ (PREUDHOMME et al., 2002) ou no gene NPM1 (com FLT3-DIT negativo) (DÖHNER et al., 2002) tendem a ter resultados favoráveis, incluindo a SG. Desse modo, as mutações nos genes $CEBP\alpha$, FLT3-DIT e NPM1 estão estabelecidas como fatores de prognóstico, e sua investigação é recomendada para todos os pacientes com LMA com citogenética normal, como está representado na Figura 1 (SWERDLOW et al., 2008; DÖHNER et al., 2010).



Grupo de risco baseado na citogenética	Recomendações moleculares
Favorável t(8;21) inv(16) t(16;16)	 c-KIT
Intermediário Cariótipo normal Anormalidades não recorrentes	 NPM1 $CEBP\alpha$ FLT3-DIT
Desfavorável t(6;9) t(6;11)	

Figura 1: Recomendações moleculares para pacientes com LMA conforme a estratificação de risco
 Fonte: Adaptada de Betz e Hess (2010).

As mutações nos genes $CEBP\alpha$, FLT3-DIT e NPM1 geralmente acometem genes envolvidos nas principais vias que regulam a proliferação, a diferenciação e/ou a sobrevivência celular. Tais descobertas foram importantes para a compreensão da leucemogênese e, a partir disso, essas mutações foram divididas em duas classes: mutações de classe I e mutações de classe II (KELLY & GILLILAND, 2002). As mutações da classe I (FLT3, c-KIT, N-RAS/K-RAS e PTPN11) conferem vantagem de sobrevivência e de proliferação celular e frequentemente estão envolvidas com vias de sinalização dependente de quinase. Por outro lado, as mutações da classe II ($CEBP\alpha$; NPM1; e as inversões e translocações cromossômicas recorrentes) prejudicam a

diferenciação, principalmente a mieloide, na qual afetam genes envolvidos na regulação da transcrição (BETZ & HESS, 2010).

O Quadro 9 mostra o significado prognóstico de algumas alterações genéticas, como a mutação no gene FLT3, do tipo DIT, que está estabelecida como de prognóstico desfavorável (SWERDLOW et al., 2008; BETZ & HESS, 2010; DÖHNER et al., 2010). Já as mutações no gene NPM1 (DÖHNER et al., 2005) e no gene CEBP α (PREUDHOMME et al., 2002) possuem prognóstico favorável. Quanto às mutações no gene c-KIT (CARE et al.; 2003), cuja investigação clínica é opcional, são consideradas de prognóstico desfavorável (Quadro 9). No que se refere às mutações no gene WT1, à DPT-MLL, à mutação pontual no gene FLT3 (SWERDLOW et al., 2008; DÖHNER et al., 2010) e a superexpressão de ERG (MARCUCCI et al., 2005) e BAALC (LANGER et al., 2008), essas não têm relevância prognóstica no contexto das terapias atuais ou ainda não possuem elucidado seu significado clínico-patológico, sendo, por isso, necessárias mais investigações para o correto esclarecimento do prognóstico (Quadro 9) (SWERDLOW et al., 2008; STONE et al., 2009; BETZ e HESS, 2010; DÖHNER et al., 2010)

Classificação das mutações	Investigação clínica		
	Recomendado	Opcional	Em investigação
Mutações favoráveis	NPM1 CEBP α		
Mutações desfavoráveis	FLT3-DIT	c-KIT	DPT-MLL WT1 FLT3-TKD
Superexpressão desfavorável			BAALC ERG

Quadro 9: Marcadores moleculares no prognóstico da LMA.

Fonte: Adaptado de Betz e Hess (2010).

As mutações que ocorrem em pacientes com LMA apresentam diferentes frequências. A mutação no gene NPM1 é a mutação mais comum, ocorrendo em mais de 50% dos pacientes, seguida da mutação

no gene *FLT3* do tipo DIT, que ocorre em cerca de 30% (SCHLENK et al., 2008). No entanto, vale lembrar que os pacientes podem apresentar mais de uma mutação. Um paciente, por exemplo, pode ter a mutação no gene *NPM1* juntamente com a mutação no gene *FLT3* do tipo DIT. A importância das combinações das mutações em pacientes com LMA ainda é um pouco desconhecida (STONE, 2009).

Os marcadores moleculares na LLA, assim como na LMA, também são identificados como fatores responsáveis pela leucemogênese (Quadro 10) (ROWE, 2010).

	Significância estabelecida	Significância emergente
LLA-B	BCR-ABL	BAALC IKAROS
LLA-T		NOTCH1 BAALC

Quadro 10: Marcadores moleculares significativos no prognóstico de LLA.

Fonte: Adaptado de Rowe (2010).

Um dos marcadores moleculares mais comuns na LLA-T, que ocorre em torno de 50% dos pacientes, é a mutação ativadora de *NOTCH1* (WENG et al., 2004). Esse gene codifica receptores transmembrana que são importantes no desenvolvimento de células T normais (MANSOUR et al., 2006; SCHNAPP, 2009); porém, as implicações prognósticas de mutações no gene *NOTCH1* ainda são incertas (LEWIS et al. 2007; MANSOUR et al., 2009).

As mutações no gene *BAALC* têm demonstrado associação a um prognóstico desfavorável (BALDUS et al., 2007) e, recentemente, um grupo de pesquisadores informou que mutações em *BAALC* também estão relacionadas com LLA-B e que igualmente possuem prognóstico desfavorável (KÜHNEL et al., 2010).

1.1.5.5.1 Mutações no gene *FLT3*

FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) é um receptor de membrana tirosina-quinase (RTQ) relacionado com a via intrínseca de sinalização celular e composto por um domínio extracelular (DE), um domínio

justamembrana (JM) formado por dímeros intracelulares altamente conservados de domínios tirosina-quinases. Esse receptor pertence à subfamília de classe III dos RTQs, que incluem membros de estrutura semelhante, tais como: os receptores c-FMS, c-KIT e PDGF (GABBIANELLI et al., 1995; ROSNET et al., 1996).

Fisiologicamente, o receptor FLT3 encontra-se na forma não-fosforilada, com o domínio quinase inativo. Após a interação do ligante (FL) com o receptor, este sofre mudança conformacional, o que permite a sua dimerização e a ativação da enzima tirosina-quinase, com isso ocorrendo a fosforilação dos domínios intracelulares. Quando o receptor FLT3 é ativado, algumas proteínas citoplasmáticas que com ele interagem são recrutadas e formam interações intracelulares caracterizadas por um complexo proteína-proteína, como as proteínas SHC, GRB2, SHIP, CBL e CBLB (ZHANG & BROXMEYER, 2000). A ligação dessas proteínas ao complexo resulta em uma cascata de reações que culmina com a ativação da fosforilação de mediadores secundários, como, por exemplo, MAPK, STAT e AKT/PI₃K. Quando tais mediadores são ativados, e conforme o sinal que é enviado para o núcleo, desencadeia-se uma série de eventos, como a regulação da apoptose, da proliferação, de sobrevivência e da diferenciação celular (Figura 2) (MESHINCHI & APPELBAUM, 2009).

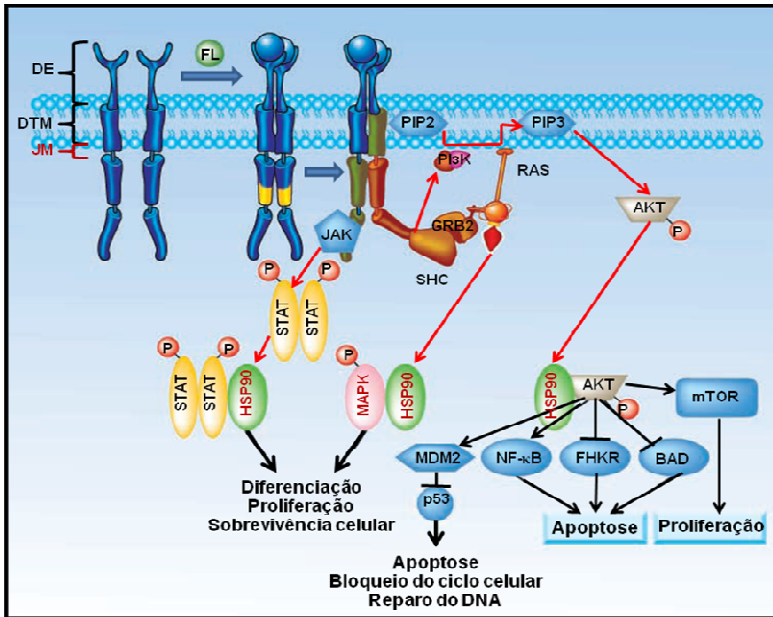


Figura 2: Vias de transdução de sinal do receptor FLT3
 Fonte: Adaptada de Meshinchi e Appelbaum (2009).

O receptor FLT3 desempenha um papel importante na hematopoiese fisiológica, devido à expressão que possui em células hematopoiéticas imaturas e no desenvolvimento de células-tronco (RUSTEN et al., 1996; SHAH et al., 1996). Dados de estudos *in vitro* com modelos murinos *knockout* para FLT3 confirmam tal importância na hematopoiese normal, especialmente em momentos de estresse hematopoiético (MACKAREHTSCHIAN et al., 1995; RUSTEN et al., 1996).

Quando o gene FLT3 sofre mutação, dá origem a um produto final modificado, ou seja, gera um receptor com alterações estruturais. As mutações mais comuns encontradas no gene FLT3 são de dois tipos: DIT e mutações pontuais (REINDL et al., 2006). No gene FLT3, as DITs resultam de uma duplicação de segmentos na região codificadora do domínio JM (codificada pelo éxon 14 e 15). Estudos *in vitro* demonstraram que as DIT promovem a dimerização do receptor independente do ligante, o que leva à própria autonomia de fosforilação e ativação do receptor, desse modo, ocorrendo proliferação celular

independente da ativação das vias de sinalização celular (HAYAKAWA et al.; 2000; STIREWALT & RADICH, 2003).

O mecanismo específico pelo qual a DIT no gene FLT3 leva à dimerização autônoma é desconhecido, porém suspeita-se que, fisiologicamente, o domínio JM atue como um regulador negativo, o que evita a ativação do receptor e o mantém em estado autoinibido. A análise da estrutura tridimensional do receptor FLT3 sugere que a duplicação do domínio JM possa prejudicar o bloqueio natural que normalmente impede a dimerização autônoma (HIROTA et al., 1998; GILLE et al., 2000). Provavelmente, a dimerização dos receptores com DIT no gene FLT3 sofrem mudanças estruturais que expõem os sítios de fosforilação dos domínios de tirosina-quinase e promovem a autofosforilação (GRIFFITH et al., 2004). Desse modo, as DITs em FLT3 promovem a proliferação celular por meio da ativação de várias vias de sinalização celular, como RAS/MAPK, STAT e AKT/PI₃ (MIZUKI et al., 2000).

A DIT no gene FLT3, que é uma das mutações mais comuns em doenças hematológicas malignas, ocorre em leucemia mieloide crônica (LMC) (5-10%), em síndrome mielodisplásica (5-10%), em LMA (15-35%) (KIYOI et al., 1999; KOTTARIDIS et al., 2001; GALE et al., 2007) e em LLA (5-10%) (KOTTARIDIS et al., 2001). A prevalência da DIT é altamente dependente da idade, aumentando com o avanço da mesma, bem como é descrita como rara na LMA infantil; assim, em pacientes de 5 a 10 anos, o acometimento é de 5% a 10%; em adultos jovens, de 20%; e em pacientes com mais de 55 anos e com LMA, as taxas são maiores de 35% (MESHINCHI et al., 2006). A mutação FLT3-DIT ocorre frequentemente em pacientes com LPA com t(15;17) (KOTTARIDIS et al., 2001; MOTYCKOVA & STONE, 2010). Além disso, a literatura descreve que as mutações FLT3-DIT em pacientes com LMA estão associadas à presença de leucocitose e a maior porcentagem de blastos (MRÓZEK et al., 2007; MOTYCKOVA & STONE, 2010).

Em um estudo com 854 pacientes que apresentavam LMA, os pesquisadores determinaram que a presença da mutação FLT3-DIT teve impacto negativo em longo prazo e que os pacientes que tinham a mutação tiveram mais chance de recidiva em cinco anos, quando comparados com aqueles sem a mutação (64% *versus* 44%) (KOTTARIDIS et al., 2001). Segundo esses pesquisadores, a SLD também foi bastante prejudicada, 30% permaneceram livres de doença em cinco anos, e, nos pacientes sem a mutação, a porcentagem foi de

46%. Ademais, no final de cinco anos, o número de pacientes vivos com a mutação FLT3-DIT foi menor (32% *versus* 44%). Ainda nesse estudo, foram comparados dois grupos: um com a presença da mutação no gene FLT3-DIT e citogenética desfavorável; e o outro com citogenética desfavorável, mas com ausência da mutação FLT3-DIT. O primeiro grupo apresentou taxa de recaída de 100% em dois anos e o segundo, de 78% em cinco anos. Isso demonstra que a mutação no gene FLT3 possui um significativo impacto sobre os pacientes com LMA (KOTTARIDIS et al., 2001). Essas conclusões também foram encontradas por outros grupos de pesquisadores (KIYOI et al., 1999; FRÖHLING et al., 2002; SCHNITTGER et al., 2002; MORENO et al., 2003; SHEIKHHA et al., 2003; CIOLLI et al., 2004; CLOOS et al., 2006). Tais estudos permitem afirmar que a DIT no gene FLT3 em pacientes com LMA estão associadas a um prognóstico desfavorável (YANADA et al., 2005; MEAD et al., 2007). Outros estudos confirmaram que a presença de FLT3-DIT é um fator de prognóstico independente que contribui para recidiva e prognóstico desfavorável na LMA (KOTTARIDIS et al., 2001; SCHNITTGER et al., 2002).

As mutações pontuais no gene FLT3, também conhecidas como FLT3-TKD, são encontradas no éxon 20 e atingem a alça de ativação do receptor FLT3 (THIEDE et al., 2002; MESHINCHI et al., 2006). Na maioria das LMAs com FLT3-TKD, a mutação acomete o códon 835, com mudança de ácido aspártico por tirosina (D835). Assim, essas mutações também são descritas como FLT3-D835. No entanto, outras mutações, exclusões e inserções no códon D835 e ao redor dos códons têm sido descritas (THIEDE et al., 2002; SPIEKERMANN et al., 2002). Tal mutação promove autofosforilação do receptor, o que leva à proliferação celular independente de ligante, semelhante ao que acontece na mutação FLT3-DIT (HAYAKAWA et al., 2000; KIYOI et al., 2002).

A mutação FLT3-D835 é encontrada em células neoplásicas de pacientes com LMC (1%), LLA (1-3%), SMD (2-5%) e LMA (5-10%) (THIEDE et al., 2002; MESHINCHI et al., 2006). Raramente os pacientes apresentam as duas mutações no gene FLT3 (CHEN et al., 2005). Diferente da DIT, a FLT3-D835 acomete pacientes de todas as faixas etárias (MESHINCHI et al., 2006), porém ainda é controverso o prognóstico de pacientes que apresentam a mutação pontual no gene FLT3 (YANADA et al., 2005; MEAD et al., 2007). Diferente da mutação FLT3-DIT, estudos mostraram que a presença de FLT3-D835

não está associada com leucocitose (CHOUDHARY et al., 2005; GRUNDLER et al., 2005).

Como já citado, quando o receptor FLT3 sofre mutação, fica permanentemente ativado, o que estimula as vias de sinalização celular e afeta a sobrevivência e proliferação celular (KOTTARIDIS et al., 2001; MARKOVIC et al., 2005). Nesse sentido, futuros alvos terapêuticos podem ser investigados, como, por exemplo, na inibição do receptor FLT3, juntamente com as vias de AKT e STAT5 (STONE, 2009).

Mediante esses conhecimentos, têm surgido novas terapias para LMA, baseadas na presença ou ausência das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1. Além disso, nos casos de resistência das células leucêmicas à terapia, é fundamental o acompanhamento da persistência ou não dos clones com essas mutações, uma vez que as cópias resistentes à quimioterapia podem apresentar vantagem proliferativa. Assim, a estratificação do prognóstico é de extrema importância para o paciente, pois contribui para a escolha adequada de qual protocolo terapêutico deve ser utilizado (NCCN, 2009).

Na literatura alguns estudos clínicos, em fase I e II (SHAH & AGARWAL, 2008) e em fase III (OHTAKE, 2007), investigam os benefícios da utilização dos inibidores de FLT3 em pacientes portadores de mutações no gene FLT3. Esses resultados mostram a importância da investigação das mutações no gene FLT3 para a estratificação e avaliação de prognóstico na LA, pois a presença dessas mutações implica na escolha da conduta terapêutica (NCCN, 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar a importância das mutações no gene FLT3 (duplicação interna em *tandem* – DIT – e mutação pontual D835) como marcadores moleculares para o prognóstico de pacientes com suspeita clínica de LA, antes da primeira terapia.

Objetivos específicos

- Padronizar a metodologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção da DIT no gene FLT3;
- Padronizar a metodologia de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) para a detecção da mutação D835 no gene FLT3;
- Aplicar as metodologias padronizadas na investigação das mutações DIT e D835 no gene FLT3 em pacientes com diagnóstico de LA, antes da primeira terapia;
- Associar a presença das mutações no gene FLT3 com outros fatores prognósticos, como: a idade, a leucometria, os níveis de LDH, a expressão de CD34 e as translocações antes da primeira terapia;
- Associar a presença das mutações no gene FLT3 (DIT e mutação pontual D835) com o gênero e a porcentagem de blastos antes da primeira terapia;
- Associar a presença das mutações no gene FLT3 com a ausência ou a presença de remissão, como também se esses pacientes com as mutações no gene FLT3 foram ou não a óbito.

2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LA

Obtiveram-se as amostras de MO ou SP de pacientes com suspeita clínica de LA, antes do primeiro tratamento, atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) e pelo Serviço de Oncologia do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), ambos situados em Florianópolis, Santa Catarina, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010. Em todos os casos, colheram-se as amostras de MO e SP com EDTA, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (212/2009; Anexo 1) e do HIJG (075/2008; Anexo 2). Os pacientes menores de 18 anos, o responsável legal foi responsável pela assinatura do TCLE. Em seguida, se fez o encaminhamento das amostras ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH).

Durante o período do estudo, encaminharam-se para o LOEH 69 amostras com suspeita clínica de LA. Das 74 amostras, três a suspeita clínica de LA não se confirmou, cinco amostras seus respectivos prontuários não foram localizados e 11 amostras eram de pacientes com recidiva. Sendo assim, 55 amostras de pacientes com diagnóstico de LA foram submetidas à investigação das mutações no gene FLT3.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Realizou-se a extração de ácido desoxirribonucléico (DNA) com isotiocianato de guanidina 5M (Sigma) livre de fenol. Para isso, adicionaram-se 200 µL de SP em 1 mL de solução de isotiocianato de guanidina 5M. Após a adição da solução de isotiocianato de guanidina 5M, fez-se a homogeneização da amostra por inversão durante 15 segundos, bem como a incubação *over night* à temperatura ambiente sob agitação contínua. Após incubação, adicionaram-se 50 µL de solução de dióxido de sílica acidificada (Sigma) e se homogeneizou o tubo por inversão durante 5 minutos. Centrifugou-se a amostra a 1000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente e se descartou o sobrenadante. Posteriormente, adicionaram-se 500 µL de solução de lavagem de isotiocianato de guanidina à sílica e novamente se centrifugou o tubo a 1000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente. Descartou-se o

sobrenadante e se realizou mais uma lavagem com solução de lavagem de isotiocianato de guanidina 5M. Na sequência, lavou-se a sílica duas vezes com 500µL de etanol 70% (Merck, Darmstadt, Germany) e, após cada lavagem, se fez a centrifugação da mesma a 1000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente. Realizou-se, então, uma última lavagem com 500 µL de acetona (Merck, Darmstadt, Germany), com posterior secagem em banho seco por 10 minutos a 56°C. Quando a sílica estava seca, se fez a reidratação da mesma com 25 µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), como também a incubação por 10 minutos a 56°C sob agitação. Após esse tempo, centrifugou-se o tubo a 2600 x g por 5 minutos e transferiu-se o sobrenadante contendo o DNA para um tubo de 0,6 mL.

2.3 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DA DIT NO GENE FLT3

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação dos éxons 14 e 15 do gene FLT3 foram previamente descritos por Meshinchi et al. (2001) (Quadro 11). Na etapa de padronização da PCR utilizaram-se diferentes concentrações de MgCl₂, desorribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) e dos oligonucleotídeos iniciadores. Após essa padronização amplificaram-se 100 ng de DNA com reagentes da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), num volume final de 50 µL que continha os seguintes volumes e concentrações finais correspondentes: 5 µL de tampão 10X concentrado para Taq-DNA polimerase (10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl); 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM); 0,4 µL de dNTP mix (200 µM de cada); 2,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (0,4 µM), 0,25 µL Taq-DNA polimerase (*recombinant*) (1,25 U/µL); e água ultrapura para completar o volume final da reação.

Tipo de iniciador	
senso	5'- GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC- 3'
antissenso	5'- CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC- 3'

Quadro 11: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção da DIT no gene FLT3.

Amplificou-se a PCR em termociclador Eppendorf, modelo *Mastercycle Personal*. A amplificação consistiu de incubação inicial de 94°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, ligação dos iniciadores a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com uma extensão final de 72°C por 8 minutos. Avaliaram-se os produtos da PCR em gel desnaturante de poliacrilamida 12% em eletroforese de 80 V por 90 minutos. Posteriormente, se procedeu à coloração com brometo de etídeo e à visualização em transiluminador sob luz UV de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV-20). A detecção de apenas uma banda com 329 pb correspondia ao gene selvagem, correlacionado com a ausência de banda compatível para a DIT no gene FLT3. Determinou-se a presença de banda compatível para essa alteração com a visualização de uma única banda com fragmento maior que o gene selvagem (mutação homozigota) ou presença de dois ou mais fragmentos (mutação heterozigota). Estimou-se o tamanho dos produtos da PCR por comparação, com o marcador de peso molecular de 50 pb.

2.3.1 Padronização do número de ciclos para a PCR para a detecção da DIT no gene FLT3

Para padronizar o número de ciclos, realizaram-se amplificações de acordo com o protocolo estabelecido anteriormente, alterando-se apenas o número de ciclos: 30, 35 e 40. Submeteram-se os produtos da PCR à eletroforese em gel de agarose 2,5% a 100 V por 30 minutos, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador sob luz UV de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV-20).

2.4 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA A DETECÇÃO DA MUTAÇÃO D835 NO GENE FLT3

Para amplificação do éxon 20 do gene FLT3, utilizaram-se pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Quadro 12) previamente descritos por Liang et al. (2003). Na etapa de padronização da PCR utilizaram-se diferentes concentrações de MgCl₂, desorribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) e dos oligonucleotídeos iniciadores. Após essa padronização amplificaram-se 100 ng de DNA, num volume final de 50

μL [com reagentes da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)], o qual continha os seguintes volumes e concentrações finais correspondentes: 5 μL de tampão 10X concentrado para Taq-DNA polimerase (10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl); 2,25 μL de MgCl_2 (2,25 mM); 0,6 μL de dNTP mix (300 μM de cada); 2,0 μL de cada oligonucleotídeo iniciador (0,4 μM de cada); 0,25 μL Taq-DNA polimerase (*recombinant*) (1,25 U/ μL); e água ultrapura para completar o volume final da reação.

Tipo de iniciador	
senso	5'- CCGCCAGGAACGTGCTTG-3'
antissenso	5'-GCAGCCTCACATTGCCCC-3'

Quadro 12: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção da mutação D835 no gene FLT3.

Realizou-se a amplificação da PCR em termociclador Eppendorf, modelo *Mastercycle Personal*, a qual consistiu de incubação inicial de 94°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, ligação dos iniciadores a 66°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com uma extensão final de 72°C por 8 minutos. Ao término da PCR, avaliaram-se os produtos em gel de agarose 2,5%, por meio de eletroforese a 100 V por 30 minutos, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador sob luz UV de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV-20). A visualização de uma única banda, com 114 pb, correspondeu aos casos com produto da PCR amplificado.

Diante do conhecimento da sequência codificante de D835, que compreende GATA, a qual é o sítio de atividade da enzima de restrição Eco RV, utilizou-se a técnica de RFLP para a detecção da mutação pontual no gene FLT3. Para isso, incubou-se por 1 h a 37°C 5U de enzima Eco RV Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) (0,5 μL), 1,5 μL de seu tampão para cada de 10 μL de produto da PCR amplificado, completando com água ultrapura para o volume final de 15 μL . Analisaram-se os produtos digeridos em gel desnaturante de poliacrilamida 12% a 70 V por 90 minutos. As amostras sem a mutação sofreram digestão enzimática completa, o que resultou na presença de duas bandas: uma de 68 pb e outra de 46 pb. Já as amostras com mutação no sítio enzimático da enzima Eco RV, apresentaram banda compatível com a mutação D835 no gene FLT3, por ser visualizada uma banda parcial com 114 pb (mutação heterozigota) ou uma banda

totalmente não digerida, de 114 pb (mutação homozigota). O tamanho dos produtos da PCR foi estimado, por comparação, com o marcador de peso molecular de 25 pb.

2.4.1 Padronização do número de ciclos para a PCR para a detecção da mutação D835 no gene FLT3

De acordo com o protocolo estabelecido anteriormente, realizaram-se amplificações com diferentes números de ciclos: 30, 35 e 40, a fim de estabelecer a padronização referida. Após o término dos ciclos, submeteram-se os produtos da PCR à eletroforese em gel de agarose 2,5% a 100 V por 30 minutos. Na sequência, se procedeu à coloração dos mesmos com brometo de etídeo e à visualização em transiluminador sob luz UV de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV-20).

2.4.2 Padronização do número de unidades da enzima Eco RV para a digestão da região codificante D835 que compreende a sequência GATA no gene FLT3

Para a padronização de quantas unidades da enzima seriam necessárias, utilizou-se uma amostra de SP de um indivíduo saudável e procedeu-se conforme o protocolo descrito anteriormente, com variação apenas nas quantidades de enzima utilizada: 1 U, 5 U e 10 U. Após incubação por 1 h a 37°C, submeteram-se os produtos da digestão enzimática à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% a 70 V por 90 minutos e, posteriormente, se realizou a coloração dos mesmos com brometo de etídeo, como também a visualização em transiluminador sob luz UV de 320 nm (HOEFER-MacroVue UV-20).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Avaliaram-se, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010, todos os pacientes com diagnóstico de LA, referenciados ao LOEH. Realizaram-se a confecção do banco de dados e a análise estatística com o auxílio do *software* SPSS 16.0®.

Sumarizaram-se os dados como números absolutos e percentuais, no caso de variáveis nominais, e como média e desvio padrão, no caso de variáveis numéricas.

Quanto à expressão das mutações no gene FLT3 (DIT e D835), se fez a sumarização de forma dicotômica (ausente ou presente).

Associaram-se as médias das variáveis numéricas entre os grupos de interesse por meio do teste *t* de *Student* em um nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Variáveis nominais, por sua vez, se associaram entre os grupos de interesse por meio do teste do *qui quadrado* ou Exato de Fisher, em um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3.1 PCR PARA A DETECÇÃO DA DIT NO GENE FLT3

A PCR realizou-se conforme Meshinchi et al. (2001), com algumas alterações como citado em Materiais e Métodos (item 2.3).

Como pode ser observado na Figura 3 – linha 5, representa uma amostra de um indivíduo sem a mutação do tipo DIT no gene FLT3, pois apresenta apenas uma banda de 329 pb. Já a Linha 6 da Figura 3, demonstra uma amostra de paciente com a presença da DIT no gene FLT3, com uma banda de 329 pb e outra com peso molecular maior que este.

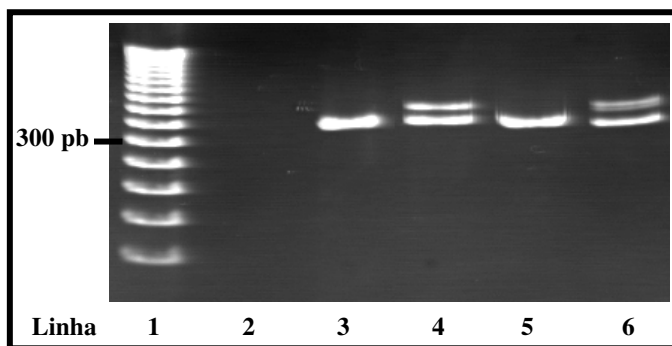


Figura 3: Gel representativo da amplificação da PCR para a DIT no gene FLT3. Linha 1 – Marcador de peso molecular de 50 pb; Linha 2 – Controle negativo da PCR; Linha 3 – Controle negativo para a DIT no gene FLT3; Linha 4 – Controle positivo para a DIT no gene FLT3; Linha 5 – Amostra de paciente com ausência da DIT no gene FLT3; Linha 6 – Amostra de paciente com presença da DIT no gene FLT3.

3.1.1 Número de ciclos para a PCR para a detecção da DIT no gene FLT3

Por meio da análise da Figura 4, pode-se estabelecer que, com 35 ciclos, obteve-se um produto de PCR de boa resolução para a investigação da DIT no gene FLT3.

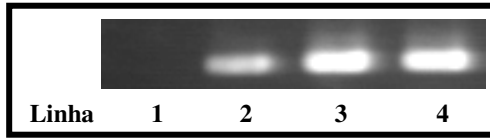


Figura 4: Gel representativo da padronização do número de ciclos para a detecção da DIT no gene FLT3

Linha 1 – Controle negativo da PCR; Linha 2 – PCR com 30 ciclos; Linha 3 – PCR com 35 ciclos; Linha 4 – PCR com 40 ciclos.

3.2 PCR PARA A DETECÇÃO DA MUTAÇÃO D835 NO GENE FLT3

Após a PCR verificou-se a presença de banda correspondente ao produto amplificado (Figura 5).

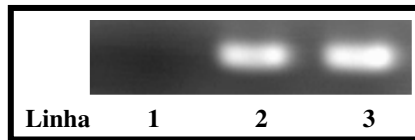


Figura 5: Gel representativo da amplificação da PCR para a mutação pontual D835 no gene FLT3

Linha 1 – Controle negativo da PCR; Linha 2 e 3 – Amostra de paciente após PCR.

Na sequência, as amostras foram submetidas à técnica de RFLP. A amostra que apresenta uma banda de 68 pb e outra de 46 pb (Figura 6 – Linha 6) corresponde à ausência de mutação do tipo D835, pois sofreu digestão enzimática completa, o que resultou na presença de duas bandas. Já a amostra na Linha 4 – Figura 6 apresentou uma banda totalmente não digerida, de 114 pb (mutação homozigota), o que correspondeu à presença da mutação pontual, D835, no gene FLT3.

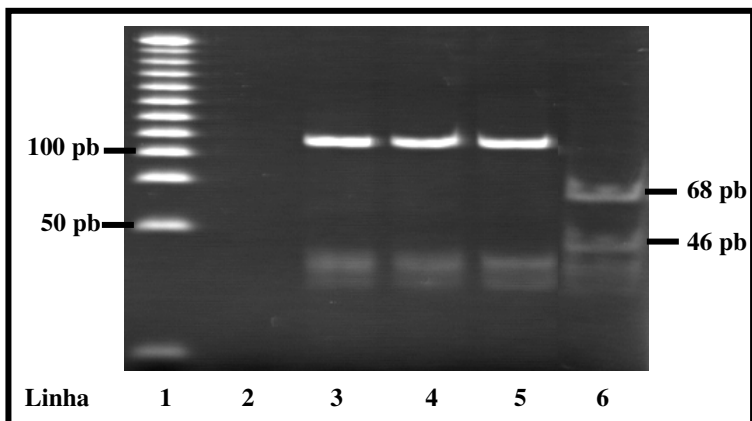


Figura 6: Gel representativo da digestão enzimática após PCR para a mutação D835 no gene FLT3

Linha 1 – Marcador de peso molecular de 25 pb; Linha 2 – Controle negativo da PCR; Linha 3 – Amostra do paciente X antes da digestão enzimática; Linha 4 – Amostra do paciente X depois da digestão enzimática; Linha 5 – Amostra do paciente Y antes da digestão enzimática; Linha 6 – Amostra do paciente Y depois da digestão enzimática.

3.2.1 Número de ciclos para a PCR para a detecção da mutação D835 no gene FLT3

A Figura 7 demonstra que, com 35 ciclos, obteve-se com boa resolução a amplificação da PCR para a investigação da mutação D835 no gene FLT3.

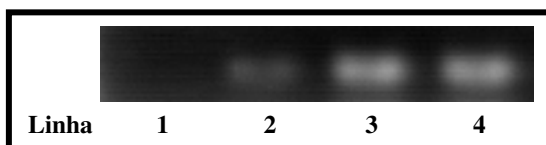


Figura 7: Gel representativo da padronização do número de ciclos para a detecção da mutação D835 no gene FLT3

Linha 1 – Controle negativo da PCR; Linha 2 – PCR com 30 ciclos; Linha 3 – PCR com 35 ciclos; Linha 4 – PCR com 40 ciclos.

3.2.2 Número de unidades da enzima Eco RV para a digestão da região codificante D835 que compreende a sequência GATA no gene FLT3

A análise da Figura 8 permite observar que 5 U da enzima de restrição Eco RV foram suficientes para a digestão da região codificante D835.

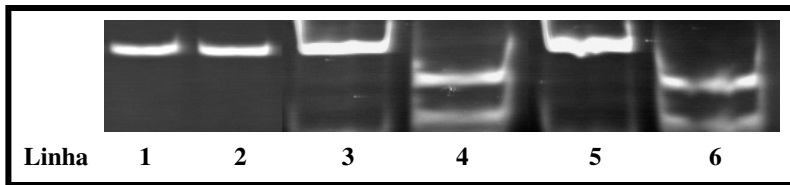


Figura 8: Gel representativo da padronização do número de unidade da enzima Eco RV para a digestão da região codificante D835 no gene FLT3

Linha 1 – Amostra do paciente X antes da digestão enzimática; Linha 2 – Amostra do paciente X depois da digestão enzimática com 1 U da enzima Eco RV; Linha 3 – Amostra do paciente X antes da digestão enzimática; Linha 4 – Amostra do paciente X depois da digestão enzimática com 5 U da enzima Eco RV; Linha 5 – Amostra do paciente X antes da digestão enzimática; Linha 6 – Amostra do paciente X depois da digestão enzimática com 10 U da enzima Eco RV.

3.3 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO

No período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010, encaminharam-se para o LOEH 55 amostras com suspeita clínica de LA, a fim de que fosse realizada a investigação das mutações no gene FLT3. Das 55 amostras, três não possuíam material suficientemente amplificável para reação de PCR. Desse modo, avaliou-se um total de 52 amostras de pacientes com diagnóstico de LA.

Encaminharam-se para investigação das mutações no gene FLT3 amostras de SP ou de MO, das quais a primeira representou 80,8% (42 amostras) e a segunda, 19,2% (10 amostras).

Das 52 amostras analisadas, 12 (23,1%) eram de pacientes maiores de 16 anos e 40 (76,9%), de indivíduos com idade igual ou inferior a 16 anos (Tabela 1). Em relação ao gênero, 46,2% (24 casos)

eram do gênero feminino, e 53,8% (28 casos) do gênero masculino (Tabela 1).

Tabela 1: Amostras com diagnóstico de LA que foram submetidas à investigação das mutações no gene FLT3, de acordo com o gênero e a faixa etária

Gênero	Faixa etária		Total
	≤ 16 anos	> 16 anos	
Feminino	17	7	24
Masculino	23	5	28
Total	40	12	

As idades dos pacientes que foram submetidos à investigação das mutações no gene FLT3 que estavam na faixa etária de idade igual ou inferior a 16 anos, no diagnóstico, variaram entre um mês e 15,7 anos (mediana de 4,5 anos), enquanto que, nos indivíduos com idade superior a 16 anos, a variação de faixa etária foi de 16,2 a 87,4 anos (mediana de 49,4 anos).

Na Tabela 2, é possível observar que os pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos com LMA apresentaram maiores porcentagens da mutação no gene FLT3 do tipo DIT, o que correspondeu a 33,3% (4 casos) de positividade para a essa mutação, e, três indivíduos (10,7%), nessa mesma faixa etária, apresentavam diagnóstico de LLA. Desse modo, constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,168$) entre os dois subtipos de LA nos pacientes com mutação DIT com idade igual ou inferior a 16 anos, mas observa-se que essa mutação é mais prevalente nos indivíduos com LMA. Entretanto, nenhum dos pacientes com LLA com idade superior a 16 anos apresentou a DIT no gene FLT3, além de que, em apenas um indivíduo (12,5%) com LMA, se detectou a presença dessa mutação, que também não apresentou diferença estatisticamente significativa nos indivíduos com idade superior a 16 anos ($P = 0,667$).

Tabela 2: Avaliação da ausência ou da presença da mutação no gene FLT3 do tipo DIT nos pacientes com diagnóstico de LA, de acordo com a faixa etária e a classificação da LA

Faixa etária	Classificação da LA	Ausência da mutação	Presença da mutação	% da presença por faixa etária e classificação da LA	P
≤ 16 anos	LLA	25	3	10,7	0,168
	LMA	8	4	33,3	
> 16 anos	LLA	4	0	0	0,667
	LMA	7	1	12,5	

*P < 0,05 é considerado estatisticamente significativo.

Como consta na Tabela 3, dos 40 casos analisados de indivíduos com idade igual ou inferior a 16 anos, 70% deles foram diagnosticados com LLA (28 casos) e 30% com LMA (12 casos). Entre as LAs presentes nesses indivíduos, a mais prevalente foi a LLA B comum, com 42,5% de todos os casos analisados nessa faixa etária, seguida pela LLA pré-B, com 17,5%. Dos 28 casos citados anteriormente, três deles apresentaram a mutação FLT3 do tipo DIT, que foram classificados nas seguintes subcategorias de LLA: LLA B comum, LLA pré-B e LLA T pró-T. Os quatro casos de LMA com DIT apresentaram diagnóstico em duas subcategorias de LMA: um caso com LMA sem maturação e três casos com LPA com t(15;17) (Tabela 3).

Tabela 3: Classificação em subcategorias das LA submetidas à investigação da ausência ou da presença da DIT no gene FLT3 nos indivíduos com idade igual ou inferior a 16 anos

Classificação da LA	Subcategoria da LA	Ausência da DIT	Presença da DIT	Total analisado	
				Número de casos	%
LLA	LLA B comum	16	1	17	42,5
	LLA B pré-B	6	1	7	17,5
	LLA T cortical	3	0	3	7,5
	LLA T pró-T	0	1	1	2,5
Total de casos de LLA		25	3	28	70,0
LMA	LMA com maturação	3	0	3	7,5
	LMA com t(8;21)	1	0	1	2,5
	LMA monoblástica	2	0	2	5,0
	LMA sem maturação	0	1	1	2,5
	LPA	1	0	1	2,5
	LPA com t(15;17)	1	3	4	10,0
	Total de casos de LMA		8	4	12

Como pode ser visto na Tabela 4, do total de 12 amostras de pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos e com LMA, em apenas um caso (8,3%), foi detectada a mutação no gene FLT3 do tipo D835, o qual correspondeu a um indivíduo com diagnóstico de LMA com maturação. Já os indivíduos com LLA na mesma faixa etária mencionada, bem como os pacientes com mais de 16 anos, não apresentaram tal anormalidade genética.

Tabela 4: Análise da associação da mutação no gene FLT3 do tipo D835 nos pacientes com diagnóstico de LA, de acordo com a faixa etária e a classificação da LA

Faixa etária	Classificação da LA	Ausência da mutação	Presença da mutação	% da presença por faixa etária e classificação da LA	P
≤ 16 anos	LLA	28	0	0	0,300
	LMA	11	1	8,3	
> 16 anos	LLA	4	0	0	-
	LMA	8	0	0	

*P < 0,05 é considerado estatisticamente significativo.

Em relação ao gênero, a presença das mutações no gene FLT3, tanto a DIT quanto a mutação D835, não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando avaliado em associação com a faixa etária (Tabela 5).

Tabela 5: Análise da associação das amostras com diagnóstico de LA que foram submetidas à investigação das mutações no gene FLT3, de acordo com o gênero e a faixa etária do paciente

Mutação	Faixa etária	Gênero	Ausência da mutação	Presença da mutação	P
DIT	≤ 16 anos	Feminino	14	3	0,649
		Masculino	19	4	
	> 16 anos	Feminino	7	0	0,909
		Masculino	4	1	
D835	≤ 16 anos	Feminino	16	1	0,425
		Masculino	23	0	
	> 16 anos	Feminino	7	0	-
		Masculino	5	0	

*P < 0,05 é considerado estatisticamente significativo.

Como descrito anteriormente, a idade, a leucometria, os níveis de LDH e as anormalidades citogenéticas, no momento do diagnóstico, são fatores prognósticos importantes (STONE, 2009); assim como as mutações no gene FLT3 (BETZ & HESS, 2010). Com base nesses pesquisadores, analisamos a associação dos referidos parâmetros com a ausência ou a presença das mutações no gene FLT3, antes da primeira terapia.

Os valores médios da idade, de leucometria, da porcentagem de blastos e dos níveis de LDH dos pacientes investigados associados com a ausência ou a presença da mutação DIT no gene FLT3 antes da primeira terapia, estão representados na Tabela 6. Como pode ser observado nessa tabela, os valores médios aumentados para leucometria, porcentagem de blastos e níveis de LDH associados com a presença da mutação no gene FLT3 do tipo DIT não foram estatisticamente significantes para nenhuma das faixas etárias. As médias de idade também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre a ausência ou a presença da mutação.

Embora a associação da leucometria, da porcentagem de blastos e dos níveis de LDH com a mutação no gene FLT3 do tipo DIT não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa, ficou evidente que pacientes com essa alteração possuem leucometria aumentada, visto que a leucometria mínima presente nos pacientes com a DIT foi de 29300 leucócitos/mm³, enquanto o valor de referência é 4.000 a 11.000/mm³ (GREER et al., 2004). O valor da porcentagem de blastos também é um dado que chama a atenção: o valor mínimo que os pacientes com tal mutação apresentaram foi de 80%, que corresponde em valores absolutos a 23.440 blastos/mm³. Além disso, o valor mínimo dos níveis de LDH encontrado foi de 787 U/L, valor muito acima do valor superior de referência, que é de 190 U/L.

Tabela 6: Valores médios da idade, da leucometria, da porcentagem de blastos e dos níveis de LDH dos pacientes com LA, de acordo com a faixa etária e a ausência ou a presença da DIT no gene FLT3

Faixa etária	Mutação DIT	Média da idade (anos)	Desvio padrão	Idade mínima (anos)	Idade máxima (anos)	P
≤ 16 anos	Ausência	6,7	4,4	0,25	15,7	0,649
	Presença	7,4	2,7	0,08	11,3	
> 16 anos	Ausência	45,9	23,4	16,2	87,4	0,391
	Presença	24,2	-	24,2	24,2	
Faixa etária	Mutação DIT	Média da Leucometria (/mm ³)	Desvio padrão	Leucometria mínima (/mm ³)	Leucometria máxima (/mm ³)	P
≤ 16 anos	Ausência	49.072,7	94.638,0	2.000,0	450.000,0	0,128
	Presença	113.157,1	91.126,7	29.300,0	220.000,0	
> 16 anos	Ausência	27.303,6	40.656,7	1.900,0	142.990,0	0,692
	Presença	44.600,0	-	44.600,0	44.600,0	
Faixa etária	Mutação DIT	Média da % de blastos	Desvio padrão	% de blastos mínima	% de blastos máxima	P
≤ 16 anos	Ausência	74,8	22,7	21,0	98,0	0,167
	Presença	87,0	4,2	80,0	92,0	
> 16 anos	Ausência	59,9	23,7	26,0	95,0	0,252
	Presença	90,0	-	90,0	90,0	

Faixa etária	Mutação DIT	Média dos níveis de LDH	Desvio padrão	Nível de LDH mínimo	Nível de LDH máximo	P
≤ 16 anos	Ausência	2.347,0	3.593,7	322,0	14.559,0	0,389
	Presença	4.393,7	5.602,5	787,0	13.087,0	
> 16 anos	Ausência	475,4	387,8	194,0	1.542,0	0,352
	Presença	871,0	-	871,0	871,0	

*P < 0,05 é considerado estatisticamente significativo.

Como nos indivíduos com mais de 16 anos não houve a presença da mutação no gene FLT3 do tipo D835, não se realizou a análise de idade, de leucometria, porcentagem de blastos e níveis de LDH. Entretanto, em indivíduos com idade igual ou inferior a 16 anos não apresentaram associação entre os valores médios de idade, de leucometria, porcentagem de blastos e níveis de LDH (Tabela 7).

Tabela 7: Valores médios da leucometria, da porcentagem de blastos e dos níveis de LDH nos indivíduos com idade igual ou inferior a 16 anos com LA, de acordo com a ausência ou a presença da mutação D835 no gene FLT3

	Média da idade (anos)	Desvio padrão	Idade mínima (anos)	Idade máxima (anos)	P
Ausência	6,6	4,1	0,08	15,7	0,083
Presença	14,1	-	-	-	
	Média da Leucometria (/mm ³)	Desvio padrão	Leucometria mínima (/mm ³)	Leucometria máxima (/mm ³)	P
Ausência	61.128,1	97.203,2	2.000,0	450.000,0	0,735
Presença	27.500,0	-	-	-	
	Média da % de blastos	Desvio padrão	% de blastos mínima	% de blastos máxima	P
Ausência	76,4	21,2	21,0	98,0	0,367
Presença	96,0	-	-	-	
	Média dos níveis de LDH	Desvio padrão	Nível de LDH mínimo	Nível de LDH máximo	P
Ausência	2.859,5	4.151,4	322,0	14.559,0	0,627
Presença	786,0	-	-	-	

*P < 0,05 é considerado estatisticamente significativo.

Como pode ser observado na Tabela 8, não houve associação entre as mutações no gene FLT3 e a expressão de CD34 nas células leucêmicas.

Tabela 8: Análise da associação das amostras com diagnóstico de LA que foram submetidas à investigação das mutações no gene FLT3, de acordo com a marcação para CD34 e a faixa etária do paciente

Mutação	Faixa etária	Marcação para CD34	Ausência da mutação	Presença da mutação	P
DIT	≤ 16 anos	Negativa	2	1	0,467
		Positiva	29	6	
	> 16 anos	Negativa	1	0	0,909
		Positiva	10	1	
D835	≤ 16 anos	Negativa	3	0	0,921
		Positiva	36	1	
	> 16 anos	Negativa	1	0	-
		Positiva	11	0	

*P < 0,05 é considerado estatisticamente significativo.

Como expõe a Tabela 9, 4 indivíduos (20%) com diagnóstico de LMA apresentaram, simultaneamente, a DIT no gene FLT3 e a alteração citogenética t(15;17), a qual está associada às anomalias citogenéticas recorrentes de prognóstico favorável. O total dos casos de LLA analisados que expressavam a DIT no gene FLT3 apresentaram cariótipo normal (resultados não mostrados).

Tabela 9: Análise da associação de anormalidades genéticas nos pacientes com diagnóstico da LMA com a ausência ou a presença da DIT no gene FLT3

Anormalidades citogenéticas	Ausência da mutação	Presença da mutação
Favoráveis	4 ^a	4 ^b
Intermediárias	5 ^c	1 ^d
Desfavoráveis	2 ^e	0
Não avaliado	4	0

^at(8;21) - 1 caso; t(15;17) - 3 casos; ^bt(15;17) em todos os casos; ^cdel(9q) - 1 caso; Cariótipo normal - 4 casos; ^dCariótipo normal; ^et(9;22) - 1 caso; deleção do cromossomo 7 - 1 caso.

Os indivíduos com a presença simultânea da DIT no gene FLT3 e a t(15;17) apresentaram valores de leucometria que variaram de 32.100/mm³ a 220.000/mm³. Desses, dois foram a óbito em seis meses.

Com a finalidade de analisar a progressão da doença, avaliaram-se os prontuários dos pacientes após seis meses do diagnóstico de LA. Para tanto, se dividiram os pacientes em três grupos: pacientes que tiveram remissão e estavam em tratamento; pacientes que foram a óbito, mas estavam em remissão; e pacientes que foram a óbito sem remissão. Como se pode visualizar na Tabela 10, a maioria dos pacientes com a presença da mutação no gene FLT3 do tipo DIT foi a óbito sem remissão.

Tabela 10: Análise da associação da progressão da doença nos pacientes, após seis meses do diagnóstico de LA, com a ausência ou a presença da mutação do gene FLT3 do tipo DIT

Progressão da doença	Ausência da mutação	Presença da mutação
Óbito com remissão	8	0
Óbito sem remissão	3	5
Remissão em tratamento	33	3

No que tange à mutação D835, a mesma foi detectada em apenas um paciente com idade igual ou inferior a 16 anos, o qual, após seis meses de diagnóstico de LA, estava em remissão (Tabela 11).

Tabela 11: Análise da associação da progressão da doença nos pacientes, após seis meses do diagnóstico da LA, com a ausência ou a presença da mutação D835 no gene FLT3

Progressão do paciente	Ausência da mutação	Presença da mutação
Óbito com remissão	8	0
Óbito sem remissão	8	0
Remissão em tratamento	35	1

A análise da progressão da doença dos pacientes que tiveram remissão e dos que não tiveram possibilita fazer uma divisão em dois grupos, como apresenta a Tabela 12. Essa tabela aponta que foi estatisticamente significativa ($P = 0,001$) a associação da presença da mutação no gene FLT3 do tipo DIT em pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos com a ausência de remissão. Já a análise da presença da mutação DIT em pacientes com idade superior a 16 anos não apresentou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,917$), assim como a mutação D835 em pacientes mais novos ($P = 0,825$) (Tabela 12).

Tabela 12: Análise da associação da resposta à terapia de pacientes com diagnóstico da LA com a ausência ou a presença das mutações no gene FLT3

Mutação	Faixa etária	Resposta à terapia	Ausência da mutação	Presença da mutação	P
DIT	≤ 16 anos	Com remissão	31	2	0,001*
		Sem remissão	2	5	
	> 16 anos	Com remissão	10	1	0,917
		Sem remissão	1	0	
D835	≤ 16 anos	Com remissão	32	1	0,825
		Sem remissão	7	0	
	> 16 anos	Com remissão	11	0	-
		Sem remissão	1	0	

*P < 0,05 é considerado estatisticamente significante.

Além do exposto, também se avaliou a associação da presença das mutações no gene FLT3 com os pacientes que, após seis meses, foram ou não a óbito. A Tabela 13 deixa perceptível que há uma associação estatisticamente significante (P = 0,027) entre a presença da mutação no gene FLT3 do tipo DIT com o óbito dos pacientes com LA com idade igual ou inferior a 16 anos. O mesmo não é evidenciado nos pacientes com idade superior a 16 anos (P = 0,750).

No que concerne à mutação D835 no gene FLT3 em pacientes com idade inferior ou igual a 16 anos, sua associação com o óbito não foi estatisticamente significante (P = 0,692) (Tabela 13).

Tabela 13: Análise da associação do desfecho final dos pacientes com diagnóstico de LA com a ausência ou a presença das mutações no gene FLT3

Mutação	Faixa etária	Desfecho final	Ausência da mutação	Presença da mutação	p
DIT	≤ 16 anos	Foram a óbito	8	5	0,027*
		Não foram a óbito	25	2	
	> 16 anos	Foram a óbito	3	0	0,750
		Não foram a óbito	8	1	
D835	≤ 16 anos	Foram a óbito	13	0	0,675
		Não foram a óbito	26	1	
	> 16 anos	Foram a óbito	3	0	-
		Não foram a óbito	9	0	

*P < 0,05 é considerado estatisticamente significante.

A LA constitui um grupo de neoplasias malignas com características muito heterogêneas entre si, apresentando inúmeras mutações gênicas, as quais conferem às células tumorais uma resistência desigual. Por isso, apresentam peculiaridades clínicas e laboratoriais distintas, assim como a resposta à quimioterapia (APPELBAUM et al., 2006; SWERDLOW et al., 2008). Como visto anteriormente, a LA acomete os indivíduos independente de faixa etária, de gênero, de etnia e de categoria socioeconômica (HWANG et al., 2004). No entanto, fatores etiológicos parecem ser diferentes em adultos e em crianças (LINABERY & ROSS, 2008), pois, em crianças, a LA mais frequente é a LLA, enquanto que pacientes adultos são mais acometidos pela LMA (PUI & EVANS, 2006; MULLIGHAN, 2009). Os resultados obtidos com a pesquisa que se realizou foram, quanto ao tipo de LA e à faixa etária acometida, concordantes com os citados na literatura, pois, nos pacientes pediátricos, a LLA foi o subtipo de leucemia mais comum e a LMA acometeu mais frequentemente os adultos.

Nas últimas décadas, avanços no entendimento da biologia molecular contribuíram para o desenvolvimento de novos alvos de diagnóstico. O diagnóstico da LA tem se tornado cada vez mais preciso, por meio de técnicas que complementam a morfologia, como marcadores imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares (EDEN, 2010). A LA, sob o aspecto genético, é uma das doenças mais bem caracterizadas; isso ocorre devido à facilidade de acesso ao material tumoral e ao sucesso das técnicas moleculares utilizadas para identificar alterações cromossômicas e genéticas (ROWLEY, 2008; MULLIGHAN, 2009).

Como visto anteriormente, os pacientes com LMA que possuem a mutação FLT3-DIT apresentam duração da remissão completa, sobrevida global e sobrevida livre de doença significativamente menor, o que lhes confere um prognóstico desfavorável (STONE, 2009). Nesse sentido, estudos multicêntricos internacionais realizados com pacientes adultos com LMA, para investigar a frequência da mutação FLT3-DIT, observaram que a incidência da DIT no gene FLT3 varia de 15 a 35% [KOTTARIDIS et al., 2001 (n = 854); YAMAMOTO et al., 2001 (n = 429); FRÖHLING et al., 2002 (n = 224); SCHNITTGER et al., 2002 (n = 1003); THIEDE et al., 2002 (n = 979); LIU et al., 2007 (n = 32); PENG et al., 2008 (n = 60); MALY et al., 2010 (n = 80); WANG, WANG et al., 2010 (n = 374)]. Um estudo brasileiro, realizado no Paraná com 40 pacientes adultos com LMA, descreveu que 25% desses possuíam a mutação no gene FLT3 do tipo DIT (KRUM, YAMAMOTO

& CHAUFFAILLE, 2009). Quanto à investigação que se fez, os resultados mostraram uma incidência menor da DIT no gene FLT3 em pacientes com LMA com idade superior a 16 anos – 12,5% – quando comparados aos dados dos estudos citados anteriormente. Esses resultados podem ser devido ao número de casos avaliados, pois na investigação aqui relatada avaliaram-se oito pacientes adultos com LMA.

Kottaridis et al. (2001) (n = 279) descreveram que a frequência da mutação FLT3-DIT em pacientes adultos com LLA era de 5 a 10%; contudo, dois estudos, um com 18 pacientes (LIU et al., 2007) e outro com 83 que apresentavam LLA (WANG, WANG et al., 2010), relataram que não foi encontrado caso algum dessa mutação nos pacientes estudados, o que demonstra que é rara a DIT no gene FLT3 em pacientes adultos com LLA. Os dados da pesquisa ora apresentada corroboram os citados por Liu et al. (2007) e Wang, Wang et al. (2010), visto que, nos pacientes com LLA com idade superior a 16 anos, não se encontrou caso algum de DIT no gene FLT3.

Em referência à mutação pontual, D835, no gene FLT3 em adultos com LMA a frequência relatada na literatura é de 5 a 10% [YAMAMOTO et al., 2001 (n = 429); THIEDE et al., 2002 (n = 979); PENG et al., 2008 (n = 60); WANG, WANG et al., 2010 (n = 374)]. Entretanto, na população brasileira, é descrita como rara [LUCENA-ARAÚJO et al., 2010 (n = 169)]. Os resultados alcançados pela pesquisa que se realizou confirmam tal evidência, haja vista que não se encontrou caso algum da mutação FLT3-D835 em pacientes com LMA com idade superior a 16 anos.

Estudos descreveram que, em pacientes adultos com LLA, a mutação pontual, D835, no gene FLT3 é de 1 a 3% [WANG, WANG et al., 2010 (n = 83)], diferente do que ocorreu neste estudo, no qual não se encontrou caso algum da mutação FLT3-D835 nos pacientes com LLA com idade superior a 16 anos, o que pode estar relacionado com a pequena casuística do estudo.

Dados da literatura mostram que a incidência de FLT3-DIT em pacientes pediátricos com LMA é menor que a incidência nos adultos, sendo a variação encontrada de 5 a 16% [MESHINCHI et al., 2001 (n = 91); KARABACAK et al., 2010 (n = 40)]. No entanto, Peng et al. (2008) (n = 60) descreveram que a incidência em crianças com LMA com DIT no gene FLT3 é de 25%. No que tange a esse aspecto, os resultados que se obtiveram mostram porcentagens superiores aos

descritos na literatura, com valores de 33,3% nos indivíduos com idade igual ou inferior a 16 anos.

Al-Tonbary et al. (2009) (n = 15) relatam que as crianças com LLA por eles investigadas não apresentaram a mutação FLT3-DIT. Em contrapartida, a análise que se realizou aponta que a incidência dessa mutação é de 10,7% nos indivíduos com idade igual ou inferior a 16 anos que apresentavam LLA.

Estudos pediátricos relatam que a frequência de FLT3-D835 em LMA é de 7% [MESHINCHI et al., 2006 (n = 630); MESHINCHI & APPELBAUM, 2009 (n = 104)]. Os dados coletados e analisados nesta pesquisa conduziram a resultados semelhantes, pois os pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos apresentaram positividade para a mutação pontual, D835, na ordem de 8,3%. Por outro lado, na LLA pediátrica, a incidência da mutação pontual, D835, no gene FLT3, descrita na literatura, é de 7,5% [(KARABACAK et al., 2010 (n = 80)], diferente do que se constatou neste estudo, no qual nenhum paciente apresentou tal anormalidade genética.

Com base nas incidências descritas para a mutação FLT3-DIT e para FLT3-D835, pôde-se observar que existe uma variação entre os estudos realizados, o que pode ser justificado pela população envolvida no estudo. Isso indica que há diferenças na frequência de tais mutações conforme a região geográfica estudada. Nesse sentido, vê-se a importância de se conhecer os dados epidemiológicos regionais, os quais interferem diretamente no planejamento clínico e farmacológico do Serviço de Hematologia que atende os pacientes onco-hematológicos. Entretanto, por se ter uma casuística pequena para conclusões mais concretas, considera-se que a continuidade da investigação se faça necessária.

Em relação ao gênero, os resultados obtidos sobre a investigação das mutações no gene FLT3 (DIT e D835) corroboram com os descritos na literatura [AL-TONBARY et al., 2009 (n = 45); WANG, XU et al., 2010 (n = 76)], que descrevem a ausência de associação estatisticamente significativa entre as mutações e o gênero.

Foran (2010) (n = 218) e Karabacak et al. (2010) (n=120) relatam que a incidência das mutações no gene FLT3 aumenta à medida que avança a idade. Porém, Parcell et al. (2006) (n = 380) e Wang, Xu et al., (2010) (n = 76) descrevem que as mutações no gene FLT3 (DIT e D835) não possuem relação com a idade dos pacientes. No que concerne à idade, os resultados aos quais se chegou são concordantes com os dois

últimos grupos citados, pois não se constatou associação estatisticamente significativa com a idade e com as mutações estudadas.

Alguns estudos descrevem que a presença de mutações no gene FLT3 (DIT e D835) em pacientes com LA está associada à leucocitose [KOTTARIDIS et al., 2001 (n = 1133); THIEDE et al., 2002 (n = 979); EMERENCIANO et al., 2008 (n = 159); PENG et al., 2008 (n = 60); WANG, XU et al., 2010 (n = 76)]. No entanto, outros trabalhos, como os dos grupos de Schlenk et al. (2008) (n = 872) e de Karabacak et al. (2010) (n = 40), relataram que a leucocitose em pacientes com LMA com a mutação DIT no gene FLT3 não apresenta significância quando comparada com o grupo que não apresentou tais mutações. No estudo aqui relatado, os resultados mostram que os valores mínimos de leucometria encontrados nos pacientes com a DIT e a mutação D835 no gene FLT3 foram $29.300/\text{mm}^3$ e $27.500/\text{mm}^3$, respectivamente, ou seja, valores acima dos limites superiores de referência ($4.000\text{-}11.000/\text{mm}^3$). No entanto, esses resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos indivíduos que não apresentava as referidas mutações. A leucocitose observada nos casos de LA com mutações no gene FLT3, incluídos no estudo, que se realizou, foram correspondentes, de acordo com a classificação das anormalidades genéticas, com alterações moleculares de Classe I, que são mutações que conferem vantagem de sobrevivência e proliferação celular (BETZ & HESS, 2010), estando, assim, provavelmente relacionadas com a leucocitose nesses pacientes.

Um achado que chamou a atenção: os valores aumentados das porcentagens de blastos nos casos que apresentavam mutações no gene FLT3. Nesses pacientes, a porcentagem de blastos mínima encontrada foi de 80% (23.440 blastos/ mm^3), que pode ser associada à vantagem proliferativa proveniente da anormalidade presente nesses indivíduos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Liu et al. (2007).

A LDH é uma enzima intracelular, cuja atividade está associada ao metabolismo celular. Assim, o aumento do nível sérico de LDH é observado em pacientes com LA e é considerado como um dos fatores prognósticos da doença (VARMA & VARMA, 2008). Um estudo realizado por Peng et al., (2008) (n = 60) com pacientes com LA com presença de DIT no gene FLT3 mostra que há associação entre a presença dessa anormalidade genética com níveis aumentados de LDH. Entretanto, essa mesma constatação não foi feita por Karabacak et al. (2010) (n = 120), o mesmo ocorrendo com a investigação que se fez.

Como já mencionado anteriormente, embora os valores de leucometria aos quais se chegou não tenham sido estatisticamente significantes, mostram que as mutações no gene FLT3 possuem uma relação com a leucocitose. Além disso, apesar de os níveis de LDH também não apresentarem diferença estatisticamente significativa nos pacientes com mutação no gene FLT3, observou-se uma relação dos níveis de LDH com o aumento da leucometria, sendo esses resultados concordantes com a vantagem proliferativa proveniente das mutações em questão.

Algumas anormalidades cromossômicas podem estar concomitantemente presentes com alterações moleculares na LA, como, por exemplo, a t(15;17) e a DIT no gene FLT3. Por isso, a LA é descrita como uma doença heterogênea, sob o aspecto clínico e laboratorial. A presença da t(15;17) translocação nos pacientes com LPA confere prognóstico favorável; todavia, quando associado com alguma anormalidade genética de prognóstico desfavorável, o benefício oriundo da translocação citada anteriormente é anulado (PASCHKA et al., 2006). A respeito da análise que se fez, os resultados demonstraram que, dos quatro indivíduos que apresentavam simultaneamente a t(15;17) e a DIT no gene FLT3, dois deles foram a óbito em até seis meses após o diagnóstico de LA. Desse modo, observou-se que o prognóstico favorável conferido pela translocação foi perdido, o que sugere que a presença da mutação FLT3-DIT deve ser considerada relevante no prognóstico dos pacientes com LA.

Como visto anteriormente, a LPA caracteriza-se, frequentemente, por apresentar leucopenia (SAGRILLO et al., 2005). Porém, nos quatro casos que se analisou e que apresentaram concomitantemente a t(15;17) e a mutação no gene FLT3-DIT, os pacientes apresentaram leucocitose, o que sugere, mais uma vez, que a DIT no gene FLT3 promove a proliferação celular.

Além das alterações citogenéticas, a expressão de imunofenótipos também está relacionada como um fator prognóstico a ser considerado no momento da determinação da conduta terapêutica do paciente. Entre eles, a expressão de CD34 nas células leucêmicas (ONCIU, 2009). Não obstante a literatura descreva que a ausência da expressão de CD34 possui associação com a DIT no gene FLT3 (KUSSICK et al., 2004), os resultados aos quais se chegou não mostraram tal associação.

Estudos que avaliaram a remissão em pacientes com LMA relataram taxas de remissão significativamente menores nos indivíduos que expressam DIT no gene FLT3 [NAKAO et al., 1996 (n = 30); LIU

et al., 2007 (n = 32); WANG, WANG et al., 2010 (n = 374); WANG, XU et al., 2010 (n = 76)]. Os dados aqui analisados confirmam os descritos na literatura, pois os pacientes com FLT3-DIT com idade igual ou inferior a 16 anos apresentaram associação estatisticamente significativa com a ausência de remissão. Contudo, o grupo de pacientes com idade superior a 16 anos com DIT no gene FLT3 e o grupo na faixa etária com idade igual ou inferior a 16 anos com a mutação D835 no gene FLT3 não apresentaram relação significativa, o que pode ser explicado pela pequena casuística que se realizou e sugere a importância da continuidade do estudo.

Vários trabalhos estudam a associação da expressão das mutações no gene FLT3 e a sobrevida dos pacientes. Alguns deles mostram que a sobrevida diminuída de pacientes com LA está associada com a positividade de FLT3-DIT [KOTTARIDIS et al., 2001 (n = 1133); YAMAMOTO et al., 2001 (n = 429); THIEDE et al., 2002 (n = 979); YANADA et al., 2005 (n = 1063); EMERENCIANO et al., 2008 (n = 159); KARABACAK et al., 2010 (n = 120); SANTOS et al., 2010 (n = 481); WANG, WANG et al., 2010 (n = 457)]; para a mutação FLT3-D835, porém, não foi observada tal associação [SANTOS et al., 2010 (n = 481)]. Outros trabalhos relatam que, no grupo de pacientes com a presença de DIT no gene FLT3, todos foram a óbito após um ano do diagnóstico de LA [KANG et al., 2005 (n = 61); FAGUNDES et al.; 2006 (n = 123)]. Já Al-Tonbary et al. (2009) (n = 45) descreveram que há associação significativa dos índices de óbito com a presença da mutação FLT3-DIT. Verificou-se, na investigação que se fez, a ocorrência de associação estatisticamente significativa entre a presença da DIT no gene FLT3 em pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos e o desfecho do caso em óbito. Isso demonstra que pacientes com a DIT no gene FLT3 possuem risco aumentado de morte, o que caracteriza essa mutação como de prognóstico desfavorável.

A análise conjunta dos fatores prognósticos que se realizou, como a idade, a leucometria, os níveis de LDH e a expressão de CD34, permitiu verificar que tais fatores não possuem associação significativa com as mutações no gene FLT3. Entretanto, a presença da DIT no FLT3 apresentou relação significativa com a ausência de remissão, assim como a associação dos pacientes que foram a óbito. Esses resultados sugerem, então, que a presença de FLT3-DIT é um fator prognóstico independente, ou seja, não possui relação com outros fatores prognósticos.

Pesquisas recentes demonstraram que o receptor FLT3, quando sofre mutação, pode ser um importante alvo terapêutico na LA (FORAN, 2010). Estudos clínicos em fase I e em fase II mostraram um discreto efeito na inibição direta do receptor FLT3 mutado, bem como relatórios preliminares mostraram que a combinação de inibidores de FLT3 com a quimioterapia convencional foi bem tolerada, com taxas de resposta clínica favorável (DOEPFNER, BOLLER & ARCARO, 2007; KNAPPER, 2007). O desenvolvimento de um novo esquema terapêutico, como o transplante alogênico de MO na terapia pós-remissão ou a administração de inibidores para o receptor FLT3 mutado pode melhorar a sobrevida dos pacientes com LA com essas mutações (KANG et al. 2010). Pacientes com FLT3-DIT parecem não se beneficiar da intensificação de dose da antraciclina (FERNANDEZ et al. 2009), mas podem ser favorecidos com o transplante alogênico de MO (SCHLENK et al., 2008). Um estudo clínico em fase III relatou que a combinação de um inibidor de FLT3, midostaurina, associado ao tratamento padrão com daunorrubicina e citarabina, foi favorável para pacientes com mutações no gene FLT3 (FORAN, 2010). Sendo assim, defende-se que a investigação das mutações no gene FLT3 deve fazer parte da rotina laboratorial no diagnóstico dos pacientes com LA, a fim de determinar o prognóstico do paciente, e que a presença de tal mutação deve ser considerada na escolha do protocolo terapêutico a ser adotado.

A compilação dos resultados encontrados neste estudo permitiu concluir:

1. Para a investigação das mutações no gene FLT3 (DIT e D835), conforme as condições da PCR utilizadas, são necessários 35 ciclos para obtenção de produto de PCR com boa resolução em cada uma das reações;
2. Para a digestão enzimática utilizada na investigação da mutação D835 no gene FLT3, são necessárias 5 U da enzima Eco RV;
3. A mutação FLT3-DIT foi mais incidente em indivíduos com LMA com idade igual ou inferior a 16 anos;
4. A mutação FLT3-DIT foi rara em indivíduos com LLA com idade superior a 16 anos;
5. A mutação FLT3-D835 foi rara em indivíduos com idade superior a 16 anos;
6. As mutações no gene FLT3 (DIT e D835) não possuem associação com o gênero e porcentagem de blastos;
7. As mutações no gene FLT3 (DIT e D835) não possuem associação com nenhum dos seguintes fatores prognósticos: leucometria, níveis de LDH e marcação para CD34;
8. A DIT no gene FLT3 parece anular o efeito de prognóstico favorável da t(15;17);
9. A DIT no gene FLT3 parece ter associação com vantagem de proliferação celular, mesmo em indivíduos com LPA;
10. Houve associação estatisticamente significativa entre a DIT no gene FLT3 e a ausência de remissão em pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos;
11. Houve associação estatisticamente significativa entre a DIT no gene FLT3 e o óbito de pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos.

Acredita-se que algumas das associações avaliadas neste estudo podem não ter apresentado resultado estatisticamente significativo devido ao número de casos analisados.

Os resultados encontrados sugerem que a presença de FLT3-DIT é um fator de prognóstico desfavorável e independente e que, apesar de não possuir relação com outros fatores prognósticos, deve ser considerado como um marcador molecular de prognóstico para pacientes com suspeita clínica de LA.

ADRIAANSEN, H. J.; TE BOEKHORST, P. A. W.; HAGEMEIJER, A. M.; VAN DER SCHOOT, C. E.; DELWEL, H. R.; VAN DONGEN, J. J. M. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. **Blood**, v.81, n.11, p.3043-51, 1993.

AL-TONBARY, Y.; MANSOUR, A. K.; GHAZY, H.; ELGHANNAM, D. M.; ABD-ELGHAFAR, H. A. Prognostic significance of foetal-like tyrosine kinase 3 mutation in Egyptian children with acute leukaemia. **Int J Lab Hematol**, v.31, n.3, p.320-6, 2009.

APPELBAUM, F. R.; GUNDAKER, H.; HEAD, D. R.; SLOVAK, M. L.; WILLMAN, C. L.; GODWIN, J. E.; ANDERSON, J. E.; PETERSDORF, S. H. Age and acute myeloid leukemia. **Blood**, v.107, p.3481-5, 2006.

BAER, M. R.; STEWART, C. C.; LAWRENCE, D.; ARTHUR, D. C.; BYRD, J. C.; DAVEY, F. R.; SCHIFFER, C.A.; BLOOMFIELD, C. D. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22; q22). **Blood**, v.90, n.4, p.1643-8, 1997.

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

BASSAN, R.; GATTA, G.; TONDINI, C.; WILLEMZE, R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.50, n.3, p.223-61, 2004.

BÉNÉ, M. C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W.; LUDWIG, W. D.; MATUTES, E.; ORFAO, A.; VAN'T VEER, M. B. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, v.9, p.1783-6, 1995.

BETZ, B. L.; HESS, J. L. Acute Myeloid Leukemia Diagnosis in the 21st Century. **Arch Pathol Lab Med**, v.134, p.1427-33, 2010.

BLOOMFIELD, C. D.; LAWRENCE, D.; BYRD, J. C.; CARROLL, A.; PETTENATI, M. J.; TANTRAVAHU, R.; PATIL, S. R.; DAVEY, F. R.; BERG, D. T.; SCHIFFER, C. A.; ARTHUR, D. C.; MAYER, R. J. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. **Cancer Res**, v.58, p. 4173-9, 1998.

BOROWITZ, M. J.; HUNGER, S. P.; CARROLL, A. J.; SHUSTER, J. J.; PULLEN, D. J.; STEUBER, C. P.; CLEARY, M. L. Predictability of the t(1;19)(q23;p13) from surface antigen phenotype: implications for screening cases of childhood acute lymphoblastic leukemia for molecular analysis: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v.82, p.1086-91, 1993.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria de nº 2.048, de 3 de setembro de 2009. Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2048_03_09_2009.html. Acesso em: 06 de dezembro de 2010.

CAMPISI, J.; SEDIVY, J. How does proliferative homeostasis change with age? What causes it and how does it contribute to aging? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.64, p.164-6, 2009.

CARE, R. S.; VALK, P. J.; GOODEVE, A. C.; ABU-DUHIER, F. M.; GEERTSMA-KLEINEKOORT, W. M.; WILSON, G. A.; GARI, M. A.; PEAKE, I. R.; LÖWENBERG, B.; REILLY, JT. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. **Br J Haematol**, v.121, p.775-7, 2003.

CHEN,W.; JONES, D.; MEDEIROS, L. J.; LUTHRA, R.; LIN, P. Acute myeloid leukaemia with FLT3 gene mutations of both internal tandem duplication and point mutation type. **Br J Haematol**, v.130, p.726-8, 2005.

CHEN, G. Q.; WANG, L. S.; WU, Y. L.; YU, Y. Leukemia, an effective model for chemical biology and target therapy. **Acta Pharmacol Sin**, v.28, n.9, p.1316-24, 2007.

CHEN, J.; ODENIKE, O.; ROWLEY, J. D. Leukaemogenesis: more than mutant genes. **Nat Rev Cancer**, v.10, n.1, p.23-36, 2010.

CHOUDHARY, C.; SCHWÄBLE, J.; BRANDTS, C.; TICKENBROCK, L.; SARGIN, B.; KINDLER, T.; FISCHER, T.; BERDEL, W. E.; MÜLLER-TIDOW, C.; SERVE, H. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. **Blood**, v.106, p.265-73, 2005.

CIOLLI, S.; VANNUCCHI, A.M.; LEONI, F.; NOZZOLI, C.; LONGO, G.; SALATI, A.; PANCRAZZI, A.; BIANCHI, L.; GIGLI, F.; BOSI, A. Internal tandem duplications of Flt3 gene (Flt3/ITD) predicts a poor post-remission outcome in adult patients with acute non-promyelocytic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v.45, p.73-8, 2004.

CLOOS, J.; GOEMANS, B.F.; HESS, C. J.; VAN OOSTVEEN, J. W.; WAISFISZ, Q.; CORTHALS, S.; DE LANGE, D.; BOECKX, N.; HÄHLEN, K.; REINHARDT, D.; CREUTZIG, U.; SCHUURHUIS, G. J.; ZWAAN, C. H. M.; KASPERS, G. J. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. **Leukemia**, v.20, p.1217-20, 2006.

COOLS, J.; DEANGELO, D. J.; GOTLIB, J.; STOVER, E. H.; LEGARE, R. D.; CORTES, J.; KUTOK, J.; CLARK, J.; GALINSKY, I.; GRIFFIN, J. D.; CROSS, N. C.; TEFFERI, A.; MALONE, J.; ALAM, R.; SCHRIER, S. L.; SCHMID, J.; ROSE, M.; VANDENBERGHE, P.; VERHOEF, G.; BOOGAERTS, M.; WLODARSKA, I.; KANTARJIAN, H.; MARYNEN, P.; COUTRE, S. E.; STONE, R.; GILLILAND, D. G. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. **N Engl J Med**, v.348, p.1201-14, 2003.

COUSTAN-SMITH, E.; MULLIGHAN, C. G.; ONCIU, M.; BEHM, F. G.; RAIMONDI, S. C.; PEI, D.; CHENG, C.; SU, X.; RUBNITZ, J. E.; BASSO, G.; BIONDI, A.; PUI, C. H.; DOWNING, J. R.; CAMPANA, D. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Oncol**, v.10, p.147-56, 2009.

CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v.111, n.8, p.3941-67, p.2008.

DIGIUSEPPE, J. A. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy. **Clin Lab Med**, v.27, p.533-49, 2007.

DOEPFNER, K. T.; BOLLER, D.; ARCARO, A. Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.63, p.215-30, 2007.

DÖHNER, K.; TOBIS, K.; ULRICH, R.; FRÖHLING, S.; BENNER, A.; SCHLENK, R. F.; DÖHNER, H. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. **J Clin Oncol**, v.20, p.3254-61, 2002.

DÖHNER, K.; SCHLENK, R. F.; HABDANK, M.; SCHOLL, C.; RÜCKER, F. G.; CORBACIOGLU, A.; BULLINGER, L.; FRÖHLING, S.; DÖHNER, H. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. **Blood**, v.106, p.3740-6, 2005.

DÖHNER, H.; ESTEY, E. H.; AMADORI, S.; APPELBAUM, F. R.; BÜCHNER, T.; BURNETT, A. K.; DOMBRET, H.; FENAUX, P.; GRIMWADE, D.; LARSON, R. A.; LO-COCO, F.; NAOE, T.; NIEDERWIESER, D.; OSSENKOPPELE, G. J.; SANZ, M. A.; SIERRA, J.; TALLMAN, M. S.; LÖWENBERG, B.; BLOOMFIELD, C. D. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v.115, p.453-474, 2010.

EDEN, T. Aetiology of childhood leukaemia. **Cancer Treatment Reviews**, v.36, p.286-97, 2010.

EMERENCIANO, M.; MENEZES, J.; VASQUEZ, M. L.; ZALCBERG, I.; THULER, L. C.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; BRAZILIAN COLLABORATIVE STUDY GROUP OF INFANT ACUTE LEUKEMIA. Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia. **Leuk Lymphoma**, v.49, n.12, p.2291-7, 2008.

ESTEY, E. H. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. **Cancer**, v.92, n.5, p.1059-73, 2001.

FABER, J.; KANTARJIAN, H.; ROBERTS, M. W.; KEATING, M.; FREIREICH, E.; ALBITAR, M. Terminal deoxynucleotidyl transferasenegative acute lymphoblastic leukemia. **Arch Pathol Lab Med**, v.124, n.1, p.92-7, 2000.

FAGUNDES, E. M.; ROCHA, V.; GLORIA, A. B.; CLEMENTINO, N. C.; QUINTÃO, J. S.; GUIMARÃES, J. P.; PEDROSO, E. R.; VIANA, M. B. 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**, v.47, n.8, p.1557-64, 2006.

FALINI, B.; MECUCCI, C.; TIACCI, E.; ALCALAY, M.; ROSATI, R.; PASQUALUCCI, L.; LA STARZA, R.; DIVERIO, D.; COLOMBO, E.; SANTUCCI, A.; BIGERNA, B.; PACINI, R.; PUCCIARINI, A.; LISO, A.; VIGNETTI, M.; FAZI, P.; MEANI, N.; PETTIROSSI, V.; SAGLIO, G.; MANDELLI, F.; LO-COCO, F.; PELICCI, P. G.; MARTELLI, M. F.; GIMEMA ACUTE LEUKEMIA WORKING PARTY. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. **N Engl J Med**, v.352, v.3, p.254-66, 2005.

FALINI, B.; NICOLETTI, I.; MARTELLI, M. F.; MECUCCI, C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc + AML): biologic and clinical features. **Blood**, v.109, n.3, p.874-85, 2007.

FAN, L.; WU, Y. J.; ZHANG, J. F.; QIU, H. R.; QIAO, C.; WANG, R.; YANG, H.; XU, W.; LI, J. Y. Immunophenotypic analysis of acute myeloid leukemia with t(8;21). **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v.18, n.6, p.1410-3, 2010.

FERNANDEZ, H. F.; SUN, Z.; YAO, X.; LITZOW, M. R.; LUGER, S. M.; PAIETTA, E. M.; RACEVSKIS, J.; DEWALD, G. W.; KETTERLING, R. P.; BENNETT, J. M.; ROWE, J. M.; LAZARUS, H. M.; TALLMAN, M. S. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v.361, p.1249-59, 2009.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. 1. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

FORAN, J. M. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.47-55, 2010.

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

FRÖHLING, S.; SCHOLL, C.; GILLILAND, D. G.; LEVINE, R. L. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. **J Clin Oncol**, v.23, p.6285-95, 2005.

FRÖHLING, S.; SCHLENK, R. F.; KAYSER, S.; MORHARDT, M.; BENNER, A.; DÖHNER, K.; DÖHNER, H.; GERMAN-AUSTRIAN AML STUDY GROUP. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. **Blood**, v.108, p.3280-8, 2006.

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

GALE, R. E.; GREEN, C.; ALLEN, C.; MEAD, A. J.; BURNETT, A. K.; HILLS, R. K.; LINCH, D. C.; MEDICAL RESEARCH COUNCIL ADULT LEUKAEMIA WORKING PARTY. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v.111, p.2776-84, 2007.

GILLE, H.; KOWALSKI, J.; YU, L.; CHEN, H.; PISABARRO, M. T.; DAVIS-SMYTH, T.; FERRARA, N. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. **Embo J**, v.19, p.4064-73, 2000.

GOLUBNITSCHAJA, O. Cell cycle checkpoints: the role and evaluation for early diagnosis of senescence, cardiovascular, cancer and neurodegenerative diseases. **Amino Acids**, v.32, n.3, p.359-71, 2007.

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

GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N.; RODGERS, G. M.; PARASKERVAS, F.; GLADER, B. **Wintrobe's clinical hematology**. 11. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

GRIFFITH, J.; BLACK, J.; FAERMAN, C.; SWENSON, L.; WYNN, M.; LU, F.; LIPPKE, J.; SAXENA, K. The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. **Mol Cell**, v.13, p.169-78, 2004.

GRIMWADE, D.; WALKER, H.; OLIVER, F.; WHEATLEY, K.; HARRISON, C.; HARRISON, G.; REES, J.; HANN, I.; STEVENS, R.; BURNETT, A.; GOLDSTONE, A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. **Blood**, v.92, p.2322-33, 1998.

GRUNDLER, R.; MIETHING, C.; THIEDE, C.; PESCHEL, C.; DUYSER, J. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. **Blood**, v.105, p.4792-9, 2005.

HAYAKAWA, F.; TOWATARI, M.; KIYOI, H.; TANIMOTO, M.; KITAMURA, T.; SAITO, H.; NAOE, T. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. **Oncogene**, v.19, n.624-31, 2000.

HEINEMANN, V.; JEHN, U. Acute myeloid leukemia in the elderly: biological features and search for adequate treatment. **Ann Hematol**, v.63, p.179-88, 1991.

HIROTA, S.; ISOZAKI, K.; MORIYAMA, Y.; HASHIMOTO, K.; NISHIDA, T.; ISHIGURO, S.; KAWANO, K.; HANADA, M.; KURATA, A.; TAKEDA, M.; MUHAMMA, D.; TUNIO, G.; MATSUZAWA, Y.; KANAKURA, Y.; SHINOMURA, Y.; KITAMURA, Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. **Science**, v.279, p.577-80, 1998.

HUNAULT, M.; HAROUSSEAU, J. L.; DELAIN, M.; TRUCHAN-GRACZYK, M.; CAHN, J. Y.; WITZ, F.; LAMY, T.; PIGNON, B.; JOUET, J. P.; GARIDI, R.; CAILLOT, D.; BERTHOU, C.; GUYOTAT, D.; SADOUN, A.; SOTTO, J. J.; LIOURE, B.; CASASSUS, P.; SOLAL-CELIGNY, P.; STALNIKIEWICZ, L.; AUDHUY, B.; BLANCHET, O.; BARANGER, L.; BÉNÉ, M. C.; IFRAH, N. Better outcome of adult acute lymphoblastic leukemia after early genoidentical allogeneic bone marrow transplantation (BMT) than after late high-dose therapy and autologous BMT: a GOELAMS trial. **Blood**, v.104, p.3028-37, 2004.

HWANG, J. P.; LAM, T. P.; COHEN, D. S.; DONATO, M. L.; GERACI, J. M. Hematopoietic stem cell transplantation among patients with leukemia of all ages in Texas. **Cancer**, v.101, p.10, p.2230-8, 2004.

INCA. **Estimativa 2010**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

KANG, H. J.; HONG, S. H.; KIM, I. H.; PARK, B. K.; HAN, K. S.; CHO, H. I.; SHIN, H. Y.; AHN, H. S. Prognostic significance of FLT3 mutations in pediatric non-promyelocytic acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v.29, p.617-23, 2005.

KANG, H. J.; LEE, J. W.; KHO, S. H.; KIM, M. J.; SEO, Y. J.; KIM, H.; SHIN, H. Y.; AHN, H. S. High transcript level of FLT3 associated with high risk of relapse in pediatric acute myeloid leukemia. **J Korean Med Sci**, v.25, v.6, p.841-5, 2010.

KARABACAK, B. H.; ERBEY, F.; BAYRAM, I.; YILMAZ, S.; ACIPAYAM, C.; KILINÇ, Y.; TANYELI, A. Fms-like tyrosine kinase 3 mutations in childhood acute leukemias and their association with prognosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.11, n.4, p.923-7, 2010.

KELLY, L. M.; GILLILAND, D. G. Genetics of myeloid leukemias. **Annu Ver Genomics Hum Genet**, v.3, p.179-98, 2002.

KITA, K.; NAKASE, K.; MIWA, H.; MASUYA, M.; NISHII, K.; MORITA, N.; TAKAKURA, N.; OTSUJI, A.; SHIRAKAWA, S.; UEDA, T. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. **Blood**, v.80, n.2, p.470-7, 1992.

KIYOI, H.; NAOE, T.; NAKANO, Y.; YOKOTA S, MINAMI S, MIYAWAKI S, ASOU N, KURIYAMA K, JINNAI I, SHIMAZAKI C, AKIYAMA H, SAITO K, OH H, MOTOJI T, OMOTO E, SAITO H, OHNO R, UEDA, T. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, v.93, p.3074-80, 1999.

KNAPPER, S. FLT3 inhibition in acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, v.138, p.687-99, 2007.

KOTTARIDIS, P. D.; GALE, R. E.; FREW, M. E.; HARRISON, G.; LANGABEER, S. E.; BELTON, A. A.; WALKER, H.; WHEATLEY, K.; BOWEN, D. T.; BURNETT, A. K.; GOLDSTONE, A. H.; LINCH, D. C. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. **Blood**, v.98, n.6, p.1752-9, 2001.

KRUM, E. A.; YAMAMOTO, M.; CHAUFFAILLE, M. D. E. L. 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**, v.127, n.1, p.23-7, 2009.

KÜHNL, A.; GÖEKBUGET, N.; STROUX, A.; BURMEISTER, T.; NEUMANN, M.; HEESCH, S.; HAFERLACH, T.; HOELZER, D.; HOFMANN, W. K.; THIEL, E.; BALDUS, C. D. High BAALC expression predicts chemoresistance in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.115, p.3737-44, 2010.

KUSSICK, S. J.; STIREWALT, D. L.; YI, H. S.; SHEETS, K. M.; POGOSOVA-AGADJANYAN, E.; BRASWELL, S.; NORWOOD, T. H.; RADICH, J. P.; WOOD, B. L. A distinctive nuclear morphology in acute myeloid leukemia is strongly associated with loss of HLA-DR expression and FLT3 internal tandem duplication. **Leukemia**, v.18, p.1591-8, 2004.

LANGER, C.; RADMACHER, M. D.; RUPPERT, A. S.; WHITMAN, S. P.; PASCHKA, P.; MRÓZEK, K.; BALDUS, C. D.; VUKOSAVLJEVIC, T.; LIU, C. G.; ROSS, M. E.; POWELL, B. L.; DE LA CHAPELLE, A.; KOLITZ, J. E.; LARSON, R. A.; MARCUCCI, G.; BLOOMFIELD, C. D.; CANCER AND LEUKEMIA GROUP B (CALGB). High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. **Blood**, v.111, p.5371-9, 2008.

LEWIS, H. D.; LEVERIDGE, M.; STRACK, P. R.; HALDON, C. D.; O'NEIL, J.; KIM, H.; MADIN, A.; HANNAM, J. C.; LOOK, A. T.; KOHL, N.; DRAETTA, G.; HARRISON, T.; KERBY, J. A.; SHEARMAN, M. S.; BEHER, D. Apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia cells after cell cycle arrest induced by pharmacological inhibition of notch signaling. **Chemistry & Biology**, v.14, p.209-19, 2007.

LIANG, D. C.; SHIH, L. Y.; HUNG, I. J.; YANG, C. P.; CHEN, S. H.; JAING, T. H.; LIU, H. C.; WANG, L. Y.; CHANG, W. H. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v.17, p.883-6, 2003.

LINABERY, A. M.; ROSS, J. A. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). **Cancer**, v.112, n.2, p.416-32, 2008.

LIU, H.; YU, H.; JIA, H. Y.; ZHANG, W.; GUO, C. J. Detection of FLT3 gene mutation in hematologic malignancies and its clinical significance. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v.15, n.4, p.709-13, 2007.

LUCENA-ARAÚJO, A. R.; SOUZA, D. L.; MORATO DE OLIVEIRA, F.; BENICIO, M. T.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; SANTANA-LEMONS, B. A.; DOS SANTOS, G. A.; JACOMO, R. H.; DINARTE-SANTOS, A. R.; YAMAMOTO, M.; SILVA-JR, W. A.; DE LOURDES CHAUFFAILLE, M.; REGO, E. M. Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. **Ann Hematol**, v.89, n.2, p.225-8, 2010.

MACKAREHTSCHIAN, K.; HARDIN, J. D.; MOORE, K. A.; BOAST, S.; GOFF, S. P.; LEMISCHKA, I. R. Targeted disruption of the flk2/ flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. **Immunity**, v.3, p.147-61, 1995.

MALY, E.; PRZYBORSKI, M.; NOWAK, T.; NOWAK, J.; JANUSZKIEWICZ, D. FLT3 internal tandem duplication and FLT3-D835 mutation in 80 AML patients categorized into cytogenetic risk groups. **Postepy Hig Med Dosw**, v.18, n.64, p.466-70, 2010.

MANSOUR, M. R.; LINCH, D. C.; FORONI, L.; GOLDSTONE, A. H.; GALE, R. E. High incidence of Notch-1 mutations in adult patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** v.20, p.537-9, 2006.

MANSOUR, M. R.; SULIS, M. L.; DUKE, V.; FORONI, L.; JENKINSON, S.; KOO, K.; ALLEN, C. G.; GALE, R. E.; BUCK, G.; RICHARDS, S.; PAIETTA, E.; ROWE, J. M.; TALLMAN, M. S.; GOLDSTONE, A. H.; FERRANDO, A. A.; LINCH, D. C. Prognostic implications of NOTCH1 and FBXW7 mutations in adults with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on the MRC UKALLXII/ECOG E2993 protocol. **Journal of Clinical Oncology**, v.27, p.4352-6, 2009.

MARCUCCI, G.; BALDUS, C.D.; RUPPERT, A.S.; RADMACHER, M. D.; MRÓZEK, K.; WHITMAN, S. P.; KOLITZ, J. E.; EDWARDS, C. G.; VARDIMAN, J. W.; POWELL, B. L.; BAER, M. R.; MOORE, J. O.; PERROTTI, D.; CALIGIURI, M. A.; CARROLL, A. J.; LARSON, R. A.; DE LA CHAPELLE, A.; BLOOMFIELD, C. D. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. **J Clin Oncol**, v.23, p.9234-42, 2005.

MEAD, A. J.; LINCH, D. C.; HILLS, R. K.; WHEATLEY, K.; BURNETT, A. K.; GALE, R. E. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v.110, p.1262-70, 2007.

MESHINCHI, S.; WOODS, W. G.; STIREWALT, D. L.; SWEETSER, D. A.; BUCKLEY, J. D.; TJOA, T. K.; BERNSTEIN, I. D.; RADICH, J. P. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v.97, n.1, p.89-94, 2001.

MESHINCHI, S.; ALONZO, T. A.; STIREWALT, D. L.; ZWAAN, M.; ZIMMERMAN, M.; REINHARDT, D.; KASPERS, G. J.; HEEREMA, N. A.; GERBING, R.; LANGE, B. J.; RADICH, J. P. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. **Blood**, v.108, p.3654-61, 2006.

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

MIZUKI, M.; FENSKI, R.; HALFTER, H.; MATSUMURA, I.; SCHMIDT, R.; MÜLLER, C.; GRÜNING, W.; KRATZ-ALBERS, K.; SERVE, S.; STEUR, C.; BÜCHNER, T.; KIENAST, J.; KANAKURA, Y.; BERDEL, W. E.; SERVE, H. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. **Blood**, v.96, p.3907-14, 2000.

MORENO, I.; MARTIN, G.; BOLUFER, P.; BARRAGÁN, E.; RUEDA, E.; ROMÁN, J.; FERNÁNDEZ, P.; LEÓN, P.; MENA, A.; CERVERA, J.; TORRES, A.; SANZ, M. A. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v.88, p.19-24, 2003.

MOTYCKOVA, G.; STONE, R. M. The role of molecular tests in acute myelogenous leukemia treatment decisions. **Curr Hematol Malig Rep**, v.5, n.2, p.109-17, 2010.

MRÓZEK, K.; BLOOMFIELD, C. D. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.169-177, 2006.

MRÓZEK, K.; MARCUCCI, G.; PASCHKA, P.; WHITMAN, S.P.; BLOOMFIELD, C. D. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? **Blood**, v.109, n.2, p.431-48, 2007.

MULLIGHAN, C. G. Genomic analysis of acute leukemia. **Int J Lab Hematol**, v.31, n.4, p.384-97, 2009.

NAKAO, M.; YOKOTA, S.; IWAI, T.; KANEKO, H.; HORIIKE, S.; KASHIMA, K.; SONODA, Y.; FUJIMOTO, T.; MISAWA, S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloideukemia. **Leukemia**, v.10, p.1911-8, 1996.

NCCN – National Comprehensive Cancer Network – **Practice Guidelines in Oncology** – Acute Myeloid Leukemia – v.1.2009, 2009.

OHTAKE, S. Acute myeloid leukemia. **Gan To Kagaku Ryoho**, v.34, n.13, p.2175-9, 2007.

ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v.23, p.655-74, 2009.

PARCELL, B. W.; IKEDA, A. K.; SIMMS-WALDRIP, T.; MOORE, T. B.; SAKAMOTO, K. M. FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. **Stem Cells**, v.24, p.1174-84, 2006.

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

PENG, H. L.; ZHANG, G. S.; GONG, F. J.; SHEN, J. K.; ZHANG, Y.; XU, Y. X.; ZHENG, W. L.; DAI, C. W.; PEI, M. F.; YANG, J. J. Fms-like tyrosine kinase (*FLT3*) and *FLT3* internal tandem duplication in different types of adult leukemia: Analysis of 147 patients. **Croat Med J**, v.49, p.650-9, 2008.

PIETERS, R.; SCHRAPPE, M.; DE LORENZO, P.; HANN, I.; DE ROSSI, G.; FELICE, M.; HOVI, L.; LEBLANC, T.; SZCZEPANSKI, T.; FERSTER, A.; JANKA, G.; RUBNITZ, J.; SILVERMAN, L.; STARY, J.; CAMPBELL, M.; LI, C. K.; MANN, G.; SUPPIAH, R.; BIONDI, A.; VORA, A.; VALSECCHI, M. G. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. **Lancet**, v.370, p.240-50, 2007.

PREUDHOMME, C.; SAGOT, C.; BOISSEL, N.; CAYUELA, J. M.; TIGAUD, I.; DE BOTTON, S.; THOMAS, X.; RAFFOUX, E.; LAMANDIN, C.; CASTAIGNE, S.; FENAUX, P.; DOMBRET, H.; ALFA GROUP. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). **Blood**, v.100, p.2717-23, 2002.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v.339, n.9, 605-15, 1998.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v.354, n.2, 166-78, 2006.

PULLARKAT, V.; SLOVAK, M. L.; KOPECKY, K.J.; FORMAN, S. J.; APPELBAUM, F. R. Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study. **Blood**, v.111, n.5, p.2563-72, 2008.

REINDL, C.; BAGRINTSEVA, K.; VEMPATI, S.; SCHNITTGER, S.; ELLWART, J. W.; WENIG, K.; HOPFNER, K-P.; HIDDEMANN, W.; SPIEKERMANN, K. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. **Blood**, v.107, n.9, p.3700-8, 2006.

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

ROWE, J. M.; BUCK, G.; BURNETT, A. K.; CHOPRA, R.; WIERNIK, P. H.; RICHARDS, S. M.; LAZARUS, H. M.; FRANKLIN, I. M.; LITZOW, M. R.; CIOBANU, N.; PRENTICE, H. G.; DURRANT, J.; TALLMAN, M. S.; GOLDSTONE, A. H. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. **Blood**, v.106, p.3760-7, 2005.

ROWE, J. M. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v.150, n.4, p.389-405, 2010.

ROWLEY, J. D. Chromosomal translocations: revisited yet again. **Blood**, v.112, p.2183-9, 2008.

RUBIN, P.; WILLIAMS, J. P.; DEVESA, S. S.; TRAVIS, L. B.; CONSTINE, L. S. Cancer genesis across the age spectrum: associations with tissue development, maintenance, and senescence. **Semin Radiat Oncol**, v.20, n.1, p.3-11, 2010.

RUBNITZ, J. E.; PUI, C. H. Molecular diagnostics in the treatment of leukemia. **Curr Opin Hematol**, v.6, n.4, p.229-35, 1999.

RUSTEN, L. S.; LYMAN, S. D.; VEIBY, O. P.; JACOBSEN, S. E. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. **Blood**, v.87, p.1317-25, 1996.

SAGRILLO, M. R.; CARDOSO, S. H.; SILVA L. R. J.; GRAÇA C. H. N.; FERREIRA, E.; HAMERSCHLAK, N.; GUERRA, J. C. C.; BACAL, N. S.; ANDRADE, J. A. D.; BOROVNIK, C. L. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Rev bras hematol hemoter**, v.27, n.2, p.94-101, 2005.

SANTAMARÍA, C.; CHILLÓN, M. C.; GARCÍA-SANZ, R.; BALANZATEGUI, A.; SARASQUETE, M. E.; ALCOCEBA, M.; RAMOS, F.; BERNAL, T.; QUEIZÁN, J. A.; PEÑARRUBIA, M. J.; GIRALDO, P.; SAN MIGUEL, J. F.; GONZALEZ, M. The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. **Haematologica**, v.93, n.12, p.1797-805, 2008.

SANTOS, F. P.; JONES, D.; QIAO, W.; CORTES, J. E.; RAVANDI, F.; ESTEY, E. E.; VERMA, D.; KANTARJIAN, H.; BORTHAKUR, G. Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia. **Cancer**, p.1-11, 2010.

SCANDURA, J. M.; BOCCUNI, P.; CAMMENGA, J.; NIMER, S. D. Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. **Oncogene**, v.21, p.3422-44, 2002.

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

SCHNAPP, L.M. Another Notch on the belt. **Blood**, v.113, p.1615-6, 2009.

SCHNITTGER, S.; SCHOCH, C.; DUGAS, M.; KERN, W.; STAIB, P.; WUCHTER, C.; LÖFFLER, H.; SAUERLAND, C. M.; SERVE, H.; BÜCHNER, T.; HAFERLACH, T.; HIDDEMANN, W. 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**, v.100, p.59-66, 2002.

SHAH, A. J.; SMOGORZEWSKA, E. M.; HANNUM, C.; CROOKS, G. M. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro. **Blood**, v.87, p.3563-70, 1996.

SHAH, M.; AGARWAL, B. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). **Indian J Pediatr**, v.75, p.831-7, 2008.

SHEIKHHA, M. H.; AWAN, A.; TOBAL, K.; LIU YIN, J. A. Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients. **Hematol J**, v.4, p.41-6, 2003.

SHIPLEY, J. L.; BUTERA, J. N. Acute myelogenous leukemia. **Exp Hematol**, v. 37, n.6, p.649-58, 2009.

SLOVAK, M. L.; KOPECKY, K. J.; CASSILETH, P. A.; HARRINGTON, D. H.; THEIL, K. S.; MOHAMED, A.; PAIETTA, E.; WILLMAN, C. L.; HEAD, D. R.; ROWE, J. M.; FORMAN, S. J.; APPELBAUM, F. R. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. **Blood**, v.96, p.4075-83, 2000.

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

SPECK, N. A.; GILLILAND, D. G. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. **Cancer**, v.2, n.7, p.502-13, 2002.

SPIEKERMANN, K.; BAGRINTSEVA, K.; SCHOCH, C.; HAFERLACH, T.; HIDDEMANN, W.; SCHNITTGER, S. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. **Blood**, v.100, p.3423-5, 2002.

STAVROPOULOU, V.; BRAULT, L.; SCHWALLER, J. Insights into molecular pathways for targeted therapeutics in acute leukaemia. **Swiss Med Wkly**, v.140, p.E1-8, 2010.

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

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

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

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

SZCZEPAŃSKI, T.; HARRISON, C. J.; VAN DONGEN, J. J. Genetic aberrations in paediatric acute leukaemias and implications for management of patients. **Lancet Oncol**, v.11, n.9, p.880-9, 2010.

TALLMAN, M. S.; HAKIMIAN, D.; SHAW, J. M.; LISSNER, G. S.; RUSSELL, E. J.; VARIAKOJIS, D. Granulocytic sarcoma is associated with the 8;21 translocation in acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, v.11, p.690-7, 1993.

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

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

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

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

YANADA, M.; MATSUO, K.; SUZUKI, T.; KIYOI, H.; NAOE, T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. **Leukemia**, v.19, p.1345-9, 2005.

WANG, L.; XU, W. L.; MENG, H. T.; QIAN, W. B.; MAI, W. Y.; TONG, H. Y.; MAO, L. P.; TONG, Y.; QIAN, J. J.; LOU, Y. J.; CHEN, Z. M.; WANG, Y. G.; JIN, J. FLT3 and NPM1 mutations in Chinese patients with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. **J Zhejiang Univ Sci B**, v.11, n.10, p.762-70, 2010.

WANG, W.; WANG, X. Q.; XU, X. P.; LIN, G. W. Prevalence and prognostic significance of FLT3 gene mutations in patients with acute leukaemia: analysis of patients from the Shanghai Leukaemia Co-operative Group. **J Int Med Res**, v.38, n.2, p.432-42, 2010.

WEINBERG, O. K.; SEETHARAM, M.; REN, L.; SEO, K.; MA, L.; MERKER, J. D.; GOTLIB, J.; ZEHNDER, J. L.; ARBER, D. A. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. **Blood**, v.113, p.1906-8, 2009.

WENG, A. P.; FERRANDO, A. A.; LEE, W.; MORRIS, J. P. T.; SILVERMAN, L. B.; SANCHEZ-IRIZARRY, C.; BLACKLOW, S. C.; LOOK, A. T.; ASTER, J. C. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Science**, v.306, p.269-71, 2004.

WHO. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2010.

ZHANG, S.; BROXMEYER, H. E. Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. **Biochem Biophys Res Commun**, v.277, p.195-9, 2000.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. **Carcinogenesis**, v.27, p.1939-45, 2006.

Apêndice 1: Aceite da Publicação: *Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda - Classificação OMS 2008*
na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Marley

De: <rbhh@sgponline.com.br>
Para: <maclau@ccs.ufsc.br>
Enviada em: quinta-feira, 18 de março de 2010 10:04
Assunto: Artigo Aprovado SGP/ RBHH

**Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**

Av. Nossa Sra. de Copacabana, 1.059 sala 1,201 - Copacabana
Rio de Janeiro - RJ - Brazil
CEP 22060-001
Tel/Fax: (21) 2521-6905
email: brazilbloodjournal@yahoo.com.br

Rio de Janeiro, quinta-feira, 18 de março de 2010

Ilmo(a) Sr.(a)
Prof(a), Dr(a) Maria Cláudia Santos da Silva

Referente ao manuscrito: **751**
Classificação: **Artigo de Revisão**

Temos o prazer de informar que o manuscrito **Importância da Detecção das Mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na Leucemia Mieloide Aguda - Classificação OMS 2008** foi aprovado pelo Conselho Editorial da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e está na pauta para publicação. Lembramos que algumas modificações poderão ser solicitadas até a publicação do artigo.

Obrigado por submeter seu trabalho a RBHH e esperamos continuar merecendo sua preferência para divulgação de suas pesquisas.

Atenciosamente,

Milton Artur Ruiz
Editor

« « « **Favor não responder esta mensagem pois ela foi gerada automaticamente pelo SGP**
» » »
</html

Apêndice 2: Publicação: *Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda - Classificação OMS 2008*

Artigo aceito em 18/03/2010 para publicação na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda - Classificação OMS 2008

Importance of detection of mutations in FLT3 and NPM1 gene in acute myeloid leukemia - WHO Classification 2008

Marley Aparecida Licínio¹, Maria Cláudia Santos-Silva^{2*}

¹Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); ²Professora Ph.D. do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Título resumido: Mutações no gene FLT3 e NPM1 – Classificação OMS-2008

* Correspondência:

Santos-Silva M.C., Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde Universidade Federal de Santa Catarina
Hospital Universitário - HU/Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Campus Universitário - Trindade

88040-970 – Florianópolis – SC – Brasil

Tel.: +55 48 37218146

Fax: +55 48 37219542

E-mail: maclau@ccs.ufsc.br

Resumo

As leucemias mieloides agudas (LMA) constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas, decorrente de mutações que podem ocorrer em diferentes fases da diferenciação de células precursoras mieloides. Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS-2008) publicou uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide. De acordo com essa classificação, para um diagnóstico mais preciso e estratificação de prognóstico de pacientes com LMA, devem-se pesquisar mutações nos genes FLT3 e NPM1. Sabe-se que a presença de mutações no gene FLT3 é de prognóstico desfavorável e que as mutações no gene NPM1 do tipo A são de prognóstico favorável. Assim, nos países desenvolvidos, a análise das mutações no gene FLT3 e NPM1 tem sido considerada como um fator de prognóstico importante na decisão terapêutica em pacientes com diagnóstico de LMA. Considerando essas informações, é de extrema importância a análise das mutações no gene FLT3 (duplicação interna em *tandem* – DIT – e mutação pontual D835) e no gene NPM1 como marcadores moleculares para o diagnóstico, o prognóstico e a monitoração de doença residual mínima em pacientes com LMA.

Palavras-chave: Leucemia mieloide aguda; FLT3; NPM1; Classificação OMS-2008.

Abstract

The acute myeloid leukemia (AML) is a group of malignancies characterized by uncontrolled proliferation of hematopoietic cells, resulting from mutations that occur at different stages of differentiation of myeloid precursor cells. In 2008, the World Health Organization (WHO-2008) published a new classification for cancers of the hematopoietic and lymphoid. According to this classification, for a more precise diagnosis and prognostic stratification of patients with AML should be investigated mutations in FLT3 and NPM1. It is known that the presence of mutations in the FLT3 gene is considered an unfavorable prognosis, as the NPM1 gene mutations in the type-A are considered favorable prognosis. Thus, in developed countries, the analysis of mutations in FLT3 and NPM1 has been considered an important prognostic factor in therapeutic decision in patients with AML. Considering this information, it is extremely important the analysis of mutations in FLT3 (internal tandem duplication - ITD- and D835 point mutation) and NPM1 gene as molecular markers for diagnosis, prognosis and monitoring of minimal residual disease in patients with LMA.

Key words: Acute myeloid leukemia, FLT3, NPM1, WHO Classification 2008

Introdução

Leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfoides, as quais, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos¹. A proliferação descontrolada de células leucêmicas resulta de uma expansão clonal de uma única célula-tronco que sofreu uma série de alterações genéticas, que se acumulam em um único clone celular, o que confere vantagem proliferativa em relação às demais células e impede seu processo de diferenciação. Em decorrência dessa proliferação, as células leucêmicas inibem a produção das células sanguíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Além disso, devido a não-funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos afetados, além de sofrerem de anemia e distúrbios hemorrágicos, são mais susceptíveis às infecções².

A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfoides ou mieloides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea, sob o aspecto biológico e morfológico. Por constituírem um grupo heterogêneo de doenças, as leucemias diferem quanto à etiologia, patogênese, prognóstico e resposta ao tratamento^{3, 4}. O fato de a leucemia ser uma doença genética faz com que a identificação das alterações nas células blásticas seja imprescindível para a identificação de subgrupos de pacientes com características clínicas distintas que orientam o tratamento, a estratificação do prognóstico e a monitoração da resposta terapêutica⁵.

O estabelecimento de um diagnóstico preciso e indicativo de prognóstico, baseado na análise de fatores clínicos, biológicos, genéticos e moleculares, é um dos motivos do sucesso terapêutico em pacientes com leucemias agudas⁶. Com o avanço tecnológico, surgiram novas metodologias para o diagnóstico das leucemias agudas, as quais são capazes de identificar fatores prognósticos altamente relevantes. Com isso, em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu novos critérios para o diagnóstico de leucemia aguda: a origem e a linhagem celular, o estágio de maturação e o tipo de anormalidade citogenética ou molecular envolvida na patogênese da doença¹.

Classificação da LMA (OMS-2008)

A OMS-2008, para Leucemia Mieloide Aguda (LMA), estabeleceu sete subcategorias: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas com

mielodisplasia, neoplasias mieloides associadas ao tratamento, LMA não-categorizada nos itens anteriores, sarcoma mielóide, proliferação mielóide relacionada com síndrome de Down e neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitoides¹.

Embora alguns trabalhos mostrem que os critérios citogenéticos sejam importantes para a diferenciação de prognóstico em favorável, intermediário e desfavorável^{7, 8}, outros demonstram que avaliação apenas do cariótipo não é satisfatória para uma correta estratificação do prognóstico de pacientes com LMA^{9, 10}. Além disso, sabe-se que só as alterações cromossômicas não são suficientes para o desenvolvimento das leucemias agudas¹¹ e que em torno de 45% dos pacientes com LMA possuem cariótipo normal^{9, 12}. Assim, torna-se cada vez mais evidente que as alterações que desregulam genes, envolvidos na regulação de vias intracelulares de transdução de sinais de morte e proliferação celular, atuam em colaboração com os fatores resultantes das modificações citogenéticas. Desse modo, a investigação de possíveis alterações é determinante para estratificação do prognóstico, o que serve de ferramenta para prever o risco de recaída, a resistência à terapia e a sobrevida livre de doença¹⁰.

Speck e Gilliland¹³ sugerem a seguinte classificação das mutações encontradas em pacientes com LMA: aquelas que conferem vantagens proliferativas e/ou de sobrevivência aos progenitores hematopoiéticos, mas não afetam a diferenciação (mutações de classe I) e aquelas que afetam a transcrição ou componentes do complexo transcricional e prejudicam a diferenciação hematopoiética (mutações de classe II). Assim, as mutações no gene FLT3, c-KIT e N-RAS pertencem às mutações de classe I¹³⁻¹⁵ e as mutações no gene NPM1^{14, 16}, C/EBPA e AML1/ETO e anormalidades em CBFB/MYH11, PML/RARA e MLL são mutações de classe II¹³⁻¹⁵.

A classificação proposta pela OMS¹, em 2008, sugere um novo subtipo, de caráter provisório, na subcategoria LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes: a LMA com mutação no gene NPM1. Segundo a OMS, as mutações no gene FLT3 estão associadas a mais de uma subcategoria e, por esse motivo, não receberam um subtipo especial para tal mutação, não obstante possuam importância clínica¹. Com isso, vários grupos de pesquisa enfatizam que se deve fazer a pesquisa das mutações no gene FLT3^{1, 14, 17, 18} e no gene NPM1^{1, 14, 17-19}, pois possuem relevância clínica, indicada para todos os pacientes portadores de LMA, como fator determinante para uma correta estratificação de prognóstico.

Sabe-se que mutações no gene FLT3 estão associadas à maior propensão de recaída e menor sobrevida global livre de doença, possuindo, conseqüentemente, prognóstico desfavorável^{14, 20, 21}, enquanto que a presença da mutação no gene NPM1 é de prognóstico favorável, com maior sobrevida livre de doença para indivíduos com LMA^{14, 22-24}.

Importância da detecção das mutações no gene NPM1 para a classificação das leucemias mieloides agudas (OMS-2008)

O gene responsável pela síntese da nucleofosmina (NPM), também conhecida como B23, numatrinal ou NO38, foi mapeado no cromossomo 5q35 em humanos. Esse gene contém 12 éxons que codificam três isoformas de NPM: NPM1 (B23.1), NPM1.2 (B23.2) e NPM1.3 (B23.3). A isoforma NPM1 é a mais prevalente e possui um domínio C-terminal e uma região N-terminal²⁵. A isoforma NPM1.2 é uma isoforma truncada, encontrada em níveis muito baixos nos tecidos, e a isoforma NPM1.3 não é muito descrita na literatura²⁶.

A NPM1 é uma fosfoproteína nucleolar que transita entre o núcleo e o citoplasma durante o ciclo celular e interage com diversas proteínas. Devido a esse comportamento, a NPM1 é uma proteína multifuncional, incluindo o processamento de RNA ribossomal, duplicação do centríolo, resposta a estímulos de estresse, tais como irradiação UV e hipóxia; manutenção da estabilidade genômica por meio do controle de ploidias celulares, participação em processos de reparo de DNA e regulação da transcrição por meio da modulação de eventos de condensação e descondensação da cromatina^{19, 23, 27}. Além disso, a NPM1 liga-se ao p53 e regula a proteína retinoblastoma (pRb)²⁸, o p19^{ARF}²⁹ e HDM2³⁰.

Alguns trabalhos relatam que mutações no gene NPM1 são encontradas em cerca de 35% de todos os pacientes com LMA e que são as alterações moleculares mais frequentes nesses indivíduos^{19, 31}. Essas mutações são classificadas de A a F, de acordo com inserção ou deleção de quatro pares de bases no éxon 12 da região C-terminal da NPM1 (Figura 1), o que faz com que ocorra um novo sinal de exportação nuclear^{26, 31}. As mutações em NPM1 além de serem detectadas pelas mutações encontradas no gene, também podem ser pesquisadas por alterações fenotípicas, através da pesquisa da proteína anormal NPM1^{1, 31}.

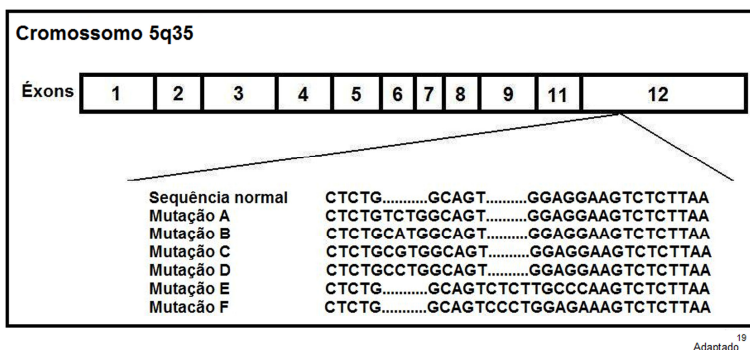


Figura 1: Representação esquemática das mutações no gene NPM1.

Muitos estudos demonstram que as mutações no gene NPM1 eram relevantes apenas para os pacientes com cariótipo normal^{17, 24, 31, 32}. Por outro lado, o grupo de Haferlach e colaboradores³³ relatou, recentemente, que, embora os pacientes com LMA com cariótipo anormal representem uma minoria dos indivíduos com a mutação no gene NPM1, sua definição, no que diz respeito às características biológicas, patológicas e clínicas, é muito importante. Este estudo de Haferlach e colaboradores³³ foi realizado com 631 pacientes com LMA com mutação no gene NPM1, na qual 14,7% dos pacientes apresentaram cariótipo anormal, além de que não foram observadas diferenças nos pacientes com LMA que apresentavam mutação NPM1 (cariótipo normal ou anormal) com relação à sobrevida global. Esse resultado ratifica o conceito de que a LMA com a mutação no gene NPM1 deve ser clinicamente tratada como um subtipo, independentemente do cariótipo³³.

Nos poucos estudos com alterações cromossômicas associadas às mutações no gene NPM1 em pacientes com LMA^{22, 23}, a associação da sua importância biológica e clínica não foi profundamente investigada. Nesse contexto, durante a elaboração da classificação da OMS-2008, um dos pontos de debate foi a denominação do subtipo “LMA com mutação no gene NPM1” como provisória e não definitiva.

Falini e colaboradores²⁶ relatam que em torno de 75-80% dos pacientes portadores de LMA com mutação no gene NPM1 possuíam a mutação do tipo A. Recentemente, um estudo relatou que indivíduos com a mutação NPM1 do tipo A é de prognóstico favorável, como já era conhecido para mutações na NPM1, como também que mutações no gene NPM1 do tipo não-A são de prognóstico desfavorável³⁴.

Valor prognóstico das mutações no gene FLT3 nas leucemias mieloides agudas

O gene que codifica a proteína FLT3 localiza-se no cromossomo 13q12 (*Fms-like tyrosine kinase-3*, também conhecido como FLK-2 de *fetal liver kinase-2*) foi clonado pela primeira vez em 1991 pelo grupo de Rosnet e colaboradores³⁵ e por Matthews e colaboradores³⁶. Em condições fisiológicas, a transcrição do gene FLT3 codifica uma proteína monomérica constituída por um domínio extracelular, uma região transmembrana, um domínio justamembrana (JM) e dois domínios tirosina-quinase intracelulares. Na presença de ligante ocorre a dimerização de monômeros seguida da fosforilação de substratos efetores de vias intracelulares de transdução de sinal. As principais vias acometidas pela ativação do FLT3 são a PI₃K (*phosphatidylinositol 3-Kinase*), as vias do RAS/ERK/MAPK (*mitogen-activated Kinase protein*) e STAT5 (*signal transducers and activators of Transcription 5*), o que resulta no aumento proliferativo e inibição da apoptose³⁷.

Quando o gene FLT3 sofre mutação, dá origem a um produto final modificado, ou seja, gera um receptor FLT3 com alterações em sua estrutura. Com isso, o domínio tirosina-quinase fica permanentemente ativado, independente de ligante, o que acarreta a proliferação descontrolada das células mieloides³⁸. Quando isso ocorre, a leucemia tem um prognóstico desfavorável e exige adequação no tratamento para contemplar tal variável¹⁸. As alterações encontradas no gene FLT3 podem ser de dois tipos: duplicações internas em *tandem* (DIT) ou mutações pontuais³⁸.

A DIT no gene FLT3 é a segunda mutação mais frequente encontrada em pacientes com LMA³⁹. Essa alteração ocorre nos éxons 14 ou 15 (previamente descritos como éxons 11 ou 12) (Figura 2-A) e acomete de 20-35% de todos os pacientes com LMA e 5-10% das leucemias linfoblásticas agudas (LLAs)²⁰. A incidência da DIT depende da idade dos pacientes com LMA. Nos indivíduos com idade superior a 60 anos, a frequência de mutações do tipo FLT3-DIT é de 30-35%; já em pacientes com LMA mais jovens, essas aberrações moleculares são detectadas em 20-25%. Esses resultados são explicados por uma maior incidência de aberrações citogenéticas, bem como por uma maior taxa de LMA secundária (por exemplo, secundária à Síndrome Mielodisplásica), associados a um resultado desfavorável em idosos com LMA^{37, 41}.

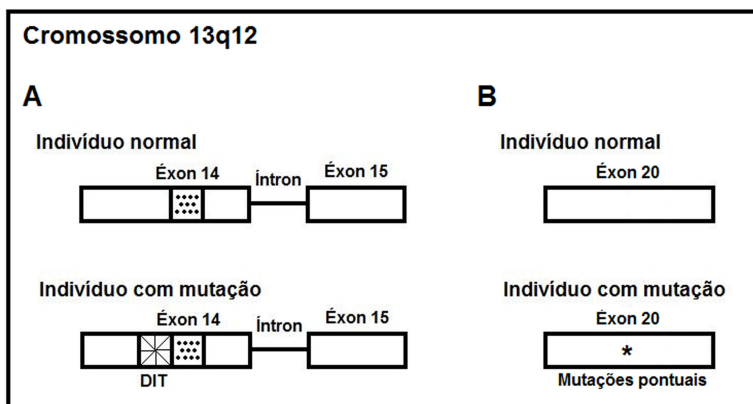


Figura 2: Representação esquemática das mutações no gene FLT3.

Painel A: Mutação no gene FLT3 do tipo DIT.

Painel B: Mutação no gene FLT3 do tipo D835.

O grupo de Nakao e colaboradores⁴² foi o primeiro a descrever a DIT no domínio JM de um alelo de FLT3 em pacientes com LMA. O modelo molecular do funcionamento da proteína alterada foi descrito por meio de estudos *in vitro* que demonstraram a dimerização descontrolada do domínio JM produzido pela DIT, o qual perde a capacidade autoinibitória e permite a dimerização dos receptores independente de ligante, o que gera autofosforilação e promove crescimento autônomo das células mutantes⁴³. Com a presença da DIT ocorre autofosforilação do receptor FLT3, o que leva à ativação permanente desse receptor, culminando com ativação das vias de sinalização celular, tais como ERK e STAT5⁴⁴.

A importância clínica das mutações em FLT3 na LMA foi estabelecida a partir da correlação entre a presença de DIT associada com leucocitose, alto percentual de blastos e resposta terapêutica desfavorável²⁰. Alguns grupos detectaram, ainda, a presença da mutação do tipo FLT3-DIT concomitante a outras alterações, como, por exemplo, a t(15;17) indicando prognóstico favorável; já a presença da t(6;9) está associada a prognóstico desfavorável^{21, 45}. No entanto, o valor prognóstico da DIT no gene FLT3 associada a outras alterações ainda não foi bem estabelecido, uma vez que a literatura traz trabalhos com DIT associado a altos níveis de recaída, com os níveis de remissão iguais aos do grupo sem essa mutação ou até mesmo associado à resposta clínica favorável^{46, 47}.

Mutações pontuais no gene FLT3 acometem a alça de ativação do segundo domínio quinase, e a mutação mais comum resulta da substituição de um resíduo de ácido aspártico na posição 835 do éxon 20 (anteriormente conhecido como éxon 17) (Figura 2-B) por um resíduo de tirosina (D835)⁴⁸. A alça de ativação é um componente comum aos receptores tirosina-quinase e tem como função bloquear o acesso de ATP e do substrato ao domínio quinase quando o receptor está inativo. Com uma mutação pontual nessa região, o receptor se encontra autoativado e, assim, como na presença da DIT, o controle da cascata de sinalização promovido por FLT3 é perdido, o que leva à proliferação celular⁴⁹.

A mutação do tipo FLT3-D835, também conhecida por FLT3-TKD, foi descrita em cerca de 5-10% dos pacientes com LMA e tem sido relacionada a um prognóstico desfavorável^{48, 50, 51}. Na presença das duas alterações em FLT3, a baixa incidência (1,7%) relatada dificulta a avaliação do valor clínico; no entanto, o prognóstico desfavorável parece prevalecer e estudos *in vitro* sugerem o desenvolvimento de resistência a terapias convencionais e específicas para o receptor⁴⁶.

De maneira geral, as alterações em FLT3 têm sido consideradas como fator de prognóstico, já incorporadas para determinação de risco e intensificação terapêutica nos protocolos recém-atualizados nos países desenvolvidos¹⁸. Por mais que haja discordâncias quanto à agressividade da doença, todos os estudos revelaram leucometria elevada e menor taxa de remissão na presença da mutação. Alguns estudos avaliam, também, a possibilidade de utilização das alterações em FLT3 como marcadores tumorais para identificação de doença residual mínima. O fato é que foram observados ganhos e perdas de mutações no decorrer do tratamento, o que restringe o valor de FLT3 como marcador indicativo de recaída^{52, 53}.

Como já descrito neste artigo, pacientes portadores de LMA com mutação no gene NPM1 estão associados a um prognóstico favorável; porém, se esse paciente apresentar concomitantemente a DIT para o gene FLT3, seu prognóstico será considerado desfavorável^{26, 31, 33, 34, 39, 54}.

Considerações finais

Na literatura alguns estudos clínicos, em fase I e II⁵⁵ e em fase III⁵⁶, investigam os benefícios da utilização dos inibidores de FLT3 em pacientes portadores de mutações no gene FLT3. Esses resultados mostram a importância da investigação das mutações no gene FLT3

para a estratificação e avaliação de prognóstico na LMA, pois a presença dessas mutações implica na escolha da conduta terapêutica¹⁸. Além disso, novos estudos envolvendo a investigação da mutação no gene NPM1 são de extrema importância, pois podem esclarecer a caracterização do subtipo “LMA com mutação no gene NPM1”.

Referências

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC Press, 2008.
- 2 Estey EH. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer*. 2001;92(5):1059-73.
- 3 Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;339(9):605-15.
- 4 Bain BJ. Diagnóstico em Leucemias. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2003.
- 5 Rubnitz JE, Pui CH. Molecular diagnostics in the treatment of leukemia. *Curr Opin Hematol*. 1999;6(4):229-35.
- 6 Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer*. 1999;35:173-85.
- 7 Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96(13):4075-83.
- 8 Byrd JC, Mrózek K, Dodge Rk, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with "de novo" acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100(13):4325-36.
- 9 Baldus CD, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol*. 2007;137:387-400.
- 10 Huang Q, Chen W, Gaal KK, Slovak ML, Stein A, Weiss LM. A rapid, one step assay for simultaneous detection of FLT3/ITD and NPM1 mutations in AML with normal cytogenetics. *Br J Haematol*. 2008;142:480-50.

- 11 Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, et al. 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*. 2002;100(1):59-66.
- 12 Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004;18:115-36.
- 13 Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Cancer*. 2002;2(7):502-13.
- 14 Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-18.
- 15 Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, et al. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2009;83(2)90-8.
- 16 Andersen MT, Andersen MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. NPM1 mutations in therapy-related acute myeloid leukemia with uncharacteristic features. *Leukemia*. 2008;22(5):951-5.
- 17 Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. 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*. 2007;109(2):431-48.
- 18 NCCN – National Comprehensive Cancer Network – Practice Guidelines in Oncology – Acute Myeloid Leukemia – v.1.2009, 2009.
- 19 Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Cancer*. 2006;6:493-505.
- 20 Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98(6):1752-9.
- 21 Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients

- with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326-35.
- 22 Verhaak RGW, Goudswaard CS, Putten WV, Bijl MA, Sanders MSA, Hugens W, et al. 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*. 2005;106(12):3747-54.
- 23 Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107(10):4011-20.
- 24 Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. 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*. 2008;111(5):2776-84.
- 25 Namboodiri VM, Akey IV, Schmidt-Zachmann MS, Head JF, Akey CW. The Structure and Function of *Xenopus* NO38-Core, a Histone Chaperone in the Nucleolus. *Structure*. 2004;12:2149–60.
- 26 Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc + AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109(3):874-85.
- 27 Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prev*. 2006;30(6):481-90.
- 28 Takemura M, Ohoka F, Perpelescu M, Ogawa M, Matsushita H, Takaba T, et al. Phosphorylation-Dependent Migration of Retinoblastoma Protein into the Nucleolus Triggered by Binding to Nucleophosmin/B23. *Exp Cell Res*. 2002;276:233-41.
- 29 Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr C. Physical and Functional Interactions of the Arf Tumor Suppressor Protein with Nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol*. 2004;24(3):985-96.
- 30 Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, et al. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer cell*. 2004;5:465-75.
- 31 Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous

- Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med.* 2005;352(3):254-66.
- 32 Akagi T, Ogawa S, Dugas M, Kawamata N, Yamamoto G, Nannya Y, et al. Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematol.* 2008;94(2):213-23.
 - 33 Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biological, pathological, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood.* 2009;114(14):3024-32.
 - 34 Koh Y, Park J, Bae EK, Ahn KS, Kim I, Bang SM, et al. Non-A type nucleophosmin 1 gene mutation predicts poor clinical outcome in de novo adult acute myeloid leukemia: differential clinical importance of NPM1 mutation according to subtype. *Int J Hematol.* 2009;90(1):1-5.
 - 35 Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics.* 1991;9(2):380-5.
 - 36 Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell.* 1991;28(7):1143-52.
 - 37 Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001;97(11):3589-95.
 - 38 Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, et al. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood.* 2006;107(9):3700-8.
 - 39 Scholl S, Fricke HJ, Sayer HG, Höffken K. Clinical implications of molecular genetic aberrations in acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135:491-505.
 - 40 Stirewalt D, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Cancer.* 2003;3:650-65.
 - 41 Andersson A, Johansson B, Lassen C, Mitelman F, Billstrom R, Fioretos T. Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. *Eur J Haematol.* 2004;72:307-13.

- 42 Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloideukemia. *Leukemia*. 1996;10:1911-8.
- 43 Gilliland DG, Griffin JD. Internal tandem duplication of the *FLT3* gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*. 1998;12:1333-7.
- 44 Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, et al. The Structural Basis for Autoinhibition of *FLT3* by the Juxtamembrane Domain. *Mol Cell*. 2004;13:169-78.
- 45 Libura M, Asnafi V, Tu A, Delabesse E, Tigaud I, Cymbalista F, et al. *FLT3* and *MLL* intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood*. 2003;102(6):2196-204.
- 46 Lacayo NJ, Meshinchi S, Kinnunen P, Yu R, Wang Y, Stuber CM, et al. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify *FLT3* mutations with good clinical outcomes. *Blood*. 2004;104(9):2646-54.
- 47 Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF, et al. Relationship between *FLT3* mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(12):3768-76.
- 48 Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97(8):2434-39.
- 49 Griffin JD. Point mutations in the *FLT3* gene in AML. *Blood*. 2001;97:2192-3.
- 50 Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin, B, Kindler T, et al. AML-associated *Flt3* kinase domain mutations show signal transduction differences compared with *Flt3* ITD mutations. *Blood*. 2005;106:265-73.
- 51 Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J. *FLT3*-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*. 2005;105:4792-9.
- 52 Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of *FLT3* mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of *FLT3* mutations in leukemogenesis,

- minimal residual disease detection and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*. 2003;100(7):2393-8.
- 53 Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*. 2006;107(1):293-300.
- 54 Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005;106(12):3733-9.
- 55 Shah M, Agarwal B. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). *Indian J Pediatr*. 2008;75:831-7.
- 56 Ohtake S. Acute myeloid leukemia. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2007;34(13):2175-9.

Apêndice 3: Dados dos pacientes submetidos à investigação das mutações no gene FLT3

7		6		5		4		3		2		1		Caso
0.08	F	13	M	2	F	11	F	1	M	6	M	11	F	Idade (anos)
SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	Sexo
LLA B pré-B	LLA B pré-B	LLA B comum	LLA B comum	LLA B comum	LLA B comum	LLA T cortical/ Linfoma Linfoblástico T	LPA com t(15;17)	LLA B comum	LLA B comum	LLA B comum	LLA B comum	LLA B comum	LLA B comum	Diagnóstico
OSR	OER	RET	RET	RET	RET	OSR	OSR	OSR	OSR	OSR	OSR	OSR	OSR	Progressão
Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	FLT3-DIT
Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	FLT3-D835
60.000	32.800	5.500	5.500	16.000	16.000	450.000	32.100	31.200	31.200	32.100	32.100	31.200	31.200	Leucometria
80	43	90	90	91	91	84	90	93	93	90	90	93	93	Blastos (%)
Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	CD34
Normal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	t(15;17)	NA	NA	t(15;17)	t(15;17)	NA	NA	Alteração citogenética
967	1.161	670	670	5.538	5.538	5.948	1.163	514	514	1.163	1.163	514	514	LDH (U/L)

14	13	12	11	10	9	8	Caso
15,7	3	5	3	3	13	7	Idade (anos)
M	M	F	F	M	M	M	Sexo
SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	Material
LMA com maturação	LLA B comum	LLA B comum	LLA B comum	LLA B comum	LLA B pré-B	LMA sem maturação	Diagnóstico
RET	OER	RET	RET	RET	RET	OSR	Progressão
Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	FLT3-DIT
Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	FLT3-D835
2.700	36.900	11.900	9.300	23.800	25.200	188.000	Leucometria
87	83	86	21	53	81	92	Blastos (%)
Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	CD34
Normal	NA	NA	NA	NA	t(9;22)	Normal	Alteração citogenética
967	960	322	746	1.184	2.737	1.292	LDH (U/L)

21	20	19	18	17	16	15	Caso
2	1	9	3	4	4	8	Idade (anos)
F	M	M	M	F	M	M	Sexo
SP	MO	SP	SP	SP	SP	SP	Material
LLA B comum	LLA T cortical	LPA	LMA monoblástica	LLA B comum	LMA com t(8;21)	LLA B comum	Diagnóstico
OSR	OER	RET	RET	RET	RET	RET	Progressão
Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	FLT3-DIT
Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	FLT3-D835
5.200	15.790	7.260	31.200	126.048	4.700	138.700	Leucometria
96	75	87	81	78	60	90	Blastos (%)
Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	CD34
NA	NA	NA	t(9;22)	NA	t(8;21)	NA	Alteração citogenética
NA	NA	600	2.155	NA	NA	832	LDH (U/L)

Caso		30	31	32	33	34	35	36			
Idade (anos)	Sexo	Material	Diagnóstico	Progressão	FLT3-DIT	FLT3-D835	Leucometria	Blastos (%)	CD34	Alteração citogenética	LDH (U/L)
14	M	MO	LMA com maturação	RET	Neg	Neg	2.000	24	Pos	NA	NA
4	F	MO	LMA monoblástica	RET	Neg	Neg	45.000	83	Pos	t(15;17)	NA
10	M	MO	LLA B comum	RET	Neg	Neg	7.400	38	Pos	NA	2.113
2	M	MO	LLA B comum	RET	Neg	Neg	15.000	48	Pos	NA	567
11	F	MO	LPA com t(15;17)	OER	Neg	Neg	3.400	80	Pos	d(9q)	467
0.1	M	MO	LPA com t(15;17)	OSR	Pos	Neg	42.700	84	Pos	t(15;17)	1.390
11	M	SP	LLA T cortical	RET	Neg	Neg	300.000	80	NA	NA	972

										Caso				
										Idade (anos)				
										Sexo				
										Material				
										Diagnóstico				
										Progressão				
										FLT3-DIT				
										FLT3-D835				
										Leucometria				
										Blastos (%)				
										CD34				
										Alteração citogenética				
										LDH (U/L)				
44		43		42		41		40		39		38		37
16,2		46		52		17		4		9		0.3		11
F		F		M		F		F		F		M		M
SP		SP		SP		MO		SP		SP		SP		SP
LLA T pró-T		LLA T pró-T		LMA com maturação		LLA B pré-B		LLA T pró-T		LLA B pré-B		LLA B pré-B		LLA B comum
RET		OER		RET		OSR		OSR		RET		OER		RET
Neg		Neg		Neg		Neg		Pos		Neg		Neg		Pos
Neg		Neg		Neg		Neg		Neg		Neg		Neg		Neg
15.400		33.300		142.990		4.810		220.000		14.600		165.000		29300
91		90		65		26		88		87		98		85
Pos		Pos		Pos		Pos		Pos		NA		Pos		Pos
NA		NA		Normal		NA		Normal		NA		NA		Normal
396		244		736		447		12.070		950		11.900		787

Caso	Idade (anos)	Sexo	Material	Diagnóstico	Progressão	FLT3-DIT	FLT3-D835	Leucometria	Blastos (%)	CD34	Alteração citogenética	LDH (U/L)
52	51	F	SP	LMA com maturação	RET	Neg	Neg	3.350	55	Pos	Normal	194
58	64	F	SP	LMA com maturação	RET	Neg	Neg	39.520	47	Pos	NA	1.542

Abreviaturas: MO – Medula óssea; NA – Não avaliado; Neg – Negativo; OER – Óbito em remissão; OSR – Óbito sem remissão; Pos – Positivo; RET – Remissão em tratamento; SP – Sangue periférico.

Anexo 1: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do UFSC, sob número de registro 212/2009



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

CERTIFICADO

Nº 205

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

APROVADO

PROCESSO: 212/09

FR- 272635

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

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

DP TO.: CCS/UFSC

FLORIANÓPOLIS, 27 de julho de 2009.

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

Anexo 2: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HIJG, sob número de registro 075/2008



Hospital Infantil Joana de Gusmão
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER Nº 081/2008

NOME DO PROJETO: INVESTIGAÇÃO DE PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA EM LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS	
PESQUISADOR: Júlio Araújo Zampirolo	
ORIENTADORA: Dra. Maria Cláudia Santos da Silva	
INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: HIJG	
DATA DO PARECER: 02/12/2008	REGISTRO NO CEP: 075/2008
GRUPO E ÁREA TEMÁTICA: Grupo III – 4.01	

DOCUMENTOS SOLICITADOS	SITUAÇÃO
1.FOLHA DE ROSTO	Ver comentário
2.PROJETO DE PESQUISA	OK
3.CURRÍCULO DO PESQUISADOR	OK
4.CARTA DE ENCAMINHAMENTO AO CEP	OK
5.TERMO DE COMPROMISSO ÉTICO	OK
6.CONCORDÂNCIA DO SERVIÇO	OK
7.DECLARAÇÃO ASSINADA PELA DIREÇÃO DO HIJG	OK
8. SUMÁRIO DO PROJETO	OK
9. FÓRMULÁRIO DE AVALIAÇÃO ECONÔMICO FINANCEIRA	ISENTO
10. DECLARAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO E RELATÓRIO FINAL	OK
Comentário: Modificar campos 5 e 6 e Preencher unitermos (campo 8)	

OBJETIVOS

Objetivo geral: Estudar a expressão de proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MDR1/Pg-P, MRP e LRP) como alvo de diagnóstico, avaliação de prognóstico e evolução da doença.

Objetivos específicos:

- Analisar a marcação imunofenotípica por citometria de fluxo das amostras de

CEP- HIJG - Rua Rui Barbosa, 152
Bairro Agrônômica, Florianópolis, Santa Catarina
Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cep@hijg.org.br

pacientes atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Infantil Joana de Gusmão para caracterização diagnóstica de LLA.

- Investigar a expressão das proteínas de resistência (MDR1/P-gp, MRP, LRP) nos blastos dos pacientes diagnosticados com LLA, no momento do diagnóstico.
- Avaliar a expressão dos genes MDR1/P-gp, MRP e LRP nos blastos dos pacientes diagnosticados de LLA, no momento do diagnóstico.

SUMÁRIO DO PROJETO

Trata-se de uma pesquisa prospectiva, exploratória, que será desenvolvida no Laboratório de Oncologia Experimental e Hematopatias e no Laboratório de Biologia Molecular da UFSC, além da possível participação do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, com financiamento assegurado pela CNPq. Serão incluídas 100 amostras de sangue de crianças com LLA, atendidas no HJG, onde serão realizadas as seguintes análises: obtenção de células blásticas, imunofenotipagem, reação transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase.

JUSTIFICATIVA

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma desordem maligna resultante da proliferação clonal de células progenitoras linfóides T ou B. O fato de 20% das crianças com LLA atingirem a remissão clínica após a fase inicial de quimioterapia e sofrer recaídas da doença, e que dificilmente são curadas, sugere que os critérios atualmente adotados na classificação da LLA não são suficientes para avaliar a resposta ao tratamento e a evolução clínica; e há necessidade de investigação de novos alvos de diagnóstico, avaliação de prognóstico e evolução da doença.

METODOLOGIA

1. DELINEAMENTO – Estudo prospectivo, exploratório, experimental
2. CÁLCULO E TAMANHO DA AMOSTRA – Por conveniência – 100 pacientes
3. PARTICIPANTES DE GRUPOS ESPECIAIS – Menores de 18 anos
4. RECRUTAMENTO – Pacientes atendidos no HJG
5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO – Os critérios de inclusão estão descritos no projeto. – Ver comentário 1
6. PONDERAÇÃO ENTRE RISCOS – BENEFÍCIOS – A pesquisa não implica em riscos físicos

CEP- HJG - Rua Rui Barbosa, 152
Bairro Agronômica, Florianópolis, Santa Catarina
Fone: (48) 3251 9092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: projeto@hig.ufsc.br

adicionais aos participantes

7.USO DE PLACEBO OU WASH-OUT - Não se aplica

8.MONITORAMENTO E SEGURANÇA DOS DADOS – Não descritos – Ver comentário 2

11.AVALIAÇÃO DOS DADOS - OK

12.PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE – Ver comentário 3

13.PREOCUPAÇÃO COM OS ASPECTOS ÉTICOS - Sim

14.CRONOGRAMA - OK

15. PROTOCOLO DE PESQUISA – Não apresentado

16.ORÇAMENTO – Pesquisa com financiamento da CNPq

Comentários:

1. Deve ser considerado como critério de exclusão a não aceitação, por parte de pais, responsáveis ou crianças maiores, em participar da pesquisa.
2. Gostaríamos de saber como será realizado o descarte do material excedente. Lembramos que segundo a Resol 196/96, todos os dados coletados referentes à pesquisa deverão ser armazenados em local seguro, sob a tutela do pesquisador, por um período de cinco anos, e após, incinerados.
3. Sugerimos que os protocolos de pesquisa e as lâminas sejam identificados pelos números de registro, ou iniciais, ou códigos, para manter a confidencialidade dos dados e resguardar a privacidade da criança doente.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE) - Adequado

PARECER FINAL

APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

- Informamos que o presente parecer foi analisado e aprovado em reunião deste comitê, na data de 02/12/2008
- Conforme Resolução 196/92, capítulo III.2.h, o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios periódicos sobre o andamento da pesquisa e relatório final. No site: www.saude.sc.gov.br/nfior/CEP.htm, está disponibilizado modelo. Seu primeiro relatório está previsto para JUNHO DE 2009.


JUCÉLIA MARIA GUEDERT
 Coordenadora do CEP-HJG

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - HJG.

CEP- HJG - Rua Rui Barbosa, 152
 Bairro Agrônômica, Florianópolis, Santa Catarina
 Fone: (48) 32519092

Registro aprovado no CONEP, conforme Carta Circular nº 168 CONEP/CNS/MS de 07 de março de 2005 e renovado em 14 de fevereiro de 2008.

e-mail: cep@hjfsc.usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

QUAL OBJETIVO DESTA PESQUISA E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

Este estudo será realizado no Laboratório de Pesquisa de Oncologia Experimental e Hemopatias, situado no Hospital Universitário (HU-UFSC) e a pesquisadora envolvida é a aluna do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Marley Aparecida Licínio, sob a orientação da professora Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva.

O objetivo principal desta pesquisa é aprimorar o diagnóstico e prognóstico de Leucemias Mielóides Agudas.

EU TENHO QUE PARTICIPAR?

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

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR?

A pesquisa será feita a partir de uma amostra de sangue enviada até nós pelo seu(a) médico(a) hematologista. Sendo assim, não haverá nenhum contato pessoal (do tipo avaliação física ou entrevistas

efetuadas pela pesquisadora), pois será feita apenas a análise da sua amostra sanguínea afim de investigação diagnóstica.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

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

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

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

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

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

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

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

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

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

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

Pesquisadora: Marley Aparecida Licínio Fone: 3234-5815

Eu, (nome do paciente ou responsável legal em letras de forma).....

.....recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa.

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

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

Assinatura
Data / /

Nome da pessoa que aplicou este termo

Assinatura do paciente
Data / /

Nome do paciente

Assinatura da testemunha imparcial
Data / /

Nome da testemunha imparcial

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

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

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

QUAL OBJETIVO DESTA PESQUISA E QUAIS AS INFORMAÇÕES DISPONÍVEIS?

Este estudo será realizado no Laboratório de Pesquisa de Oncologia Experimental e Hemopatias, situado no Hospital Universitário (HU-UFSC) e a pesquisadora envolvida é a aluna do curso de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Marley Aparecida Licínio, sob a orientação da professora Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva.

O objetivo principal desta pesquisa é aprimorar o diagnóstico e prognóstico de Leucemias Mielóides Agudas.

É OBRIGATÓRIO PARTICIPAR?

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

parentesco do paciente) do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência.

O QUE ACONTECERÁ SE EU ASSINAR ESSE TERMO?

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

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS DESCONFORTOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

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

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

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

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

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

QUAIS OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS QUE POSSO TER SE PARTICIPAR?

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

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

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

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

Pesquisadora: Marley Aparecida Licínio Fone: 3234-5815

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

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

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

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

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

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

Assinatura	Nome da pessoa que aplicou este termo
Data/...../.....	

Assinatura do paciente/responsável	Nome do paciente/responsável
Data/...../.....	

Assinatura da testemunha imparcial	Nome da testemunha imparcial
Data/...../.....	

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Trabalho: “**INVESTIGAÇÃO DE PROTEÍNAS DE RESISTÊNCIA EM LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS PEDIÁTRICAS**”

Senhores Pais:

Por Favor, leiam atentamente as instruções abaixo antes de decidir com seu (sua) filho (a) se ele (a) deseja participar do estudo e se o Senhor (a) concorda com que ele (a) participe do presente estudo. Se possível, discuta esse assunto com seu (sua) filho (a) para que seja uma decisão em conjunto.

Eu,..... confirmo que Júlio Araújo Zampirolo discutiu comigo este estudo. Eu compreendi que:

1. O objetivo deste estudo é estudar a expressão de proteínas de resistência a múltiplos fármacos como alvo de diagnóstico, avaliação de prognóstico e evolução da doença.
2. Minha participação e do meu filho colaborando neste trabalho é muito importante porque permitirá uma melhor compreensão da leucemia. A participação do meu filho na pesquisa implica em eu responder a algumas perguntas sobre a doença e o pesquisador irá examinar e anotar os dados que interessam para a pesquisa.
3. O Hospital Infantil Joana de Gusmão também está interessado no presente estudo e já deu a permissão por escrito para que esta pesquisa seja realizada. Porém minha participação e de meu filho (a), ou não, no estudo não implicará em nenhum benefício ou restrição de qualquer ordem para meu (sua) filho (a) ou para mim.
4. Eu também sou livre para não participar desta pesquisa se não quiser. Isto não implicará em quaisquer prejuízos pessoais ou no atendimento de meu filho (a). Além disto, estou ciente de que em qualquer momento, ou por qualquer motivo, eu ou minha família podemos desistir de participar da pesquisa.
5. Estou ciente de que o meu nome e o do meu filho não serão divulgados e que somente as pessoas diretamente relacionadas à

pesquisa terão acesso aos dados e que todas as informações serão mantidas em segredo e somente serão utilizados para este estudo.

6. Se eu tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa, eu posso entrar em contato com Júlio Araújo Zampirolo pelo telefone 8836-0063.

7. Eu concordo em participar deste estudo.

Nome e assinatura de participante maior de 14 anos:

Nome e assinatura do responsável legal pela criança:

Entrevistador:

Data:

Em caso de dúvidas relacionadas aos procedimentos éticos da pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital Infantil Joana de Gusmão, pelo telefone (48) 3251-9092.

