



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Programa de Residência em Área Profissional da Saúde

ALESSANDRA HELENA DA SILVA HELLWIG

Padronização de técnica molecular para detecção simultânea das mutações nos genes da Nucleofosmina (*NPM1*) e do Fms-Like Tirosina Quinase-3 (*FLT3/ITD*) em pacientes com leucemia mieloide aguda através da técnica de PCR multiplex e eletroforese capilar.

Porto Alegre

2023

ALESSANDRA HELENA DA SILVA HELLWIG

Padronização de técnica molecular para detecção simultânea das mutações nos genes da Nucleofosmina (*NPM1*) e do Fms-Like Tirosina Quinase-3 (*FLT3/ITD*) em pacientes com leucemia mieloide aguda através da técnica de PCR multiplex e eletroforese capilar.

Trabalho de Conclusão de Residência apresentado ao Programa de Residência na área profissional de saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Análises Clínicas.

Orientador(a): Eduardo Wandame Gomez  
Coorientador(a): Dariane Castro Pereira

Porto Alegre

2023

#### CIP - Catalogação na Publicação

Hellwig, Alessandra Helena da Silva  
Padronização de técnica molecular para detecção simultânea das mutações nos genes da Nucleofosmina (NPM1) e do Fms-Like Tirosina Quinase-3 (FLT3/ITD) em pacientes com leucemia mieloide aguda através da técnica de PCR multiplex e eletroforese capilar. / Alessandra Helena da Silva Hellwig. -- 2023.  
70 f.  
Orientadora: Eduardo Wandame Gomez.

Coorientadora: Dariane Castro Pereira.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Programa de Residência em Área Profissional de Saúde: Análises Clínicas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. leucemia mieloide aguda. 2. NPM1. 3. FLT3/ITD.  
I. Gomez, Eduardo Wandame, orient. II. Pereira, Dariane Castro, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## SUMÁRIO

Resumo	5
1. Introdução	6
2. Revisão da literatura	8
2.1. Leucemia Mieloide Aguda	8
2.1.1. Definição	8
2.1.2. Classificação	9
2.1.3. Sintomas	11
2.1.4. Diagnóstico laboratorial	12
2.2. Nucleofosmina-1 (NPM1)	13
2.2.1. Definição e funções	13
2.2.2. Mutação do gene	14
2.3. Fms-Like Tirosina Quinase-3 (FLT3/ITD)	16
2.3.1. Definição e funções	16
2.3.2. Mutação do gene	16
2.4. Prognóstico das mutações NPM1 e FLT3/ITD na LMA	17
3. Objetivos	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. Resultados e Discussão	20
4.1. Relatório de Validação	21
5. Considerações finais	47
6. Referências	48
7. Anexos	51

## Resumo

Leucemia mieloide aguda (LMA) é um câncer maligno de caráter heterogêneo. Sua classificação, atualmente, baseia-se quanto às alterações citogenéticas, moleculares e imunofenotipagem, porém a sua estratificação é, principalmente, pelas alterações citogenéticas. Entretanto, cerca de 45% dos pacientes com LMA possuem cariótipo normal, o que dificulta a correta estratificação do tratamento. Novos fatores de prognósticos, como alterações moleculares já descritas na literatura, são necessários na rotina do laboratório de diagnóstico para, desta forma, ocorrer a correta categorização através de grupos de riscos. O presente trabalho de conclusão da residência visa a implementação no Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a detecção das mutações nos genes *NPM1* e *FLT3/ITD* através das técnicas reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex e eletroforese capilar. Para isto, foi realizada a padronização da técnica assim como a sua validação através dos seguintes testes: precisão do teste, verificado quanto a sua repetibilidade e reprodutibilidade; veracidade que foi avaliada pelo índice de concordância; especificidade *in silico* onde as sequências de *primers* foram analisadas em relação à sequência alvo através da ferramenta BLAST. Ao implementar este exame na rotina, uma assistência mais abrangente será composta, contribuindo no manejo do paciente com LMA na correta estratificação do seu prognóstico.

**Palavras-chave:** leucemia mieloide aguda; diagnóstico molecular; validação; nucleofosmina; duplicações internas em tandem.

## 1. Introdução

Leucemia mieloide aguda (LMA) é um câncer maligno clinicamente heterogêneo (HUANG et al., 2008; LICÍNIO; SILVA, 2010; VELLOSO et al., 2011; ZARKA et al., 2020), tanto no aspecto biológico quanto morfológico (LICÍNIO; SILVA, 2010; VELLOSO et al., 2011), apesar do baixo número de alterações genômicas quando comparado com outros cânceres (ZARKA et al., 2020). O cariótipo de pacientes com LMA é amplamente estudado, entretanto esta análise isolada não fornece informações que sejam suficientes para estratificação do prognóstico, visto que 45% dos pacientes com LMA possuem cariótipo normal, sendo necessária mais ferramentas de análises (LICÍNIO; SILVA, 2010; VELLOSO et al., 2011).

O gene responsável pela síntese da nucleofosmina (NPM) é altamente conservado entre os humanos (ZARKA et al., 2020). Fica localizado na banda 5 da região 3 do braço longo do cromossomo 5 (5q35) e é composto por 12 éxons (LICÍNIO; SILVA, 2010; SHAHAB; SHAMSI; AHMED, 2013; VELLOSO et al., 2011; ZARKA et al., 2020), possuindo três isoformas: NPM1 (sendo esta a mais prevalente), NPM1.2 e NPM1.3 (LICÍNIO; SILVA, 2010; SHAHAB; SHAMSI; AHMED, 2013). A NPM1 é uma proteína que reside no nucléolo sob condições fisiológicas normais, mas continuamente realiza transportes entre o núcleo e o citoplasma (LICÍNIO; SILVA, 2010; SHAHAB; SHAMSI; AHMED, 2013; VELLOSO et al., 2011; ZARKA et al., 2020). Por ser uma proteína multifuncional (LICÍNIO; SILVA, 2010) e estar envolvida diretamente na regulação e estabilidade de proteínas nucleares (VELLOSO et al., 2011), a NPM1 possui papel importante no ciclo celular, como participação no processo de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA), além de interações com proteínas, como p53 (LICÍNIO; SILVA, 2010; SHAHAB; SHAMSI; AHMED, 2013). Mutações no gene *NPM1* são encontradas em torno de 45-55% dos pacientes com LMA com cariótipo normal e, as mais prevalentes, consistem na inserção de quatro nucleotídeos no éxon 12 (HUANG et al., 2008; MENCIA-TRINCHANT et al., 2017; VELLOSO et al., 2011), causando localização anormal da proteína NPM1 no citoplasma (SCHNITTGER et al., 2009; VELLOSO et al., 2011). As mutações são classificadas de A a F, porém, as mutações do tipo A são mais prevalente, ocorrendo em torno de 75-80% desses pacientes (LICÍNIO; SILVA, 2010; SCHNITTGER et al., 2009; SHAHAB; SHAMSI; AHMED, 2013).

Por outro lado, o gene responsável pela síntese da Fms-like tirosina quinase-3 (FLT3) fica localizado na banda 2 da região 1 do braço longo do cromossomo 13 (13q12) (LICÍNIO; SILVA, 2010; VELLOSO et al., 2011). Este gene codifica um receptor com atividade tirosina quinase que está relacionado com vias de sinalização celular (VELLOSO et al., 2011) que, quando ativado, ocorre um aumento proliferativo e inibição da apoptose (LICÍNIO; SILVA, 2010). Quando ocorre uma mutação nesse gene, há alterações na estrutura do receptor FLT3, e o produto final modificado acarreta uma ativação permanente, ocorrendo uma proliferação descontrolada das células mieloides (LICÍNIO; SILVA, 2010). As alterações estruturais que ocorrem quando há mutação no gene *FLT3* podem ser de dois tipos: mutações pontuais ou duplicações internas em tandem (ITD), sendo esta última a segunda mutação mais frequente encontrada em pacientes com LMA (35-45%), podendo estar presente nos éxons 14 ou 15 (LICÍNIO; SILVA, 2010; VELLOSO et al., 2011).

A fim de prognóstico, conhecimento da fisiopatologia, classificação de risco e escolha do tratamento, as mutações que ocorrem são grandes aliadas como marcadores genéticos na rotina diagnóstica para pacientes com LMA. Por exemplo, a mutação no gene *NPM1* em uma pessoa que apresenta cariótipo normal é classificada como prognóstico favorável, enquanto que a mutação no gene *FLT3/ITD* é de prognóstico desfavorável (SHIMONY; STAHL; STONE, 2023).

Sabe-se que um diagnóstico preciso, analisando variáveis como fatores clínicos, biológicos, genéticos e moleculares, é essencial no sucesso terapêutico do paciente com LMA (HUANG et al., 2008; LICÍNIO; SILVA, 2010). Logo, a pesquisa de mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* tem sido considerada de extrema importância (LICÍNIO; SILVA, 2010) pois fornece informações essenciais que prevê risco de recaída, resistência ao tratamento e sobrevida livre da doença para pacientes com LMA (HUANG et al., 2008; LICÍNIO; SILVA, 2010). Investigações na área de onco-hematologia no Serviço de Diagnóstico Laboratorial (SDLab) de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) já são realizadas, como é o caso da detecção da mutação no gene *FLT3/ITD*. Porém, para uma correta estratificação do prognóstico, o presente trabalho visa também implementar a detecção da mutação no gene *NPM1*, fornecendo, desta forma, mais uma ferramenta na assistência aos pacientes com LMA.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1. Leucemia Mieloide Aguda

#### 2.1.1. Definição

LMA é uma doença da medula óssea (PELCOVITS; NIROULA, 2020) definida pela proliferação exacerbada de células leucêmicas sem funcionalidades a partir de uma célula tronco que sofreu alterações genéticas e que impedem sua diferenciação celular, inibindo a produção de células sanguíneas normais (LICÍNIO; SILVA, 2010; PELCOVITS; NIROULA, 2020). O sangue periférico frequentemente é acometido, podendo ocorrer infiltrações em órgãos (ESTEY, 2018; QIN, 2021), como fígado, pele e sistema nervoso central (EL SALLOUKH et al., 2022).

Qualquer faixa etária pode ser acometida pela LMA (TALATI; SWEET, 2018), entretanto os adultos são os mais diagnosticados, sendo a população idosa, com faixa etária média de 65 anos (BELL et al., 2018), e o sexo masculino mais frequentes (HOU; TIEN, 2020; OWATTANAPANICH et al., 2018). De todas as leucemias, a LMA é a que tem maior taxa de mortalidade (HORIBATA et al., 2020), visto que pacientes com idade mais avançada geralmente desenvolvem complicações devido o tratamento utilizado, infecções associadas e toxicidade hematológica prolongada (PALMIERI et al., 2020).

As alterações genéticas sem um agente causador definido - como anormalidades cromossômicas ou mutações genéticas - são as principais responsáveis pela formação de uma célula leucêmica (LICÍNIO; SILVA, 2010; PELCOVITS; NIROULA, 2020). Tais alterações podem ocorrer em diferentes etapas da diferenciação celular e evoluir com o tempo sob uma pressão seletiva da terapia utilizada no tratamento (BLOOMFIELD et al., 2018). Devido à isso, a LMA é caracterizada como uma doença heterogênea (KANTARJIAN et al., 2021; LICÍNIO; SILVA, 2010); ou seja, diferentes pacientes com LMA podem apresentar variabilidade no curso clínico - seja quanto à etiologia, patogênese e prognóstico - e na resposta terapêutica (HOU; TIEN, 2020; KANTARJIAN et al., 2021; LICÍNIO; SILVA, 2010; VELLOSO et al., 2011). Sendo assim, a identificação dessas alterações genéticas são imprescindíveis para a identificação dos subgrupos de pacientes com características clínicas distintas (LICÍNIO; SILVA, 2010).

O progresso nesse entendimento molecular e genético da LMA tem sido importante pois, a partir desses achados, é possível relacioná-lo com a clínica do paciente e obter um plano terapêutico baseado no seu perfil molecular (KAYSER; LEVIS, 2019) em conjunto com exames (BELL et al., 2018; HAFERLACH; SCHMIDTS, 2020) como a citogenética e a citometria de fluxo (HAFERLACH; SCHMIDTS, 2020; HORIBATA et al., 2020). A necessidade de diagnóstico preciso e ferramentas que auxiliem para que isto ocorra vão refletir nas duas pontas desta cadeia: na instituição e no paciente com LMA (CARRERA; KANTARJIAN; BLINDER, 2018); isto porque essa abordagem aumenta as chances de sucesso terapêutico (HOU; TIEN, 2020) ao evitar tratamentos errados, não efetivos e de alto custo (KAYSER; LEVIS, 2019).

### 2.1.2. Classificação

Já se sabe que a investigação das alterações que levam à LMA é essencial para estratificar o prognóstico, prever risco de recaída, sobrevida livre da doença e resistência à terapia (LICÍNIO; SILVA, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu em 2022, categorias com critérios para o diagnóstico da LMA, levando em consideração a origem e a linhagem celular, o estágio de maturação e o tipo de anormalidade citogenética ou molecular envolvida (KHOURY et al., 2022; SHIMONY; STAHL; STONE, 2023) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação da OMS (2022) para leucemia mieloide aguda e neoplasias relacionadas.

---

#### **LMA com anormalidades genéticas definidas**

LPA com fusão *PML-RARA*

LMA com fusão *RUNX1-RUNX1T1*

LMA com fusão *CBFB-MYH11*

LMA com fusão *DEK-NUP214*

LMA com fusão *RBM15-MRTFA*

LMA com fusão *BCR-ABL1*

LMA com rearranjo *KMT2A*

LMA com rearranjo *MECOM*

LMA com rearranjo *NUP98*

LMA com *NPM1* mutado  
 LMA com *CEBPA* mutado  
 LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia  
 LMA com outras alterações genéticas definidas  
**LMA com diferenciação definida**  
 LMA com diferenciação mínima  
 LMA sem maturação  
 LMA com maturação  
 Leucemia basofílica aguda  
 Leucemia mielomonocítica aguda  
 Leucemia monocítica aguda  
 Leucemia eritroide aguda  
 Leucemia megacarioblástica aguda

---

LMA: leucemia mieloide aguda; LPA: leucemia promielocítica aguda.

Além disso, com a atualização da classificação realizada pela OMS em 2022, não é mais necessário uma porcentagem de mieloblastos de, no mínimo, 20% na medula óssea ou sangue periférico para LMA com anormalidades genéticas definidas (com exceção das LMA com fusão *BCR-ABL1* e LMA com mutações no gene *CEBPA*) (KHOURY et al., 2022; SHIMONY; STAHL; STONE, 2023). Já para LMA com diferenciação definida, o ponto de corte de 20% de mieloblastos continua sendo recomendado (KHOURY et al., 2022; SHIMONY; STAHL; STONE, 2023).

Atualizada no ano de 2023 pela *National Comprehensive Cancer Network*® (NCCN) e considerando os diferentes achados citogenéticos e moleculares e como estes possuem diferentes respostas terapêuticas, a LMA foi classificada em três grupos quanto ao seu perfil de risco: favorável, intermediário e adverso (Tabela 2) (POLLYEA et al., 2023; SHIMONY; STAHL; STONE, 2023).

**Tabela 2.** Estratificação de risco de acordo com NCCN *guideline*.

---

**Perfil de risco Grupos de risco genético para leucemia mieloide aguda**

---

Favorável t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*

	<p>inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>Mutação <i>in frame</i> bZIP em <i>CEBPA</i></p> <p><i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3-ITD</i>*</p>
	<p><i>NPM1</i> mutado com <i>FLT3-ITD</i>*</p> <p><i>NPM1</i> selvagem com <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal)</p>
Intermediário	<p>t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i></p> <p>Outras anormalidades moleculares e/ou citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas</p>
Adverso	<p>t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranjado</p> <p>t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></p> <p>t(8;16)(p11.2;p13.3); <i>KAT6A-CREBBP</i></p> <p>inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOME(EVII)</i></p> <p>t(3q26.2;v); <i>MECOM(EVII)</i> rearranjado</p> <p>-5 ou del(5q);-7;-17/abn(17p)</p> <p>Cariótipo complexo, cariótipo monossomal</p> <p><i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i>, e/ou <i>ZRSR2</i> mutado**</p> <p><i>TP53</i> mutado</p>

\* LMA com *NPM1* mutado e anormalidade citogenética de risco adverso é categorizada como risco adverso;

\*\* LMA com *NPM1* mutado e uma dessas alterações moleculares de risco adverso não altera a categoria de risco atual; bZIP: zíper de leucina básica.

Fonte: Adaptado de NCCN Guidelines® (“NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Myeloid Leukemia”, versão 6, ano 2023).

### 2.1.3. Sintomas

Pacientes com LMA geralmente apresentam sintomas indicativos de falha na medula óssea, como anemia, febre, sangramentos (OWATTANAPANICH et al., 2018) acompanhado de fraqueza, fadiga, letargia e cansaço (QUISPE et al., 2022). Outros sintomas comuns são: perda de apetite, perda de peso sem motivo aparente, baço e fígado aumentados (WANG, 2021). Manifestações extra medulares podem ocorrer, como é o caso de sarcomas mieloides e infiltrações na pele (PELCOVITS; NIROULA, 2020).

Em uma revisão realizada em 2021 sobre as manifestações da leucemia como parte do diagnóstico precoce, foi observado que sintomas orais eram os mais prevalentes na LMA

(72,72%) quando comparados com outros tipos de leucemia (QUISPE et al., 2022). Ao analisar os diferentes tipos de tecido, viu-se que os tecidos moles apresentavam os primeiros sinais de lesão, sendo o tecido gengival o mais afetado por lesões como sangramentos e úlceras (63,63%) (QUISPE et al., 2022).

#### 2.1.4. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da LMA é feito pelo cruzamento de informações a partir dos exames de citomorfologia, citogenética, análise molecular e imunofenotipagem (ECKARDT et al., 2020); os resultados obtidos irão fornecer dados importantes para prognóstico e estratificação da doença, o que irá auxiliar a equipe médica quanto a adequação do tratamento e monitorização da resposta terapêutica (LICÍNIO; SILVA, 2010).

##### *Citomorfolgia*

A citomorfolgia é realizada em paralelo com o hemograma ou medulograma. São analisadas características de células mieloides, como presença de blastos com granações (ou promielócitos, no caso de uma LPA) e presença de bastonetes de Auer (EMADI; LAW, 2020). Acompanhado com a contagem diferencial, não é mais necessário um mínimo de blastos nas anormalidades genéticas definidas (salvo casos de LMA com fusão *BCR-ABL1*; LMA com mutações no gene *CEBPA*; LMA com diferenciação definida) (KHOURY et al., 2022; SHIMONY; STAHL; STONE, 2023). Além disso, um baixo número de células vermelhas e plaquetas também pode ser observado em pacientes com LMA (EMADI; LAW, 2020).

##### *Citogenética*

Através de um cariótipo é realizada a análise dos cromossomos dentro das células. Em alguns casos de LMA, é possível notar alterações cromossômicas quanto ao tamanho, formato e estrutura do cromossomo, como nos casos de translocações. Outra técnica que também pode ser utilizada na citogenética para procura de anormalidades cromossômicas e genéticas é *FISH* (Hibridização fluorescente *in situ*) (WANG, 2021).

Embora os critérios citogenéticos sejam importantes para diferenciação e prognóstico, somente a análise destes não são totalmente suficientes para a LMA, visto que 45%-50% dos

pacientes possuem o cariótipo normal (AITKEN et al., 2021; LICÍNIO; SILVA, 2010). Devido a isso, a investigação de outras possíveis alterações envolvidas nesta doença são determinantes para a estratificação do prognóstico, o que nos auxilia na previsão de risco de recaída, resistência à terapia e a sobrevida livre da doença (LICÍNIO; SILVA, 2010).

### *Imunofenotipagem*

A imunofenotipagem é realizada pela técnica de citometria de fluxo para determinar a linhagem das células hematopoiéticas - através da expressão de diferentes antígenos que estas apresentam durante a maturação celular - e também na detecção da doença residual mínima, que é uma preocupação na LMA já que está fortemente associada com a recaída clínica (BLOOMFIELD et al., 2018; HAFERLACH; SCHMIDTS, 2020).

### *Análise molecular*

A análise molecular é muito utilizada na procura de mutações genéticas (WANG, 2021) e no monitoramento de doença residual mínima (HAFERLACH; SCHMIDTS, 2020). A reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de nova geração (NGS) são testes “padrão ouro” no diagnóstico (HAFERLACH; SCHMIDTS, 2020; PANUZZO et al., 2022). Através da PCR, consegue-se amplificar uma sequência alvo específica (HAFERLACH; SCHMIDTS, 2020), possibilitando a identificação de determinada mutação genética e expressão gênica (PANUZZO et al., 2022). No caso de uma PCR quantitativa, também é possível mensurar a doença residual mínima (PANUZZO et al., 2022). Já o NGS, também conhecido como sequenciamento massivo em paralelo, consegue sequenciar desde um segmento ou gene mas também o genoma inteiro (HAFERLACH; SCHMIDTS, 2020; PANUZZO et al., 2022; QIN, 2021).

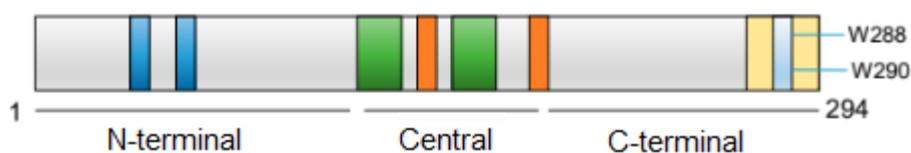
## **2.2. Nucleofosmina-1 (NPM1)**

### **2.2.1. Definição e funções**

A NPM1 é uma proteína intracelular (BRODSKÁ; ŠAŠINKOVÁ; KUŽELOVÁ, 2019) que realiza transporte entre o núcleo e citoplasma da célula e age como uma chaperona para estabelecer interações entre proteínas (FORGHIERI et al., 2018). Localizada

principalmente no nucléolo (SHAHAB; SHAMSI; AHMED, 2013), possui funções que são cruciais em diversos processos celulares, como a biogênese do ribossomo, transporte, controle e resposta apoptótica, manutenção da estabilidade genômica, reparo do DNA, regulação da via da proteína p53 (importante supressor tumoral) e regulação do centrôssomo (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021; FORGHIERI et al., 2018; KAYSER; LEVIS, 2019). Algumas outras isoformas já foram descritas, como NPM2, NPM3 e drosophila NP-like (BRODSKÁ; ŠAŠINKOVÁ; KUŽELOVÁ, 2019).

A proteína NPM1 é composta por 294 aminoácidos, possui peso molecular de 37 kDa e é composta por três domínios: N-terminal, central e C-terminal (ZARKA et al., 2020). O domínio C-terminal, que é altamente conservado, tem dois resíduos de triptofano que formam a localização nuclear da proteína (Figura 1) (ZARKA et al., 2020).



**Figura 1.** Estrutura da proteína NPM1, composta pelos domínios N-terminal, central e C-terminal. Domínio C-terminal com dois resíduos de triptofano (W288 e W290).

Fonte: adaptado de Zarka et al., 2020.

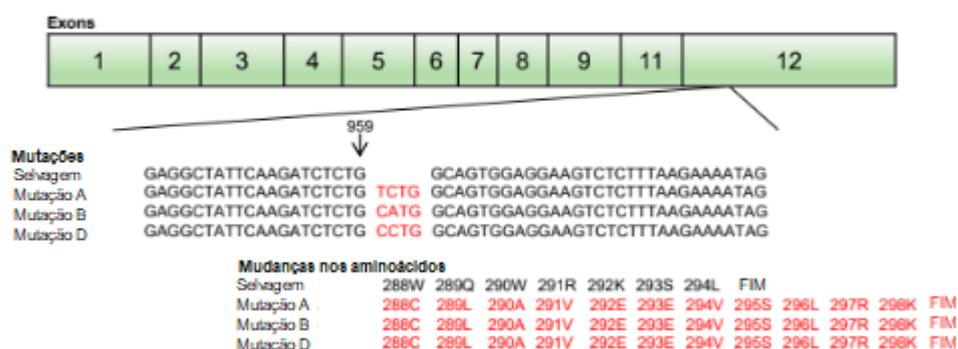
O gene *NPM1*, que codifica a proteína NPM1 (FORGHIERI et al., 2018), encontra-se na banda 5 da região 3 do braço longo no cromossomo 5 (5q35) (KULSOOM et al., 2017; SHAHAB; SHAMSI; AHMED, 2013) e é composto por 12 éxons (SHAHAB; SHAMSI; AHMED, 2013) com tamanhos entre 58 a 358 pares de base (ZARKA et al., 2020).

### 2.2.2. Mutação do gene

A mutação no gene *NPM1* é uma das alterações mais frequentes - e quase que exclusiva - na LMA (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021; FORGHIERI et al., 2018; KAYSER; LEVIS, 2019). Ocorre, aproximadamente, em 30% dos adultos com a doença (FORGHIERI et al., 2018), sendo a sua grande maioria em indivíduos com cariótipo normal (50-60%) (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021; FORGHIERI et al., 2018; KAYSER; LEVIS, 2019). Desde a sua descoberta, mais de 50 diferentes mutações já foram

descritas no éxon 12, mas os subtipos A, B e D são os principais na LMA (95% dos casos), com frequência de 75-80%, 10% e 5%, respectivamente (FORGHIERI et al., 2018; KAYSER; LEVIS, 2019; POZDNYAKOVA, 2021; SHAHAB; SHAMSI; AHMED, 2013).

Basicamente, a alteração no gene *NPM1* se dá pela inserção de 4 pares de base (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021), geralmente entre os nucleotídeos na posição 960 e 961 (ZARKA et al., 2020), causando um tipo de mutação chamado de *frameshift* (Figura 2) (KAYSER; LEVIS, 2019). A proteína, que foi codificada pelo gene mutado, acaba tendo uma mudança estrutural na região C-terminal, afetando os dois resíduos de triptofano e resultando em uma localização atípica dela no citoplasma celular (Figura 3) (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021; FALINI et al., 2020; FORGHIERI et al., 2018; ZARKA et al., 2020). Devido a isso, a atividade da proteína p53 fica inativada e a leucemogênese ativada (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021; FORGHIERI et al., 2018).



**Figura 2.** Estrutura do gene *NPM1* e as suas principais mutações e mudanças de aminoácidos que ocorrem no éxon 12.

Fonte: adaptado de Zarka et al., 2020.



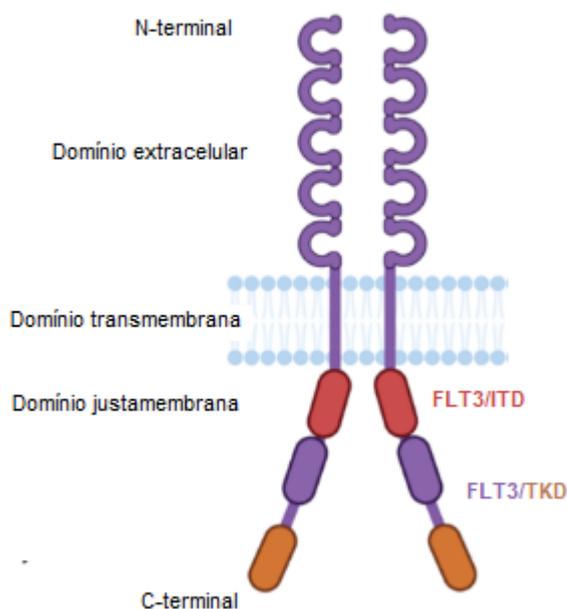
**Figura 3.** Comparação entre as estruturas da proteína *NPM1* selvagem com a proteína mutada, ao perder os dois resíduos de triptofano na região C-terminal.

Fonte: adaptado de Falini et al., 2020.

## 2.3. Fms-Like Tirosina Quinase-3 (FLT3/ITD)

### 2.3.1. Definição e funções

O gene *FLT3* fica localizado no cromossomo 13 e possui 24 éxons (RIBEIRO; EIRING; KHORASHAD, 2021). A proteína resultante possui atividade tirosina quinase (receptor transmembrana FLT3) e é composta por 993 aminoácidos (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021; RIBEIRO; EIRING; KHORASHAD, 2021). Possui regiões extracelular, transmembrana, justamembrana e intracelular (Figura 4) (NITIKA; WEI; HUI, 2022; RIBEIRO; EIRING; KHORASHAD, 2021). Este receptor está envolvido em processos hematopoiéticos como na proliferação e diferenciação de células progenitoras (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021; MARANDO; HUNTLY, 2020) e é fortemente expresso em células tronco hematopoiéticas (MARANDO; HUNTLY, 2020).



**Figura 4.** Estrutura do receptor FLT3 e a localização das mutações que ocorrem: FLT3/ITD no domínio justamembrana e FLT3/TKD no domínio intracelular.

Fonte: adaptado de Nitika et al., 2022.

### 2.3.2. Mutação do gene

Há dois tipos de mutações no gene *FLT3* que podem ocorrer:

- *FLT3/TKD*: ocorre uma mutação de ponto que afeta o domínio tirosina quinase do receptor FLT3 (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021), resultando numa proliferação de blastos (MARANDO; HUNTLY, 2020).
- *FLT3/ITD*: alteração mais frequente que a anterior (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021). Consiste na duplicação de sequências que podem variar de 3 a mais de 400 pares de base (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021; NITIKA; WEI; HUI, 2022). Afeta a região justamembrana do receptor FLT3, tendo sua auto fosforilação e ativação permanente (KULSOOM et al., 2017).

Isto culmina na ativação de vias intracelulares proporcionando uma proliferação celular aumentada (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021). Na LMA, este tipo de mutação é frequente, em torno de 20 a 50% dos casos (EL ACHI; KANAGAL-SHAMANNA, 2021), e está relacionada com a idade, sendo pouco frequente em crianças e mais identificadas em indivíduos com 60 anos ou mais (KAYSER; LEVIS, 2019).

#### **2.4. Prognóstico das mutações *NPM1* e *FLT3/ITD* na LMA**

O prognóstico do paciente com LMA quando na presença da mutação *NPM1* e *FLT3/ITD* varia e deve ser avaliada (Tabela 2), já que frequentemente coexistem (POLLYEA et al., 2023; SHIMONY; STAHL; STONE, 2023):

- Presença da mutação *NPM1* quando na ausência da mutação *FLT3/ITD*: bom marcador de prognóstico e com boa resposta à terapia (EL CHAER; HOURIGAN; ZEIDAN, 2023; POLLYEA et al., 2023);
- Presença da mutação *FLT3/ITD* com ou sem ausência da mutação *NPM1*: o prognóstico já se torna intermediário, independente da carga alélica (EL CHAER; HOURIGAN; ZEIDAN, 2023; POLLYEA et al., 2023);
- Presença da mutação *NPM1* e anormalidade citogenética complexa: automaticamente classificado como perfil de risco adverso (EL CHAER; HOURIGAN; ZEIDAN, 2023; POLLYEA et al., 2023).

A influência que essas e outras alterações genéticas têm no diagnóstico, no tratamento e no pós tratamento de pacientes com LMA vem, cada vez mais, sendo foco de estudo nas definições de *guidelines* clínicos e de classificação diagnóstica. A melhoria na classificação

de prognóstico aumenta a possibilidade de novos alvos terapêuticos para serem utilizados em terapias de precisão (EL CHAER; HOURIGAN; ZEIDAN, 2023).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

Realizar a validação da técnica de PCR multiplex e eletroforese capilar para detecção das mutações dos genes *NPM1* e *FLT3/ITD* em pacientes com LMA do HCPA.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de PCR para detecção da mutação do gene *NPM1*;
- Realizar a padronização da análise de fragmento do amplificado através da técnica de eletroforese capilar para avaliação da presença de mutação do gene *NPM1*;
- Estabelecer um protocolo da técnica para detecção da mutação dos genes *NPM1* e *FLT3/ITD* - este último já realizado no SDLab de Biologia Molecular do HCPA - através de uma reação de PCR multiplex;
- Estabelecer precisão, veracidade e especificidade para posterior implementação do ensaio no SDLab do HCPA;

#### 4. Resultados e Discussão

Os resultados do trabalho estão descritos no protocolo “**A simple and fast protocol to detect nucleophosmin 1 (NPM1) mutation and Fms-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication (FLT3/ITD): optimizing laboratory routine**”, que será submetido à revista *Methods and Protocols*, assim como o **relatório de validação** para implementação do exame no Serviço de Diagnóstico Laboratorial no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### 4.1. Relatório de Validação

Para ocorrer a implementação de um exame na rotina assistencial em um laboratório, é necessário validar a técnica utilizada quanto às especificações desta para que erros sejam minimizados e que não haja prejuízo ao paciente. O relatório de validação para a detecção das mutações nos genes *FLT3/ITD* e *NPM1* por PCR multiplex e eletroforese capilar está descrito abaixo e dividido da seguinte forma: ficha de informações gerais (quadro 1); análise dos dados; conclusão.

##### 4.1.1. Ficha de informações

**Quadro 1.** Ficha de informações gerais referente à validação da técnica para detecção das mutações nos genes *FLT3/ITD* e *NPM1* para implementação na rotina assistencial.

<b>Ficha de Informações - Validação da técnica para detecção das mutações <i>FLT3/ITD</i> e <i>NPM1</i> por PCR multiplex com eletroforese capilar</b>	
<b>Data</b>	19/10/2023
<b>Responsável</b>	Alessandra Helena da Silva Hellwig (Elaboradora);
<b>CARACTERIZAÇÃO DO EXAME PROPOSTO</b>	
<b>Nome</b>	Detecção das mutações nos genes <i>FLT3/ITD</i> e <i>NPM1</i> ;
<b>Registro na ANVISA</b>	Exame elaborado pelo laboratório - <i>in house</i> ;
<b>Insumos, fabricante e referências</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TAQ DNA Polimerase 500U, tampão 10x e MgCl<sub>2</sub> (concentração 5U/ul) - Ludwig Biotecnologia (ref: 35);</li> <li>• <i>Primers</i> (para <i>NPM1</i>) 10 uM - Applied Biosystems;</li> </ul> Forward: 5' - ATT TCT TTT TTT TTT TTT CCA GGC TAT TCA AG - 3' Reverse: 5'HEX - CAC GGT AGG GAA AGT TCT CAC TCT GC - 3' <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Primers</i> (para <i>FLT3/ITD</i>) 10 uM - Sigma Aldrich;</li> </ul> Forward: 5' - GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC - 3' Reverse: 5'FAM - CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC - 3' <ul style="list-style-type: none"> <li>• dNTP set 2,5 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - Quatro G</li> </ul>

	Biotecnologia (ref: 100018);
<b>Descrição da metodologia</b>	Teste <i>in vitro</i> para amplificação de ácidos nucleicos a partir de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex convencional seguida da técnica de análise de fragmentos para a análise de presença ou ausência das mutações nos genes <i>FLT3/ITD</i> e <i>NPM1</i> a partir de sangue total ou medula óssea em tubo EDTA.
<b>Informações adicionais</b>	Teste elaborado a partir de trabalho de conclusão de residência ( <i>in house</i> ). Valor de referência: Não detectado.
<b>JUSTIFICATIVA PARA VALIDAÇÃO</b>	
<b>Finalidade</b>	Detecção de mutações no gene <i>FLT3/ITD</i> e <i>NPM1</i> na rotina assistencial na área onco-hematológica.
<b>Benefícios da nova técnica</b>	Detecção da mutação no gene <i>FLT3/ITD</i> já está implementado na rotina assistencial do laboratório. Porém, para uma correta estratificação do prognóstico, há também a necessidade de implementação de um exame que detecte mutação no gene <i>NPM1</i> , fornecendo, desta forma, mais uma ferramenta na assistência aos pacientes com leucemia mieloide aguda. Além disso, também visa otimizar a rotina laboratorial ao realizar a detecção desses dois alvos na mesma técnica (PCR multiplex e eletroforese capilar).
<b>ESTRATÉGIA DE VALIDAÇÃO</b>	
<b>Data dos ensaios</b>	27/04/2023 - 29/09/2023.
<b>Testes de Desempenho Realizados</b>	Especificidade <i>in silico</i> ; Veracidade; Precisão;
<b>Teste Referência</b>	PCR convencional seguido de eletroforese capilar para detecção de mutação no gene <i>FLT3/ITD</i> (singleplex); PCR convencional seguido de eletroforese capilar para detecção de mutação no gene <i>NPM1</i> (singleplex);
<b>Número de Testes</b>	40 testes;
<b>Origem das amostras</b>	Amostras clínicas da rotina laboratorial, fragmentos genéticos e

	controles externos (UK NEQAS);
<b>Tipos e quantidade de amostras</b>	<p>Total de 40 amostras:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 8 amostras sem mutações nos genes <i>FLT3/ITD</i> e <i>NPM1</i>;</li> <li>- 10 amostras com mutações em ambos os genes <i>FLT3/ITD</i> e <i>NPM1</i>;</li> <li>- 9 amostras com mutação apenas no gene <i>NPM1</i>;</li> <li>- 13 amostras com mutação apenas no gene <i>FLT3/ITD</i>.</li> </ul> <p>Tipos de amostras utilizadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 23 amostras provenientes de medula óssea (EDTA);</li> <li>- 7 amostras provenientes de sangue total (EDTA);</li> <li>- 8 amostras sintéticas provenientes do controle externo (UK NEQAS);</li> <li>- 1 fragmento genético sintético mutado para <i>FLT3/ITD</i>;</li> <li>- 1 fragmento genético sintético mutado para <i>NPM1</i>.</li> </ul>
<b>OBSERVAÇÕES ADICIONAIS</b>	
<b>Referencial Bibliográfico</b>	<p>BURD, E. M. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. <i>Clinical Microbiology Reviews</i>, v. 23, n. 3, p. 550–576, jul. 2010.</p> <p>BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. <i>Clinical Chemistry</i>, v. 55, n. 4, p. 611–622, abr. 2009.</p> <p>HUANG, Q. et al. A rapid, one step assay for simultaneous detection of <i>FLT3/ITD</i> and <i>NPM1</i> mutations in AML with normal cytogenetics. <i>British Journal of Haematology</i>, v. 142, n. 3, p. 489–492, jul. 2008.</p>

#### 4.2.2. Análise de dados

- **Avaliação de desempenho: veracidade**

- **Teste:** percentual de concordância;
- **Resultado:** 100% de concordância;
- **Comentários e interpretação:**

Houve 100% de concordância na detecção das mutações nos genes *NPM1* (quadro 2) e *FLT3/ITD* (quadro 3) que foi obtida na reação multiplex quando comparada com a reação singleplex (força de concordância perfeita - Kappa = 1). Das 40 amostras testadas, 22 foram detectadas mutações nas duplicatas realizadas para o gene *FLT3/ITD* e que resultaram em dados de razão de sinal (quadro 4). Destas, 4 amostras obtiveram classificação de carga alélica (alta ou baixa) divergentes entre as reações singleplex e multiplex. Entretanto, ao analisar todos os casos divergentes, a razão de sinal estava próxima do *cut-off* (0,5), o que pode ser justificável, já que os desvios padrões das amostras foram baixas (quadro 3). Nos resultados obtidos para detecção da mutação no gene *NPM1*, não houve divergência de resultados entre as técnicas multiplex e singleplex (quadro 5).

**Quadro 2.** Comparação dos resultados obtidos com o teste multiplex em relação ao teste singleplex (referência) na detecção de mutação no gene *NPM1* e seu percentual de concordância.

		<i>NPM1</i> multiplex	
		Detectado	Não detectado
<i>NPM1</i> singleplex	Detectado	19	0
	Não detectado	0	21
Total de amostras		40	
Amostras concordantes		40	
Percentual de concordância		100%	
Valor Kappa		1	

**Quadro 3.** Comparação dos resultados obtidos com o teste multiplex em relação ao teste singleplex (referência) na detecção de mutação no gene *FLT3/ITD*, percentual de concordância e média dos desvios padrões (dp) das razões de sinal que foram obtidas em cada teste.

		<i>FLT3/ITD</i> multiplex		Média dos dp das razões de sinal
		Detectado	Não detectado	
<i>FLT3/ITD</i> singleplex	Detectado	23	0	0,174
	Não detectado	0	17	
Total de amostras		40		
Amostras concordantes		40		
Percentual de concordância		100%		
Valor Kappa		1		
Média dos dp das razões de sinal		0,059		

**Quadro 4.** Resultados obtidos nas duplicatas de cada amostra para teste de veracidade quanto à concordância obtida no teste em validação (PCR multiplex com eletroforese capilar sublinhado em rosa) comparado com o teste de referência (PCR singleplex com eletroforese capilar sublinhado em laranja) na detecção de mutação no gene *FLT3/ITD*.

Amostra	Resultado para <i>FLT3/ITD</i> singleplex (detectado se RS ≥ 0,05)	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mutado 1	Área alelo mutado 1	Tamanho alelo mutado 2	Área alelo mutado 2	RS	Carga Alélica (alta se RS ≥ 0,5)	RS Médio e Carga Alélica	Resultado para <i>FLT3/ITD</i> multiplex (detectado se RS ≥ 0,05)	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mutado 1	Área alelo mutado 1	Tamanho alelo mutado 2	Área alelo mutado 2	RS	Carga Alélica (alta se RS ≥ 0,5)	RS Médio e Carga Alélica	Concord.
1	NÃO DETECTADO	328,41	21569,25	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,73	16836,2	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,54	12529,04	387,12	312,44	-	-	0,02	-	-	NÃO DETECTADO	328,64	6346,86	-	-	-	-	-	-	-	
2	NÃO DETECTADO	328,33	13979,64	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,69	12855,36	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,61	19706,2	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,71	10799,16	-	-	-	-	-	-	-	
3	DETECTADO	328,21	11819,40	384,54	8090,47	-	-	0,68	ALTA	0,64	DETECTADO	328,73	6326,14	384,37	3111,25	-	-	0,49	BAIXA	0,51	Sim
	DETECTADO	328,7	14110,83	384,3	8270,48	-	-	0,59	ALTA	ALTA	DETECTADO	328,66	4074,63	384,62	2148,64	-	-	0,53	ALTA	ALTA	
4	NÃO DETECTADO	328,30	7260,55	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,69	8019,17	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,79	12731,48	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,73	8515,88	-	-	-	-	-	-	-	
5	DETECTADO	328,34	8511,54	393,10	20218,95	-	-	2,38	ALTA	2,20	DETECTADO	328,85	3772,72	393,45	6874,47	-	-	1,82	ALTA	1,75	Sim
	DETECTADO	328,61	7757,61	393,08	15780,73	-	-	2,03	ALTA	ALTA	DETECTADO	328,71	2337,38	393,35	3934,47	-	-	1,68	ALTA	ALTA	
6	DETECTADO	328,59	1736,79	352,56	271,26	-	-	0,16	BAIXA	0,20	DETECTADO	328,78	8547,82	353,03	1221,99	-	-	0,14	BAIXA	0,14	Sim
	DETECTADO	328,64	3955,19	352,71	958,19	-	-	0,24	BAIXA	BAIXA	DETECTADO	328,55	7188,16	352,82	1003,25	-	-	0,14	BAIXA	BAIXA	
7	DETECTADO	328,15	25299,98	352,40	1766,39	-	-	0,07	BAIXA	0,09	DETECTADO	328,76	20347,38	352,82	1438,57	-	-	0,07	BAIXA	0,06	Sim
	DETECTADO	328,7	6180,87	352,50	638,66	-	-	0,10	BAIXA	BAIXA	DETECTADO	328,65	7969,54	352,72	459,77	-	-	0,06	BAIXA	BAIXA	
8	NÃO DETECTADO	328,29	23547,65	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,68	14969,34	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,44	11893,55	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,57	8896,77	-	-	-	-	-	-	-	
9	NÃO DETECTADO	328,20	22473,63	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,62	11863,3	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,53	5727,83	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,6	13002,17	-	-	-	-	-	-	-	
10	NÃO DETECTADO	328,30	21690,48	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,68	12774,06	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,53	16981,81	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,62	11990,02	-	-	-	-	-	-	-	
11	DETECTADO	328,33	44127,74	352,6	7191,37	420,30	4583,4	0,27	BAIXA	0,19	DETECTADO	328,7	11640,75	352,88	1056,11	420,66	505,83	0,13	BAIXA	0,12	Sim
	DETECTADO	328,51	13691,67	352,55	910,14	420,39	719,7	0,12	BAIXA	BAIXA	DETECTADO	328,66	8635,54	352,85	553,52	420,74	303,28	0,10	BAIXA	BAIXA	

Amostra	Resultado para <i>FLT3/ITD</i> singleplex (detectado se $RS \geq 0,05$ )	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mutado 1	Área alelo mutado 1	Tamanho alelo mutado 2	Área alelo mutado 2	RS	Carga Alélica (alta se $RS \geq 0,5$ )	RS Médio e Carga Alélica	Resultado para <i>FLT3/ITD</i> multiplex (detectado se $RS \geq 0,05$ )	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mutado 1	Área alelo mutado 1	Tamanho alelo mutado 2	Área alelo mutado 2	RS	Carga Alélica (alta se $RS \geq 0,5$ )	RS Médio e Carga Alélica	Concord.	
12*	NÃO DETECTADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	-	-	-	-	-	-	-	-		NÃO DETECTADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
13	DETECTADO	328,25	17090,11	355,44	10066,22	-	-	0,59	ALTA	0,64	DETECTADO	328,53	8240,18	355,94	4152,96	-	-	0,50	ALTA	0,52	ALTA	Sim
	DETECTADO	328,38	9956,42	355,58	6856,95	-	-	0,69	ALTA		DETECTADO	328,56	5082,66	355,67	2681,06	-	-	0,53	ALTA			
14	DETECTADO	328,18	12918,41	396,02	6468,48	-	-	0,50	ALTA	0,32	DETECTADO	328,59	6830,35	396,31	2144,40	-	-	0,31	BAIXA	0,28	BAIXA	Sim
	DETECTADO	328,53	9334	395,93	1307,03	-	-	0,14	BAIXA		DETECTADO	328,59	3355,07	396,17	805,36	-	-	0,24	BAIXA			
15	DETECTADO	328,22	17462,71	369,93	2331,21	395,78	4179,7	0,37	BAIXA	0,41	DETECTADO	328,62	6427,64	370,41	866,65	396,2	798,67	0,26	BAIXA	0,23	BAIXA	Sim
	DETECTADO	328,51	16522,82	369,99	4119,69	395,89	3432,3	0,46	BAIXA		DETECTADO	328,6	4330,01	370,11	456,15	396,01	375,45	0,19	BAIXA			
16	DETECTADO	328,20	11993,98	387,19	8268,85	-	-	0,69	ALTA	0,66	DETECTADO	328,58	10768,61	387,57	4346,71	-	-	0,40	BAIXA	0,36	BAIXA	Sim
	DETECTADO	328,44	19280,53	387,16	11972,58	-	-	0,62	ALTA		DETECTADO	328,65	3134,79	387,48	990,64	-	-	0,32	BAIXA			
17	DETECTADO	328,32	8904,72	375,72	6143,06	-	-	0,69	ALTA	0,68	DETECTADO	328,74	7297,69	375,99	4634,08	-	-	0,64	ALTA	0,61	ALTA	Sim
	DETECTADO	328,47	15909,21	375,66	10730,5	-	-	0,67	ALTA		DETECTADO	328,61	5133,5	375,9	3018,33	-	-	0,59	ALTA			
18	DETECTADO	328,20	20003,11	358,31	11061,44	-	-	0,55	ALTA	0,55	DETECTADO	328,53	10301,50	358,61	4504,58	-	-	0,44	BAIXA	0,44	BAIXA	Sim
	DETECTADO	328,18	19210,38	358,29	10583,68	-	-	0,55	ALTA		DETECTADO	328,67	6774,37	358,5	3027,71	-	-	0,45	BAIXA			
19	DETECTADO	328,24	25399,16	381,63	2640,68	-	-	0,10	BAIXA	0,09	DETECTADO	328,57	13937,23	382,03	780,19	-	-	0,06	BAIXA	0,05	BAIXA	Sim
	DETECTADO	328,33	21676,28	381,59	1523,66	-	-	0,07	BAIXA		DETECTADO	328,59	7143,37	381,77	375,85	-	-	0,05	BAIXA			
20	DETECTADO	328,11	15930,98	364,27	13797,65	-	-	0,87	ALTA	1,00	DETECTADO	328,56	7912,83	364,64	6144,33	-	-	0,78	ALTA	0,77	ALTA	Sim
	DETECTADO	328,52	5674,35	364,12	6474,24	-	-	1,14	ALTA		DETECTADO	328,68	3891,66	364,5	3003,05	-	-	0,77	ALTA			
21	DETECTADO	328,15	13389,22	346,64	8802,61	-	-	0,66	ALTA	0,71	DETECTADO	328,5	6108,19	347,02	4103,69	-	-	0,67	ALTA	0,69	ALTA	Sim
	DETECTADO	328,45	12647,06	346,76	9719,38	-	-	0,77	ALTA		DETECTADO	328,49	4600,06	347,07	3271,12	-	-	0,71	ALTA			
22	DETECTADO	328,05	15048,44	358,24	10228,54	-	-	0,68	ALTA	0,72	DETECTADO	328,53	7765,24	358,59	3804,15	-	-	0,49	BAIXA	0,48	BAIXA	Sim
	DETECTADO	328,51	3751,44	358,13	2889,18	-	-	0,77	ALTA		DETECTADO	328,49	6502,29	358,53	3091,03	-	-	0,48	BAIXA			
23	DETECTADO	328,04	915,07	393,00	6428,07	-	-	7,02	ALTA	7,98	DETECTADO	328,62	1613,68	393,14	10431,25	-	-	6,46	ALTA	6,08	ALTA	Sim
	DETECTADO	328,45	2170,13	392,81	19407,44	-	-	8,94	ALTA		DETECTADO	328,5	999,49	393,11	5702,65	-	-	5,71	ALTA			
24	DETECTADO	328,11	13951,25	396,05	9824,05	-	-	0,70	ALTA	0,61	DETECTADO	328,59	9152,08	396,41	4118,18	-	-	0,45	BAIXA	0,45	BAIXA	Sim
	DETECTADO	328,38	20068,44	396,03	10342,06	-	-	0,52	ALTA		DETECTADO	328,56	5699,03	396,28	2544,36	-	-	0,45	BAIXA			
25	DETECTADO	328,22	16693,31	358,27	1412,54	-	-	0,08	BAIXA	0,08	DETECTADO	328,5	11388,98	358,5	682,59	-	-	0,06	BAIXA	0,06	Sim	

Amostra	Resultado para FLT3/ITD singleplex (detectado se RS ≥ 0,05)	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mutado 1	Área alelo mutado 1	Tamanho alelo mutado 2	Área alelo mutado 2	RS	Carga Alélica (alta se RS ≥ 0,5)	RS Médio e Carga Alélica	Resultado para FLT3/ITD multiplex (detectado se RS ≥ 0,05)	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mutado 1	Área alelo mutado 1	Tamanho alelo mutado 2	Área alelo mutado 2	RS	Carga Alélica (alta se RS ≥ 0,5)	RS Médio e Carga Alélica	Concord.
	DETECTADO	328,33	24091,65	358,16	1916,09	-	-	0,08	BAIXA	BAIXA	DETECTADO	328,49	11435,42	358,43	706,4	-	-	0,06	BAIXA	BAIXA	
26	DETECTADO	328,20	16577,57	358,42	1247,35	453,74	1769,2	0,18	BAIXA	0,20	DETECTADO	328,53	15447,35	358,73	1047,5	454,11	837,18	0,12	BAIXA	0,12	Sim
	DETECTADO	328,45	19116,16	358,39	2716,35	453,72	1284,4	0,21	BAIXA	BAIXA	DETECTADO	328,55	12362,53	358,61	867,8	454,04	655,61	0,12	BAIXA	BAIXA	
27	DETECTADO	328,18	19086,70	453,82	3744,52	-	-	0,20	BAIXA	0,25	DETECTADO	328,57	15302,56	454,14	2044,99	-	-	0,13	BAIXA	0,12	Sim
	DETECTADO	328,42	18921,71	453,73	5690,22	-	-	0,30	BAIXA	BAIXA	DETECTADO	328,56	9821,95	454,07	1044,72	-	-	0,11	BAIXA	BAIXA	
28	DETECTADO	328,27	23145,71	358,42	5133,40	-	-	0,22	BAIXA	0,26	DETECTADO	328,44	10115,97	358,7	1803,41	-	-	0,18	BAIXA	0,17	Sim
	DETECTADO	328,39	19506,95	358,24	5950,44	-	-	0,31	BAIXA	BAIXA	DETECTADO	328,49	6439,48	358,6	1025,01	-	-	0,16	BAIXA	BAIXA	
29	NÃO DETECTADO	328,35	34495,22	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,53	11192,76	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,29	22193,02	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,56	7396,65	-	-	-	-	-	-	-	
30	DETECTADO	328,18	4629,77	358,32	20821,57	-	-	4,50	ALTA	3,88	DETECTADO	328,53	2061,05	358,62	6498,15	-	-	3,15	ALTA	2,95	Sim
	DETECTADO	328,33	4940,25	358,39	16129,75	-	-	3,26	ALTA	ALTA	DETECTADO	328,65	1439,15	358,59	3941,65	-	-	2,74	ALTA	ALTA	
31**	DETECTADO	-	-	350,79	53101,84	-	-	-	-	-	DETECTADO	-	-	351,55	33015,99	-	-	-	-	-	Sim
	DETECTADO	-	-	351,01	43669,87	-	-	-	-	-	DETECTADO	-	-	351,25	25069,3	-	-	-	-	-	
32	NÃO DETECTADO	328,27	17099,61	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,56	16944,26	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,23	23273,78	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,58	6344,4	-	-	-	-	-	-	-	
33	NÃO DETECTADO	328,14	24505,89	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,47	18660,43	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,2	23765,44	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,62	15985,79	-	-	-	-	-	-	-	
34	NÃO DETECTADO	328,11	25128,55	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,53	14179,29	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,33	20155,75	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,65	11773,1	-	-	-	-	-	-	-	
35	NÃO DETECTADO	327,88	47228,25	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,45	8062,27	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,05	36648,94	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,56	3433,98	-	-	-	-	-	-	-	
36	NÃO DETECTADO	328,06	24487,43	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,56	10295,86	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,24	27256,14	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,58	9237,09	-	-	-	-	-	-	-	
37	NÃO DETECTADO	327,97	28456,65	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,54	9441,42	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,29	13419,07	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,52	7509,96	-	-	-	-	-	-	-	
38	NÃO DETECTADO	328,06	23894,19	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,53	9254,16	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,21	25726,32	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,52	6971,98	-	-	-	-	-	-	-	

Amostra	Resultado para <i>FLT3/ITD</i> singleplex (detectado se $RS \geq 0,05$ )	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mutado 1	Área alelo mutado 1	Tamanho alelo mutado 2	Área alelo mutado 2	RS	Carga Alélica (alta se $RS \geq 0,5$ )	RS Médio e Carga Alélica	Resultado para <i>FLT3/ITD</i> multiplex (detectado se $RS \geq 0,05$ )	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mutado 1	Área alelo mutado 1	Tamanho alelo mutado 2	Área alelo mutado 2	RS	Carga Alélica (alta se $RS \geq 0,5$ )	RS Médio e Carga Alélica	Concord.
39	NÃO DETECTADO	328,18	14286,13	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,51	6131,19	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,3	18844,52	-	-	-	-	-	-		NÃO DETECTADO	328,92	9071,06	-	-	-	-	-	-		
40	NÃO DETECTADO	328,18	23380,21	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	328,53	12361,92	-	-	-	-	-	-	-	Sim
	NÃO DETECTADO	328,24	27764,26	-	-	-	-	-	-		NÃO DETECTADO	328,58	11187,38	-	-	-	-	-	-		

Legenda: WT, selvagem; \* fragmento genético mutado para *NPM1* (sem WT); \*\* fragmento mutado para *FLT3/ITD* (sem WT); RS, razão de sinal; Concord., concordância.

**Quadro 5.** Resultados obtidos para teste de veracidade quanto à concordância obtida no teste em validação (PCR multiplex com eletroforese capilar sublinhado em rosa) comparado com o teste de referência (PCR singleplex com eletroforese capilar sublinhado em laranja) na detecção de mutação no gene *NPM1*.

Amostra	Resultado para <i>NPM1</i> singleplex	Tamanho alelo WT	Tamanho alelo mutado	Resultado para <i>NPM1</i> multiplex	Tamanho alelo WT	Tamanho alelo mutado	Concordância
1	DETECTADO	169,76	173,66	DETECTADO	169,81	173,74	Sim
2	DETECTADO	169,98	173,94	DETECTADO	169,81	173,81	Sim
3	DETECTADO	169,78	173,67	DETECTADO	169,77	173,66	Sim
4	DETECTADO	169,70	173,73	DETECTADO	169,93	173,81	Sim
5	DETECTADO	169,80	173,71	DETECTADO	169,89	173,92	Sim
6	DETECTADO	169,62	173,76	DETECTADO	169,98	174,01	Sim
7	DETECTADO	169,73	176,65	DETECTADO	170,01	173,92	Sim
8	DETECTADO	169,80	173,70	DETECTADO	170,06	173,94	Sim
9	DETECTADO	169,81	173,71	DETECTADO	169,83	173,78	Sim
10	DETECTADO	169,93	173,92	DETECTADO	169,85	173,88	Sim
11	DETECTADO	169,95	173,94	DETECTADO	169,79	173,76	Sim
12*	DETECTADO	-	173,40	DETECTADO	-	174,12	Sim
13	DETECTADO	169,64	173,66	DETECTADO	169,88	173,8	Sim
14	NÃO DETECTADO	169,70	-	NÃO DETECTADO	169,92	-	Sim
15	NÃO DETECTADO	169,70	-	NÃO DETECTADO	169,91	-	Sim
16	NÃO DETECTADO	169,70	-	NÃO DETECTADO	169,74	-	Sim
17	NÃO DETECTADO	169,73	-	NÃO DETECTADO	169,81	-	Sim
18	NÃO DETECTADO	169,82	-	NÃO DETECTADO	170,00	-	Sim
19	NÃO DETECTADO	169,68	-	NÃO DETECTADO	169,88	-	Sim
20	DETECTADO	169,80	173,70	DETECTADO	169,88	173,8	Sim

Amostra	Resultado para <i>NPM1</i> singleplex	Tamanho alelo WT	Tamanho alelo mutado	Resultado para <i>NPM1</i> multiplex	Tamanho alelo WT	Tamanho alelo mutado	Concordância
21	NÃO DETECTADO	169,80	-	NÃO DETECTADO	169,79	-	Sim
22	DETECTADO	169,85	173,78	DETECTADO	169,91	173,95	Sim
23	NÃO DETECTADO	169,80	-	NÃO DETECTADO	170,02	-	Sim
24	NÃO DETECTADO	169,73	-	NÃO DETECTADO	170,13	-	Sim
25	DETECTADO	169,72	173,64	DETECTADO	169,94	173,87	Sim
26	DETECTADO	170,00	173,89	DETECTADO	170,03	173,96	Sim
27	NÃO DETECTADO	169,87	-	NÃO DETECTADO	169,86	-	Sim
28	NÃO DETECTADO	169,86	-	NÃO DETECTADO	169,76	-	Sim
29	NÃO DETECTADO	169,89	-	NÃO DETECTADO	169,78	-	Sim
30	NÃO DETECTADO	169,98	-	NÃO DETECTADO	169,9	-	Sim
31**	NÃO DETECTADO	-	-	NÃO DETECTADO	-	-	Sim
32	DETECTADO	170,06	174,05	DETECTADO	169,89	173,92	Sim
33	NÃO DETECTADO	169,94	-	NÃO DETECTADO	169,93	-	Sim
34	NÃO DETECTADO	169,86	-	NÃO DETECTADO	169,78	-	Sim
35	NÃO DETECTADO	169,90	-	NÃO DETECTADO	169,98	-	Sim
36	NÃO DETECTADO	169,84	-	NÃO DETECTADO	170,01	-	Sim
37	DETECTADO	169,94	173,93	DETECTADO	169,9	173,83	Sim
38	NÃO DETECTADO	169,98	-	NÃO DETECTADO	169,94	-	Sim
39	NÃO DETECTADO	169,97	-	NÃO DETECTADO	170,06	-	Sim
40	NÃO DETECTADO	170,05	-	NÃO DETECTADO	169,89	-	Sim

Legenda: WT, selvagem; \* fragmento genético mutado para *NPM1* (sem WT); \*\* fragmento mutado para *FL3/ITD* (sem WT).

- **Avaliação de desempenho: precisão**

- **Teste:** coeficiente de variação (%) intraensaio e interensaio;
- **Resultado:** Os coeficientes de variação dos testes intraensaio e interensaio foram 5,53% e 6,75%, respectivamente (quadro 6);
- **Comentários e interpretação:**

Houve 100% de concordância dos resultados obtidos nos testes intraensaio e interensaio na pesquisa das mutações para *FLT3/ITD* e *NPM1* quando realizada a reação multiplex (quadro 7). Das 40 amostras testadas, 22 foram detectadas mutações para o gene *FLT3/ITD*. Destas, uma amostra obteve classificação de carga alélica (alta ou baixa) divergente quando realizada a análise interensaio. Entretanto, ao analisar a razão de sinal, a carga alélica encontrava-se próxima do *cut-off* (0,5), o que pode ser justificável, já que os desvios padrões das amostras foram baixas para os testes intraensaio e interensaio: 0,024 e 0,053, respectivamente (quadro 6). Os coeficientes de variação mostraram que os dados obtidos foram homogêneos, obtendo poucos resultados acima de 15% - classificados como média dispersão - mas ainda considerado satisfatório: 15,34% (teste intraensaio); 23,21% e 17,41% (teste interensaio).

**Quadro 6.** Resultados obtidos nos testes intraensaio e interensaio quanto à concordância obtida no teste em validação (PCR multiplex com eletroforese capilar) na detecção de mutação nos genes *FLT3/ITD* e *NPM1* para avaliação de desempenho da precisão.

	<b>Desvio padrão médio</b>	<b>Média do coeficiente de variação (%)</b>	<b>Coeficiente de Variação (%) Mín - Máx</b>
<b>Intraensaio</b>	0,024	5,534	0,474 - 15,342
<b>Interensaio</b>	0,053	6,755	0,082 - 23,210

**Quadro 7.** Resultados obtidos nos testes intraensaio e interensaio quanto à concordância obtida no teste em validação (PCR multiplex com eletroforese capilar) na detecção de mutação nos genes *FLT3/ITD* e *NPM1* para avaliação de desempenho da precisão.

Amostra	Data	FLT3/ITD									Teste intraensaio			Teste interensaio			NPM1			Concord.
		Resultado	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mut. 1	Área alelo mut. 1	Tamanho alelo mut. 2	Área alelo mut. 2	RS	CA	Média da RS	DP	CV (%)	DP	Média da RS	CV (%)	Resultado	Tamanho alelo WT	Tamanho alelo mut.	
1	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,73	16836,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,81	173,74	Sim
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,64	6346,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,55	173,51	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,65	5994,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,55	173,51	
2	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,69	12855,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,81	173,81	Sim
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,71	10799,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,51	173,57	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,67	9610,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,65	173,6	
3	25/08/2023	DETECTADO	328,73	6326,14	384,37	3111,25	-	-	0,49	BAIXA	-	-	-	0,023	0,51	4,621	DETECTADO	169,77	173,66	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,66	4074,63	384,62	2148,64	-	-	0,53	ALTA	0,53	0,003	0,617				DETECTADO	169,52	173,52	
	12/09/2023	DETECTADO	328,66	4748,82	384,62	2482,4	-	-	0,52	ALTA	-	-	-				DETECTADO	169,55	173,44	
4	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,69	8019,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,93	173,81	Sim
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,73	8515,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,63	173,69	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,56	6891,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,55	173,51	
5	25/08/2023	DETECTADO	328,85	3772,72	393,45	6874,47	-	-	1,82	ALTA	-	-	-	0,078	1,77	4,436	DETECTADO	169,89	173,92	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,71	2337,38	393,35	3934,47	-	-	1,68	ALTA	1,71	0,040	2,316				DETECTADO	169,49	173,55	
	12/09/2023	DETECTADO	328,46	2575,68	393,34	4479,97	-	-	1,74	ALTA	-	-	-				DETECTADO	169,63	173,62	
6	25/08/2023	DETECTADO	328,78	8547,82	353,03	1221,99	-	-	0,14	BAIXA	-	-	-	0,004	0,14	2,627	DETECTADO	169,98	174,01	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,55	7188,16	352,82	1003,25	-	-	0,14	BAIXA	0,14	0,003	1,874				DETECTADO	169,55	173,63	
	12/09/2023	DETECTADO	328,50	2738,52	352,84	372,22	-	-	0,14	BAIXA	-	-	-				DETECTADO	169,47	173,57	
7	25/08/2023	DETECTADO	328,76	20347,38	352,82	1438,57	-	-	0,07	BAIXA	-	-	-	0,009	0,06	13,636	DETECTADO	170,01	173,92	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,65	7969,54	352,72	459,77	-	-	0,06	BAIXA	0,06	0,001	1,394				DETECTADO	169,55	173,51	
	12/09/2023	DETECTADO	328,57	14238,64	352,74	837,8	-	-	0,06	BAIXA	-	-	-				DETECTADO	169,49	173,48	
8	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,68	14969,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	170,06	173,94	Sim
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,57	8896,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,63	173,57	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,6400	13717,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,55	173,51	
9	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,62	11863,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,83	173,78	Sim
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,6	13002,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,47	173,45	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,59	11213,76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,47	173,45	

Amostra	Data	FLT3/ATD									Teste intraensaio			Teste interensaio			NPMI			Concord.
		Resultado	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mut. 1	Área alelo mut. 1	Tamanho alelo mut. 2	Área alelo mut. 2	RS	CA	Média da RS	DP	CV (%)	DP	Média da RS	CV (%)	Resultado	Tamanho alelo WT	Tamanho alelo mut.	
10	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,68	12774,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,85	173,88	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,62	11990,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,61	173,59		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,51	11331,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,53	173,6		
11	25/08/2023	DETECTADO	328,7	11640,75	352,88	1056,11	420,66	505,8	0,13	BAIXA	-	-	-	0,021	0,12	17,412	DETECTADO	169,79	173,76	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,66	8635,54	352,85	553,52	420,74	303,3	0,10	BAIXA	0,10	0,008	7,483				DETECTADO	169,53	173,52	
	12/09/2023	DETECTADO	328,65	9746,44	352,97	689,48	420,62	385,6	0,11	BAIXA	-	-	-				DETECTADO	169,49	173,48	
12*	25/08/2023	NÃO DETECTADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	-	174,12	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	-	173,79		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	-	173,35		
13	25/08/2023	DETECTADO	328,53	8240,18	355,94	4152,96	-	-	0,50	ALTA	-	-	-	0,000	0,50	0,082	DETECTADO	169,88	173,8	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,65	3604,76	355,68	1736,25	-	-	0,48	BAIXA	0,50	0,032	6,424				DETECTADO	169,59	173,55	
	12/09/2023	DETECTADO	328,56	5082,66	355,67	2681,06	-	-	0,53	ALTA	-	-	-				DETECTADO	169,65	173,6	
14	25/08/2023	DETECTADO	328,59	6830,35	396,31	2144,40	-	-	0,31	BAIXA	-	-	-	0,035	0,29	12,200	NÃO DETECTADO	169,92	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,59	3355,07	396,17	805,36	-	-	0,24	BAIXA	0,26	0,034	12,876				NÃO DETECTADO	169,51	-	
	12/09/2023	DETECTADO	328,65	5522,65	396,16	1591,25	-	-	0,29	BAIXA	-	-	-				NÃO DETECTADO	169,59	-	
15	25/08/2023	DETECTADO	328,62	6427,64	370,41	866,65	396,20	798,7	0,26	BAIXA	-	-	-	0,033	0,24	13,795	NÃO DETECTADO	169,91	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,6	4330,01	370,11	456,15	396,01	375,5	0,19	BAIXA	0,21	0,030	13,927				NÃO DETECTADO	169,63	-	
	12/09/2023	DETECTADO	328,5	5949,12	370,25	762,9	396,15	629,3	0,23	BAIXA	-	-	-				NÃO DETECTADO	169,58	-	
16	25/08/2023	DETECTADO	328,58	10768,61	387,57	4346,71	-	-	0,40	BAIXA	-	-	-	0,037	0,38	9,678	NÃO DETECTADO	169,74	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,65	3134,79	387,48	990,64	-	-	0,32	BAIXA	0,35	0,051	14,436				NÃO DETECTADO	169,55	-	
	12/09/2023	DETECTADO	328,55	8152,9	387,4	3162,21	-	-	0,39	BAIXA	-	-	-				NÃO DETECTADO	169,65	-	
17	25/08/2023	DETECTADO	328,74	7297,69	375,99	4634,08	-	-	0,64	ALTA	-	-	-	0,030	0,61	4,839	NÃO DETECTADO	169,81	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,61	5133,5	375,9	3018,33	-	-	0,59	ALTA	0,59	0,007	1,198				NÃO DETECTADO	169,55	-	
	12/09/2023	DETECTADO	328,59	4169,57	375,83	2493,47	-	-	0,60	ALTA	-	-	-				NÃO DETECTADO	169,57	-	
18	25/08/2023	DETECTADO	328,53	10301,50	358,61	4504,58	-	-	0,44	BAIXA	-	-	-	0,000	0,44	0,103	NÃO DETECTADO	170,00	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,67	6774,37	358,5	3027,71	-	-	0,45	BAIXA	0,44	0,013	2,915				NÃO DETECTADO	169,51	-	
	12/09/2023	DETECTADO	328,53	7451,74	358,4	3195,93	-	-	0,43	BAIXA	-	-	-				NÃO DETECTADO	169,56	-	
19	25/08/2023	DETECTADO	328,57	13937,23	382,03	780,19	-	-	0,06	BAIXA	-	-	-	0,001	0,06	1,527	NÃO DETECTADO	169,88	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,59	7143,37	381,77	375,85	-	-	0,05	BAIXA	0,05	0,003	5,596				NÃO DETECTADO	169,61	-	
	12/09/2023	DETECTADO	328,53	8665,38	381,83	493,5	-	-	0,06	BAIXA	-	-	-				NÃO DETECTADO	169,49	-	
20	25/08/2023	DETECTADO	328,56	7912,83	364,64	6144,33	-	-	0,78	ALTA	-	-	-	0,007	0,78	0,838	DETECTADO	169,88	173,8	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,68	3891,66	364,5	3003,05	-	-	0,77	ALTA	0,79	0,020	2,536				DETECTADO	169,65	173,6	

Amostra	Data	FLT3/ATD									Teste intraensaio			Teste interensaio			NPMI			Concord.
		Resultado	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mut. 1	Área alelo mut. 1	Tamanho alelo mut. 2	Área alelo mut. 2	RS	CA	Média da RS	DP	CV (%)	DP	Média da RS	CV (%)	Resultado	Tamanho alelo WT	Tamanho alelo mut.	
	12/09/2023	DETECTADO	328,56	6655,88	364,38	5323,69	-	-	0,80	ALTA							DETECTADO	169,52	173,47	
21	25/08/2023	DETECTADO	328,5	6108,19	347,02	4103,69	-	-	0,67	ALTA	-	-	-	0,020	0,69	2,876	NÃO DETECTADO	169,79	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,49	4600,06	347,07	3271,12	-	-	0,71	ALTA	0,70	0,016	2,299				NÃO DETECTADO	169,55	-	
	12/09/2023	DETECTADO	328,66	5656,17	346,99	3893,46	-	-	0,69	ALTA							NÃO DETECTADO	169,55	-	
	25/08/2023	DETECTADO	328,53	7765,24	358,59	3804,15	-	-	0,49	BAIXA							-	-	-	
22	12/09/2023	DETECTADO	328,49	6502,29	358,53	3091,03	-	-	0,48	BAIXA	0,48	0,002	0,474	0,009	0,48	1,890	DETECTADO	169,58	173,54	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,5	5530,02	358,53	2646,52	-	-	0,48	BAIXA							DETECTADO	169,61	173,58	
	25/08/2023	DETECTADO	328,62	1613,68	393,14	10431,25	-	-	6,46	ALTA							-	-	-	
23	12/09/2023	DETECTADO	328,5	999,49	393,11	5702,65	-	-	5,71	ALTA	5,65	0,073	1,293	0,573	6,06	9,458	NÃO DETECTADO	169,57	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,5	1361,25	393,13	7625,93	-	-	5,60	ALTA							NÃO DETECTADO	169,45	-	
	25/08/2023	DETECTADO	328,59	9152,08	396,41	4118,18	-	-	0,45	BAIXA							-	-	-	
24	12/09/2023	DETECTADO	328,56	5699,03	396,28	2544,36	-	-	0,45	BAIXA	0,46	0,026	5,632	0,011	0,46	2,318	NÃO DETECTADO	169,53	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,59	4208,41	396,28	2034,71	-	-	0,48	BAIXA							NÃO DETECTADO	169,56	-	
	25/08/2023	DETECTADO	328,5	11388,98	358,5	682,59	-	-	0,06	BAIXA							-	-	-	
25	12/09/2023	DETECTADO	328,49	11435,42	358,43	706,4	-	-	0,06	BAIXA	0,06	0,002	2,888	0,000	0,06	0,707	DETECTADO	169,58	173,54	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,65	8482,04	358,4	502,99	-	-	0,06	BAIXA							DETECTADO	169,58	173,54	
	25/08/2023	DETECTADO	328,53	15447,35	358,73	1047,5	454,11	837,2	0,12	BAIXA							-	-	-	
26	12/09/2023	DETECTADO	328,55	12362,53	358,61	867,8	454,04	655,6	0,12	BAIXA	0,12	0,006	5,257	0,002	0,12	1,876	DETECTADO	169,53	173,6	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,55	10447,36	358,61	818,51	454,07	376,6	0,11	BAIXA							DETECTADO	169,63	173,56	
	25/08/2023	DETECTADO	328,57	15302,56	454,14	2044,99	-	-	0,13	BAIXA							-	-	-	
27	12/09/2023	DETECTADO	328,56	9821,95	454,07	1044,72	-	-	0,11	BAIXA	0,10	0,015	15,342	0,027	0,11	23,210	NÃO DETECTADO	169,47	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,59	9260,54	454,05	792,21	-	-	0,09	BAIXA							NÃO DETECTADO	169,47	-	
	25/08/2023	DETECTADO	328,44	10115,97	358,7	1803,41	-	-	0,18	BAIXA							-	-	-	
28	12/09/2023	DETECTADO	328,49	6439,48	358,6	1025,01	-	-	0,16	BAIXA	0,15	0,015	10,270	0,021	0,16	12,933	NÃO DETECTADO	169,63	-	Sim
	12/09/2023	DETECTADO	328,55	4877,77	358,5	671,29	-	-	0,14	BAIXA							NÃO DETECTADO	169,49	-	
	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,53	11192,76	-	-	-	-	-	-							-	-	-	
29	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,56	7396,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,65	-	Sim
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,65	6893,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,56	-	
	25/08/2023	DETECTADO	328,53	2061,05	358,62	6498,15	-	-	3,15	ALTA	-	-	-	0,226	2,99	7,558	NÃO DETECTADO	169,9	-	
12/09/2023	DETECTADO	328,65	1439,15	358,59	3941,65	-	-	2,74	ALTA	2,83	0,133	4,695	NÃO DETECTADO				169,55	-		
12/09/2023	DETECTADO	328,53	1196,58	358,51	3502,38	-	-	2,93	ALTA				NÃO DETECTADO				169,55	-		
31**	25/08/2023	DETECTADO	-	-	351,55	33015,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	-	-	Sim

Amostra	Data	FLT3/ITD									Teste intraensaio			Teste interensaio			NPM1			Concord.
		Resultado	Tamanho alelo WT	Área alelo WT	Tamanho alelo mut. 1	Área alelo mut. 1	Tamanho alelo mut. 2	Área alelo mut. 2	RS	CA	Média da RS	DP	CV (%)	DP	Média da RS	CV (%)	Resultado	Tamanho alelo WT	Tamanho alelo mut.	
	12/09/2023	DETECTADO	-	-	351,25	25069,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	-	-		
	12/09/2023	DETECTADO	-	-	351,25	28681,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	-	-		
32	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,56	16944,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,89	173,92	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,58	6344,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,5	173,56		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,58	10150,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,5	173,56		
33	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,47	18660,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,93	-	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,62	15985,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,55	-		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,49	15495,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,55	-		
34	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,53	14179,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,78	-	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,65	11773,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,66	-		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,54	10283,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,63	-		
35	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,45	8062,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,98	-	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,56	3433,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,63	-		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,59	2929,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,47	-		
36	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,56	10295,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	170,01	-	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,58	9237,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,66	-		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,61	3571,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,63	-		
37	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,54	9441,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,9	173,83	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,52	7509,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,56	173,63		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,68	732,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DETECTADO	169,66	173,6		
38	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,53	9254,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,94	-	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,52	6971,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,45	-		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,68	4660,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,56	-		
39	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,51	6131,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	170,06	-	Sim	
	29/09/2023	NÃO DETECTADO	328,92	9071,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,77	-		
	29/09/2023	NÃO DETECTADO	328,83	7278,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,78	-		
40	25/08/2023	NÃO DETECTADO	328,53	12361,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,89	-	Sim	
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,58	11187,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,66	-		
	12/09/2023	NÃO DETECTADO	328,57	5121,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NÃO DETECTADO	169,59	-		

Legenda: WT, selvagem; mut., mutado; RS, razão de sinal; CA, carga alélica; DP, desvio padrão; CV, coeficiente de variação; Concord., concordância; \* fragmento genético mutado para *NPM1* (sem WT); \*\* fragmento mutado para *FL3/ITD* (sem WT).

- **Avaliação de desempenho: especificidade *in silico***

- **Teste:** percentual de identidade;
- **Resultado:** 100% de identidade;
- **Comentários e interpretação:**

Os *primers* utilizados no ensaio variam de 23 a 32 pares de base de comprimento; temperatura de fusão (T melting) entre 60,0 a 65,05°C (com variação de, no máximo, 5°C entre os pares); e concentração de GC% de 25,00 a 53,85% (tabela 1). Os tamanhos dos fragmentos amplificados gerados para detecção de mutação no gene *NPM1* e *FLT3/ITD* são 172 pares de base (figuras 1 e 3A) e 329 pares de base (figuras 2 e 3B), respectivamente.

Em relação à especificidade dos *primers* utilizados para o gene *NPM1*, não foram observados outros alvos (figura 1), ocorrendo o anelamento no éxon 11 do gene (transcrito de referência atual NM\_002520, ou éxon 12 com o transcrito de referência antigo NM\_001355006) que é a região com maior prevalência de mutações do gene (tabela 2). O fragmento amplificado gerado na reação para detectar mutação no gene *NPM1* (figura 3A) foi alinhado com a sequência selvagem de interesse, onde se obteve um percentual de identidade de 100%, representando sua alta especificidade; já para sequências mutadas (tipo A, B e D), foi obtido um percentual de identidade de 98%, sendo os 2% restantes correspondentes à inserção de nucleotídeos decorrentes da mutação (figura 4).

Para o gene *FLT3/ITD*, há o aviso que os *primers* utilizados na reação poderiam anelar em outros alvos além da RefSeq (NG\_007066.1) utilizada na análise, entretanto estes são variantes do gene gerados pelo splicing alternativo (figura 2). Como as mutações no gene *FLT3* que estão sendo pesquisadas são do tipo ITD, ou seja, duplicações internas em tandem, o número de inserção de nucleotídeos pode variar bastante nos éxons 14 e 15. Para fins de análise *in silico*, foi pesquisada a região de anelamento dos *primers*, para se certificar que os éxons 14 e 15 fossem contemplados, como foi confirmado pelo software BLAST do NCBI (figura 2). Além disso, foi confirmado o percentual de identidade do fragmento amplificado conseguido com a reação para a uma sequência selvagem do gene *FLT3* (figura 5).

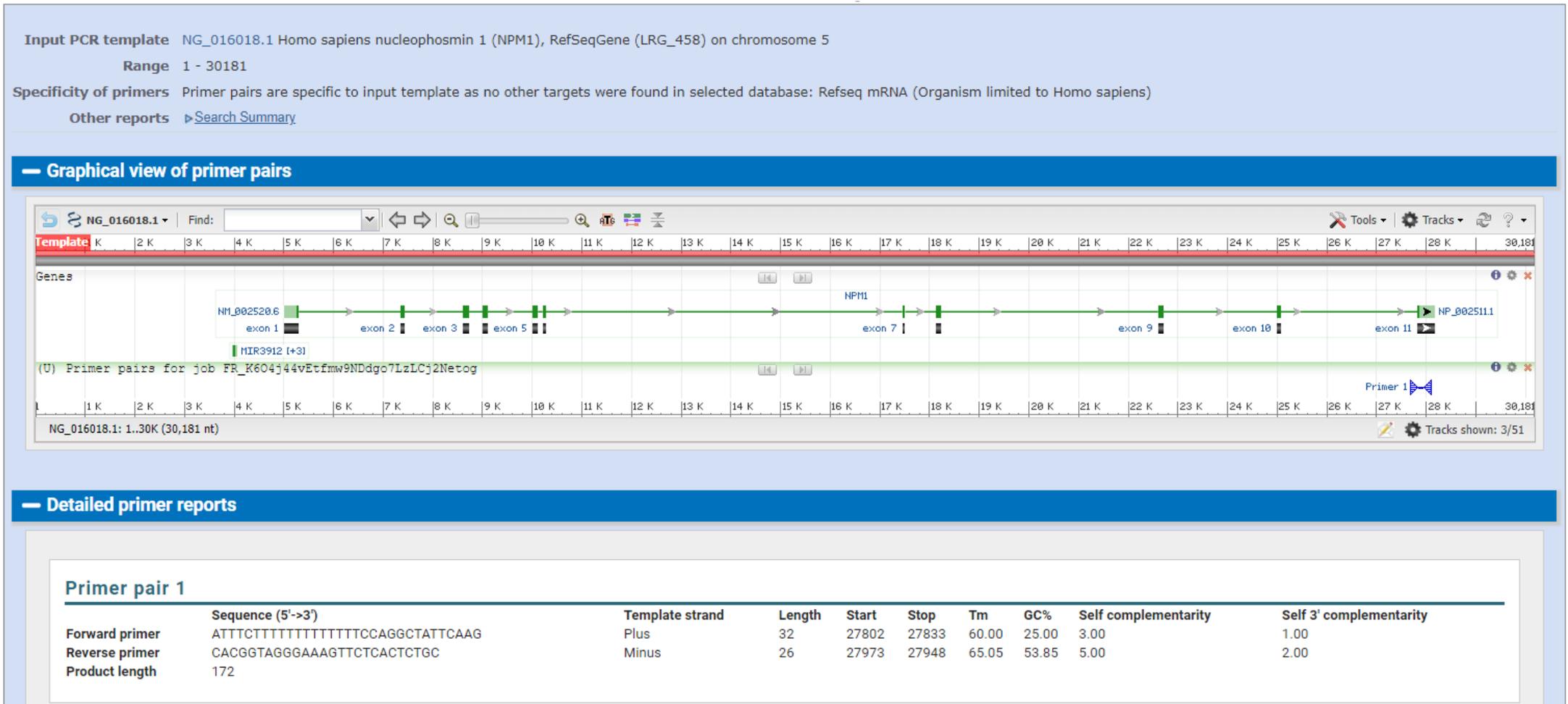
**Tabela 1.** Informações gerais dos *primers* que foram utilizados no teste multiplex na detecção de mutações nos genes *FLT3/ITD* e *NPM1*.

	<b>Sequência (5' -&gt; 3')</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>T melt (°C)</b>	<b>%GC</b>
<b><i>NPM1</i> Forward</b>	ATTCTTTTTTTTTTTTTTCCAGGCTATTCAAG	32	60,00	25,00
<b><i>NPM1</i> Reverse</b>	HEX - CACGGTAGGGAAAGTTCTCACTCTGC	26	65,05	53,85
<b><i>FLT3/ITD</i> Forward</b>	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	23	58,64	43,48
<b><i>FLT3/ITD</i> Reverse</b>	FAM - CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC	23	61,64	47,83

Legenda: pb, pares de base; T mel, temperatura de melting.

**Tabela 2.** Mutações com maior prevalência no gene *NPM1*, suas respectivas inserções nucleotídicas e os números de acesso no *GenBank* das sequências de referência (RefSeq).

<b>Tipo de mutação</b>	<b>Posição de inserção nucleotídica</b>	<b>RefSeq</b>
Sem mutação (selvagem)	-	NG_016018.1
Mutação tipo A	c. 860_863dupTCTG	AY740634
Mutação tipo B	c. 862_863insCATG	AY740635
Mutação tipo D	c. 863_864insCCTG	AY740637



**Figura 1.** Análise da especificidade dos *primers* utilizados para detecção de mutação no gene *NPM1* (RefSeq NG\_016018.1) no éxon 11

(software primer-BLAST do NCBI).

**Input PCR template** NG\_007066.1 Homo sapiens fms related receptor tyrosine kinase 3 (FLT3), RefSeqGene (LRG\_457) on chromosome 13  
**Range** 71162 - 77391

**Specificity of primers** Primers may **not** be specific to the input PCR template as targets were found in selected database:RefSeq Representative Genome Database (Organism limited to Homo sapiens)...[help on specific primers](#)

**Other reports** [▶ Search Summary](#)

---

**Graphical view of primer pairs**

**Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
<b>Forward primer</b>	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	Plus	23	71354	71376	58.64	43.48	4.00	2.00
<b>Reverse primer</b>	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC	Minus	23	71682	71660	61.64	47.83	6.00	2.00
<b>Product length</b>	329								

**Products on potentially unintended templates**

>NC\_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 329

Features associated with this product:

receptor-type tyrosine-protein kinase flt3 isoform x3

receptor-type tyrosine-protein kinase flt3 isoform x2

Forward primer	1	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	23
Template	28034215	.....	28034193
Reverse primer	1	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC	23
Template	28033887	.....	28033909

**Figura 2.** Análise da especificidade dos *primers* utilizados para detecção de mutação no gene *FLT3/ITD* (RefSeq NG\_007066.1) nos éxons 14 e 15 (*software* primer-BLAST do NCBI).

FASTA ▾

Send to: ▾

**(A) Homo sapiens nucleophosmin 1 (NPM1), RefSeqGene (LRG\_458) on chromosome 5**

NCBI Reference Sequence: NG\_016018.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NG_016018.1:27802-27980 Homo sapiens nucleophosmin 1 (NPM1), RefSeqGene (LRG_458) on
chromosome 5
ATTTCTTTTTTTTTTCCAGGCTATTCAAGATCTCTGGCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAGT
TTAAACAATTTGTTAAAAAATTTCCGTCTTATTTCAATTTCTGTAACAGTTGATATCTGGCTGTCCCTTT
TATAATGCAGAGTGAGAACTTTCCCTACCGTGTGATA
```

**(B) Homo sapiens fms related receptor tyrosine kinase 3 (FLT3), RefSeqGene (LRG\_457) on chromosome 13**

NCBI Reference Sequence: NG\_007066.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NG_007066.1:71354-71682 Homo sapiens fms related receptor tyrosine kinase 3 (FLT3),
RefSeqGene (LRG_457) on chromosome 13
GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATGGTACAGGTGACCGGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTAC
GTTGATTTTCAGAGAATATGAATATGATCTCAAATGGGAGTTTCCAAGAGAAAAATTTAGAGTTTGGTAAGA
ATGGAATGTGCCAAATGTTTCTGCAGCATTTCTTTCCATTGGAAAAATCTTTAAAAATGCACGTAATCACC
ATTTGTCTTTGCAGGGAAGGTAAGGATCAGGTGCTTTTGGAAAAGTGATGAACGCAACAGCTTATGGA
ATTAGCAAACAGGAGTCTCAATCCAGGTTGCCGTCAAATGCTGAAAG
```

**Figura 3.** (A) Sequência de nucleotídeos do fragmento amplificado obtida a partir do alinhamento do par de *primer* utilizado no gene *NPM1*. (B) Sequência de nucleotídeos do fragmento amplificado obtida a partir do alinhamento do par de *primer* utilizado no gene *FLT3*. (software *GenBank* do NCBI).



(A)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens nucleophosmin 1 (NPM1), RefSeqGene (LRG_458) on chromosome 5</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	324	324	100%	1e-91	100.00%	30181	<a href="#">NG_016018.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens nucleophosmin (NPM1) mRNA, complete cds</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	276	276	88%	7e-77	97.55%	1092	<a href="#">AY740637.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens nucleophosmin (NPM1) mRNA, complete cds</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	276	276	88%	7e-77	97.55%	1092	<a href="#">AY740635.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens nucleophosmin (NPM1) mRNA, NPM1-A allele, complete cds</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	276	276	88%	7e-77	97.55%	1092	<a href="#">AY740634.1</a>

### Homo sapiens nucleophosmin 1 (NPM1), RefSeqGene (LRG\_458) on chromosome 5

(B) Sequence ID: [NG\\_016018.1](#) Length: 30181 Number of Matches: 1

Range 1: 27802 to 27980 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
324 bits(358)	1e-91	179/179(100%)	0/179(0%)	Plus/Plus
Query 27802	ATTTCTTTTTTTTTTTTTCCAGGCTATTCAAGATCTCTGGCAGTGGAGGAAGTCTCTTTA	27861		
Sbjct 27802	ATTTCTTTTTTTTTTTTTCCAGGCTATTCAAGATCTCTGGCAGTGGAGGAAGTCTCTTTA	27861		
Query 27862	AGAAAAATAGTTTAAACAATTTGTTAAAAAATTTCCGTCCTATTTCATTTCTGTAACAGT	27921		
Sbjct 27862	AGAAAAATAGTTTAAACAATTTGTTAAAAAATTTCCGTCCTATTTCATTTCTGTAACAGT	27921		
Query 27922	TGATATCTGGCTGCTCTTTTATAATGCAGAGTGAGAACTTCCCTACCGTGTGTTGATA	27980		
Sbjct 27922	TGATATCTGGCTGCTCTTTTATAATGCAGAGTGAGAACTTCCCTACCGTGTGTTGATA	27980		

(C) Homo sapiens nucleophosmin (NPM1) mRNA, NPM1-A allele, complete cds

Sequence ID: [AY740634.1](#) Length: 1092 Number of Matches: 1

Range 1: 917 to 1079 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
276 bits(305)	7e-77	159/163(98%)	4/163(2%)	Plus/Plus
Query 27822	AGGCTATTCAAGATCTCTG----SCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAGTTTAAAC	27877		
Sbjct 917	AGGCTATTCAAGATCTCTGCTGSCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAGTTTAAAC	976		
Query 27878	AATTTGTTAAAAAATTTCCGTCCTATTTCATTTCTGTAACAGTTGATATCTGGCTGTCC	27937		
Sbjct 977	AATTTGTTAAAAAATTTCCGTCCTATTTCATTTCTGTAACAGTTGATATCTGGCTGTCC	1036		
Query 27938	TTTTTATAATGCAGAGTGAGAACTTCCCTACCGTGTGTTGATA	27980		
Sbjct 1037	TTTTTATAATGCAGAGTGAGAACTTCCCTACCGTGTGTTGATA	1079		

(D) Homo sapiens nucleophosmin (NPM1) mRNA, complete cds

Sequence ID: [AY740635.1](#) Length: 1092 Number of Matches: 1

Range 1: 917 to 1079 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
276 bits(305)	7e-77	159/163(98%)	4/163(2%)	Plus/Plus
Query 27822	AGGCTATTCAAGATCTCTG----SCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAGTTTAAAC	27877		
Sbjct 917	AGGCTATTCAAGATCTCTGCATGSCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAGTTTAAAC	976		
Query 27878	AATTTGTTAAAAAATTTCCGTCCTATTTCATTTCTGTAACAGTTGATATCTGGCTGTCC	27937		
Sbjct 977	AATTTGTTAAAAAATTTCCGTCCTATTTCATTTCTGTAACAGTTGATATCTGGCTGTCC	1036		
Query 27938	TTTTTATAATGCAGAGTGAGAACTTCCCTACCGTGTGTTGATA	27980		
Sbjct 1037	TTTTTATAATGCAGAGTGAGAACTTCCCTACCGTGTGTTGATA	1079		

(E) Homo sapiens nucleophosmin (NPM1) mRNA, complete cds

Sequence ID: [AY740637.1](#) Length: 1092 Number of Matches: 1

Range 1: 917 to 1079 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
276 bits(305)	7e-77	159/163(98%)	4/163(2%)	Plus/Plus
Query 27822	AGGCTATTCAAGATCTCTG----SCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAGTTTAAAC	27877		
Sbjct 917	AGGCTATTCAAGATCTCTGCTGSCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAAATAGTTTAAAC	976		
Query 27878	AATTTGTTAAAAAATTTCCGTCCTATTTCATTTCTGTAACAGTTGATATCTGGCTGTCC	27937		
Sbjct 977	AATTTGTTAAAAAATTTCCGTCCTATTTCATTTCTGTAACAGTTGATATCTGGCTGTCC	1036		
Query 27938	TTTTTATAATGCAGAGTGAGAACTTCCCTACCGTGTGTTGATA	27980		
Sbjct 1037	TTTTTATAATGCAGAGTGAGAACTTCCCTACCGTGTGTTGATA	1079		

Figura 4. (A) Informações gerais do alinhamento do fragmento amplificado (*query*) com as

diferentes sequências de mutações no gene *NPM1* (*subject*). **(B)** Alinhamento do fragmento amplificado frente a uma sequência selvagem *NPM1*, com percentual de identidade de 100%. **(C)** Alinhamento do fragmento amplificado frente a uma mutação do tipo A para o gene *NPM1*, com percentual de identidade de 98%, sendo 2% referente ao *gap* da inserção dos 4 pares de bases (TCTG). **(D)** Alinhamento do fragmento amplificado frente a uma mutação do tipo B para o gene *NPM1*, com percentual de identidade de 98%, sendo 2% referente ao *gap* da inserção dos 4 pares de bases (CATG). **(E)** Alinhamento do fragmento amplificado frente a uma mutação do tipo D para o gene *NPM1*, com percentual de identidade de 98%, sendo 2% referente ao *gap* da inserção dos 4 pares de bases (CCTG).

**(A)**

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens fms related receptor tyrosine kinase 3 (FLT3), RefSeqGene (LRG_457) on chromosome 13	Homo sapiens	608	608	100%	2e-171	100.00%	104953	NG_007066.1

### Homo sapiens fms related receptor tyrosine kinase 3 (FLT3), RefSeqGene (LRG\_457) on chromosome 13

Sequence ID: [NG\\_007066.1](#) Length: 104953 Number of Matches: 1

Range 1: 71354 to 71682 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
608 bits(329)	2e-171	329/329(100%)	0/329(0%)	Plus/Plus
Query 71354	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATGGTACAGGTGACCGGCTCCTCAGATAATGA			71413
Sbjct 71354	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATGGTACAGGTGACCGGCTCCTCAGATAATGA			71413
Query 71414	GTACTTCTACGTTGATTTT CAGAGAATATGAATATGATCTCAAATGGGAGTTTCCAAGAGA			71473
Sbjct 71414	GTACTTCTACGTTGATTTT CAGAGAATATGAATATGATCTCAAATGGGAGTTTCCAAGAGA			71473
Query 71474	AAATTTAGAGTTTGGTAAGAATGGAATGTGCCAAATGTTTCTGCAGCATTCTTTTCCAT			71533
Sbjct 71474	AAATTTAGAGTTTGGTAAGAATGGAATGTGCCAAATGTTTCTGCAGCATTCTTTTCCAT			71533
Query 71534	TGGAAAATCTTTAAAATGCACGTACTCACCATTTGTCTTTGCAGGGAAGGTACTAGGATC			71593
Sbjct 71534	TGGAAAATCTTTAAAATGCACGTACTCACCATTTGTCTTTGCAGGGAAGGTACTAGGATC			71593
Query 71594	AGGTGCTTTTGGAAAAGTGATGAACGCAACAGCTTATGGAATTAGCAAAACAGGAGTCTC			71653
Sbjct 71594	AGGTGCTTTTGGAAAAGTGATGAACGCAACAGCTTATGGAATTAGCAAAACAGGAGTCTC			71653
Query 71654	AATCCAGGTTGCCGTCAAAATGCTGAAAG			71682
Sbjct 71654	AATCCAGGTTGCCGTCAAAATGCTGAAAG			71682

**Figura 5. (A)** Informações gerais do alinhamento do fragmento amplificado (*query*) com a sequência de maior percentual de identidade. **(B)** Alinhamento do fragmento amplificado gerado com o par de *primers* para éxon 14 e 15 do gene *FLT3* frente à sequência selvagem, com percentual de identidade de 100%.

### 4.2.3. Conclusão

Diante dos resultados apresentados nos testes de validação, é concedido parecer **favorável** à implementação do teste "Detecção das mutações nos genes *FLT3/ITD* e *NPM1* por PCR multiplex e análise de fragmentos" na rotina assistencial do laboratório.

## 5. Considerações finais

A detecção das mutações nos genes *NPM1* e *FLT3/ITD* através da reação de PCR multiplex e análise de fragmentos se mostrou uma ferramenta importante para diagnóstico e, conseqüentemente, prognóstico de pacientes com LMA, visto que é considerada uma análise mínima para decisão de tratamento. A validação desta técnica mostrou-se 100% de concordância com os resultados obtidos quando comparados com a técnica singleplex (teste de referência).

O intuito com a elaboração deste trabalho foi viabilizar e implementar na rotina laboratorial assistencial uma técnica simples, rápida e de baixo custo com equipamentos do parque tecnológico que a instituição possui. Além disso, outro objetivo foi iniciar a ampliação do menu de exames moleculares a serem disponibilizados no serviço de diagnóstico laboratorial na área onco-hematológica, visto que há uma necessidade de técnicas que identifiquem essas e outras alterações moleculares que sejam potenciais alvos terapêuticos.

A partir deste estudo, fica a possibilidade de implementação do exame “Detecção de mutações nos genes *NPM1* e *FLT3/ITD*” no Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SDLab/HCPA) através da validação da técnica aqui realizada.

## 6. Referências

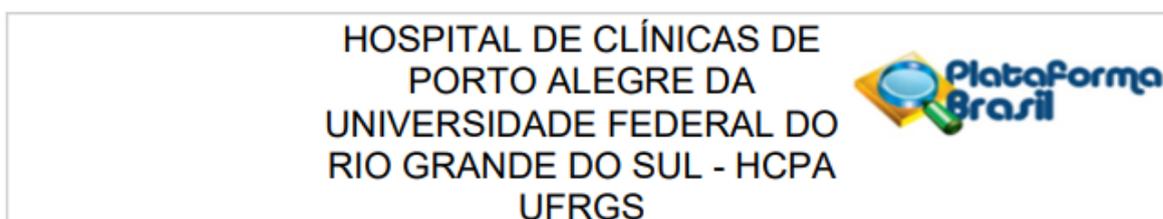
- AITKEN, M. et al. Prognostic and therapeutic implications of measurable residual disease in acute myeloid leukemia. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 14, n. 1, p. 137, 2021.
- BELL, J. A. et al. Effectiveness and Safety of Therapeutic Regimens for Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Literature Review. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**, v. 18, n. 7, p. 303–314, 2018.
- BLOOMFIELD, C. D. et al. Time to repeal and replace response criteria for acute myeloid leukemia? **Blood Reviews**, v. 32, n. 5, p. 416–425, 2018.
- BRODSKÁ, B.; ŠAŠINKOVÁ, M.; KUŽELOVÁ, K. Nucleophosmin in leukemia: Consequences of anchor loss. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 111, p. 52–62, 2019.
- CARRERA, P. M.; KANTARJIAN, H. M.; BLINDER, V. S. The Financial Burden and Distress of Patients with Cancer: Understanding and Stepping-Up Action on the Financial Toxicity of Cancer Treatment. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 2, p. 153–165, 2018.
- ECKARDT, J.-N. et al. Application of machine learning in the management of acute myeloid leukemia: current practice and future prospects. **Blood Advances**, v. 4, n. 23, p. 6077–6085, 2020.
- EL ACHI, H.; KANAGAL-SHAMANNA, R. Biomarkers in Acute Myeloid Leukemia: Leveraging Next Generation Sequencing Data for Optimal Therapeutic Strategies. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 748250, 2021.
- EL CHAER, F.; HOURIGAN, C. S.; ZEIDAN, A. M. How I treat AML incorporating the updated classifications and guidelines. **Blood**, v. 141, n. 23, p. 2813–2823, 2023.
- EL SALLOUKH, N. A. et al. Early Ophthalmological Manifestations of Acute Myeloid Leukemia: Current Perspectives. **Clinical Ophthalmology**, v. 16, p. 2119–2127, 2022.
- EMADI, A.; LAW, J. **Leucemia mieloide aguda (LMA) - Hematologia e oncologia**. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/hematologia-e-oncologia/leucemia/leucemia-mieloide-aguda-lma>>. Acesso em: 10 out. 2022.
- ESTEY, E. H. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 10, p. 1267–1291, 2018.
- FALINI, B. et al. NPM1-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside. **Blood**, v. 136, n. 15, p. 1707–1721, 2020.
- FORGHIERI, F. et al. Minimal/Measurable Residual Disease Monitoring in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Clinical Viewpoint and Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. E3492, 2018.
- HAFERLACH, T.; SCHMIDTS, I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 188, n. 1, p. 36–48, 2020.
- HORIBATA, S. et al. The Evolving AML Genomic Landscape: Therapeutic Implications. **Current Cancer Drug Targets**, v. 20, n. 7, p. 532–544, 2020.

- HOU, H.-A.; TIEN, H.-F. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 81, 2020.
- HUANG, Q. et al. A rapid, one step assay for simultaneous detection of FLT3/ITD and NPM1 mutations in AML with normal cytogenetics. **British Journal of Haematology**, v. 142, n. 3, p. 489–492, 2008.
- KANTARJIAN, H. et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. **Blood Cancer Journal**, v. 11, n. 2, p. 41, 2021.
- KAYSER, S.; LEVIS, M. J. Clinical implications of molecular markers in acute myeloid leukemia. **European Journal of Haematology**, v. 102, n. 1, p. 20–35, 2019.
- KHOURY, J. D. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703–1719, 2022.
- KULSOOM, B. et al. Recent advances in diagnostic and prognostic aspects of acute myeloid leukaemia. **The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 67, n. 10, p. 1580–1587, 2017.
- LICÍNIO, M. A.; SILVA, M. C. S. DA. Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda - Classificação da Organização Mundial de Saúde 2008. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6, p. 476–481, 2010.
- MARANDO, L.; HUNTLY, B. J. P. Molecular Landscape of Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications. **Current Oncology Reports**, v. 22, n. 6, p. 61, 2020.
- MENCIA-TRINCHANT, N. et al. Minimal Residual Disease Monitoring of Acute Myeloid Leukemia by Massively Multiplex Digital PCR in Patients with NPM1 Mutations. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 4, p. 537–548, 2017.
- NITIKA; WEI, J.; HUI, A.-M. Role of Biomarkers in FLT3 AML. **Cancers**, v. 14, n. 5, p. 1164, 2022.
- OWATTANAPANICH, W. et al. Efficacy and Toxicity of Idarubicin Versus High-dose Daunorubicin for Induction Chemotherapy in Adult Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**, v. 18, n. 12, p. 814–821, 2018.
- PALMIERI, R. et al. Therapeutic Choice in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Matter of Fitness. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. 120, 2020.
- PANUZZO, C. et al. Revealing the Mysteries of Acute Myeloid Leukemia: From Quantitative PCR through Next-Generation Sequencing and Systemic Metabolomic Profiling. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 3, p. 483, 2022.
- PELCOVITS, A.; NIROULA, R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. **Rhode Island Medical Journal (2013)**, v. 103, n. 3, p. 38–40, 2020.
- POLLYEA, D. A. et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 21, n. 5, p. 503–513, 2023.
- POZDNYAKOVA, O. NPM1: not present? Mark! **Blood**, v. 138, n. 25, p. 2602–2603, 2021.
- QIN, D. Molecular testing for acute myeloid leukemia. **Cancer Biology & Medicine**, v. 19, n. 1, p. 4–13, 2021.
- QUISPE, R. A. et al. Oral manifestations of leukemia as part of early diagnosis. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, n. 3, p. 392–401, 2022.
- RIBEIRO, S.; EIRING, A. M.; KHORASHAD, J. S. Genomic Abnormalities as Biomarkers and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. **Cancers**, v. 13, n. 20, p. 5055, 2021.

- SCHNITTGER, S. et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. **Blood**, v. 114, n. 11, p. 2220–2231, 2009.
- SHAHAB, S.; SHAMSI, T. S.; AHMED, N. Prognostic involvement of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v. 14, n. 10, p. 5615–5620, 2013.
- SHIMONY, S.; STAHL, M.; STONE, R. M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, v. 98, n. 3, p. 502–526, 2023.
- TALATI, C.; SWEET, K. Recently approved therapies in acute myeloid leukemia: A complex treatment landscape. **Leukemia Research**, v. 73, p. 58–66, 2018.
- VELLOSO, E. D. R. P. et al. Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 2, p. 184–189, 2011.
- WANG, E. **Acute Myeloid Leukemia in Adults**. Disponível em: <<https://www.lls.org/publications>>. Acesso em: 10 out. 2022.
- ZARKA, J. et al. Nucleophosmin 1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. **Genes**, v. 11, n. 6, p. 649, 2020.

## 7. Anexos

### Anexo I - Parecer Consubstanciado do CEP (Plataforma Brasil)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Padronização de técnica molecular para detecção simultânea das mutações nos genes da Nucleofosmina (NPM1) e do Fms-Like Tirosina Quinase-3 (FLT3/ITD) em pacientes com leucemia mieloide aguda através da técnica de PCR multiplex e eletroforese capilar.

**Pesquisador:** EDUARDO WANDAME GOMEZ

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 63728122.4.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.697.284

##### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo do projeto e das Informações Básicas da Pesquisa "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_\_DO\_PROJETO\_2018529", de 27/09/2022.

Projeto: Padronização de técnica molecular para detecção simultânea das mutações nos genes da Nucleofosmina (NPM1) e do Fms-Like Tirosina Quinase-3 (FLT3/ITD) em pacientes com leucemia mieloide aguda através da técnica de PCR multiplex e eletroforese capilar.

Leucemia mielóide aguda (LMA) é um câncer maligno de caráter heterogêneo. Sua classificação, atualmente, baseia-se quanto às alterações citogenéticas, moleculares e imunofenotipagem, porém a sua estratificação é, principalmente, pelas alterações citogenéticas. Entretanto, cerca de 45% dos pacientes com

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.697.284

categorização através de grupos de riscos. O presente projeto visa implementar no Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a detecção das mutações nos genes NPM1 e FLT3/ITD através das técnicas reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex e eletroforese capilar. Para isto, será realizada a padronização da técnica assim como a sua validação através dos seguintes testes: sensibilidade analítica, que será verificada pelo limite de detecção; precisão do teste, que será verificado quanto a sua repetibilidade e reprodutibilidade; veracidade que será avaliada pelo índice de concordância; especificidade in silico, que irá analisar as sequências de primers em relação à sequência alvo através da ferramenta BLAST. Ao implementar este exame na rotina, uma assistência mais abrangente será composta, contribuindo no manejo do paciente com LMA na correta estratificação do seu prognóstico.

Serão utilizadas, para padronização e validação da técnica na detecção da mutação do gene NPM1, 20 amostras padrão obtidas a partir do programa de controle externo de qualidade. Além destas, também serão utilizadas, para o ensaio PCR multiplex, 20 amostras de descarte previamente positivas para mutação do gene FLT3/ITD (SDLab). Para validação, serão utilizadas 35 amostras. Sendo assim, não serão realizadas novas coletas de amostras exclusivamente para a realização do presente estudo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo geral

Realizar a validação da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex e eletroforese capilar para detecção das mutações dos genes NPM1 e FLT3/ITD em pacientes com LMA do HCPA.

Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de PCR para detecção da mutação do gene NPM1;
- Realizar a padronização da análise de fragmento do amplificado através da técnica de eletroforese capilar para avaliação da presença de mutação do gene NPM1;
- Estabelecer um protocolo da técnica para detecção da mutação dos genes NPM1 e FLT3/ITD - este último já realizado no SDLab de Biologia Molecular do HCPA - através de uma reação de PCR multiplex;
- Estabelecer sensibilidade, precisão, veracidade e especificidade analítica para posterior

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.697.284

implementação do ensaio no SDLab do HCPA;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

O presente trabalho acarreta riscos ainda desconhecidos. Será utilizado material biológico de descarte da rotina do SDLab e do programa de qualidade externo. Devido a isso, não serão necessárias novas coletas de amostras. O potencial risco envolvido neste projeto é a quebra de confidencialidade.

**Benefícios:**

A detecção da mutação do gene NPM1, além da mutação do gene FLT3/ITD, contribui para um melhor prognóstico do paciente e na tomada de decisão clínica em relação às abordagens terapêuticas. Sabe-se que esta doença possui anormalidades genéticas diversas e variada resposta ao tratamento. A investigação de mutações em pacientes com esta patologia pode vir a ser determinante para a estratificação do prognóstico, pois auxiliará na previsão do tratamento e na sobrevida livre da doença. Para o SDLab localizado no HCPA, será mais um exame que ficará disponibilizado para a área de onco-hematologia, compondo uma assistência mais completa aos pacientes com LMA, além de otimizar a rotina do laboratório com a técnica PCR multiplex, onde duas mutações serão detectadas simultaneamente na mesma técnica, não havendo a necessidade de realizá-las separadamente.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A questão de pesquisa a ser respondida é se a padronização e a implementação da detecção da mutação no gene NPM1 no mesmo teste FLT3/ITD são possíveis de serem realizadas na rotina do laboratório de Microbiologia, setor de Biologia Molecular do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Para isto, será realizado um delineamento experimental. Para padronização da técnica, 40 amostras (sangue total ou medula óssea) serão utilizadas, sendo 20 amostras a partir do controle externo de qualidade (para NPM1) e 20 amostras de descarte (para FLT3/ITD). Dessas 40 amostras, 35 serão utilizadas para validação do método. A técnica utilizada será PCR multiplex com posterior análise de fragmentos por eletroforese capilar. O projeto será desenvolvido no Serviço de

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.697.284

no setor de Biologia Molecular, com suporte da Unidade de Pesquisa Laboratorial.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os autores solicitam dispensa do TCLE com a seguinte justificativa:

Para padronização da técnica, serão analisadas somente amostras de descarte e sintéticas positivas na detecção da mutação do gene NPM1; para reação de PCR multiplex, também serão utilizadas amostras positivas de descarte e sintéticas para a mutação no gene FLT3/ITD. Com isso, não se faz necessário a utilização dos dados do prontuário do paciente, assim como não se prevê coleta adicional de material biológico, já que será utilizado o mesmo material de rotina de análise dos pacientes e banco de amostras de conveniência. Assim, entendemos não haver a necessidade da assinatura do "Termo de Consentimento Livre Esclarecido" (TCLE), pois os pacientes não estarão expostos a nenhum risco adicional além daqueles da rotina do serviço. Dessa forma, solicitamos a dispensa do TCLE em virtude de utilizarmos amostras de descarte que são conhecidamente positivas.

**Recomendações:**

Nada a recomendar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto apresenta condições de ser aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

- Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS N.º 466/2012 e na Norma Operacional CNS/Conep N.º 001/2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

- O projeto está aprovado para inclusão, revisão de registros ou uso de amostras biológicas de 40

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.697.284

- Eventos adversos deverão ser comunicados de acordo com as orientações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep (Carta Circular N.º 13/2020-CONEP/SECNS/MS). Os desvios de protocolo também deverão ser comunicados em relatórios consolidados, por meio de Notificação.

- Os projetos executados no HCPA somente poderão ser iniciados quando seu status no sistema AGHUse Pesquisa for alterado para "Aprovado", configurando a aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2018529.pdf	27/09/2022 16:09:20		Aceito
Folha de Rosto	FR_20220410.pdf	27/09/2022 16:08:53	ALESSANDRA HELENA DA SILVA HELLWIG	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Delegacao_de_Funcoes_2022_09_10_21_27.pdf	22/09/2022 15:25:52	EDUARDO WANDAME GOMEZ	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_TCR_NPM1_SUBMETIDO_.pdf	22/09/2022 15:22:34	EDUARDO WANDAME GOMEZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_TCR_NPM1_SUBMETIDO.pdf	22/09/2022 15:15:33	EDUARDO WANDAME GOMEZ	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4  
**Bairro:** Rio Branco **CEP:** 90.410-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Página 05 de 06

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.697.284

PORTO ALEGRE, 11 de Outubro de 2022

---

**Assinado por:**  
**Têmis Maria Félix**  
**(Coordenador(a))**

## Anexo II - Carta de aprovação pela Diretoria de Pesquisa



**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DIRETORIA DE PESQUISA**

**Carta de Aprovação**

**Projeto**

2022/0410

**Pesquisadores:**

**EDUARDO WANDAME GOMEZ**

ALESSANDRA HELENA DA SILVA  
HELLWIG

RODRIGO MINUTO PAIVA

DARIANE CASTRO PEREIRA

GRAZIELLE MOTTA RODRIGUES

**Número de Participantes:** 40

**Título:** Padronização de técnica molecular para detecção simultânea das mutações nos genes da Nucleofosmina (NPM1) e do Fms-Like Tirosina Quinase-3 (FLT3/ITD) em pacientes com leucemia mieloide aguda através da técnica de PCR multiplex e eletroforese capilar.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.