

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS AO
DIAGNÓSTICO E CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS
CLÍNICAS E LABORATORIAIS E EVOLUÇÃO EM
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

ANA FLÁVIA LEONARDI TIBÚRCIO RIBEIRO

Belo Horizonte

2014

ANA FLÁVIA LEONARDI TIBÚRCIO RIBEIRO

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS AO
DIAGNÓSTICO E CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS
CLÍNICAS E LABORATORIAIS E EVOLUÇÃO EM
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor.

Área de concentração: Patologia Geral.

Orientador: Profa. Silvana Maria Elói Santos.

Coorientador: Profa. Sandra Guerra Xavier
Prof. Ruud Delwel

Colaboradores: Evandro Maranhão Fagundes
Ana Beatriz Firmato Glória

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina – UFMG

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Jaime Arturo Ramírez

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Rodrigo Antonio de Paiva Duarte

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Sandhi Maria Barreto

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA: PATOLOGIA MÉDICA

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Prof. Wagner Luiz Tafuri

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PATOLOGIA

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Prof. Geovanni Dantas Cassali

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes

Prof. Pedro Guatimosim Vidigal

Profa. Tatiane Alves da Paixão

Profa. Milene Alvarenga Rachid

Prof. Conrado de Oliveira Gamba

Pai e Mãe,
Vocês são meus maiores exemplos

Ao Daniel, Ana Clara e Juliano,
pelo carinho, beijinhos e abraços.

AGRADECIMENTOS

Minha admiração e respeito aos Professores Silvana Maria Elói Santos, Sandra Guerra Xavier e Ruud Delwel pelos ensinamentos, orientação segura, paciência e disponibilidade dedicada em todas as horas.

Aos colaboradores, colegas e amigos Evandro Maranhão Fagundes e Ana Beatriz Firmato Glória pela disponibilidade e perseverança ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Aos queridos Claudia Erpelinck-Verschueren, Marta Pratorcorona, Saman Abbas e Davine Hofste Op Bruinink pela amizade, confiança, carinho, generosidade e pelos lindos momentos que trouxeram harmonia e diversão ao período em que vivi na Holanda. Minha admiração por vocês é eterna. Ao Peter Valk e toda a equipe do Departamento de Hematologia da *Erasmus University Medical Center*, Rotterdam, que proporcionaram as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Professor Henrique Bitterncourt por ter intermediado o contato com Departamento de Hematologia da *Erasmus University Medical Center*, Rotterdam. Ao Professor Eduardo Rego do Serviço de Hematologia da USP, Ribeirão Preto, pela compreensão e colaboração ao longo do desenvolvimento de outros projetos.

À Professa Suely Meireles pela colaboração ao longo do desenvolvimento do projeto.

À colega Mariana Benício pelo apoio e amizade e Juliana Godoy Assumpção e Nathália Gomide pela ajuda na execução do projeto.

À Equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte, Francisco Danilo Ferreira Paula e Valéria Cristina Câmara, pelo carinho e atenção com que sempre me atenderam. Aos alunos Diego Peixoto e Fabrício Braga pela ajuda na coleta dos dados clínicos.

À Dra. Cybele de Andrade Paes pela amizade e assistência com o processamento de amostras dos pacientes. À Dra. Mitiko Murao pela análise e revisão das amostras dos pacientes, por citometria de fluxo.

Ao Professor Enrico Antônio Colosimo pela orientação estatística.

Ao meu Daniel, por tudo o que ele representa, pelo carinho e incentivo demonstrados ao longo das inúmeras jornadas na vida. Aos meus filhos Ana Clara e Juliano por trazer brilho, poesia e gargalhadas ao meu mundo.

A toda a família Leonardi Tibúrcio, pelo apoio, amizade, cumplicidade e por estarem sempre e incondicionalmente ao meu lado.

À Família Dias Ribeiro, por me deixarem fazer parte de sua história.

À minha mãe, pela presença constante, encorajadora e generosa. Ao meu pai, pelo exemplo de dedicação e sabedoria.

A todos aqueles que, embora não tenham sido citados, contribuíram direta ou indiretamente nas várias etapas deste trabalho.

“Basta-me um pequeno gesto,
feito de longe e de leve,
para que venhas comigo
e eu para sempre te leve....

“Cecília Meireles”.

RESUMO 1

A prevalência e o prognóstico das mutações no gene do *DNMT3A* e sua interação com outros marcadores moleculares foi avaliado em 415 pacientes adultos com leucemia mieloide aguda (LMA) e idade inferior a 60 anos, quanto ao seu valor prognóstico. Identificou-se 96 mutações no *DNMT3A* em 415 portadores de LMA (23.1%) estudados. A análise de regressão univariada de Cox mostrou que os pacientes com *DNMT3A*^{mut} apresentaram sobrevida global (SG; $P = 0.022$; hazard ratio [HR] = 1.38; 95% intervalo de confiança [IC], 1.04-1.81) e sobrevida livre de recidiva (SLR; $P = 0.005$; HR = 1.52; 95% IC, 1.13-2.05) inferiores quando comparado aos pacientes sem a mutação nesse gene (*DNMT3A*^{wild-type}). Em uma análise multivariada, as mutações no *DNMT3A* apresentaram valor prognóstico independente desfavorável para SG ($P = 0.003$; HR = 1.82; 95% IC, 1.2-2.7) e SLR ($P < 0.001$; HR = 2.2; 95% IC, 1.4-3.3). Na análise do subgrupo citogenético de risco intermediário sem mutações no gene *NPM1* ou *FLT3-ITD* (*NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type}), esta associação foi particularmente evidente (SG: $P = 0.013$; HR = 2.09; 95% IC, 1.16-3.77; SLR: $P = 0.001$; HR = 2.65; 95% IC, 1.48-4.89). O efeito das mutações no *DNMT3A* em portadores de LMA permanece indefinido já que as LMA que apresentaram a mutação no gene do *DNMT3A* não expressaram um padrão no perfil de metilação ou de expressão gênica que as discrimine de pacientes com *DNMT3A*^{wild-type}. Conclui-se que o *status* da mutação no gene *DNMT3A* é fator importante a ser considerado para estratificação de risco de portadores de LMA.

ABSTRACT 1

The prevalence, the prognostic effect, and interaction with other molecular markers of *DNMT3A* mutations were studied in 415 adults patients with acute myeloid leukemia (AML) younger than 60 years, regarding its prognostic value. We showed mutations in *DNMT3A* in 96 of 415 patients with newly diagnosed AML (23.1%). Univariate Cox regression analysis showed that patients with *DNMT3A*^{mut} AML show significantly worse overall survival (OS; $P = 0.022$; hazard ratio [HR] = 1.38; 95% confidence interval [CI], 1.04-1.81), and relapse-free survival (RFS; $P = 0.005$; HR = 1.52; 95% CI, 1.13-2.05) than *DNMT3A*^{wild-type} AMLs. In a multivariable analysis, *DNMT3A* mutations express independent unfavorable prognostic value for OS ($P = 0.003$; HR = 1.82; 95% CI, 1.2-2.7) and RFS ($P < 0.001$; HR = 2.2; 95% CI, 1.4-3.3). In a composite genotypic subset of cytogenetic intermediate-risk AML without *FLT3-ITD* and *NPM1* mutations, this association is particularly evident (OS: $P = 0.013$; HR = 2.09; 95% CI, 1.16-3.77; RFS: $P = 0.001$; HR = 2.65; 95% CI, 1.48-4.89). The effect of *DNMT3A* mutations in human AML remains elusive, because *DNMT3A*^{mut} AMLs did not express a methylation or gene expression signature that discriminates them from patients with *DNMT3A*^{wild-type} AML. We conclude that *DNMT3A* mutation status is an important factor to consider for risk stratification of patients with AML. *Blood*. 2012;119 (24):5824-5831

RESUMO 2

Os portadores de leucemia mieloide aguda (LMA) são classificados em grupos de risco de acordo com a presença de anomalias citogenéticas. No entanto, o advento de análises moleculares tem permitido a identificação de novos subtipos de LMA com prognósticos diferentes principalmente dentre as que apresentam cariótipo normal (CN-LMA).

Foram estudados retrospectivamente 149 adultos portadores de LMA (exceto leucemia promielocítica aguda), não selecionados por idade ou tipo de LMA (secundária ou *de novo*), consecutivamente, tratados em único centro de referência no Brasil, entre abril de 2004 até março de 2013, para caracterização molecular dos genes *NPM1*, *FLT3* e *IDH1* e suas associações com prognóstico.

Entre os 149 pacientes, a maioria (113/149; 75.8%) foi *de novo* LMA e a mediana de idade foi de 49 (18-84) anos. Identificou-se *NPM1*^{mut} em 31/144 (21.5%), *FLT3*-ITD em 20/144 (13.9%) e *IDH1*^{mut} em 7/114 (6.1%) pacientes analisados.

Entre 122/149 (81.9%) pacientes que receberam a quimioterapia com intenção de atingir a remissão completa (RC), o *status* dos genes *NPM1*, *FLT3*, ou *IDH1* por si só ou em combinação não se associaram com RC ($P = 0.267$; $P = 0.424$; $P = 0.464$; respectivamente) nem se correlacionaram com o achado de menos de 10% de blastos na medula óssea realizado precocemente após o tratamento de indução ($P = 0.077$; $P = 0.432$; $P = 0.379$; respectivamente). A Mutação no *NPM1* emergiu como fator independente de melhor prognóstico para sobrevida livre de recidiva (SLR; $P = 0.039$; HR = 0.318; 95% de Intervalo de Confiança [IC], 0.107-0.943) e sobrevida geral (SG; $P = 0.007$; HR = 0.474; 95% IC, 0.275-0.817), independente do *status* do *FLT3*. Nenhum dos pacientes com *FLT3*-ITD recaiu até o momento. Nenhuma diferença foi observada na SG em relação à presença da *FLT3*-ITD ($P = 0.313$) ou da mutação do *IDH1* ($P = 0.321$). Foram observadas diferenças na SG entre os subgrupos compostos, *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type}, *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD, *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type} e *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*-ITD ($P = 0.002$; HR = 1.526; 95% IC, 1.166-1.997). Observaram-se baixos índices de SLR (13.8 meses) e SG (3.6 meses), e reduzidas taxas de RC (42.1%) e mortalidade precoce (43.4%). A idade e a mutação no gene do *NPM1* se comportaram como fatores de risco independentes para SLR, quando considerou-se níveis de LDH e presença de CD34 nas células blásticas. Em relação à SG, idade, mutação no gene *NPM1* e presença de menos de 10% de blastos na medula óssea avaliada precocemente após o tratamento de indução apareceram como fatores de risco independentes quando considerou-se categorias de risco citogenéticas, *FLT3*-ITD, níveis de LDH e contagem de GL.

A frequência das mutações nos genes *NPM1* e *FLT3* demonstrada aqui foi menor que as apresentadas na literatura atual, já a no gene *IDH1* foi semelhante às relatadas nos grandes

coortes. Apesar das reduzidas taxa de RC, SG e SLR, a mutação no gene do *NPM1* emergiu como um fator prognóstico independente para SG e SLR superiores. Há necessidade crucial de se coletar dados epidemiológicos precisos sobre as LMA na América Latina e, portanto, realizar estudos maiores para fornecer análises comparativas das mutações genéticas e sobrevida dos pacientes.

ABSTRACT 2

Acute myeloid leukemia (AML) patients are categorized into risk groups according to cytogenetic abnormalities. Nevertheless, the advent of molecular tools has allowed the identification of new subtypes with different prognosis notably among those with normal karyotype AML (NK-AML).

We retrospectively studied 149 non-APL adult AML unselected by age, secondary or *de novo* AML patients consecutive treated in one reference center in Brazil between April 2004 till March 2013 to determine molecular characterization of *NPM1*, *FLT3* and *IDH1* genes and their associations with clinical outcomes. Among 149 patients, the majority (113/149; 75.8%) was *de novo* AML and median age was 49 (18-84) years. We identified *NPM1*^{mut} in 31/144 (21.5%), *FLT3*-ITD in 20/144 (13.9%) and *IDH1*^{mut} in 7/114 (6.1%) tested patients.

Among 122/149 (81.9%) patients who received chemotherapy with intention to achieve complete remission (CR), neither *NPM1*, *FLT3* nor *IDH1* status alone or in combination were associated with CR ($P = 0.267$; $P = 0.424$; $P = 0.464$, respectively) nor correlate with early bone marrow (BM) blast clearance using 10% blast cutoff ($P = 0.077$; $P = 0.432$; $P = 0.379$, respectively). *NPM1* mutation emerged as an independent prognostic factor for superior relapse-free survival (RFS; $P = 0.039$; Hazard Ratio [HR] = 0.318; 95% Confidence Interval [CI] = 0.107-0.943) and overall survival (OS; $P = 0.007$; HR = 0.474; 95%CI = 0.275-0.817), independent of *FLT3* status. None of *FLT3*-ITD patients relapsed so far. No difference in OS was observed regarding *FLT3* ($P = 0.313$) nor *IDH1* ($P = 0.321$) mutations status. Different OS were observed between composite subgroups *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type}, *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD, *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*-ITD and *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type} ($P = 0.002$; HR = 1.526; 95%CI = 1.166-1.997).

We report low RFS (13.8 months), OS (3.6 months), and CR (42.1%) and early death (43.4%) rates. RFS was affected by age and *NPM1* mutation as independent prognostic variables when we consider LDH serum levels and CD34 blast cells positivity. OS was affected by age, *NPM1* mutation status, and less than 10% blast cells in BM 15 days after induction as independent prognostic variables when we consider cytogenetic risk categories, *FLT3*-ITD and WBC count and LDH levels.

NPM1 and *FLT3*-ITD mutations frequency demonstrated here were lower than expected and *IDH1*^{mut} frequency was in accordance to literature. We reported low overall CR rate, short OS and RFS, but even so *NPM1* mutation emerged as an independent prognostic factor for superior OS and RFS. There is a crucial need to collect accurate epidemiologic AML data in Latin America and therefore conduct larger studies to provide gene mutations and survival comparative analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-HG	2-hidroxiglutarato
ABI-PRISM3100	Analizador genético da <i>Applied Biosystems</i>
AMLCG	Grupo Cooperativo Alemão de LMA (<i>German AML Cooperative Group</i>)
AML1	<i>Runt-related transcription factor 1</i> (RUNX1) ou <i>acute myeloid leukemia 1</i> protein (AML1) ou <i>core-binding factor subunit alpha-2</i> (CBFA2) é uma proteína de ligação codificada pelo gene <i>RUNX1</i>
AML1/ETO	Gene de fusão categorizados como LMA FAB-M2
APL	Leucemia promielocítica aguda
Ara-C	<i>cytosina arabinoside</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
cDNA	DNA complementar sintetizado a partir de um molde de RNA mensageiro
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
CEBPA ^{DM}	Gene do <i>CEBPA</i> com dupla mutação
CEBPA ^{UM}	Gene do <i>CEBPA</i> com mutação única
CEBPA ^{wild-type}	Gene do <i>CEBPA</i> sem mutação
CBFβ/SMMHC	Gene de fusão que codifica a proteína CBFβ-SMMHC
CN-LMA	Leucemia mielóide aguda com cariótipo normal
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COEP-UFMG	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
D15	Período entre 14 e 17 dias após início da quimioterapia de indução
D35	Trigésimo quinto dia após início da quimioterapia de indução
dATP	2'-desoxinucleotídeo de adenina-5'-trifosfato
dbSNP	Banco de dados referente aos polimorfismos de único nucleotídeo

<i>dCTP</i>	2'-desoxinucleotídeo de citosina-5'-trifosfato
<i>DEPC</i>	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
<i>dGTP</i>	2'-desoxinucleotídeo de guanina-5'-trifosfato
<i>DHPLC</i>	Desnaturação cromatográfica líquida de alta performance
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferases
DNMT1	DNA (Cytosine-5) Methyltransferase 1
DNMT3A	DNA (Cytosine-5) Methyltransferase 3 Alpha
<i>DNMT3A^{mut}</i>	Gene do <i>DNMT3A</i> mutado
<i>DNMT3A^{wild-type}</i>	Gene do <i>DNMT3A</i> sem mutação
DNMT3B	DNA (Cytosine-5) Methyltransferase 3 Beta
<i>dNTP</i>	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
<i>dNTP</i>	2'-desoxinucleosídeos-5'-trifosfatados tipos <i>dATP</i> , <i>dCTP</i> , <i>dGTP</i> e <i>dTTP</i>
DRM	Doença residual mínima
<i>dTTP</i>	2'-desoxinucleotídeo de timina-5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAB	Sistema Franco-Americano-Britânico
FAB-M0	Leucemia mielóide aguda com evidência mínima de diferenciação mielóide
FAB-M1	Leucemia mielóide aguda sem maturação
FAB-M2	Leucemia mielóide aguda com maturação de granulócitos
FAB-M3	Leucemia promielocítica aguda (<i>APL</i>)
FAB-M4	Leucemia mielomonocítica aguda

FAB-M5	Leucemia monoblástica aguda ou leucemia monocítica aguda
FAB-M6	Leucemia eritrocítica aguda
FAB-M7	Leucemia megacarioblástica aguda
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
<i>FLT3</i> -ITD	Duplicação interna em tandem do gene <i>FLT3</i>
<i>FLT3</i> -TDK	Domínio tirosina quinase no gene do <i>FLT3</i>
<i>FLT3</i> ^{wild-type}	Gene do <i>FLT3</i> sem a duplicação interna em tandem
GL	Global de leucócitos no sangue periférico
HC/UFGM	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
<i>HELP</i>	<i>HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR</i>
<i>Hidac</i>	Altas doses de Ara-C equivalente a 3g/m ² a cada 12 horas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
<i>HL60</i>	<i>Human promyelocytic leukemia cells</i> (tipo de linhagem celular)
<i>HOVON</i>	Grupo Cooperativo Holandês e Belga de Hematologia
<i>HOX</i>	<i>Homeobox</i> (grupo de genes que produzem fatores de transcrição)
<i>HOXB5</i>	<i>Homeobox protein Hox-B5</i>
<i>HR</i>	<i>Hazard ratio</i>
IC	Intervalo de confiança
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1
<i>IDH1</i> ^{mut}	Gene do <i>IDH1</i> mutado
IDH2	Isocitrato desidrogenase 2
<i>IDH2</i> ^{mut}	Gene do <i>IDH2</i> mutado
ITD	Duplicação interna em tandem

<i>K-RAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
µg	Micrograma (10 ⁻⁶ gramas)
mL	Mililitro (10 ⁻³ litros)
µL	Micro litro (10 ⁻⁶ litros)
<i>MLL</i> -PTD	Duplicação parcial no gene <i>MLL</i>
mM	Milimolar
MO	Medula óssea
<i>MRC</i>	<i>Medical Research Council</i>
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
não- <i>APL</i>	Todas as LMA exceto a leucemia promielocítica aguda
ng	Nanograma (10 ⁻⁹ gramas)
nm	Nanômetro (10 ⁻⁹ metros)
<i>NPM1</i>	<i>Nucleolar phosphoprotein B23, numatrin</i>
<i>NPM1</i> ^{mut}	Gene do <i>NPM1</i> mutado
<i>NPM1</i> ^{wild-type}	Gene do <i>NPM1</i> sem mutação
<i>N-RAS</i>	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
<i>NUP98/HOXA9</i>	Gene de fusão associado à LMA. O gene <i>NUP98</i> se funde ao <i>HOXA9</i> no cromossomo 7
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases nitrogenadas
<i>PBGD</i>	<i>Porphobilinogen deaminase</i>

PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PHD</i>	<i>Plant Homeo Domain</i>
pM	Picomol (10^{-12} moles)
<i>PML</i>	Gene de fusão da leucemina promielocítica
<i>PML/RARα</i>	Fusão do gene da leucemia promielocítica com gene do receptor alfa do ácido retinóico
<i>PWWP</i>	Domínio com núcleo composto de prolina-tryptofano-tryptofano-prolina
<i>RARA</i>	Gene do receptor alfa do ácido retinóico
RC	Remissão Completa
<i>RHG</i>	<i>Reverse hot Giemsa (RHG)-banding</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase reversa
<i>SEER</i>	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry</i>
SG	Sobrevida geral
<i>SKOV3</i>	<i>Sloan-Kettering HER2 3 + Ovarian Cancer</i> (tipo de linhagem celular)
SLR	Sobrevida livre de recidiva
SMD	Síndrome Mielodisplásica
<i>SNP</i>	Polimorfismo de único nucleotídeo
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TDK	Domínio tirosina quinase
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
TMO	Transplante de medula óssea
<i>TRM</i>	Mortalidade relacionada com o tratamento

U	Unidade
UV	Ultra-violeta
α -KG	α -cetogluturato

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sobrevida Geral em portadores de leucemia mielóide aguda e idade entre 16 e 59 anos de acordo com a classificação prognóstica de risco revisada proposta pelo grupo do <i>Medical Research Council</i>	27
Figura 2. Sobrevida Geral em portadores de leucemia mielóide aguda e idade entre 18 e 60 anos de acordo com a estratificação prognóstica de risco proposta pelo grupo do <i>LeukemiaNet</i>	29
Figura 3. O gene <i>NPM1</i> codifica uma proteína envolvida em várias funções.	31
Figura 4. Estrutura do receptor <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i> (FLT3) e as mutações encontradas em Leucemia Mielóide Aguda.	33
Figura 5. Organização dos domínios das DNA metiltransferases (DNMTs) em mamíferos. ...	35
Figura 6. Modelo ilustrativo da enzima DNMT3A e prováveis sítios de interações e mutações.	36
Figura 7. Reações químicas catalisadas pelas enzimas isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2, respectivamente) de tipo selvagem e mutadas.....	39
Figura 8. Camundongos LysM-ki apresentam esplenomegalia acentuada dependente da idade e diminuição da celularidade da medula óssea.	40
Figura 9. Etapas da patogênese da LMA.	43
Figura 10. Modelo de classificação prognóstico de Leucemia Mielóide Aguda baseado somente na análise das mutações.....	46
Figura 11. Mutações no gene do <i>DNMT3A</i> em portadores de leucemia mielóide aguda estudados.	59
Figura 12. Representação esquemática dos tipos e localizações das mutações no gene <i>DNMT3A</i>	60
Figura 13. Análise de sobrevida de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA), com ou sem mutações no <i>DNMT3A</i>	63
Figura 14. Análise de sobrevida de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA), com ou sem mutações no codon R882 do <i>DNMT3A</i>	65
Figura 15. Sobrevida global (SG) de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA), com ou sem mutações no <i>DNMT3A</i> em subgrupos genotípicos distintos.....	67
Figura 16. Sobrevida livre de recidiva (SLR) em subgrupos genotípicos específicos de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA), com ou sem mutações no <i>DNMT3A</i> , dentro do total de 415 pacientes com idade inferior a 60 anos, excluindo casos de <i>APLs/t(15;17)</i>	69
Figura 17. <i>Clustering</i> de amostras de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) de acordo com perfis de metilação com <i>HELP</i> e a distribuição das LMAs com <i>DNMT3A^{mut}</i> e <i>DNMT3A^{wild-type}</i>	71
Figura 18. <i>Clustering</i> de amostras de pacientes portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) com base no perfil de expressão gênica: a distribuição das LMAs com <i>DNMT3A^{mut}</i> e <i>DNMT3A^{wild-type}</i>	72
Figura 19. Expressão de <i>HOXB5</i> em genótipos compostos <i>DNMT3A/NPM1</i>	73
Figura 20. Fluxograma de inclusão e exclusão dos portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) estudados.	81
Figura 21. Análise de sobrevida global (SG) de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) quanto às características clínicas e laboratoriais.....	108
Figura 22. Análise de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de recidiva (SLR) de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) quanto às características clínicas e laboratoriais	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação prognóstica de risco revisada proposta pelo grupo do <i>Medical Research Council</i>	27
Tabela 2- Proposta de estratificação de risco do grupo <i>LeukemiaNet</i> associando citogenética e alterações moleculares nos genes <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> e <i>FLT3</i> em portadores de LMA	29
Tabela 3- Características clínicas dos 415 pacientes com LMA.....	61
Tabela 4- Análise multivariada do <i>DNMT3A</i> como fator prognóstico para sobrevida global e sobrevida livre de recidiva.....	64
Tabela 5- <i>DNMT3A</i> como um marcador de prognóstico para sobrevida global e sobrevida livre de recidiva em subconjuntos genotípicos distintos de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA).....	66
Tabela 6- Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR, RT-PCR e sequenciamento	88
Tabela 7- Características pré-tratamento dos portadores de leucemia mielóide aguda (LMA).....	94
Tabela 8. Características clínicas dos 27 portadores de leukemia mielóide aguda (LMA) eleitos para o tratamento paliativo.....	95
Tabela 9- Associação entre características pré-tratamento e o <i>status</i> de marcadores moleculares em 149 portadores de LMA	98
Tabela 10- Associação entre características pré-tratamento e o <i>status</i> de marcadores moleculares em 58 pacientes LMA e cariótipo normal	100
Tabela 11- Comparação entre o <i>status</i> da mutação nos genes <i>NPM1</i> , <i>FLT3</i> e <i>IDH1</i> entre LMA <i>de novo</i> e LMA secundária.....	101
Tabela 12- Comparação de características pré-tratamento de 122 portadores de LMA tratados com intenção de atingir a remissão completa (n = 122).....	104
Tabela 13- Análise Multivariada para Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Recidiva em 122 portadores de leucemia mielóide aguda tratados com intenção de atingir a remissão completa.	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1	Marcadores moleculares na LMA.....	30
2.1.1	<i>NPM1</i>	30
2.1.2	<i>FLT3</i>	32
2.1.3	<i>DNMT3A</i>	34
2.1.4	<i>IDH1</i>	38
2.2	Modelos Prognósticos.....	41
2.3	<i>Clearance</i> precoce de blastos na medula óssea	47
2.4	LDH	47
2.5	Justificativa	49
	PARTE 1	51
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivo geral	52
3.2	Objetivos específicos	52
4	MATERIAIS E MÉTODO	53
4.1	Tipo de estudo.....	53
4.2	População de estudo.....	53
4.2.1	Critérios de inclusão.....	54
4.2.2	Critérios de exclusão ou de não-inclusão	54
4.2.3	Variáveis em estudo	55
4.2.4	Definição de algumas variáveis em estudo	56
4.2.5	Desfechos do estudo.....	56
4.3	Metodologia	56
4.3.1	Amostras biológicas e análises das mutações	56
4.3.2	Pesquisa da mutação do gene <i>DNMT3A</i>	57
4.3.3	Perfis de expressão gênica e metilação	58
4.4	Estatística	58
5	RESULTADOS	59
5.1	A prevalência da mutação no <i>DNMT3A</i> em LMA.....	59
5.2	<i>DNMT3A</i> ^{mut} como marcador de prognóstico na LMA	62
5.3	Análises do <i>DNMT3A</i> ^{mut} e resposta ao tratamento no subgrupo <i>NPM1</i> ^{wild-type} / <i>FLT3</i> ^{wild-type} / <i>CEBPA</i> ^{wild-type} da LMA.....	65
5.4	Análises das mutações no <i>DNMT3A</i> em relação à metilação do DNA e expressão gênica na LMA.....	70
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÕES	77
	PARTE 2	78
8	OBJETIVOS	79
8.1	Objetivo geral	79
8.2	Objetivos específicos	79
9	MATERIAIS E MÉTODO	80
9.1	Tipo de estudo.....	80

9.2	População de estudo.....	80
9.2.1	Considerações éticas	82
9.2.2	Critérios de inclusão.....	83
9.2.3	Critérios de exclusão ou de não-inclusão	83
9.2.4	Variáveis em estudo	83
9.2.5	Definição de algumas variáveis em estudo	84
9.2.6	Desfechos do estudo.....	85
9.3	Metodologia	85
9.3.1	Amostras biológicas e testes moleculares	85
9.3.2	Mielograma e Cariótipo	90
9.4	Estatística	91
10	RESULTADOS	92
10.1	Características dos pacientes	92
10.2	A prevalência das mutações nos genes <i>IDH1</i> e <i>NPM1</i> e da <i>FLT3</i> -ITD e suas associações com características clínicas e laboratoriais.....	96
10.2.1	<i>IDH1</i>	96
10.2.2	<i>NPM1</i>	96
10.2.3	<i>FLT3</i>	97
10.2.4	CN-LMA e subgrupos genotípicos compostos.....	99
10.3	Análise da remissão completa, do <i>clearance</i> precoce de blastos na medula óssea avaliado no D15 de indução e da sobrevida em 122 pacientes tratados com intenção de alcançar RC	102
10.3.1	Remissão Completa	102
10.3.2	<i>Clearance</i> precoce de blastos na medula óssea avaliado no D15 da indução ..	105
10.3.3	Mortalidade precoce	106
10.3.4	Análise de sobrevida.....	107
10.4	Análises no subgrupo de 74 portadores de LMA <i>de novo</i> e idade inferior a 60 anos que completaram o tratamento de indução “7+3”	112
11	DISCUSSÃO	114
12	CONCLUSÕES	125
13	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
14	ANEXOS	149
14.1	Anexo 1.....	149
14.2	Anexo 2.....	150
14.3	Anexo 3.....	151
14.4	Anexo 4.....	154
14.5	Anexo 5.....	156
14.6	Anexo 6.....	157
14.7	Anexo 7.....	15877

1 INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença maligna das células precursoras hematopoiéticas comprometidas com a linhagem mielóide que se caracteriza pela proliferação clonal dessas células blásticas, acúmulo das mesmas na medula óssea, sangue periférico e/ou outros tecidos e pela perda da função hematopoiética normal ^{1; 2; 3}. Há um acúmulo de alterações genéticas herdadas ou adquiridas que alteram os mecanismos de autorenovação, proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas ^{3; 4; 5; 6}. Esses precursores hematopoiéticos envolvidos na leucemogênese da LMA podem ser comprometidos com as linhagens granulocítica, monocítica, megacariocítica e eritrocítica ^{7; 8; 9; 10}. Em algumas situações esses precursores podem ser muito imaturos, sem definição de linhagem ou apresentar características imunofenotípicas das linhagens mielóide e linfóide ^{11; 12; 13; 14}. Por isso, a LMA representa, na verdade, um grupo de doenças com aspectos clínicos e biológicos diferentes que demandam estratégia terapêutica específica ^{15; 16; 17; 18}. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o diagnóstico de LMA é feito quando mais de 20% de blastos mielóides são vistos na medula óssea e/ou sangue periférico através da microscopia óptica, com ou sem o auxílio da identificação dos blastos por citometria de fluxo, ou quando uma identificação genética típica de LMA é feita mesmo na ausência do critério numérico acima ¹⁹. Quando o número de blastos está entre 5%, que é o limite superior da normalidade, e 19%, o diagnóstico poderá ser de uma síndrome mielodisplásica ou uma doença mieloproliferativa, dependendo dos outros aspectos clínicos e hematológicos ¹⁹.

Inicialmente, as LMAs foram classificadas exclusivamente por critérios morfológicos, citoquímicos, e pela celularidade e percentual de blastos da medula óssea (Sistema Franco-Americano-Britânico - FAB) ⁸. Logo após, através de marcadores imunológicos, foram identificados os subtipos LMA com evidência mínima de diferenciação mielóide (FAB-M0) e a leucemia megacarioblástica aguda (FAB-M7) ^{9; 12; 20}. Métodos diagnósticos mais refinados (imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares) permitiram identificar subtipos imperceptíveis à microscopia óptica comum e reclassificar as leucemias de acordo com a

origem e linhagem celular, estágio de maturação e tipo de anormalidade citogenética ou molecular envolvida ²¹. A classificação da LMA proposta em 2001 pela OMS reconhece 19 subtipos diferentes e inclui, não somente características citológicas, citoquímicas e imunofenotípicas, como também alterações cariotípicas e genéticas ²¹. Algumas mutações genéticas foram, posteriormente, acrescentadas à nova classificação de LMA da OMS ¹⁹. Atualmente, cerca de 30 mutações recorrentes foram identificadas, em grande parte pela técnica de sequenciamento de genes que possibilitou rapidez na caracterização de novas alterações genéticas ^{22; 23}. Para a maioria delas, o papel na leucemogênese e o impacto no prognóstico ainda é incerto ou foi avaliado apenas em grupos específicos de pacientes, não podendo ser extrapolado para toda a população de portadores de LMA. ^{22; 24; 25; 26; 27}.

Há variações geográficas na incidência da LMA ²⁸. Nos adultos, as taxas mais elevadas são vistas na América do Norte, Europa e Oceania. Essas diferenças podem ser atribuídas a características genéticas da população, fatores ambientais ou combinação desses fatores ^{29; 30; 31}.

O tratamento da LMA pode ser dividido em duas grandes fases: indução da remissão e terapia pós-remissão ^{32; 33; 34}. O objetivo inicial do tratamento é alcançar a remissão completa (RC) e o restabelecimento da hematopoiese normal ¹⁰. A RC é definida como medula óssea contendo até 5% de blastos, ausência de alterações morfológicas típicas de LMA como o bastonete de Auer, contagens normais de global de leucócitos (GL), neutrófilos e plaquetas no sangue periférico ^{35; 36; 37}. Essa avaliação é feita por meio da análise da medula óssea coletada geralmente 35 dias (D35) após o início da quimioterapia de indução. Os pacientes que não alcançam RC com até dois ciclos de quimioterapia de indução são classificados como refratários e deverão ser tratados de outras formas ^{38; 39; 40}. O objetivo final do tratamento é a erradicação do clone leucêmico que deverá ocorrer com o tratamento pós-remissão ³⁴.

Alcançar RC é uma condição essencial para o paciente ter sobrevida prolongada e mesmo cura ³⁷. A capacidade de entrar em RC é, sem dúvida, um dos principais fatores

prognósticos no paciente com LMA, fator este reconhecido desde os primeiros protocolos terapêuticos utilizados ^{10; 41; 42}. O tratamento de indução convencional para LMA resulta em taxa de RC em torno de 60% a 70%, em pacientes adultos com menos de 60 anos ^{43; 44; 45}. A sobrevida global (SG) dos indivíduos que alcançam a remissão completa é três a dez vezes superior à dos que não a alcançam ^{46; 47}. A maioria dos portadores de LMA que recidivam o fazem no período de 1 a 3 anos após o término do tratamento ³⁷. Portanto, há grande necessidade de se identificar fatores prognósticos mais sensíveis que possam prever recaída. A detecção de células leucêmicas residuais com técnicas mais sensíveis e menos subjetivas do que a morfologia vislumbra uma nova dimensão na determinação do prognóstico dos portadores de LMA ^{48; 49; 50}. Porém, até o momento, a pesquisa de doença residual mínima raramente tem sido utilizada na estratificação de risco dos portadores de LMA e persiste a dúvida sobre qual é o melhor método para estimá-la ^{37; 51; 52; 53}.

Alterações cromossômicas observadas em exame de citogenética com banda G nas células leucêmicas são observadas em aproximadamente 55% dos casos de LMA ^{1; 54; 55; 56; 57}. A citogenética é o fator prognóstico mais importante e prediz probabilidade de RC, SG e sobrevida livre de recidiva (SLR) ^{56; 57; 58; 59; 60}. De acordo com a citogenética, os pacientes podem ser classificados como risco favorável, adverso e risco intermediário ^{37; 61; 62; 63; 64}. Muitas recomendações de tratamento são baseadas nessa estratificação ^{62; 65}. Nesse sentido, está claro que pacientes de risco favorável podem ser tratados apenas com quimioterapia de indução e quimioterapia pós-remissão, enquanto pacientes de risco adverso devem receber um transplante de medula óssea (TMO) alogênico como parte do tratamento pós-remissão ^{66; 67}. O tratamento do grupo de risco intermediário é mais controverso e a melhor estratégia não está bem definida ^{65; 68}. Os pacientes desse grupo podem ser tratados com quimioterapia e TMO autólogo ou alogênico ^{69; 70}. Cada uma dessas terapias oferece risco de recidiva e morbimortalidade relacionada aos tratamentos diferentes. O grande problema do risco intermediário

é que os pacientes que não apresentam alterações na citogenética e, portanto, apresentam cariótipo normal (CN-LMA), constituem a maioria dos casos^{61; 68}.

A detecção de mutações gênicas crípticas utilizando técnicas de biologia molecular permite, teoricamente, um refinamento da classificação de risco citogenética, especialmente no grupo de portadores de CN-LMA pertencentes ao risco intermediário^{37; 71; 72; 73; 74; 75}. Além disso, novas terapias estão sendo testadas e poderão ser desenvolvidas para LMA tendo como alvo algumas mutações genéticas^{76; 77}.

Desse modo, o presente estudo aborda a pesquisa de algumas mutações genéticas em LMA em diferentes populações. A primeira parte foi desenvolvida durante o período de Agosto de 2010 à Agosto de 2011, no decorrer do estágio de Doutorado sanduíche da pesquisadora, pela CAPES, na *Erasmus Medical Center, Rotterdam*, Holanda. Esta parte se refere à pesquisa de mutações no gene *DNMT3A* em LMA no grupo de pacientes do *HOVON* (Grupo Cooperativo Holandês e Belga de Hematologia), e suas associações com características e desfechos clínicos. A segunda parte analisa a frequência da *FLT3*-ITD e das mutações nos genes *IDH1* e *NPM1* (*NPM1^{mut}*) em portadores de LMAs diagnosticados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG), durante o período de Abril de 2004 a Março de 2013, e suas associações com características e desfechos clínicos. A pesquisa de mutações no gene *IDH1* foi realizada, em sua maioria, na *Erasmus Medical Center*, Holanda, como trabalho de cooperação entre os grupos de Hematologia e de Biologia Molecular dos dois países.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A análise de grandes séries de portadores de LMA permitiu identificar fatores prognósticos altamente relevantes, que podem ser subdivididos entre aqueles relacionados ao paciente (características e condições gerais de saúde) e aqueles relativos às características específicas do clone leucêmico³⁷. Os primeiros predizem a mortalidade relacionada com o tratamento (*TRM*) e tornam-se mais importantes com o aumento da idade, enquanto os últimos predizem resistência ao tratamento^{78; 79}.

Os principais fatores relacionados ao prognóstico da LMA são: idade, contagem de GL no sangue periférico ao diagnóstico, se primária (*de novo*) ou secundária a síndrome mielodisplásica (SMD) ou quimioterapia, presença de alterações citogenéticas e citorredução precoce^{80; 81; 82; 83}.

A detecção das alterações citogenéticas tem grande importância do ponto de vista clínico, já que vários estudos demonstraram que constituem, quando analisadas individualmente, o fator prognóstico mais importante para resposta à terapia de indução e sobrevida na LMA (Figura 1)^{64; 80}. Vários sistemas de estratificação de risco foram propostos com base na presença destas alterações^{21; 56; 61; 62; 63}. De modo geral, a divisão em grupos de risco favorável, intermediário e adverso é amplamente aceita. Como consenso, o grupo de risco favorável inclui as alterações *t(15;17)/PML/RAR α* , *t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1* e *inv(16)/t(16;16)/CBF α -MYH11*; o grupo de risco adverso inclui as alterações do 3q, as deleções completas ou parciais dos cromossomos 5 e 7, a *t(9;22)* e os cariótipos complexos; e o grupo intermediário é definido pelo CN-LMA e algumas alterações cromossômicas não descritas acima (Tabela 1). As alterações do 11q23 e algumas outras anomalias citogenéticas recorrentes estão alocadas no grupo intermediário ou no grupo adverso, dependendo do estudo^{37; 64}.

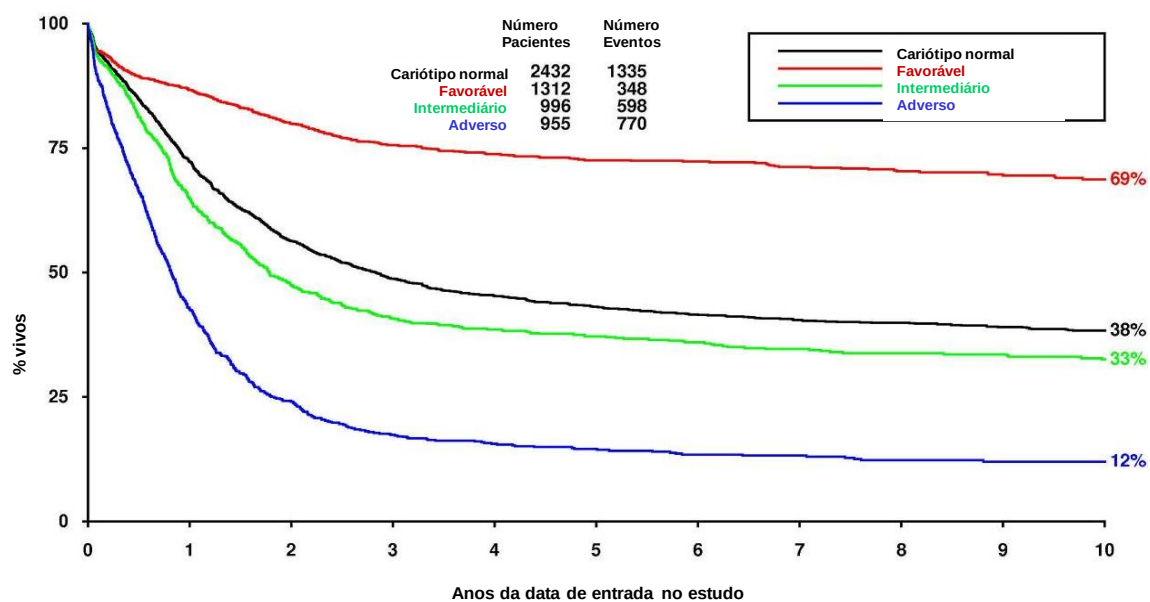


Figura 1. Sobrevida Geral em portadores de leucemia mielóide aguda e idade entre 16 e 59 anos de acordo com a classificação prognóstica de risco revisada proposta pelo grupo do *Medical Research Council*.

Adaptado de Grimwade *et al*, 2010

Tabela 1- Classificação prognóstica de risco revisada proposta pelo grupo do *Medical Research Council*

Anomalia Citogenética	Comentários
Favorável	
t(15;17)(q22;q21)	Independente de anomalia citogenética associada*
t(8;21)(q22;q22)	
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	
Intermediário	
Entidades não classificadas como favorável ou adversa	
Adverso	
abn(3q)	[Excluindo t(3;5)(q21~25;q31~35)]
inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26),	Excluindo os casos com cariótipo favorável†
add(5q), del(5q), -5,	
-7, add(7q)/del(7q),	
t(6;11)(q27;q23),	[Excluding t(9;11)(p21~22;q23) e t(11;19)(q23;p13)]
t(10;11)(p11~3;q23),	
t(11q23)	
t(9;22)(q34;q11),	Complexo (≥4 anomalias não relacionadas)
-17/abn(17p),	
Complexo (≥4 anomalias não relacionadas)	

*Todas as anomalias de risco favorável. †Todas as anomalias de risco adverso. Adaptado de Grimwade *et al*, 2010

Entretanto, a estratificação de risco citogenética tem uma grande limitação: os pacientes que apresentam CN-LMA. Diferenças significativas na resposta terapêutica e na evolução são observadas nesse grupo, o que sugere que outras alterações associadas à ativação ou inativação de vias celulares críticas [tais como transdução de sinais, apoptose, resistência a drogas, regulação do ciclo celular e reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA)] também tenham impacto na biologia da doença e, consequentemente, na resposta terapêutica⁸⁴.

O grupo de portadores de CN-LMA representa 40-50% dos adultos com LMA⁶⁴. Neste grupo, mutações em vários genes como *FLT3*, *MLL*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *NPM1*, *ASXL1*, *WT1*, *IDH1*, *IDH2*, e expressão aberrante dos genes *EVI1* e *BAALC*, têm sido avaliadas quanto ao valor prognóstico, contribuindo para um refinamento nos sistemas de classificação e estratificação de risco^{37; 71; 85; 86; 87}. A revisão dos critérios da OMS em 2008 já acrescentou duas entidades provisórias, definidas pela presença de mutações no gene da nucleofosmina e no gene *CEBPA*: “LMA com mutação em *NPM1* [*nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)*]”, e “LMA com mutação em *CEBPA* [*CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha*]”¹⁹.

Em 2010, o grupo de especialistas trabalhando em diretrizes para diagnóstico, prognóstico e tratamento da LMA, *LeukemiaNet*, propôs um sistema de estratificação de risco incorporando alterações nos genes *NPM1*, *FLT3* e *CEBPA*, como demonstrado na Tabela 2³⁷.

Tabela 2- Proposta de estratificação de risco do grupo *LeukemiaNet* associando citogenética e alterações moleculares nos genes *NPM1*, *CEBPA* e *FLT3* em portadores de LMA

Grupo genético	
Favorável	
	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
	inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFα-MYH11</i>
	<i>NPM1</i> ^{mut} sem <i>FLT3</i> -ITD (CN*)
	<i>CEBPA</i> ^{mut} (CN*)
Intermediário-I	
	<i>NPM1</i> ^{mut} / <i>FLT3</i> -ITD (CN*)
	<i>NPM1</i> ^{wild-type} / <i>FLT3</i> -ITD (CN*)
	<i>NPM1</i> ^{wild-type} sem <i>FLT3</i> -ITD (CN*)
Intermediário-II	
	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i>
	Alterações citogenéticas não classificadas no grupo favorável ou adverso
Adverso	
	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); rearranjo no <i>MLL</i>
	-5 ou del(5q); -7; abn(17p); cariótipo complexo [‡]

LMA, leucemia mielóide aguda; *NPM1*^{mut}, mutação no gene *NPM1*; *FLT3*-ITD, duplicação interna em tandem do gene *FLT3*; *FLT3*^{wild-type}, ausência de ITD no gene *FLT3*; *CEBPA*^{mut}, mutação no gene *CEBPA*. *Cariótipo normal. ‡ Presença de ≥3 anomalias não relacionadas. Adaptado de Donher *et al*, 2010

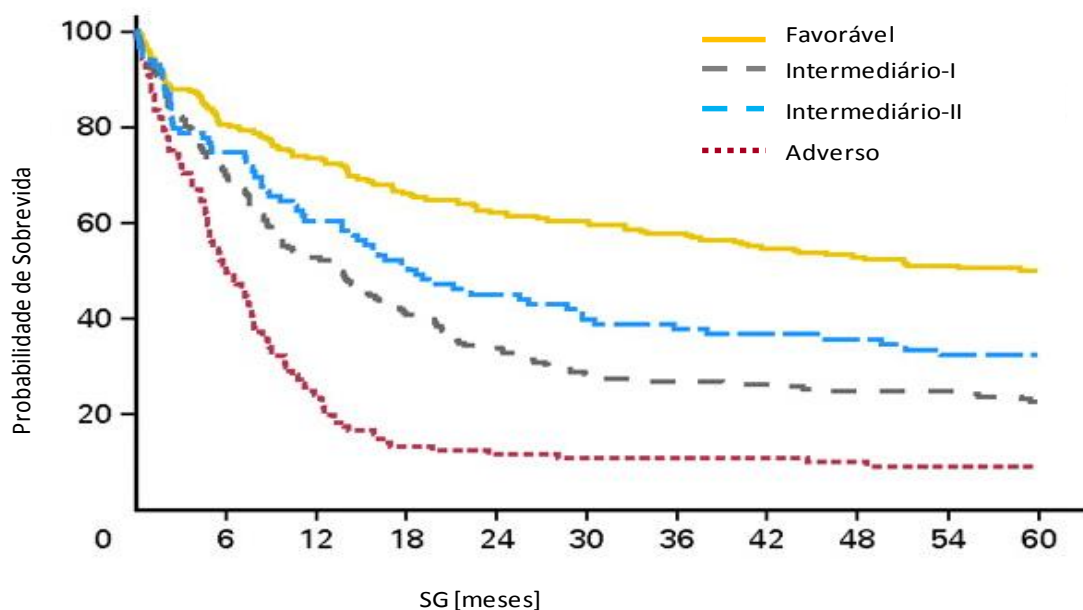


Figura 2. Sobrevida Geral em portadores de leucemia mielóide aguda e idade entre 18 e 60 anos de acordo com a estratificação prognóstica de risco proposta pelo grupo do *LeukemiaNet*.

Adaptado de Röllig *et al*, 2011

As recomendações do grupo *LeukemiaNet* integraram alterações moleculares e citogenéticas, subdividindo o grande grupo heterogêneo de pacientes de risco intermediário em intermediário-I e intermediário-II ³⁷. Röllig *et al* avaliaram o valor prognóstico da nova classificação de risco em um grande coorte de portadores de LMA e foram observadas diferenças significativas entre todas as categorias de risco em pacientes com idade ≤ 60 anos em relação à SLR e SG ⁸⁸. A mediana de SG no grupo de risco favorável, intermediário-I, intermediário-II e adverso foi de 5.3, 1.1, 1.6, e 0.5 anos, respectivamente (Figura 2). É interessante notar que os pacientes do grupo intermediário-II apresentaram melhor sobrevida do que do intermediário-I. Porém, quando se analisou os pacientes com > 60 anos não houve diferenças entre a sobrevida dos pacientes classificados nos grupos de risco intermediário-I e intermediário-II. Portanto, em pacientes jovens com LMA, a classificação recomendada pelo grupo *LeukemiaNet* parece ser ótimo método de classificação para estimativas de prognóstico.

2.1 Marcadores moleculares na LMA

2.1.1 *NPM1*

A nucleofosmina é uma fosfoproteína altamente conservada que reside fisiologicamente no nucléolo e transita entre o núcleo e o citoplasma (Figura 3). Ela está envolvida em vários processos celulares como a biogênese do ribossomo, manutenção da estabilidade do genoma e a regulação da atividade e estabilidade de genes supressores de tumor como o p53 ^{89; 90}.

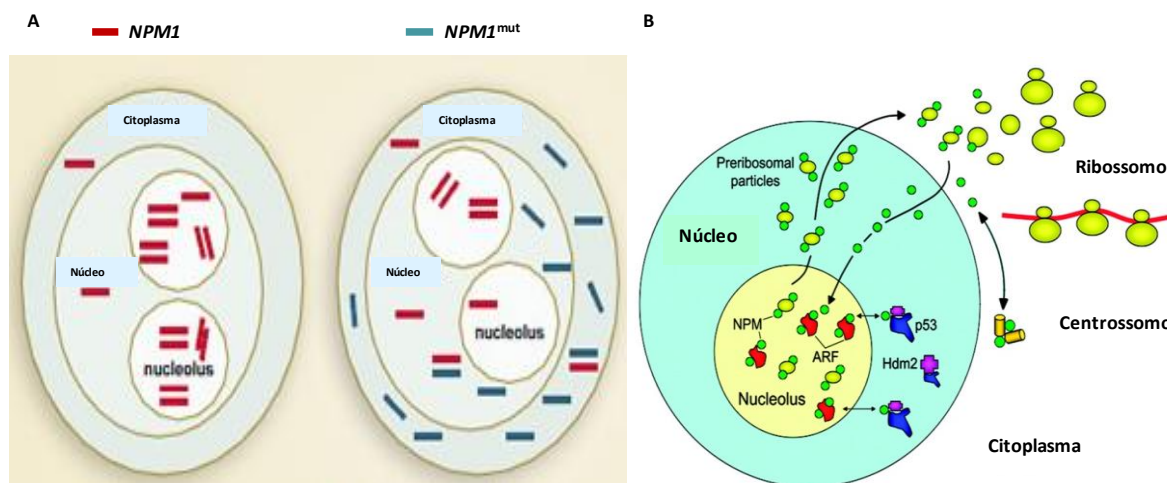


Figura 3. O gene *NPM1* codifica uma proteína envolvida em várias funções.

(A) *NPM1* é uma proteína oligomérica e normalmente transita entre os compartimentos nucleolar, nucleoplasmático e citoplasmático. Mutações no *NPM1* (*NPM1^{mut}*) causam localização aberrante da proteína no citoplasma. (B) A mobilidade da *NPM1* (microesferas verdes) desempenha um papel fundamental na biogênese do ribossomo, uma vez que a molécula transporta partículas preribossomais (esferas amarelas). *NPM1* participa também da organização da cromatina, duplicação do centríolo (cilindros amarelos), maturação do mRNA nuclear e do reparo do DNA. No citoplasma, a *NPM1* se liga ao centríolo e regula a sua duplicação durante a divisão celular. Além disso, a *NPM1* interage com p53 e suas moléculas reguladoras (ARF e Hdm2) que influenciam o percurso oncosupressor ARF-Hdm2/p53. Adaptado de Ostronoff *et al*, 2011 e Falini *et al*, 2007

As mutações do gene *NPM1* são as aberrações genéticas mais frequentemente detectadas na LMA do adulto, sendo observadas em 35-45% dos pacientes e em cerca de 46-64% daqueles com CN-LMA^{89; 91; 92}. Vários estudos demonstraram que as mutações em *NPM1* conferem um prognóstico favorável na LMA⁹¹. Entretanto, algumas diferenças na evolução clínica foram observadas entre *NPM1^{mut}* e *NPM1^{wild-type}* e não se relacionam somente ao *status* mutacional, mas também às interações cooperativas com outras mutações, como por exemplo, *FLT3*-ITD⁹³. Trinta e seis a 50% das LMAs com mutação no *NPM1* também apresentam *FLT3*-ITD. O prognóstico favorável é perdido se os pacientes apresentam simultaneamente o *NPM1^{mut}* e a *FLT3*-ITD^{91; 92}.

O *NPM1^{mut}* tem sido considerado como marcador de prognóstico favorável para se alcançar a remissão completa após a terapia de indução. A resposta favorável é somente encontrada nos portadores de genótipo combinado *NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}* (*FLT3* sem duplicações internas em tandem-ITD)^{75; 91; 93}. O *NPM1^{mut}* tem sido descrito também como marcador de prognóstico favorável para SLR e SG. Na maioria dos estudos, o impacto

favorável nos desfechos de sobrevida foi evidente para o genótipo $NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}$, enquanto o prognóstico desfavorável dos portadores do genótipo $NPM1^{mut}/FLT3-ITD$ foi principalmente determinado pelo impacto negativo da $FLT3-ITD$ ^{75; 91; 93}. O desfecho favorável dos pacientes $NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}$ foi alcançado não somente com a quimioterapia intensiva de consolidação, mas também após o TMO autólogo ou alogênico.

Até o momento, o impacto do $NPM1^{mut}$ no prognóstico dos portadores de cariótipo anormal não está bem estabelecido. Em pacientes idosos recebendo tratamento intensivo, as mutações no $NPM1$ foram encontradas em 56% dos portadores de CN-LMA e também foram consideradas um fator de risco favorável independente ⁹⁴. Em pacientes não selecionados e com idade ≥ 65 anos, as mutações no $NPM1$ tiveram prevalência de apenas 16% e mostraram um impacto prognóstico favorável no subgrupo de LMA com $FLT3^{wild-type}$ ⁹⁵.

2.1.2 *FLT3*

O $FLT3$ (*FMS-like tyrosine kinase 3*) é um membro da classe III da família dos receptores tirosina cinase, que normalmente se expressa na superfície das células progenitoras hematopoiéticas. O $FLT3$ e o seu ligante são importantes para a proliferação, sobrevida e diferenciação dessas células progenitoras. As mutações que envolvem o gene $FLT3$ nos portadores de LMA podem ser de dois tipos: mutações de ponto e duplicações internas em tandem (ITD), e resultam na ativação constitutiva do receptor, com a consequente ativação da proliferação celular ^{96; 97} (Figura 4).

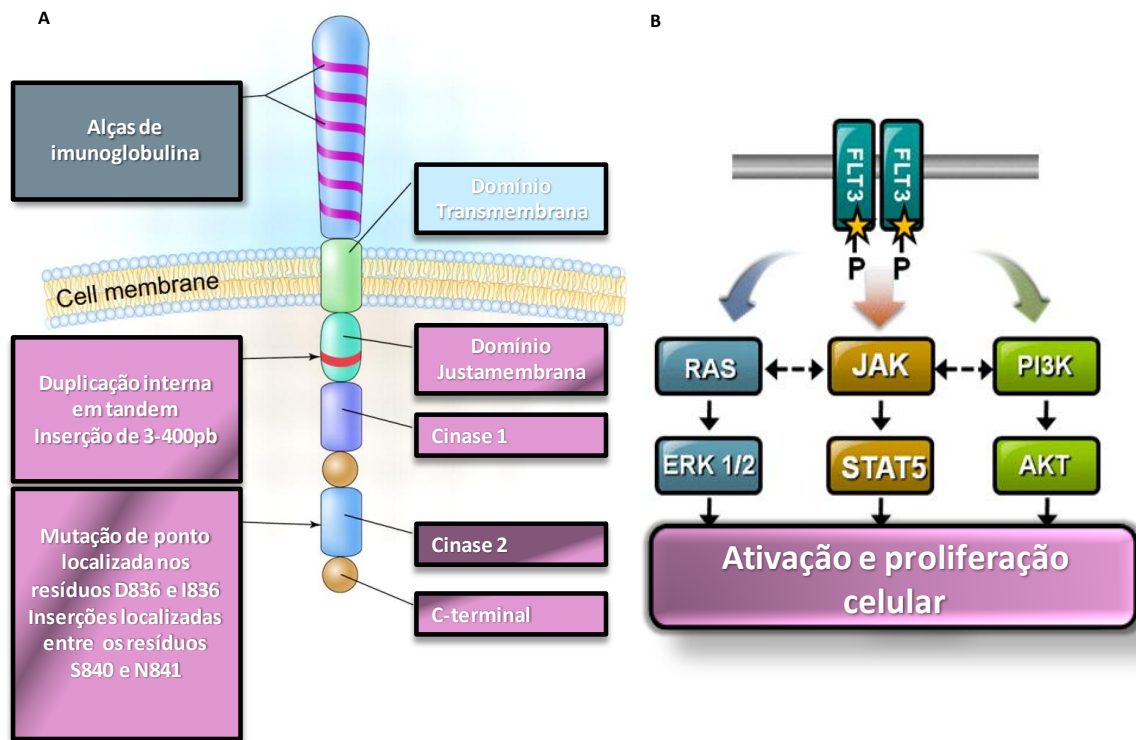


Figura 4. Estrutura do receptor *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3) e as mutações encontradas em Leucemia Mieloide Aguda.

(A) Diagrama esquemático do FLT3, mostrando a localização da duplicação interna em tandem (ITD) dentro do domínio justamembrana e da mutação de ponto (TKD) e inserções no segundo domínio da cinase. (B) As ITDs causam ativação constitutiva dos receptores do FLT3 devido à alteração da autoinibição da função do domínio justamembrana e ativação aberrante de uma cascata de sinalização incluindo PI3K/AKT, ERK e STAT5. O receptor torna-se auto fosforilado e estimula a proliferação celular e inibição da apoptose. As mutações de ponto dentro da segunda cinase resultam da substituição de tirosina por ácido aspártico, na maioria dos casos. Semelhante ao FLT3-ITD, as mutações TKD causam ativação constitutiva do receptor FLT3, causando ativação aberrante de vias de sinalização à jusante com proliferação celular. Adaptado de Litzow *et al*, 2005

Os pacientes que apresentam a FLT3-ITD são caracterizados por certos achados pré-tratamento como leucocitose, alto percentual de blastos no sangue periférico e na medula óssea e maior frequência de LMA *de novo*⁹⁸. As mutações no gene FLT3 estão presentes em cerca de 25-30% dos portadores de LMA (28-45% em CN-LMA), variando um pouco de acordo com a idade e o risco clínico, e sendo menos comum na LMA infantil e na secundária a SMD^{99; 100}. Elas conferem pior prognóstico no grupo de risco citogenético favorável e também no intermediário^{101; 102; 103; 104}. Na classificação da OMS de 2008, não foi definida categoria à parte para essas mutações em FLT3, por sua reconhecida associação com outros subtipos, como por exemplo, a t(15;17) e a t(6;9). Entretanto, recomenda-se sua investigação em todos os portadores de LMA¹⁹.

Em pacientes com risco citogenético intermediário, o impacto prognóstico negativo da *FLT3*-ITD é evidente em pacientes com mutação concomitante no *NPM1*, somente quando a proporção de alelos mutantes do *FLT3* é elevada em relação à quantidade de alelos selvagens (*FLT3*^{wild-type}), enquanto em pacientes com *NPM1*^{wild-type}, a presença *per si* da *FLT3*-ITD confere um prognóstico negativo ^{105; 106}.

O tamanho da ITD se correlaciona com a localização da mesma dentro do gene *FLT3* ¹⁰⁷. Entretanto, não está claro se é o tamanho do ITD ou a sua localização que afeta o prognóstico ^{104; 108}.

Em pacientes idosos não selecionados e tratados com quimioterapia intensiva, a prevalência de *FLT3*-ITD foi de 34% em pacientes com mais de 55 anos de idade, enquanto em outro estudo a prevalência foi de 14% em pacientes com idade superior a 60 anos ^{95; 109}. Em pacientes idosos com CN-LMA tratados intensivamente, a presença da *FLT3*-ITD foi um fator de risco adverso independente ¹¹⁰.

Alguns inibidores do *FLT3* já estão na fase I, II e III de ensaios clínicos, usados como agentes isolados ou em combinação com outros agentes quimioterápicos ^{111; 112; 113; 114}. Até o momento, nenhum dos inibidores do *FLT3* ganharam aprovação do *FDA* para o tratamento de portadores de LMA. Inibidores do *FLT3* mais recentes e mais potentes, tais como o *sorafenib* AC220, possuem a capacidade de atingir a inibição mais sustentada do *FLT3 in vivo* e têm demonstrado atividade altamente promissora em estudos clínicos ^{115; 116; 117}. O potencial terapêutico desses agentes com alvo molecular para o *FLT3*, no futuro, poderá trazer grande impacto à evolução clínica dos portadores de LMA.

2.1.3 *DNMT3A*

O impacto da associação entre metilação do DNA e os vários tipos de câncer humano tornou-se um domínio de investigação importante na última década. Em conjunção com outros processos epigenéticos tais como modificações de histonas e ácido ribonucléico

(RNA), a metilação do DNA representa um componente essencial da regulação da transcrição e um mecanismo repressor da estrutura da cromatina ^{118; 119}. A metilação aberrante do DNA pode resultar em silenciamento de genes supressores de tumor e provavelmente contribuir para a patogênese da LMA ^{120; 121}. De acordo com a sua estrutura em mamíferos, três famílias de DNA metiltransferases (DNMT) foram identificadas, DNMT1, DNMT2 e DNMT3 e estão presentes em diferentes cromossomos (Figura 5) ^{122; 123; 124}. Elas estão relacionadas entre si e catalisam a transferência de um grupo metil para a posição 5' da citosina no dinucleotídeo CpG ^{125; 126}. A DNMT1 é a principal enzima responsável pela manutenção da metilação ^{118; 122; 127; 128; 129}. A família da DNMT3 é composta pela DNA (Cytosine-5) Methyltransferase 3 Alpha (DNMT3A) e DNA (Cytosine-5) Methyltransferase 3 Beta (DNMT3B) que catalisam a metilação *de novo* do DNA ^{122; 128}.

A proteína DNMT3A apresenta três domínios conservados, sendo dois na região reguladora do N-terminal (domínio *PWWP* e um domínio *PHD* que interage com histona H3) e um domínio catalítico altamente conservado na região C-terminal ^{124; 128}. O domínio *PHD* da DNMT3A é suficiente para reprimir a transcrição, independentemente da atividade de metiltransferase ^{130; 131}.

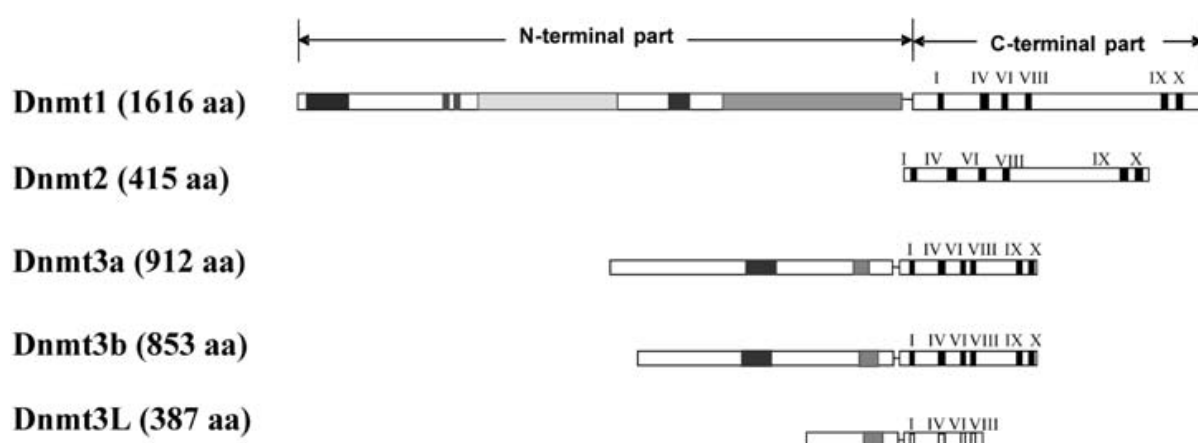


Figura 5. Organização dos domínios das DNA metiltransferases (DNMTs) em mamíferos.

Adaptado de Hermann *et al*, 2004

Recentemente, uma alteração somática no gene *DNMT3A* foi identificada na LMA, resultando em substituição Arg-to-His no codon R882, localizada próxima à porção C-

terminal da proteína e causando perda de atividade de metilação ¹³². Posteriormente, foram descritas outras mutações recorrentes em vários locais do gene *DNMT3A*, sendo a maioria em heterozigose, em coortes de portadores de LMA (Figura 6) ^{133; 134; 135}. As mutações em *DNMT3A* nesses pacientes foram associadas ao subtipo morfológico leucemia monocítica aguda (FAB-M5) e ao CN-LMA ^{133; 134; 135}. Mutações somáticas no *DNMT3A* são encontradas em aproximadamente 30% dos casos de CN-LMA. Além disso, parecem estar associadas a um determinado perfil de metilação do DNA e de expressão gênica e com prognóstico desfavorável em LMA ^{134; 135}. Holz-Schietinger *et al* tentaram fornecer uma explicação plausível para as mudanças na regulação epigenética em portadores de LMA, quando a *DNMT3A* mutada altera a interface da tetramerização: o processo de metilação de múltiplos locais de CpG é interrompido quando a tetramerização é eliminada ¹³⁶. A atividade de metiltransferase R882H *DNMT3A* é reduzida em cerca de 80% em comparação com a enzima *wild-type* e a combinação das duas altera a capacidade para homotetramerizar ¹³⁷.

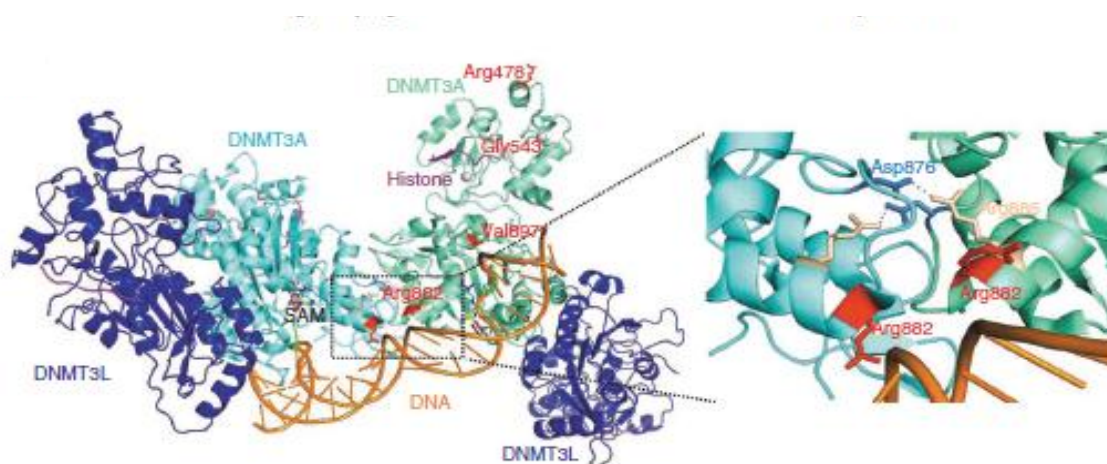


Figura 6. Modelo ilustrativo da enzima DNMT3A e prováveis sítios de interações e mutações.

A estrutura de dímero da DNMT3A é mostrado em ciano, a estrutura de duas moléculas de DNMT3L ligadas a ambos os lados do dímero DNMT3A (3A - 3A) é mostrado em azul e o DNA dupla hélice é mostrado em laranja. Em vermelho, estão as mutações nas LMAs FAB-M5. As mutações estão envolvidos nas dimerização 3A - 3A ou na ligação com o DNA (Arg882), no cofator de ligação SAM (Val897), na interação proteína - proteína (Arg478) e na ligação com a histona H3 (Gly543). A mutação Arg882 está perto da interface 3A - 3A com dois pares de pontes formadas entre Arg885 e Asp876 e muito perto da dupla hélice de DNA. Adaptado de Yan *et al*, 2011

A mutação na DNMT3A em outro local exceto na posição R882, resulta na expressão de proteína truncada, a qual parece exibir função enzimática alterada ¹³⁵. Contudo, não está claro ainda, como a mutação no *DNMT3A* se relaciona à leucemogênese.

Patel *et al* analisaram 18 genes em 398 portadores de LMA e mostraram que mutações no *DNMT3A* ou no *NPM1* ou duplicação parcial em tandem no gene *MLL* (*MLL*-PTD) foram preditoras de melhor sobrevida em pacientes tratados com altas doses de quimioterapia de indução (citarabina + 90mg/m² de daunorrubicina comparado com a citarabina + 45mg/m² de daunorrubicina) ¹³⁸. Diante disso, sugerem que a pesquisa de mutações no *DNMT3A* seja fator de utilidade prognóstica e de decisão terapêutica relevante, de acordo com a análise do perfil mutacional integrado ¹³⁸. O mesmo não foi encontrado por Grossmann *et al*, que avaliaram a presença de mutações nos genes *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A* e *TET2* e não observaram associação significativa com a SG ¹³⁹. Outro estudo com grande número de pacientes não demonstrou impacto no prognóstico de portadores de mutações no *DNMT3A* ¹⁴⁰. Nos portadores de CN-LMA, Gaidzik *et al* encontraram um impacto negativo dessas mutações no prognóstico dos portadores de risco molecular adverso, ou seja, sem mutações nos genes do *CEBPA* (*CEBPA*^{wild-type}) ou *NPM1* com ou sem *FLT3*-ITD (*CEBPA*^{wild-type}/*NPM1*^{wild-type}/*FLT3*-ITD ou *CEBPA*^{wild-type}/*NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type}), enquanto Renneville *et al* encontraram um prognóstico negativo dentre os pacientes com risco molecular favorável (*CEBPA*^{mut} ou *NPM1*^{mut} associado ao *FLT3*^{wild-type}) ^{140; 141}. Uma possível explicação para esta discrepância é a observação que o impacto prognóstico de mutações no *DNMT3A* dependem da dose de antraciclina administrada durante a terapia de indução ¹³⁸.

É interessante notar que os pacientes portadores de mutações no *DNMT3A* podem se beneficiar de tratamento específico ¹⁴². Metzeler *et al* mostraram em pequeno grupo de pacientes idoso com LMA e virgens de tratamento, cujos blastos leucêmicos apresentavam baixa atividade da DNMT3A devido a mutações com perda de função ou à baixa expressão do gene, puderam se beneficiar do tratamento com agentes hipometilantes ¹⁴². Se mais estudos

confirmarem que as mutações no *DNMT3A* identificam um subgrupo de pacientes que apresentam uma boa resposta à terapia com hipometilante, como a decitabine, isso representaria um avanço importante para correlação entre a estratificação de risco dos portadores de LMA e a terapia epigenética.

2.1.4 *IDH1*

A isocitrato desidrogenase (IDH) é uma enzima envolvida no Ciclo de Krebs, que participa da descarboxilação oxidativa do isocitrato^{143; 144}. A família IDH é composta por três isoformas: IDH1, IDH2, e IDH3. A IDH1 está localizada no citosol e nos peroxissomas, enquanto a IDH2 e IDH3 estão localizados nas mitocôndrias^{145; 146; 147}. Mutações somáticas dos genes que codificam as IDH1 e IDH2 foram descritas em mais de 70% dos portadores de astrocitomas, oligodendrogliomas e glioblastomas de graus II e III da classificação da OMS^{148; 149; 150}.

Recentemente, mutações nos genes *IDH1* (*IDH1^{mut}*) e *IDH2* (*IDH2^{mut}*) foram observadas em 6% a 14% e 11% a 19%, respectivamente, de grandes séries de portadores de LMA^{86; 151}. Nesses pacientes, as mutações em *IDH1* e *IDH2* foram mais comumente observadas em pacientes com risco citogenético intermediário, CN-LMA e *NPM1* mutado¹⁵¹. As frequências das mutações em portadores de CN-LMA são 10% a 15% para *IDH1* e 10% a 19% para *IDH2*, respectivamente.^{138; 152; 153}. As mutações no *IDH1* e *IDH2* são heterozigóticas, mutuamente excludentes e resultam em restritas trocas de aminoácidos, ocorrendo primariamente no resíduo R132 no *IDH1* e no R140 ou R172 no *IDH2*¹⁵⁴.

IDH1 e o *IDH2* participam no ciclo do ácido cítrico para converter isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG), enquanto reduz o NAD fosfato-positivo (NADP^+) a NADP (NADPH)¹⁵⁵. Mutações na IDH1 ou na IDH2 conferem uma nova função enzimática para estas enzimas, com a aquisição da capacidade de converter α -KG a 2-hidroxiglutarato (2-HG) através da conversão de NADPH para NADP^+ ^{156; 157}. Isto resulta num aumento da produção de 2-HG

que poderia ocorrer em condições fisiológicas normais (Figura 7). Uma das consequências deste aumento da produção de 2-HG é que enzimas que normalmente dependem do α -KG como substrato são funcionalmente prejudicadas na presença de $IDH1^{mut}$ ou $IDH2^{mut}$ devido à inibição competitiva pelo 2-HG ^{158; 159}.

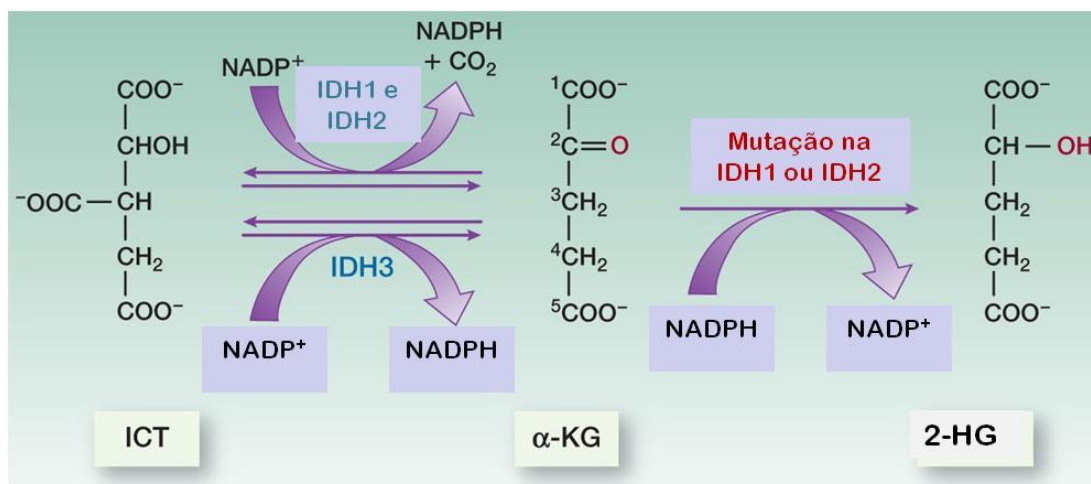


Figura 7. Reações químicas catalisadas pelas enzimas isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2, respectivamente) de tipo selvagem e mutadas.

A única diferença estrutural entre α -cetoglutarato (α -KG) e 2-hidroxiglutarato (2-HG) é a substituição do grupo 2-cetona em α -KG por um grupo hidroxila em 2-HG e que está indicada em vermelho. ICT, se refere ao isocitrato. Adaptado de Yang *et al*, 2012

Sasaki *et al* relataram que os camundongos que expressam a mutação R132H produziram dez vezes mais 2-HG sérico que a ninhada sem a mutação ¹⁶⁰. Ao mesmo tempo, a expressão de *IDH1* R132H resultou em desenvolvimento de medula óssea hipocelular, com esplenomegalia devido à hematopoiese extramedular como mostrado na Figura 8. Apesar da diminuição da celularidade da medula óssea nos camundongos *knock-in*, houve proliferação dentre as células progenitoras multipotentes. Isto sugere que a IDH1 mutada realmente resulta em bloqueio na diferenciação hematopoiética ¹⁶⁰.

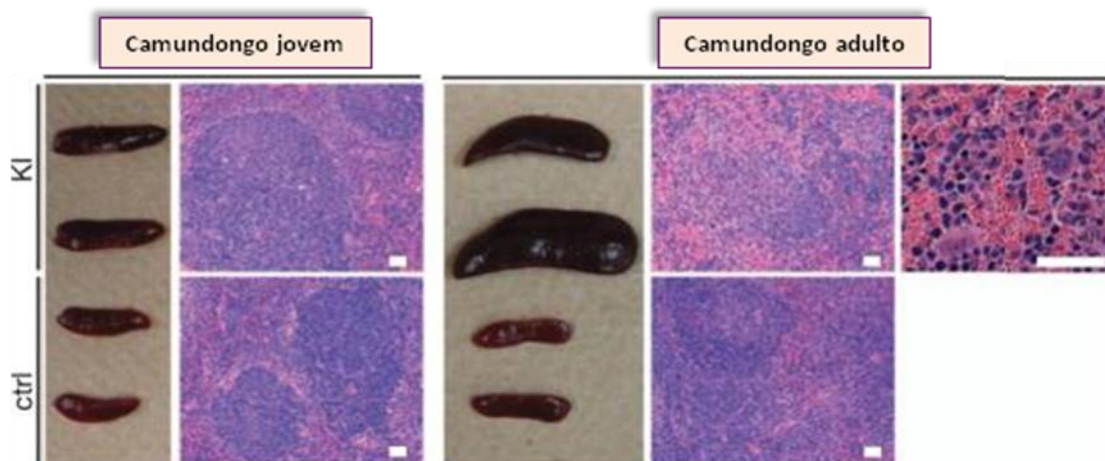


Figura 8. Camundongos LysM-ki apresentam esplenomegalia acentuada dependente da idade e diminuição da celularidade da medula óssea.

Aparência macroscópica e lâminas corados com hematoxilina-eosina de fragmentos de baço de camundongos jovens e adultos, controles (Ctrl) e *LysM-KI* (KI). *LysM-KI* indicam camundongos *knock-in* que apresentam a mutação *IDH1* R132H expressa em todas as células da linhagem mielóide. Adaptado de Sasaki *et al*, 2014

Aparentemente as mutações no *IDH1* estão associadas com o prognóstico, visto que os portadores apresentaram menor sobrevida^{86; 151}. Embora em alguns estudos nenhum impacto prognóstico tenha sido relatado, duas meta-análises avaliaram o impacto das mutações do *IDH1* no prognóstico dos pacientes portadores de LMA e descreveram que o impacto negativo dessas mutações sobre a sobrevida seria restrito a portadores de CN-LMA que apresentam mutações no *NPM1* e *FLT3*^{wild-type}^{161; 162; 163; 164}.

O efeito no prognóstico em relação às mutações no *IDH2* é ainda menos claro já que alguns autores encontraram um impacto positivo na sobrevida^{138; 154; 162} enquanto outros encontraram impacto negativo em subgrupos bem definidos^{165; 166}. Green *et al* encontraram resultados divergentes, com favorável impacto da mutação R140 e impacto desfavorável não significativo da mutação R172¹⁵³. A maioria dos estudos não encontrou um impacto prognóstico de mutações *IDH2*^{151; 161; 167}.

Esses resultados, de certo modo conflitantes, podem se justificar já que alguns trabalhos incluíram na análise um número limitado de alterações genéticas adicionais além da *IDH1* e *IDH2*, ou estudaram os pacientes que receberam diferentes terapias incluindo quimioterapia de altas doses, TMO e terapias em baixas doses^{138; 151; 153; 154; 161; 162; 167}.

Embora a expressão do *IDH1* R132H no sistema hematopoiético não pareça ser suficiente por si só para resultar em LMA *in vivo*, ela tem sido claramente associada a um perfil distinto de metilação^{23; 168}. Estudos realizados por Figueroa *et al* demonstraram que LMA com mutações no *IDH1* e *IDH2* exibem hipermetilação global do DNA além de padrão de hipermetilação específico¹⁵⁹. Além disso, houve diminuição da expressão de GATA1 (envolvido na diferenciação mielóide), aumento da expressão do c-Kit e prejuízo na diferenciação mielóide com hiperproliferação das células progenitoras¹⁵⁹.

Este tipo de atividade enzimática adquirida com as mutação nas proteínas do IDH1 e IDH2 fornecem uma atraente possibilidade de alvo terapêutico. Inibidores de IDH estão em desenvolvimento e têm demonstrado reverter hipermetilação de ambas as histonas e DNA em IDH mutante¹⁶⁹. Várias drogas têm sido testadas mas serão necessários novos ensaios para determinar se os inibidores da IDH1 e IDH2 mutantes apresentarão algum benefício clínico^{170; 171}. A este respeito, é importante destacar a droga AG-221 que está atualmente na fase I de ensaios clínicos, sendo testada em portadores de LMA e mutação no gene do *IDH1* (*clinicaltrials.gov* NCT01915498). Os resultados deste e de outros estudos em curso deverão mostrar em breve como tais compostos serão tolerados.

2.2 Modelos Prognósticos

Agora que várias mutações genéticas estão sendo descritas, torna-se necessário resumir a informação prognóstica do crescente número de marcadores clínicos e moleculares. É importante determinar quando as mutações ocorrem e como elas se combinam no desenvolvimento e prognóstico da LMA. Nesse sentido, os dados relativos às análises de diferentes mutações na LMA estão de acordo com o modelo proposto por Gilliland *et al* (Figura 9), sugerindo que a associação de mutações de genes desempenham um papel na leucemogênese¹⁷². As LMAs são caracterizadas por translocações cromossômicas que envolvem fatores de transcrição necessários para a diferenciação mielóide normal. As

consequências funcionais dessas translocações são a perda da função destes fatores de transcrição, resultando em alterações na diferenciação mielóide. No entanto, isto não é suficiente para causar leucemia aguda e acredita-se na hipótese de que outras mutações são necessárias. A patogênese da LMA envolveria várias etapas como a presença das mutações de classe I, tais como mutações em receptores tirosina-quinases (por exemplo, FLT3 e c-KIT), que alteram a proliferação e/ou sobrevida de células progenitoras hematopoiéticas. Mutações de classe II ocorrem nos fatores de transcrição hematopoiéticos e alteram a diferenciação celular e apoptose. Em conjunto, estas mutações resultam na produção de células leucêmicas com capacidade de proliferação e sobrevida prolongadas, mas sem diferenciação. É possível que este modelo seja simplificado e que mutações adicionais desempenham um papel importante na patogênese da doença, ou que existam subtipos de genes mutantes que confirmem diferenças fenotípicas importantes em LMA. Além disso, o modelo poderia prever que a LMA pode efetivamente, ou até mesmo de forma sinérgica, ser tratada com pequenas moléculas que visam cada uma das duas classes de mutações, com redução da toxicidade em comparação com a quimioterapia convencional ⁶.

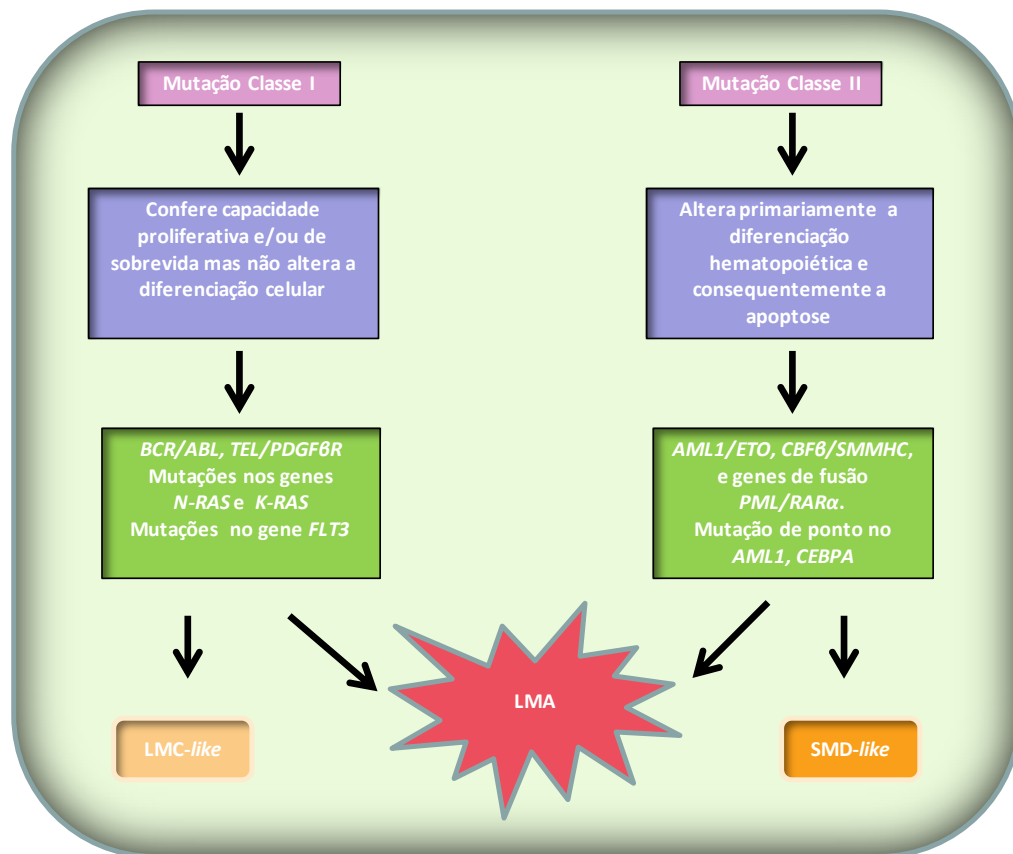


Figura 9. Etapas da patogênese da LMA.

Este modelo tem como hipótese que a LMA seja consequência da interação de pelo menos duas grandes classes de mutações. Mutações de classe I, exemplificada pela ativação constitutiva da tirosina quinase ou de seus efetores a jusante, tais como, *N-RAS* ou *K-RAS* mutados, ou pela ativação constitutiva do *FLT3*, conferindo vantagem proliferativa e/ou de sobrevivência para células hematopoéticas. Quando são eventos únicos, estes genes mutantes conferem uma doença semelhante à Leucemia Mieloide Crônica (LMC-like) caracterizada por leucocitose com maturação e função celular normais. Mutações de classe II resultam em perda de função de fatores de transcrição que são importantes para a diferenciação hematopoética normal e incluem o *AML1/ETO*, *CBFβ/SMMHC*, *PML/RARα* *NUP98/HOXA9*, bem como mutações de ponto em fatores de transcrição hematopoéticos, tais como *AML1* e *CEBPα*. Essas mutações também alteram a subsequente apoptose já que as células não apresentam diferenciação terminal. Quando únicas, essas mutações podem conferir um fenótipo semelhante à Síndrome Mielodisplásica (SMD-like). Independentemente do tempo ou ordem de aquisição das mutações, os indivíduos que acumulam as duas mutações de classe I e II têm um fenótipo clínico de LMA, caracterizado por uma capacidade proliferativa e/ou de sobrevivência das células devido à incapacidade de diferenciação hematopoética. Adaptado de Gilliland *et al*, 2002.

Já em relação ao prognóstico, vários modelos estão tentando integrar as informações e validá-las com o objetivo de melhor classificar os pacientes e oferecer terapia individualizada. A avaliação das mutações moleculares (isto é, mutações em *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*, *ASXL1*, *FLT3-ITD*, e *MLL-PTD*) revelaram-se valiosas em subdividir os portadores de CN-LMA em subgrupos com sobrevivência diferentes^{75; 85; 89; 173; 174; 175; 176; 177; 178}. Além disso, os modelos de classificação prognósticos se propõem combinar a citogenética aos marcadores moleculares^{37;}

⁸⁰. Estas concepções foram baseadas em revisões da literatura e avaliações em grandes séries de dados está apenas começando.

Em 2012, Patel *et al* realizaram análise mutacional de 18 genes em portadores de LMA e identificaram pelo menos uma alteração somática em 97,3% dos pacientes ¹³⁸. A *FLT3*-ITD, a *MLL*-PTD e mutações no *ASXL1* foram associados à redução da SG. O efeito favorável do *NPM1*^{mut} foi restrito a pacientes com a co-ocorrência de mutações no *NPM1* e *IDH1* ou *IDH2*. O estudo validou o significado dessas mutações como preditores genéticos de prognóstico já que a presença deles alterou a sobrevida entre os portadores de LMA, independentemente da idade, contagem de GL, dose de quimioterapia de indução e terapia pós-remissão. Os pacientes que tinham *DNMT3A*^{mut} e *NPM1*^{mut} e translocações envolvendo o gene *MLL* apresentaram melhor sobrevida com quimioterapia de indução usando daunorubicina em altas doses em comparação com dose padrão, mas o mesmo não ocorreu entre os pacientes *DNMT3A*^{wild-type}, *NPM1*^{wild-type} e sem mutação no *MLL*. O perfil mutacional poderia então, ser usado para estratificação prognóstica de risco e para orientar decisões terapêuticas em relação aos portadores de LMA ¹³⁸.

Grossmann *et al* propuseram um modelo de classificação prognóstico baseado somente na análise molecular, que inclui o rastreo molecular para os rearranjos recorrentes (*PML/RAR α* , *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF α -MYH11*) e análise de mutações em *CEBPA*, *NPM1*, *RUNX1*, *ASXL1* e *TP53*, bem como para *FLT3*-ITD e *MLL*-PTD (Figura 10) ¹³⁹. Como resultado, cinco grupos de risco puderam ser identificados com diferenças significativas: a sobrevida em 3 anos no grupo de risco molecular muito favorável foi superior a 80%. Uma terapia individualizada e, possivelmente, a redução da intensidade de terapia com base no monitoramento da doença residual mínima (DRM) seria uma opção neste grupo. O impacto prognóstico negativo do *MLL*-PTD, mutações no *RUNX1*, ou mutações *ASXL1* foi confirmado. Estas três alterações moleculares ocorrem freqüentemente juntas e foram colocadas no grupo de risco adverso com SG em 3 anos de 21.9%. As mutações no gene *TP53*

foram observadas em 9.5% dos portadores de LMA com SG em 3 anos de 0%. Enquanto 19.3% dos pacientes com citogenética adversa sobrevivem três anos, nenhum dos pacientes com a mutação *TP53* o fez. Portanto, para o grupo de risco muito adverso que apresentou sobrevida em 1 ano de 25.3%, o tratamento proposto pode variar entre novos protocolos experimentais ou TMO alogênico. A subdivisão no grande grupo de risco intermediário, que segundo Grossmann *et al* incluiu as categorias favorável, intermediária e adversa, pode revelar-se útil para analisar o efeito de novas opções terapêuticas, especialmente em combinação com a monitorização da DRM. O impacto da presença de certas mutações na sobrevida foi tão importante que os autores propõem que essa classificação molecular abrangente forneça um modelo mais poderoso para categorização prognóstica do que a própria citogenética ¹³⁹.

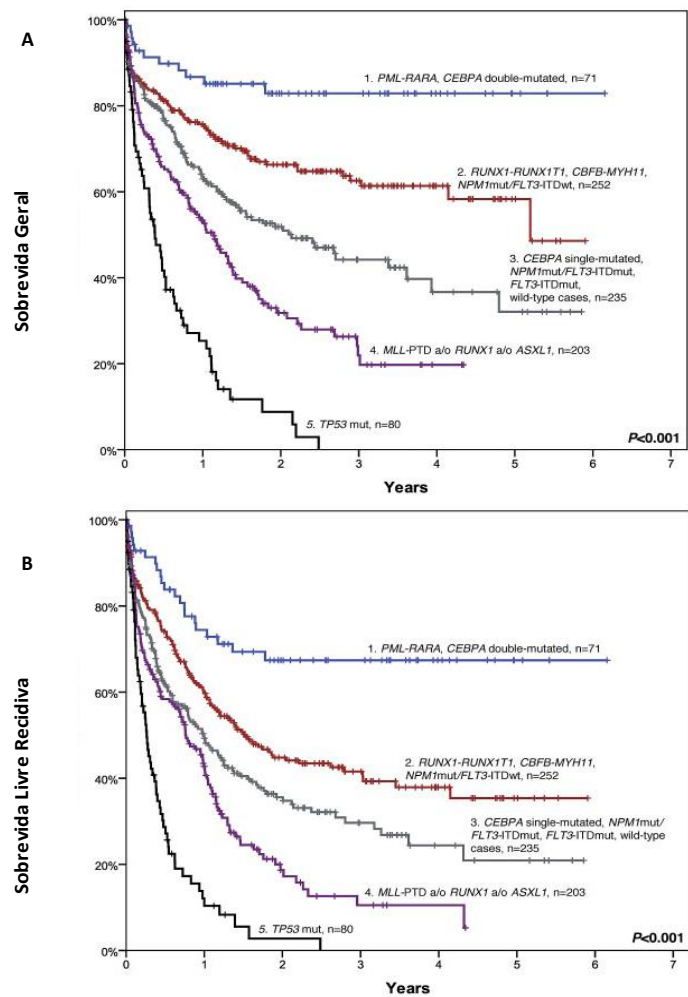
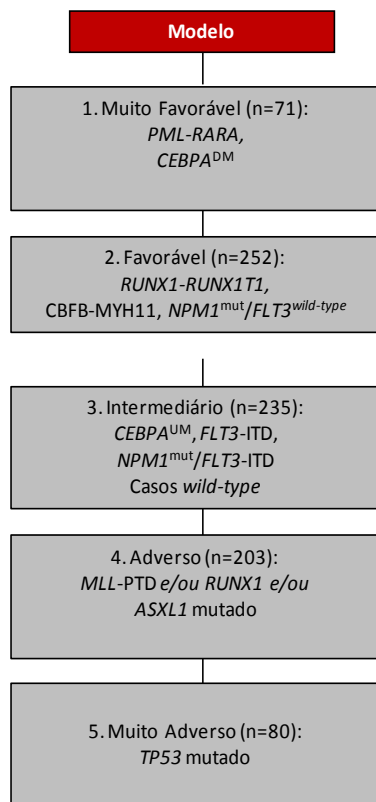


Figura 10. Modelo de classificação prognóstico de Leucemia Mielóide Aguda baseado somente na análise das mutações.

O modelo é baseado na presença de mutações moleculares que se distribuem em cinco subgrupos prognósticos em vez de 3 como o modelo prognóstico citogenético e, portanto, refina a categorização dos pacientes em diferentes grupos prognósticos que apresentam grandes diferenças na sobrevida. (A) Curvas de Kaplan-Meier em relação à sobrevida geral para o modelo baseado nas mutações moleculares. (B) As estimativas da distribuição de sobrevida livre de recidiva calculadas pelo método de Kaplan-Meier de acordo com a categorização das mutações moleculares. *NPM1^{mut}*, mutação no gene *NPM1*; *FLT3-ITD*, duplicação interna em tandem do gene *FLT3*; *FLT3^{wild-type}* ausência de ITD no gene *FLT3*; *CEBPA^{UM}*, única mutação no *CEBPA*; *CEBPA^{DM}*, dupla mutação no *CEBPA*.

Adaptado de Grossmann *et al*, 2012

Mais recentemente, Pastore *et al* apresentaram outro modelo de prognóstico para pacientes adultos com CN-LMA, sem restrição de idade, que combina características clínicas pré-tratamento com variáveis moleculares de prognóstico bem estabelecidas²⁴. Com base na mediana de idade, *performance status*, contagem de GL e *status* de mutações do *NPM1*, *CEBPA* e da *FLT3-ITD*, os pacientes foram classificados nos seguintes três grupos de risco: 29% dos pacientes tinham doença de risco favorável (SG em cinco anos, 74%; SLR em cinco

anos, 55%); 56% tinham doença de risco intermediário (SG em cinco anos, 28%; SLR em cinco anos, 27%), e 15% de risco adverso (SG em cinco anos, 3%, SLR em cinco anos, 5%). A integração de ambos, marcadores clínicos e moleculares, permite, segundo o autor, estabelecer uma base para realização de assistência individualizada ao paciente com CN-LMA através da terapia adaptada ao risco ²⁴.

2.3 Clearance precoce de blastos na medula óssea

Em portadores de LMA, um fator importante de potencial utilidade na prática clínica é a avaliação precoce de blastos na medula óssea após a administração de quimioterapia de indução ^{36; 179}. O ponto de corte de 10% de blastos avaliado entre os dias 12 a 17 do início da quimioterapia é altamente relevante para o prognóstico, pois é uma indicação evidente de quimiorresistência ou de quimiosensibilidade ³⁶. Alguns grupos mostraram claramente que, caso o paciente não consiga reduzir adequadamente a sua contagem de blastos, ele apresentará um prognóstico adverso mesmo tendo alcançado a RC ^{36; 179}.

A combinação da citogenética com a avaliação precoce de blastos na medula óssea pode ser particularmente útil em pacientes do grupo de risco citogenético intermediário, especialmente nas instituições na quais a avaliação molecular em relação à pesquisa das mutações nos genes do *NPM1*, *FLT3* e *CEBPA* não estão rotineiramente disponíveis.

Segundo o grupo do *LeukemiaNet*, a avaliação precoce da medula óssea pode ser utilizada em estudos experimentais para se avaliar a eficácia anti-leucêmica de uma nova droga ou para orientar tratamento com regimes de indução intensificados ³⁷.

2.4 LDH

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima intracelular que catalisa a conversão de piruvato, produto final da glicólise, em lactato quando o oxigênio está ausente ou em pequenas quantidades, e realiza a reação reversa durante o ciclo de Cori, via glicolítica

anaeróbica, no fígado ^{180; 181; 182}. Em humanos, embora presente em praticamente todos os tecidos do corpo (em cinco diferentes isoformas) sua elevação pode ser dosada no sangue periférico durante dano tecidual (LDH-Total) ^{183; 184}. Os níveis de suas isoformas dependem de qual órgão está afetado, acordando para o fato de maior quantidade de LDH-1 estar presente nos eritrócitos, LDH-2 nos leucócitos e miócitos cardíacos, LDH-3 nos pneumócitos, LDH-4 nos rins, placenta e pâncreas e LDH-5 nos hepatócitos e miócitos esqueléticos ¹⁸⁵. Contudo, a dosagem de LDH é um teste não-específico que pode ser utilizado na avaliação de uma série de doenças e condições sendo um indicador geral de dano celular e gravidade da lesão tecidual ^{186; 187}.

A estimativa da LDH sérica é fácil, prontamente disponível e econômica, porém a dosagem dessa enzima não tem valor diagnóstico e os níveis sérico de LDH encontram-se geralmente elevados em desordens neoplásicas e relacionam-se com o volume da neoplasia ^{188; 189; 190; 191}. Há anos vêm sendo sugerido que, elevados níveis de LDH dosados anteriormente ao tratamento, seja considerado como possível marcador tumoral, por refletir presumivelmente, uma taxa de crescimento e o volume do tumor ^{192; 193; 194; 195; 196; 197}.

Alguns estudos mostram associação de níveis sérico pré-tratamento de LDH com o desfecho clínico adverso em leucemia linfoblástica aguda na infância, mieloma, linfomas e LMA ^{198; 199; 200; 201; 202; 203}. Apesar da maioria dos trabalhos avaliar os níveis de LDH como uma das variáveis pretratamento em LMA e da associação desses valores conferirem algum efeito prognóstico, o mesmo é variável entre os estudos ^{35; 36; 204; 205; 206; 207}. Döhner *et al* propõe que o significado do fator prognóstico dos níveis de LDH em relação à LMA para estimar a probabilidade de cura seja dependente do esquema de tratamento dado ao paciente e por isso, pequenas variações no tratamento poderiam alterar o valor prognóstico desse fator ^{37; 208}.

2.5 Justificativa

Embora muito se tenha avançado nos últimos anos na elucidação da patogênese molecular, diagnóstico e tratamento da LMA, proporcionando índices de remissão pós-indução de até 60-80% ^{16; 209}, somente cerca de 50% dos pacientes com menos de 60 anos têm uma sobrevida maior ou igual a cinco anos ^{81; 210; 211}. De acordo com o registro *SEER* (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry*), a taxa de sobrevida em cinco e dez anos melhorou entre o período de 1980-1984 comparado com o de 2000-2004, aumentando de 8.4% e de 5.6% para 19.5% e 17.1%, respectivamente. A sobrevida relativa em cinco e dez anos para os pacientes com idades entre 15 a 34 anos foi de 52.3% e 47.9%, respectivamente, em 2000-2004 ²¹². Dados semelhantes do *Swedish Cancer Registry 2011* mostraram aumento da sobrevida até os 80 anos, embora mais proeminente em pessoas mais jovens ²¹³.

A descoberta e validação de novos biomarcadores são de fundamental importância para permitir melhor estratificação de risco, em particular para aqueles pacientes que não podem ser classificados com os biomarcadores disponíveis atualmente. Nas últimas décadas, os refinamentos no diagnóstico e na abordagem terapêutica têm aumentado a perspectiva de sobrevida do paciente com LMA ¹⁶. Os avanços na elucidação da patogênese molecular dessa doença levam a crer que o futuro do tratamento será marcado pela terapêutica dirigida a cada genótipo específico.

No Brasil, dados referentes à incidência de LMA, bem como à caracterização clínica, laboratorial e molecular dos pacientes são escassos, ainda que vários centros de hematologia no país realizem testes moleculares ao diagnóstico, especialmente a detecção do equivalente molecular da $t(15;17)(q24;q21)$, o gene de fusão *PML/RAR α* nos portadores de leucemia promielocítica aguda (*APL*) ²¹⁴. Fagundes *et al* demonstraram que aparentemente os pacientes brasileiros com LMA apresentaram taxas de sobrevida inferiores às relatadas na literatura ²¹⁵. Além disso, na população brasileira é difícil avaliar a resposta real ao tratamento instituído em

relação à recidiva da LMA, já que a alta porcentagem de óbitos ocorre durante a indução e é atribuída em parte à dificuldade no tratamento de suporte ²¹⁵.

Diante disso, o presente estudo tem como objetivo investigar a frequência de mutações no *DNMT3A* em uma coorte de 415 pacientes adultos jovens com LMA que foram incluídos no grupo *HOVON*, bem como a frequência das mutações em *IDH1*, *FLT3* e *NPM1* em 149 portadores de LMA atendidos pelo HC/UFGM. Objetiva-se ainda investigar a correlação dos marcadores estudados com características clínicas e laboratoriais e com a evolução clínica dos pacientes em cada respectiva população.

Os resultados poderão contribuir para melhor conhecimento da LMA em nosso meio. Ademais, a caracterização molecular mais detalhada dos pacientes estudados poderá contribuir para a estratificação de risco, de crucial importância para o prognóstico e tratamento dos mesmos, em especial aqueles do grupo de CN-LMA.

PARTE 1

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a associação das mutações no gene *DNMT3A* com características clínicas e laboratoriais e com a evolução clínica em pacientes adultos portadores de LMA incluídos no estudo do HOVON.

3.2 Objetivos específicos

Padronizar a técnica de sequenciamento do gene *DNMT3A*.

Analisar as mutações no gene *DNMT3A*.

Classificar os tipos de mutações somáticas encontradas no gene *DNMT3A*.

Verificar a prevalência das mutações no gene *DNMT3A* na população de pacientes adultos com LMA *de novo*, não-*APL* e idade inferior a 60 anos do grupo do *HOVON*.

Correlacionar a presença das mutações no gene *DNMT3A* com perfis de metilação do DNA e de expressão gênica.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Tipo de estudo

O estudo é um coorte retrospectivo que foi conduzida no Serviço de Hematologia e Laboratório de Biologia Molecular da *Erasmus University Medical Center, Rotterdam*, Holanda.

4.2 População de estudo

Foram estudadas 415 amostras de aspirado de medula óssea de portadores de LMA, colhidas ao diagnóstico, que estavam armazenadas no Laboratório de Hematologia da *Erasmus University Medical Center, Rotterdam*, Holanda. Os pacientes foram tratados de acordo com os protocolos do *HOVON* (Grupo cooperativo Holandês e Belga de Hematologia) para LMA denominados HO04, HO04A, HO29, HO42 e HO42A (<http://www.hovon.nl>), no período de 1987 a 2008.

As análises foram realizadas mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em conformidade com a Declaração de Helsinki. O estudo foi aprovado pela *Erasmus University Medical Center*, CKVO No. 94-14, CKVO 2000-08, MEC: METC EUR/AZR, 29 Novembro 2000.

4.2.1 Critérios de inclusão

Pacientes incluídos nos protocolos do *HOVON* (HO04, HO04A, HO29, HO42, HO42A e HO43):

- Os pacientes com diagnóstico recente de LMA *de novo* confirmada por citopatologia (Classificação FAB de LMA: FAB-M0-M2 e FAB-M4-M7);
- Idade entre 15 e 60 anos inclusive;
- Assinatura do TCLE;
- OMS *performance status* < 3.

4.2.2 Critérios de exclusão ou de não-inclusão

- Neoplasia concomitante em atividade, exceto carcinoma de cérvix uterino estágio I e carcinoma basocelular;
- Crise blástica de leucemia mielóide crônica ou leucemia secundária à doença mieloproliferativa;
- LMA FAB-M3 ou LMA com t(15;17) ou LMA com *PML/RARα*;
- Alterações da função renal e do fígado definidas por:
 - a. TGO e/ou TGP > 3x valor normal ou
 - b. Bilirrubina > 3x valor normal ou
 - c. Creatinina sérica > 3x valor normal (após hidratação adequada)(exceto quando provavelmente secundárias à própria infiltração do órgão pela LMA).
- Sorologia positiva para HIV;
- Doença pulmonar ou neurológica graves;
- LMA recidivada;
- TMO anterior;

- Doença concomitante grave e/ou não controlada (por exemplo: Diabetes Mellitus não controlado, infecção, Hipertensão Arterial, etc.);
- Disfunção cardíaca definida como:
 - a. Infarto do miocárdio há menos de 6 meses do diagnóstico de LMA ou
 - b. Função ventricular esquerda reduzida, com fração de ejeção <50% ou
 - c. Angina instável ou
 - d. Arritmias cardíacas instáveis
- Gravidez.

4.2.3 Variáveis em estudo

- Idade ao diagnóstico
- Sexo
- Número GL no sangue periférico ao diagnóstico
- Número de plaquetas no sangue periférico ao diagnóstico
- Número de blastos na medula óssea ao diagnóstico
- Subtipos de LMA
- Classificação FAB
- Citogenética
- Presença de mutações dos genes *NPM1*, *CEBPA*^{UM ϕ} , *CEBPA*^{DM^s}, *IDH1*, *IDH2*, *FLT3*-ITD, *FLT3*-TDK[‡], *NRAS*, *KRAS*, *cKIT*, *WT1* e expressão do *EVI1*

^{ϕ} mutação única no *CEBPA*; ^{s} dupla mutação no *CEBPA*; [‡]domínio tirosina quinase (TDK) no *FLT3*.

4.2.4 Definição de algumas variáveis em estudo

Os pacientes foram classificados de acordo com as categorias de risco de citogenético: (I) favorável: t(8;21) ou inv(16); (II) adversa: inv(3)/t(3;3), t(6;9), alterações no 11q23 que não a t(9;11), del5, del5(q), del7, del7(q), ou t(9,22) e alterações monossômicas ²¹⁶; e (III) intermediário: o restante dos casos de LMA. Os desfechos para SG foram óbito e vivo no último *follow-up* (censurado), medido a partir da entrada no estudo. Os desfechos para SLR foram recidiva da doença ou óbito por qualquer causa, medido a partir de RC.

4.2.5 Desfechos do estudo

- a. Remissão Completa
- b. Sobrevida Livre de Recidiva (definida somente para os pacientes que adquiriram a RC; medida a partir da data de aquisição da remissão até a data da recidiva ou óbito por qualquer causa. Pacientes sem dados de recidiva ou óbito no último *follow-up* são censurados na data da última consulta)
- c. Sobrevida Geral (definida para todos os pacientes do estudo; medida a partir da data de admissão no estudo até a data do óbito por qualquer causa. Pacientes sem dados de óbito no último *follow-up* são censurados na data do último contato em que estiveram vivos)

4.3 Metodologia

4.3.1 Amostras biológicas e análises das mutações

Aspirados de medula óssea de portadores de LMA do diagnóstico foram coletadas após consentimento informado conforme a Declaração de Helsinki. Aberrações moleculares

em *FLT3*-ITD ou domínio tirosina quinase (TDK), *NPM1*, *NRAS*, *KRAS*, *IDH1*, *IDH2*, cKIT, WT1, *CEBPA*^{UM}, *CEBPA*^{DM} e expressão do *EVI1* foram determinados como descrito previamente pelo grupo^{92; 151; 217; 218; 219}.

4.3.2 Pesquisa da mutação do gene *DNMT3A*

Recentemente, foi relatado que a maioria das mutações no gene *DNMT3A* ocorreu na segunda parte do gene, principalmente no codon R882^{133; 134; 135}.

Baseados nestas regiões foram desenhados vários *primers* para a amplificação do DNA complementar (cDNA). As mutações do *DNMT3A* em torno do *hotspot* (R882) foram amplificações com FWD-5'-TGATTGATGCCAAAGAAGTGTC e REVE-5'-GACTGGCACGCTCCATGAC-3', seguido por análise de desnaturação cromatográfica líquida de alta performance (DHPLC), usando um sistema de onda transgenômica (Omaha, NE, USA). Os produtos foram executados a 60,4°C.

Logo após, para pesquisa das mutações no *DNMT3A* determinadas no presente estudo, foram analisados os fragmentos do exon 10 até o último exon por amplificações cDNA. Todas as amostras foram amplificadas usando os seguintes *primers* desenhados para este estudo, FWA-5'-ACGACAGCGATGAGAGTGAC-3' e REVA-5'-CCCAATCACCAGATCGAATG-3' ou 5'-FWC-TGAGGACTCCATCACGGTG-3' e REVC-5'-CGGTATTTCCGCCTCTGTG-3'. O primeiro par de *primers* gerou fragmentos de 956pb e se estendeu do exon 10 ao exon 18. O segundo continha cerca de 900pb e abrange o exon 17 até a parte não codificadora. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas na presença de trifosfato de desoxinucleósido 25 mM, *primers* 20 pM, 1 mM de MgCl₂, Taq polimerase, dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão (10X) (Invitrogen, Breda, Holanda). As condições de amplificação foram como se segue: 1 ciclo de 5 minutos a 94 ° C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 ° C, 1 minuto a 56 ° C, 1 minuto a 72 ° C, e um ciclo de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram subsequentemente sequenciados utilizando *primers* apropriados (FWA-5'-ACGACAGCGATGAGAGTGAC-3' e FWB-5'-GCTTTCTGGAGTGTGCGTAC-3' ou 5'-FWC-TGAGGACTCCATCACGGTG-3' e 5'-FWD-TGATTGATGCCAAAGAAGTGTC-3' em analisador genético ABI-PRISM3100 (Applied Biosystems, Nieuwerkerk a/d IJssel, Holanda). Os produtos geraram fragmentos com cerca de 700pb, 530pb, 650pb e de 520pb, respectivamente.

4.3.3 Perfis de expressão gênica e metilação

Todos os casos de LMA foram previamente analisados em outros trabalhos do grupo (HOVON) por Verhaak *et al* em relação à expressão gênica ²²⁰ (*Gene Expression Omnibus; National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/geo; accession no. GSE6891*) e pela Figueiroa *et al* em relação ao perfil de metilação ²²¹ (*accession no. GSE18700*). Para a classificação do gene *DNMT3A* em diferentes subtipos de risco intermediário baseada na expressão gênica ou perfil de metilação do DNA (*HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR*) foram utilizados dados da coorte HOVON. Para tal cálculo, utilizou-se o modelo de regressão logística com regularização de Lasso como relatado previamente ¹⁷⁸.

4.4 Estatística

As associações entre mutações no *DNMT3A* e as características dos pacientes foram determinadas pelo teste χ^2 ou teste exato de Fisher para variáveis categóricas e pelo teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas. As estimativas da distribuição de SG e SLR foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier. O modelo de regressão de Cox (Cox's *proportional hazards model*) foi usado nas análises uni e multivariada, sendo os valores de *P* relatados de acordo com o Teste de Wald. O modelo de Andersen-Gill foi usado para analisar resultado da sobrevida em relação à covariável tempo-dependente.

5 RESULTADOS

5.1 A prevalência da mutação no *DNMT3A* em LMA

Analisou-se a presença da mutação na segunda parte do gene *DNMT3A*, que abrange os domínios *PHD* e metiltransferase em 415 portadores de LMA. Esta parte do gene contém 95% das mutações encontradas no *DNMT3A* e é representada pelo exon 10 até o último exon, isto é, o exon 23. Encontraram-se mutações em 96 dos 415 pacientes (23.1%), sendo 58 mutações *missense* na posição R882 e 38 mutações em outras posições (Figura 11 e 12).

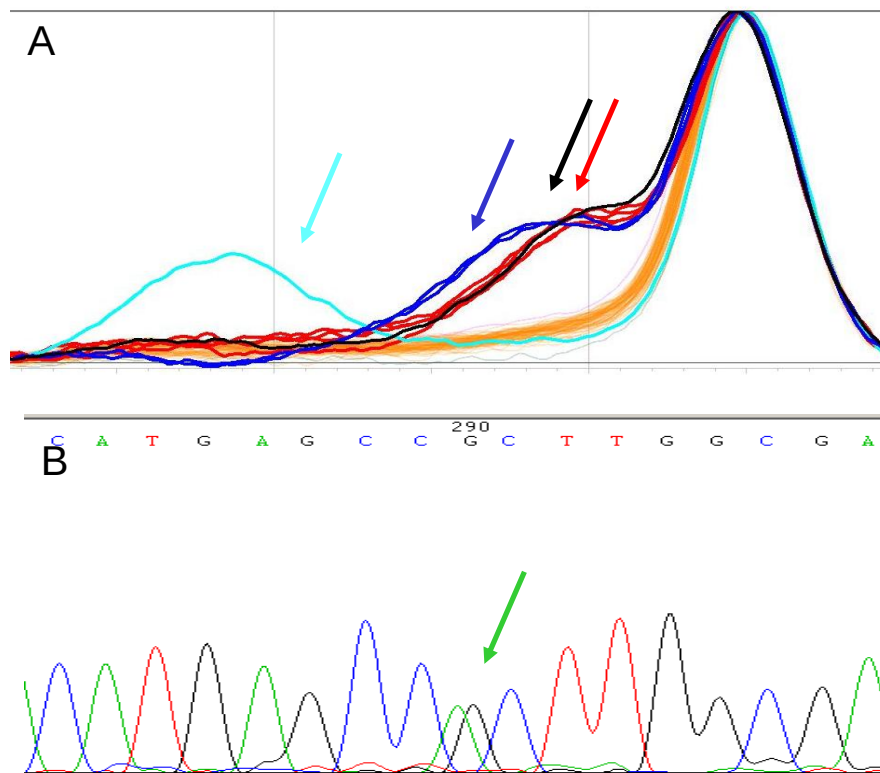


Figura 11. Mutações no gene do *DNMT3A* em portadores de leucemia mielóide aguda estudados.

(A) Perfil das prováveis mutações no gene do *DNMT3A* identificadas pela desnaturação cromatográfica líquida de alta performance (DHPLC), usando um sistema de ondas, avaliados em 96 portadores de LMA. Em laranja, amostras sem mutações. Linhas em vermelho, azul, preto e ciano se referem a amostras com possíveis mutações. (B) Cromatograma mostrando a mutação no gene do *DNMT3A* do tipo G>A R882H (seta verde) identificada pelo sequenciamento.

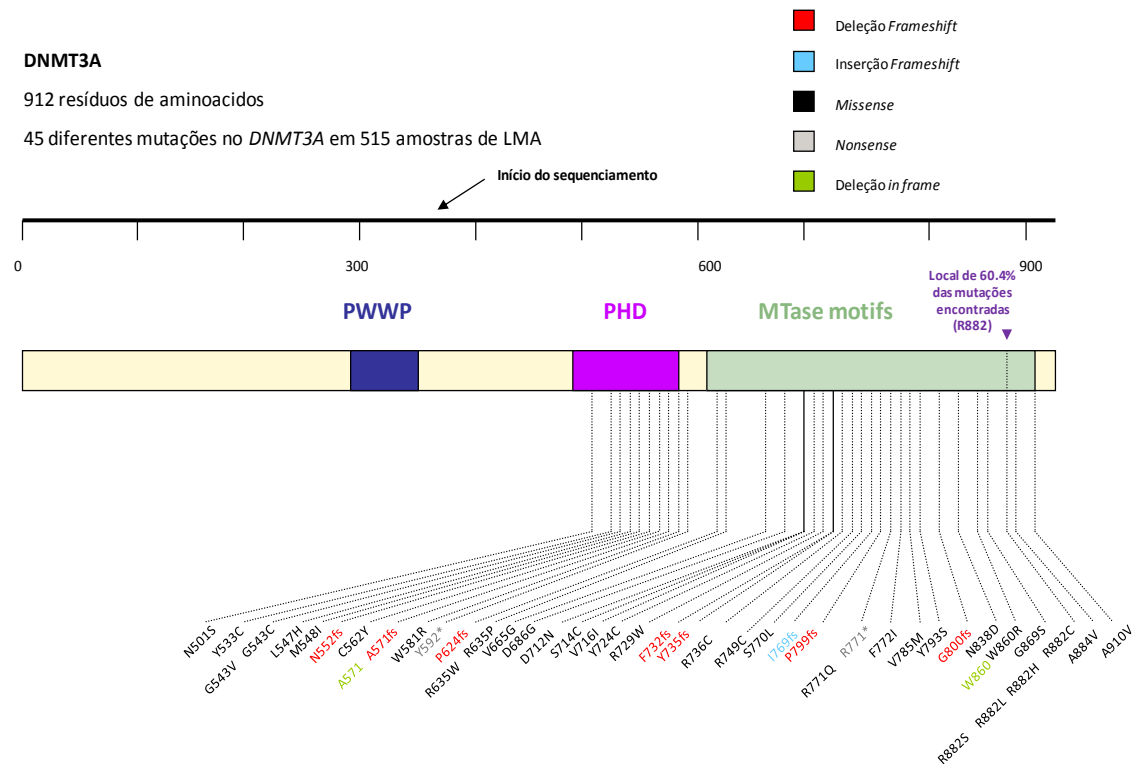


Figura 12. Representação esquemática dos tipos e localizações das mutações no gene *DNMT3A*.
Adaptado de Ribeiro *et al*, 2012

Em dois casos de LMA duas mutações simultâneas foram encontradas no *DNMT3A*. Todas as mutações no *DNMT3A* foram consideradas somáticas de acordo com a *dbSNP* (versão 132). Os portadores de LMA com mutações no *DNMT3A* eram significativamente mais velhos, apresentaram maior número de GL e contagens elevadas de plaquetas em comparação com LMA e *DNMT3A*^{wild-type} (Tabela 3).

Tabela 3- Características clínicas dos 415 pacientes com LMA

	<i>DNMT3A</i> ^{wild-type}	<i>DNMT3A</i> ^{mut}	<i>DNMT3A</i> R882	<i>DNMT3A</i> ^{mut} exceto para codon R882 n=38	P-value
Características clínico laboratoriais	n=319	n=96	mutante n=58		
Sexo, masculino, n (%)	163(51.10)	47(48.96)	31(53.45)	16(42.11)	0.800
Idade ao diagnóstico, mediana em anos (variação)	41(15-60)	50.5(18-60)	51(18-60)	51(18-60)	< 0.001*
Mediana de GL, x10 ⁹ /L (variação)	23.05(0.6-274)	52.9(1.1-278)	54.85(2-278)	48(1.1-220)	< 0.001*
Mediana de Plaquetas, x10 ⁹ /L (variação)	50.5(3-998)	64(10-494)	64.5(10-494)	63.5(10-267)	0.003*
Mediana de blastos na MO, % (variação)	68(0-98)	68(9-98)	70(9-97)	65.5(22-98)	0.940*
FAB subtipo					0.054†
FAB-M0	15(4.7)	1(1.0)	1(1.7)	0	0.180†
FAB-M1	72(22.6)	15(15.6)	9(15.5)	6(15.8)	0.270†
FAB-M2	81(25.4)	23(24.0)	11(19.0)	12(31.6)	0.860†
FAB-M4	64(20.1)	15(15.6)	10(17.2)	5(13.2)	0.580†
FAB-M5	64(20.1)	36(37.5)	23(39.7)	13(34.2)	< 0.001†
FAB-M6	5(1.6)	1(1.0)	0	1(2.6)	‡
RAEB	13(4.0)	3(3.1)	2(3.4)	1(2.6)	0.990†
ND	5(1.6)	2/(2.1)	2(3.4)	0	‡
Citogenética					
Cariótipo Normal	122(38.2)	72(75.0)	46(79.3)	26(68.4)	< 0.001†
t(8;21)	35(11.9)	0	0	0	‡
inv(16)	34(10.6)	0	0	0	‡
del5/del5(q)	13(4.0)	2(2.0)	1(1.7)	1(2.6)	0.650
del7/del7(q)	24(7.5)	3(3.1)	2(3.4)	1(2.6)	0.780
inv(3;3)/t(3;3)	5(1.5)	0	0	0	‡
trissomia 8	27(8.4)	5(5.2)	3(5.1)	2(5.2)	0.390
trissomia 21	7(2.1)	0	0	0	0.860
11q23	25(7.8)	1(1.0)	0	1(2.7)	0.010
Monossomia	22(6.9)	2(2.0)	1(1.7)	1(2.7)	0.080
Complexo	34(10.6)	4(4.1)	3(5.1)	1(2.7)	0.070
Grupo citogenético de risco					< 0.001†
Favorável	57(17.9)	0	0	0	
Intermediário	191(59.9)	85(88.5)	51(88.0)	34(89.4)	
Adverso	64(20.0)	6(6.3)	4(6.9)	2(5.3)	
ND	7(2.2)	5(5.2)	3(5.1)	2(5.3)	
Anormalidades Moleculares					
<i>FLT3</i> ^{ITD}	77(24.1)	39(40.6)	24(41.3)	15(39.4)	0.002
<i>FLT3</i> ^{TKD}	26(8.2)	15(15.6)	9(15.5)	6(15.7)	0.052
<i>NPM1</i> ^{mut}	60(18.8)	73(76.0)	46(79.3)	27(71.0)	< 0.001
<i>CEBPA</i> ^{UM}	7(2.1)	1(1.0)	1(1.7)	0	0.690†
<i>CEBPA</i> ^{DM}	21(6.5)	2(2.0)	0	2(5.2)	0.150
<i>IDH1</i> ^{mut}	11(3.4)	22(22.9)	18(31.0)	4(10.5)	< 0.001
<i>IDH2</i> ^{mut}	23(7.2)	13(13.5)	4(6.9)	9(23.6)	0.086
<i>cKit</i> mutado	22(6.9)	1(1.0)	1(1.7)	0	‡
<i>WT1</i> mutado	21(6.5)	3(3.1)	1(1.7)	2(5.2)	0.311
<i>KRAS</i> mutado	1(0.3)	3(3.1)	2(3.4)	1(2.6)	‡
<i>NRAS</i> mutado	34(10.6)	8(8.3)	4(6.9)	4(10.5)	0.570
<i>EVI1</i> hiperexpresso	39(12.2)	1(1.0)	1(1.7)	0	‡

GL, global de leucócitos; FAB, Classificação americano-britânica francesa; MO, medula óssea; RAEB, anemia refratária com excesso de blastos; *FLT3*-ITD, duplicação interna em tandem do gene *FLT3*; *FLT3*-TKD, uma mutação no domínio da tirosina-quinase do gene *FLT3*; *NPM1*^{mut}, mutação no *NPM1*; *CEBPA*^{UM}, única mutação no *CEBPA*; *CEBPA*^{DM}, dupla mutação no *CEBPA*; *IDH1*^{mut}, mutação no *IDH1*; *IDH2*^{mut}, mutação no *IDH2*; ND, não determinado. *DNMT3A*^{mut}, mutação no gene do *DNMT3A*. O grupo de risco citogenético favorável inclui t(8;21), inv(16) ou t(15;17); o adverso se refere às anomalias inv(3)/t(3;3), t(6;9), 11q23 exceto t(9;11) del5, del5(q), del7, del7(q), t(9;22) ou cariótipo monossômico; o grupo intermediário inclui todos os outros casos.

Valor de *P* não indicados foram calculados utilizando o teste do qui-quadrado 2-sided, e se referem às comparações entre nenhuma mutação *DNMT3A* (*DNMT3A*^{wild-type}) e qualquer mutação no gene *DNMT3A*. * Valores de *P* foram calculados usando o teste de Mann-Whitney para as comparações entre *DNMT3A*^{wild-type} e qualquer mutação no *DNMT3A*. † Valores de *P* foram calculados pelo teste exato de Fisher para as comparações entre *DNMT3A*^{wild-type} e qualquer mutação no *DNMT3A*. ‡ Números muito pequenos para realizar análise estatística confiável.

Em concordância com estudos anteriores, 36/96 (37.5%) das mutações no *DNMT3A* eram FAB-M5 (36 de 100 casos FAB-M5) e 72/96 (75.0%) de *DNMT3A*^{mut} tinham CN-LMA. LMA com t(8;21), inv(16), inv(3;3)/t (3,3) e trissomia do 21 não apresentaram mutações no *DNMT3A*. Além disso, poucas mutações no *DNMT3A* foram encontradas no cariótipo complexo (Tabela 3). Foram também analisadas separadamente 25 portadores de APL, portanto com t(15;17), e encontrou-se apenas 1 paciente com uma mutação no *DNMT3A* (R882) (Figura 12 e Anexo 3). Mutações no *DNMT3A* estão significativamente associadas com o *FLT3*-ITD ($P = 0.002$), bem como com as mutações no gene *NPM1* ($P < 0.001$) e *IDH1* ($P < 0.001$). Em contraste, as mutações no *DNMT3A* foram significativamente sub-representadas nas LMAs com hiperexpressão do *EVII*. A presença de mutações no *DNMT3A* não se correlacionou com mutações recorrentes nos genes *CEBPA*, *NRAS*, *KRAS*, *WT1*, *FLT3*-TKD ou *cKIT* (Tabela 3). A frequência de mutações no *DNMT3A* em portadores de LMA e mais de 60 anos de idade, que foram analisados separadamente, foi de 10/63 (16%). Quatro de 16 (25.0%) LMA secundárias à SMD apresentaram mutações no *DNMT3A*. Mutações no *DNMT3A* também foram encontrados em 2/11 (18.1%) casos de LMA secundários à quimioterapia.

5.2 *DNMT3A*^{mut} como marcador de prognóstico na LMA

A mediana de acompanhamento dos 415 portadores de LMA que estavam vivos no último contato foi de 115.7 meses (variação: 7.2 a 224.1 meses). A mediana de SG de portadores de *DNMT3A*^{mut} foi menor do que a de pacientes com *DNMT3A*^{wild-type} (11.9 meses versus 24.0 meses). As LMA com *DNMT3A*^{mut} não apresentaram taxa de RC significativamente diferente em comparação com os portadores de *DNMT3A*^{wild-type} (ou seja, 88.5% para *DNMT3A*^{mut} versus 79.3% para *DNMT3A*^{wild-type}; $P = 0.058$). A análise de regressão univariada de Cox mostrou que a presença de mutação no *DNMT3A* é um fator

prognóstico desfavorável para SG ($P=0.022$; *Hazard ratio* [HR], 1.38; 95% de intervalo de confiança [IC] 1.04-1.81) e SLR ($P=0.005$; HR, 1.52; 95% IC, 1.13-2.05) (Figura 13A - B).

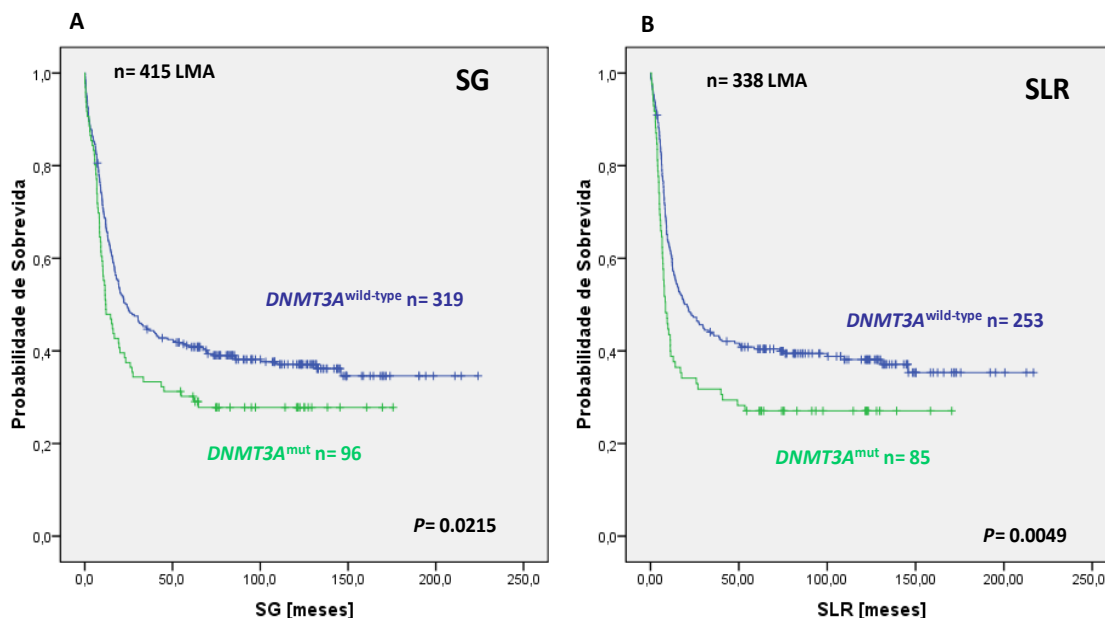


Figura 13. Análise de sobrevida de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA), com ou sem mutações no *DNMT3A*.

As análises de sobrevida foram realizadas na coorte de portadores de LMA e idade inferior a 60 anos e foram excluídos todos os casos de LMA *APLs/t(15;17)*. (A) Sobrevida global (SG). (B) Sobrevida livre de recidiva (SLR).

A análise multivariada mostrou que o *DNMT3A*^{mut} é um indicador de prognóstico desfavorável independente para SG ($P = 0.003$; HR, 1.82; 95% IC, 1.2-2.7) e SLR ($P < 0.001$; HR, 2.2; 95% IC, 1.4-3.3), quando consideramos a idade (variável contínua), contagem de GL, grupo de risco citogenético, *NPM1*^{mut}, *FLT3*-ITD, dupla mutação no *CEBPA* (*CEBPA*^{DM}), mutações nos genes *NRAS*, *WT1*, *cKIT*, *IDH1*^{mut}, *IDH2*^{mut} e hiperexpressão do *EVII* (Tabela 4). As variáveis que independentemente se associaram à SG foram *DNMT3A*^{mut}, *NPM1*^{mut}, *FLT3*-ITD, *CEBPA*^{DM}, categorias de risco citogenético e GL. Dentre esses fatores, *FLT3*-ITD e o GL não foram independentemente associados com SLR (Tabela 4). *DNMT3A*^{mut} não mostrou valor prognóstico independente para RC na análise multivariada.

Tabela 4- Análise multivariada do *DNMT3A* como fator prognóstico para sobrevida global e sobrevida livre de recidiva

	Sobrevida Global			Sobrevida Livre de Recidiva		
	HR	(95%IC)	<i>P value</i>	HR	(95%IC)	<i>P value</i>
<i>DNMT3A</i>	1.82	(1.2-2.7)	0.003	2.20	(1.4-3.3)	<0.001
<i>FLT3</i> -ITD	1.67	(1.2-2.3)	0.002	1.40	(0.9-2.0)	0.060
<i>NPM1</i>	0.44	(0.2-0.6)	<0.001	0.40	(0.2-0.6)	<0.001
<i>CEBPA</i> ^{DM}	0.34	(0.1-0.7)	0.005	0.40	(0.2-0.8)	0.017
<i>NRAS</i>	0.78	(0.4-1.3)	0.341	0.70	(0.3-1.3)	0.310
<i>IDH1</i>	0.76	(0.4-1.3)	0.330	0.87	(0.5-1.5)	0.630
<i>IDH2</i>	0.69	(0.4-1.1)	0.170	0.70	(0.4-1.2)	0.220
<i>EVI1</i>	1.43	(0.8-2.3)	0.145	1.59	(0.8-2.8)	0.120
<i>WT1</i>	1.23	(0.7-2.1)	0.430	1.40	(0.8-2.6)	0.180
<i>cKit</i>	0.54	(0.2-1.3)	0.190	1.22	(0.5-2.8)	0.630
Grupo de risco citogenético*	1.77	(0.9-3.2)	0.050	2.70	(1.3-5.4)	0.003
Idade	1.01	(0.9-1.0)	0.125	1.001	(0.9-1.0)	0.970
GL	1.002	(1.001-1.003)	0.002	1.001	(0.9-1.0)	0.140

GL, global de leucócitos; *FLT3*-ITD, duplicação interna em tandem do gene *FLT3*; *CEBPA*^{DM}, dupla mutação no *CEBPA*; HR, hazard ratio; IC, intervalo de confiança. O grupo de risco citogenético favorável inclui t(8;21), inv(16) ou t(15;17); o adverso se refere às anomalias inv(3)/t(3;3), t(6;9), 11q23 exceto t(9;11) del5, del5(q), del7, del7(q), t(9;22) ou cariótipo monossômico; o grupo intermediário inclui todos os outros casos. As análises de sobrevida foram realizadas na coorte de portadores de LMA *de novo* e idade inferior a 60 anos e foram excluídos todos os casos de leucemias promielocíticas/t(15;17) (n=415). Idade e GL foram analisados como variáveis contínuas.

Para investigar se o TMO alogênico modificava o efeito prognóstico da presença do *DNMT3A*^{mut}, aplicou-se o modelo proporcional de Cox a fim de comparar as mutações no *DNMT3A* e o TMO alogênico como covariável tempo-dependente, incluindo também uma interação entre eles. Para a SG, observou-se uma HR de 1.3507 ($P = 0.066$; 95% IC, 0.98-1.86) para *DNMT3A*^{mut}. A interação do TMO alogênico não foi significativa ($P = 0.615$; HR, 1.173; 95% IC, 0.623-2.189).

Analisando somente as mutações da posição R882 no *DNMT3A*, observou-se uma associação com a piora da sobrevida em relação à SG ($P = 0.0175$; HR, 1.49; 95% IC, 1.07-2.07) e SLR ($P = 0.029$; HR, 1.50; 95% IC, 1.04-2.15) nesta série de portadores de LMA (Figura 14A – B).

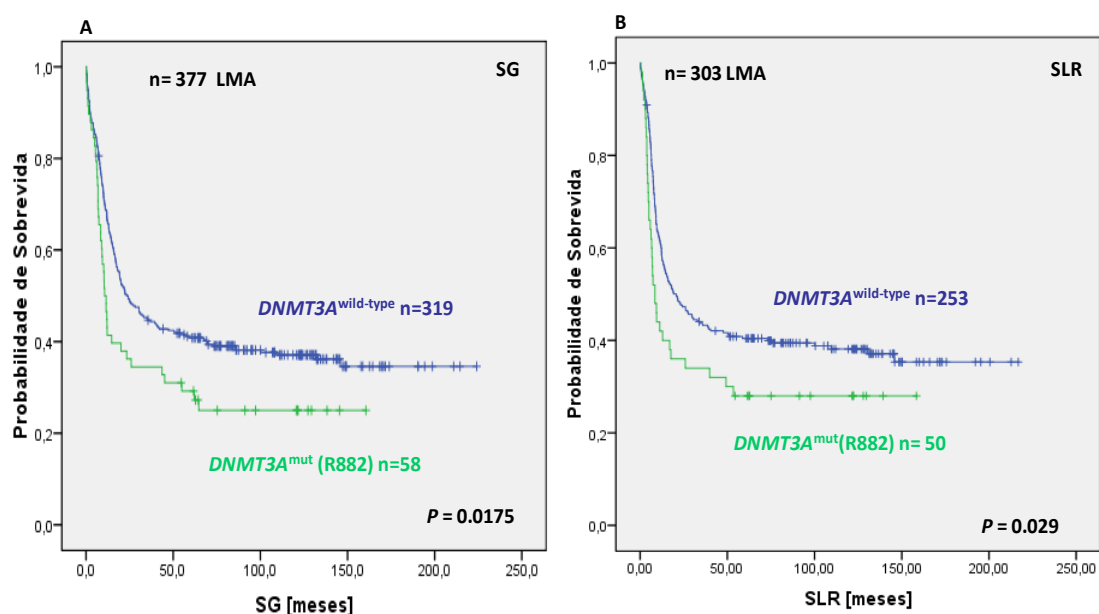


Figura 14. Análise de sobrevida de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA), com ou sem mutações no codon R882 do *DNMT3A*.

As análises de sobrevida foram realizadas na coorte de portadores de LMA e idade inferior a 60 anos e foram excluídos todos os casos de LMA *APLs/t(15;17)*. (A) Sobrevida global (SG) em todos os pacientes com *DNMT3A*^{wild-type} ou mutações no codon R882 do *DNMT3A*. (B) Sobrevida livre de recidiva (SLR) em todos os pacientes com *DNMT3A*^{wild-type} ou mutações no codon R882 do *DNMT3A*.

5.3 Análises do *DNMT3A*^{mut} e resposta ao tratamento no subgrupo *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type}/*CEBPA*^{wild-type} da LMA

Mutações em *DNMT3A* particularmente foram associados com anomalias moleculares, como por exemplo, mutações no *NPM1*, *FLT3* (*FLT3*-ITD), *IDH1* e *IDH2* (Tabela 3). Mutações no *DNMT3A* não foram frequentemente encontradas nas LMAs com *CEBPA*^{DM} (Tabela 3). Estudou-se o valor preditivo de mutações no *DNMT3A* em subgrupos de LMA de acordo com certas alterações moleculares. Dentre as análises desses subgrupos, após excluir os casos de *CEBPA*^{DM} da coorte, a presença das mutações no *DNMT3A* ainda foi capaz de prever inferiores SG ($P = 0.046$; HR, 1.325; 95% IC, 1.01-1.75), e SLR ($P = 0.023$; HR, 1.414; 95% IC, 1.05-1.91; Tabela 5; Figura 15A e 16A).

Tabela 5- DNMT3A como um marcador de prognóstico para sobrevida global e sobrevida livre de recidiva em subconjuntos genotípicos distintos de portadores de leucemia mieloide aguda (LMA)

	SG			SLR		
	DNMT3A*	HR	P	DNMT3A*	HR	P
Subgrupos moleculares em toda a coorte†						
CEBPA ^{wild-type}	94/392	1.325	0.046	83/316	1.414	0.023
NPM1 ^{mut} /FLT3 ^{wild-type}	37/64	1.967	0.075	34/58	1.912	0.089
NPM1 ^{mut} /FLT3-ITD	36/69	1.491	0.179	32/61	1.616	0.133
NPM1 ^{wild-type} /FLT3 ^{wild-type}	20/235	2.167	0.002	17/193	2.781	<0.001
NPM1 ^{wild-type} /FLT3 ^{wild-type} /IDH1 ^{wild-type} /IDH2 ^{wild-type}	10/203	2.830	0.003	8/167	3.812‡	
NPM1 ^{wild-type} /FLT3 ^{wild-type} /CEBPA ^{wild-type}	18/215	2.268	0.002	15/174	2.503	0.002
NPM1 ^{wild-type} /FLT3 ^{wild-type} /CEBPA ^{wild-type} /IDH1 ^{wild-type} /IDH2 ^{wild-type}	8/184	3.987‡		6/149	3.783‡	
Cariótipo Normal	72/194	1.255	0.216	67/164	1.524	0.033
Grupo de risco Intermediário	85/276	1.330	0.073	79/236	1.530	0.011
Subgrupo moleculares dentro do grupo de risco Intermediário§						
CEBPA ^{wild-type}	83/254	1.243	0.179	77/215	1.373	0.064
NPM1 ^{mut} /FLT3 ^{wild-type}	34/59	2.044	0.074	31/54	2.108	0.063
NPM1 ^{mut} /FLT3-ITD	33/65	1.429	0.249	31/59	1.673	0.117
NPM1 ^{wild-type} /FLT3 ^{wild-type}	16/117	2.097	0.013	15/102	2.703	0.001
NPM1 ^{wild-type} /FLT3 ^{wild-type} /IDH1 ^{wild-type} /IDH2 ^{wild-type}	7/91	2.593‡		7/79	4.690‡	
NPM1 ^{wild-type} /FLT3 ^{wild-type} /CEBPA ^{wild-type}	14/98	2.114	0.017	13/84	2.181	0.016
NPM1 ^{wild-type} /FLT3 ^{wild-type} /CEBPA ^{wild-type} /IDH1 ^{wild-type} /IDH2 ^{wild-type}	5/73	4.711‡		5/62	4.616‡	

A sobrevida global (SG) e sobrevida livre de recidiva (SLR) foram determinados em subgrupos distintos indicados. HR indica taxa de risco (*hazard ratio*); CEBPA^{wild-type}, ausência de CEBPA^{DM}, e FLT3^{wild-type}, ausência de FLT3-ITD. *DNMT3A significa o número de mutantes detectados entre o número total de pacientes que estavam presentes no subgrupo indicado. † subgrupos foram definidos dentro do grupo total de 415 pacientes < 60 anos de idade com LMA após exclusão das APLs. ‡ Os números eram demasiado baixos para análise estatística confiável. § Pacientes estudados com < 60 anos e com risco citogenético de risco intermediário.

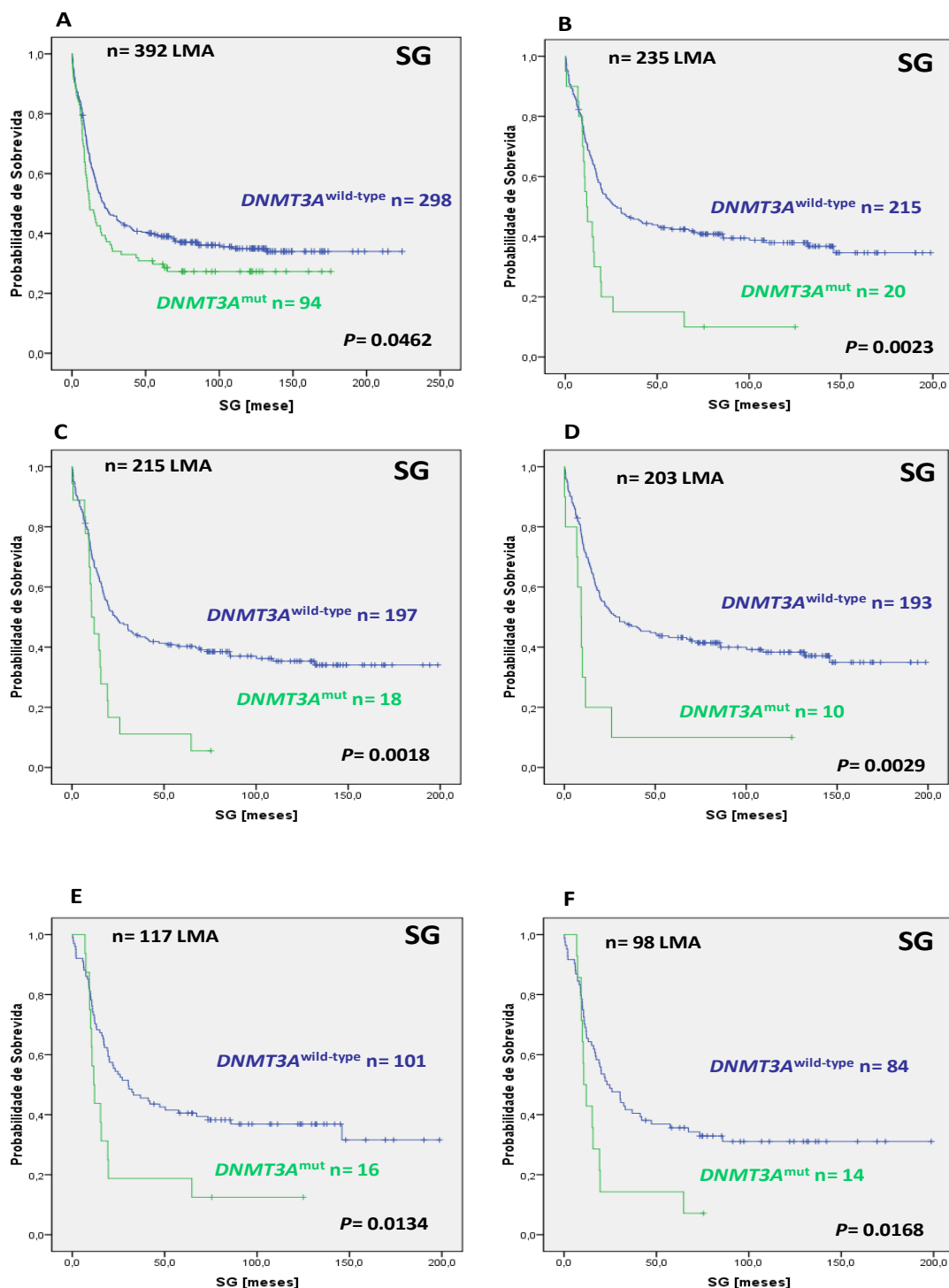


Figura 15. Sobrevida global (SG) de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA), com ou sem mutações no *DNMT3A* em subgrupos genotípicos distintos.

As análises de sobrevida foram realizadas em portadores de < 60 anos, após exclusão dos casos de APL. (A) SG em pacientes sem dupla mutação no *CEBPA* ($CEBPA^{wild-type}$; n=392). (B) SG de pacientes sem mutações *FLT3*-ITD e ausência de mutação no *NPM1* ($NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}$; n=235). (C) SG de pacientes $NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}/CEBPA^{wild-type}$, n=215. (D) SG de pacientes $NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}/IDH1^{wild-type}/IDH2^{wild-type}$, n=203. (E) SG de portadores de citogenética de risco intermediário e $NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}$, n=117. (F) SG de pacientes com citogenética de risco intermediário $NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}/CEBPA^{wild-type}$, n=98.

Analizou-se o valor prognóstico das mutações no *DNMT3A* em cada um dos seguintes subgrupos genotípicos específicos: $NPM1^{mut}/FLT3\text{-ITD}$, $NPM1^{mut}/FLT3^{wild\text{-}type}$, $NPM1^{wild\text{-}type}/FLT3\text{-ITD}$ e $NPM1^{wild\text{-}type}/FLT3^{wild\text{-}type}$. Significativa redução da SG ($P = 0.002$; HR, 2.167; 95% IC, 1.32-3.56) e SLR ($P = 0.001$; HR, 2.781; 95% IC, 1.63-4.75) foi encontrada para *DNMT3A*^{mut} no subgrupo $NPM1^{wild\text{-}type}/FLT3^{wild\text{-}type}$ (Figura 15B e 16B), ao passo que mutações no *DNMT3A* não apresentaram valor preditivo no subgrupo $NPM1^{mut}/FLT3^{wild\text{-}type}$ ou $NPM1^{mut}/FLT3\text{-ITD}$ (Tabela 5). O valor preditivo para reduzida SG ($P = 0.002$; HR, 2.268; 95% IC, 1.36-3.79) e SLR ($P = 0.002$; HR, 2.503; 95% IC, 1.42-4.42) também foi evidente no subgrupo $NPM1^{wild\text{-}type}/FLT3^{wild\text{-}type}/CEBPA^{wild\text{-}type}$ (ausência de dupla mutação no gene *CEBPA*) (Figura 15C e 16C).

Já que as mutações no *DNMT3A* foram freqüentemente encontrados no grupo de risco citogenético intermediário (Tabela 3), foi realizada a mesma análise de sobrevida em subgrupos genotípicos específicos, com resultados semelhantes (Tabela 5). No subgrupo de risco citogenético intermediário, $NPM1^{wild\text{-}type}/FLT3^{wild\text{-}type}$, as mutações no *DNMT3A* foram associadas significativamente com inferiores SG ($P = 0.013$; HR, 2.09; 95% IC, 1.16-3.77) e SLR ($P = 0.001$; HR, 2.70; 95% IC, 1.48-4.89; Figura 15E e 16E). Importante valor preditivo das mutações no *DNMT3A* para resposta inferior ao tratamento também foi encontrado no subgrupo de risco intermediário $NPM1^{wild\text{-}type}/FLT3^{wild\text{-}type}/CEBPA^{wild\text{-}type}$ (SG: $P = 0.017$; HR, 2.11; 95% IC, 1.145-3.907; SLR: $P = 0.016$; HR, 2.18; 95% IC, 1.153-4.125; Figura 15F e 16F). Recentemente, o grupo (HOVON) demonstrou que mutações no *IDH1* apresentam valor prognóstico em LMA com $NPM1^{wild\text{-}type}/FLT3^{wild\text{-}type}$ ¹⁵¹. Embora os números fossem demasiado baixos para uma análise estatística confiável, as altas taxas de HR (Tabela 5) fortaleceram a hipótese de que o valor preditivo das mutações no *DNMT3A* tenha sido independente da presença de mutações no *IDH1*, bem como no *IDH2*.

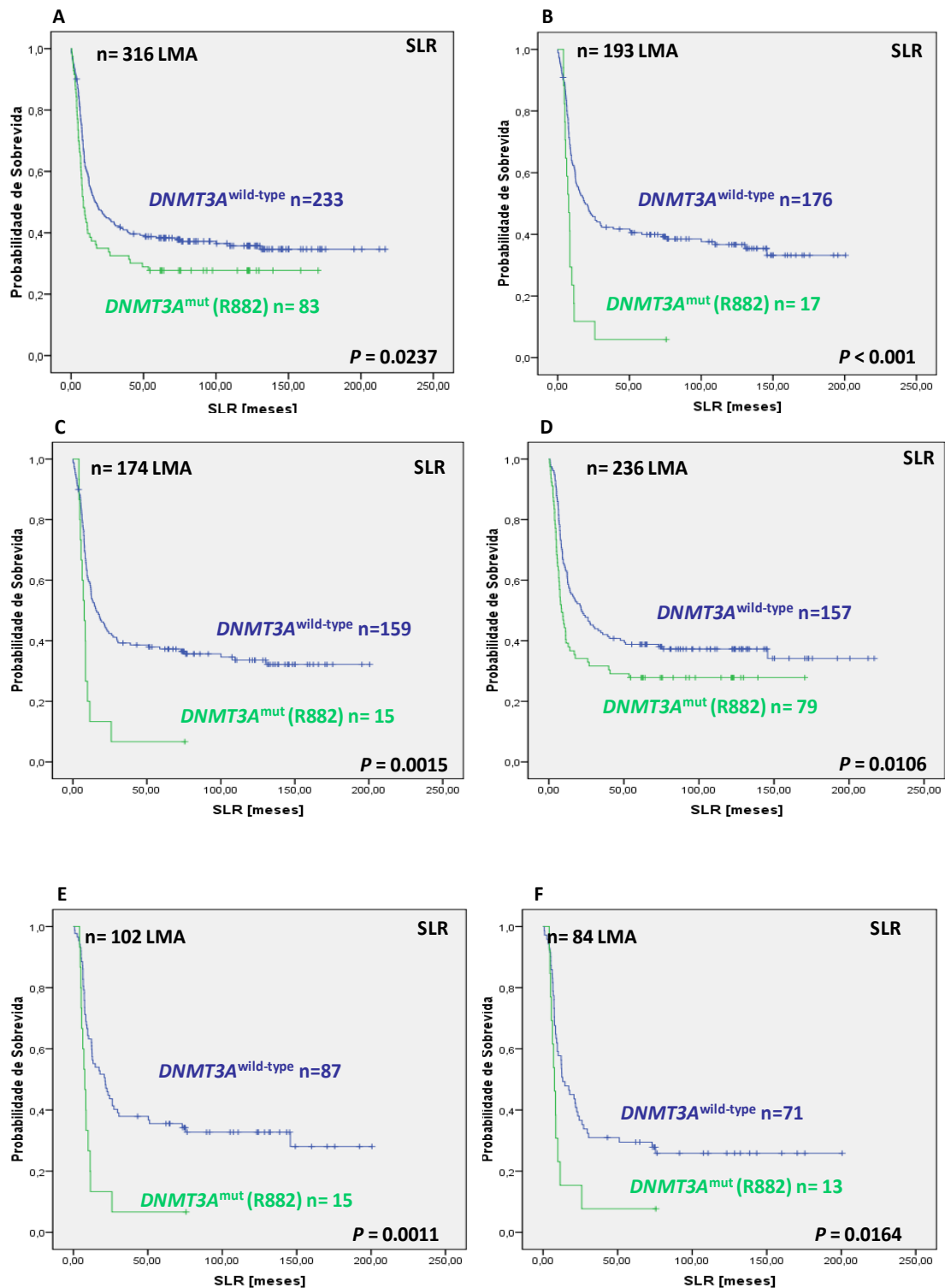


Figura 16. Sobrevida livre de recidiva (SLR) em subgrupos genotípicos específicos de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA), com ou sem mutações no *DNMT3A*, dentro do total de 415 pacientes com idade inferior a 60 anos, excluindo casos de *APL*s/t(15;17).

(A) SLR de portadores de LMA após excluir os casos de *CEBPA*^{DM} (*CEBPA*^{wild-type}). (B) SLR em LMA após excluir os casos de *FLT3*-ITD e *NPM1*^{mut} (*NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type}). (C) SLR em pacientes *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type}/*CEBPA*^{wild-type}. (D) SLR dentro do grupo de risco citogenético intermediário. (E) SLR dentro do grupo de risco citogenético intermediário e com *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type}. (F) SLR de pacientes com citogenética de risco intermediário e *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type}/*CEBPA*^{wild-type}.

5.4 Análises das mutações no *DNMT3A* em relação à metilação do DNA e expressão gênica na LMA.

Investigou-se se as LMA com *DNMT3A*^{mut} estariam associadas a um perfil único (*signatures*) de metilação do DNA ou de expressão gênica. Embora as LMA com *DNMT3A*^{mut} não expressassem um perfil exclusivo de metilação do DNA, como determinado pelo ensaio HELP (*HpaII* tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR) ²²¹ (Figura 17), o grupo (*cluster*) de número 13 que se mostra aglomerado e metilado apresentava grande número de LMA com *DNMT3A*^{mut} (32/45; 71.1%) (Figura 18). É importante ressaltar que esta *cluster* é composta principalmente de LMA do tipo FAB-M4/M5 e *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD ²²¹. Este grupo de LMA também mostrou um perfil único de expressão gênica (Figura 18).

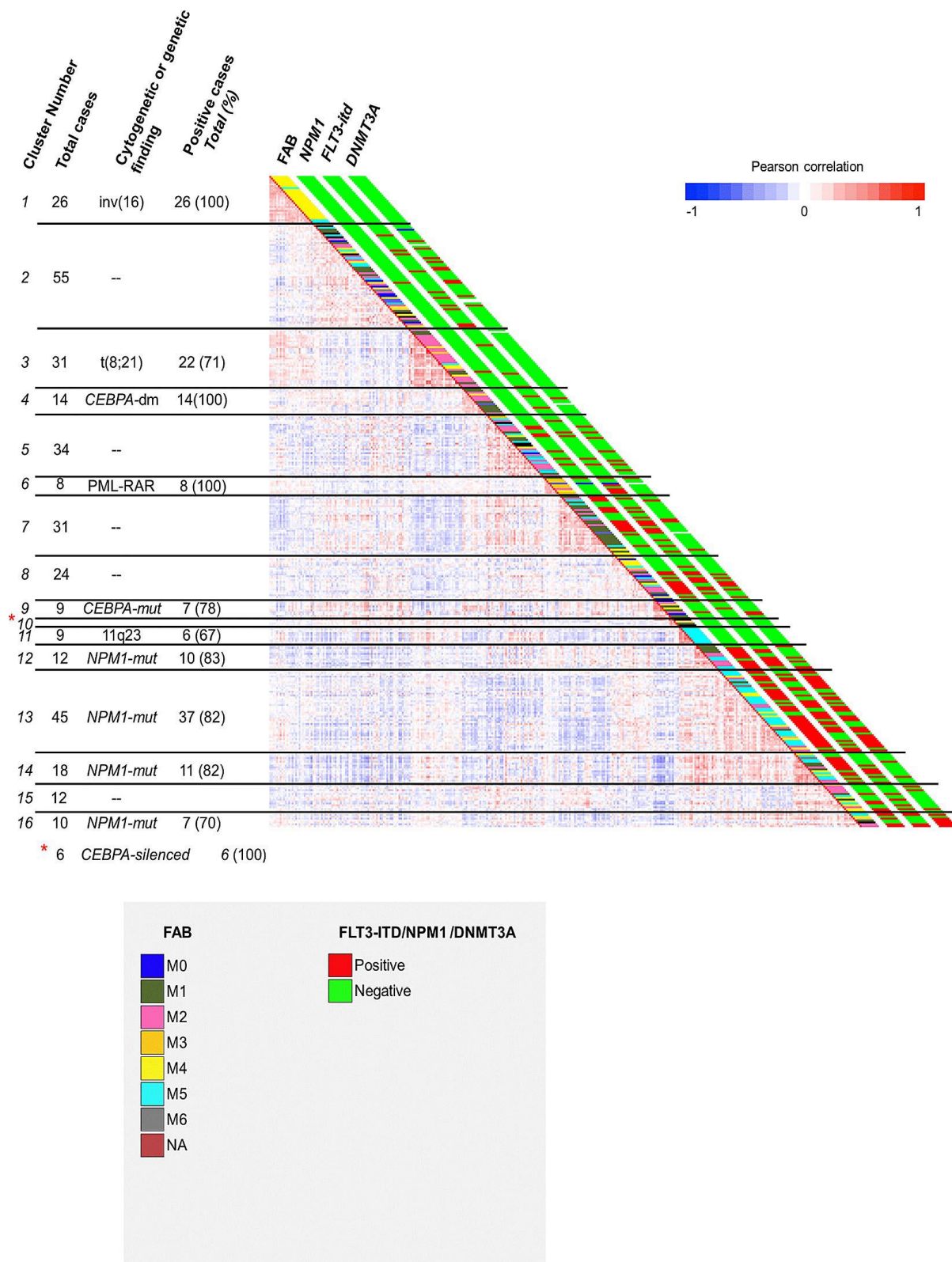


Figura 17. Clustering de amostras de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) de acordo com perfis de metilação com HELP e a distribuição das LMAs com $DNMT3A^{mut}$ e $DNMT3A^{wild-type}$.

Exibição da correlação de Pearson baseada em perfis de metilação de 334 casos de LMA (ver figura anterior de Figueroa *et al* ¹⁵⁹). A presença (vermelho) ou ausência (verde) de mutação no *NPM1*, *FLT3*-ITD ou mutação no *DNMT3A* está indicada para os casos individuais de LMA adjacentes à matriz de correlação. Os tipos FAB são indicados em cores diferentes. Adaptado de Ribeiro *et al*, 2012

De fato, as amostras dos pacientes dentro desta *cluster* hiperexpressa múltiplos genes *HOX*, um perfil que é particularmente associado a LMA com *NPM1*^{mut} 92; 94; 222. Tem sido proposto que o aumento dos níveis de genes *HOX* nestas leucemias são causados por perda da metilação como resultado de mutações em *DNMT3A* 135. No entanto, não foi observado diferença na expressão de genes *HOX*, por exemplo, entre os níveis de expressão de *HOXB5* das LMAs com *NPM1*^{mut}/*DNMT3A*^{mut} das com *NPM1*^{mut}/*DNMT3A*^{wild-type} (Figura 19). Assim, a hiperexpressão do *HOXB5*, que é um representante da expressão de múltiplos genes *HOX* em LMA de humanos, não se associou especificamente com a presença de mutações no *DNMT3A*.

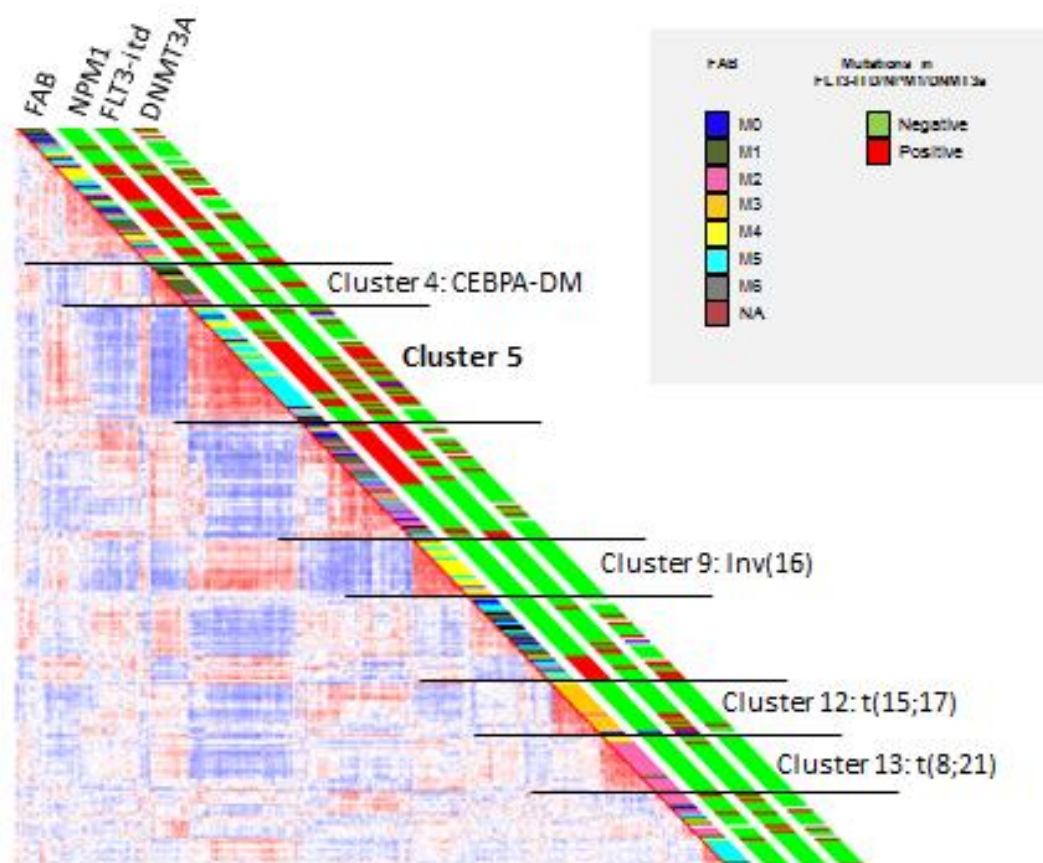


Figura 18. *Clustering* de amostras de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (LMA) com base no perfil de expressão gênica: a distribuição das LMAs com *DNMT3A*^{mut} e *DNMT3A*^{wild-type}.

Exibição da correlação de Pearson com base no perfil de expressão gênica de 285 casos de LMA 223. As *clusters* (em cores diferentes) e presença (em vermelho) ou ausência (em verde) de FLT3-ITD, mutação no *NPM1* e mutação no *DNMT3A* são indicadas para os casos individuais de LMA adjacentes à matriz da correlação. A *Cluster* n° 5 apresenta concentração de pacientes portadores da mutação no *DNMT3A*. Adaptado de Ribeiro *et al*, 2012

Foi realizada análise supervisionada (com o uso do modelo de regressão logística com regularização de Lasso) para comparar a expressão gênica, bem como o perfil de metilação do gene $DNMT3A^{mut}$ com o $DNMT3A^{wild-type}$ em subgrupos distintos, isto é, em $NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}$, $NPM1^{mut}/FLT3-ITD$, $NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}$, $NPM1^{wild-type}/FLT3^{mut}$. Não foi identificado um perfil (*signature*) preditor evidente em qualquer um dos subgrupos de LMA acima mencionados dentro do grupo de risco citogenético intermediário. Portanto, o papel do $DNMT3A$ mutado em relação à metilação do DNA e à expressão gênica em LMA se mantém indefinido.

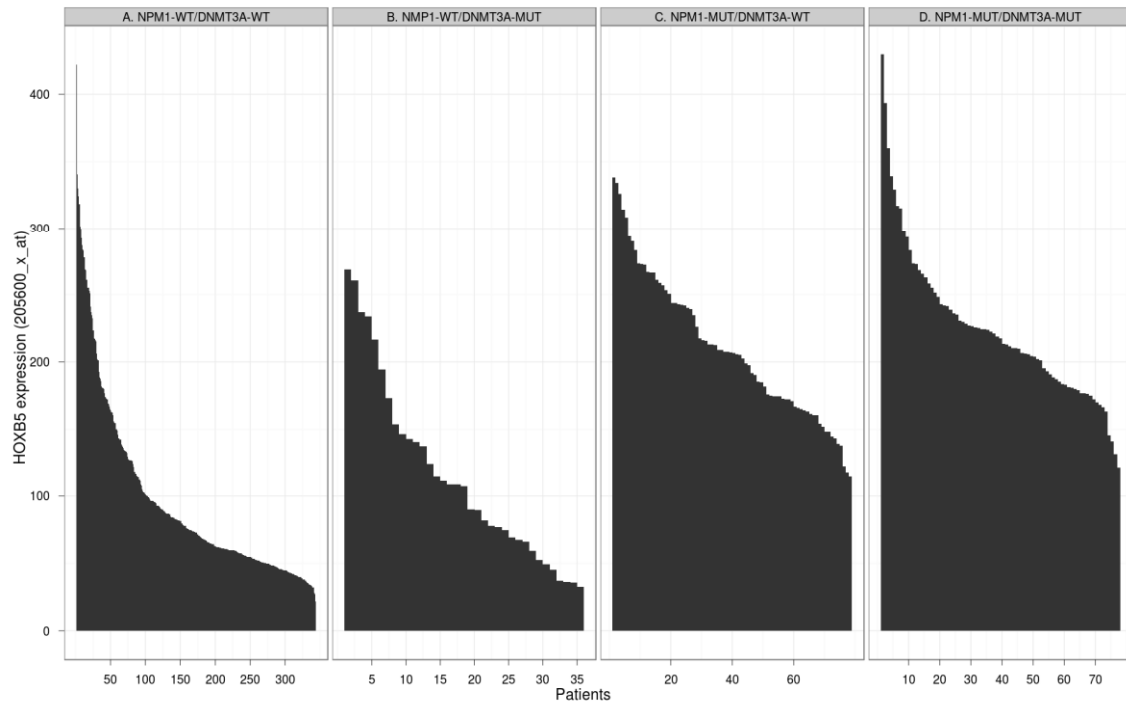


Figura 19. Expressão de HOXB5 em genótipos compostos $DNMT3A/NPM1$.

Adaptado de Ribeiro *et al*, 2012

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi identificado mutações no gene *DNMT3A* em 96/415 (23.1%) LMA *de novo*. Dentre as 96 LMA com mutação no *DNMT3A*, 85 (88.5%) pertenciam ao grupo de LMA com perfil de risco citogenético intermediário. De fato, as mutações no *DNMT3A* são tão freqüentes neste grupo de LMA quanto outras alterações moleculares recorrentes, tais como mutações em *NPM1*, *IDH1*, *IDH2* ou *FLT3-ITD*. As mutações no *DNMT3A* estão freqüentemente associadas a estas mutações em particular, o que está em concordância com os dados relatados previamente^{133; 134; 135}.

Nota-se que, com o uso dessa abordagem para determinar as mutações no *DNMT3A*, um pequeno número de LMA com *DNMT3A*^{mut} pode não ter sido identificado. A análise da mutação no cDNA foi realizada somente na segunda metade do gene *DNMT3A*, parte essa que contem a região dos domínios PDH e metiltransferase os quais, de acordo com estudos anteriores, abrigam > 95% das mutações do *DNMT3A*^{133; 134; 135}. Mutações no *DNMT3A* foram consideradas novas mutações somáticas em casos não relatados como polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) de acordo com a versão dbSNP 132. A utilização de cDNA para seqüenciamento dos nucleotídeos poderia ser outra causa de não identificação de certas “mutações não sinônimas” (*missense*) ou de “mutações que alteram ou interrompem o marco de leitura” (*frameshift*) que acarretariam o “decaimento de RNA mensageiro mediado por mutação sem sentido” (*nonsense-mediated RNA decay*)¹³³. Entretanto, esse fenômeno ocorreu em apenas uma minoria das mutações em estudos anteriores. Apesar disso, a freqüência das mutações evidenciadas aqui foi semelhante às freqüências relatadas em outros estudos, sugerindo que se conseguiu identificar a maioria das mutações no *DNMT3A* das LMAs desta coorte e que as conclusões desse estudo são válidas^{133; 134; 135}.

No presente estudo, portadores de *DNMT3A*^{mut} apresentaram redução significativa da SG quando comparado com pacientes com *DNMT3A*^{wild-type}, independente do número de

mutações no *NPM1*, *FLT3*, ou *CEBPA*, da idade, do grupo de risco citogenético, ou da contagem do GL. Curiosamente, por análise univariada, mostrou-se que em subgrupo genotípico composto de LMA com citogenética de risco intermediário sem *FLT3*-ITDs e mutações no *NPM1* esta associação foi particularmente evidente (SG, $P=0.013$; SLR, $P=0.001$). O efeito prognóstico negativo das mutações do *DNMT3A* nas LMAs com CN-LMA e com *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type} foi previamente relatado por Thol *et al*, enfatizando a relevância deste achado ¹³⁴. Semelhante ao relatado por Thol *et al*, nenhum efeito na sobrevida foi encontrado no subgrupo *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type} do subgrupo de CN-LMA em relação à presença das mutações no *DNMT3A* ¹³⁴. Ao contrário, os mesmos investigadores relataram redução significativa da SG em CN-LMA com *DNMT3A*^{mut}/*NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD comparado com *DNMT3A*^{wild-type}/*NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD, o que não foi evidenciado em nosso estudo. Mesmo assim, analisamos os efeitos de mutações no *DNMT3A* nas LMA de risco citogenético intermediário, e a discrepância é notável, o que enfatiza a necessidade de estudos em coortes maiores.

Mutações no *DNMT3A* poderiam predizer um padrão de metilação do DNA distinto quando comparado com LMA sem mutações neste gene. Yan *et al* relataram que mutações no *DNMT3A* proporcionaram a perda da atividade de metilação e propuseram que essas alterações resultaram em hipometilação e expressão descontrolada de múltiplos genes *HOX* ¹³⁵. Embora, no presente estudo, tenha sido demonstrado que as LMA com *DNMT3A*^{mut} não apresentaram um padrão/perfil bem definido de metilação, uma *cluster* (*cluster* 13) apresentou uma convergência de casos de *DNMT3A*^{mut} (Figura 17). É importante ressaltar que já havia sido descrito que este grupo, *cluster* 13, consistia principalmente de LMA classificadas como FAB-M4/M5 e que apresentavam genótipo *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD ^{92; 221}. Além disso, este grupo de pacientes apresentaram também único perfil de expressão gênica (*signature*), incluindo a hiperexpressão de múltiplos genes *HOX* ^{92; 94; 222}. Portanto, precisava ser elucidado se este perfil na expressão dos genes *HOX*, isto é, com aumento significativo da

expressão de múltiplos genes *HOX*, foi de fato provocado por hipometilação dos promotores do genes *HOX* como resultado de mutações no gene *DNMT3A*, como foi relatado por Yan *et al* ¹³⁵. Muitos pesquisadores demonstraram anteriormente que o perfil de expressão dos genes *HOX* estava particularmente associado com LMA com *NPM1*^{mut} ^{92; 94; 222}. No grupo de pacientes estudados aqui, foi demonstrado que LMA com *DNMT3A*^{mut} sem mutações no *NPM1* não apresentaram este perfil de expressão de gene *HOX*; ou seja, os genes *HOX* não foram hiperexpressos nessas LMA (Figura 19). Além disso, os genes *HOX* hiperexpressos também foram encontrados em *DNMT3A*^{wild-type}/*NPM1*^{mut} ^{92; 94; 222}. Vassiliou *et al* mostraram, recentemente, que a expressão da mutação no *NPM1* no compartimento mielóide, através do modelo em camundongo *NPM1*^{mut} *knock-in*, foi associada a forte aumento da expressão de genes *HOX* ²²⁴. Portanto, o papel da mutação no *DNMT3A* no controle aberrante de genes *HOX* permanece indefinido. Camundongos com *DNMT3A*^{mut}/*NPM1*^{mut} poderiam esclarecer qual seria o efeito do *DNMT3A*^{mut} nos progenitores mielóides e na expressão dos genes *HOX* no contexto das mutações do gene *NPM1*.

7 CONCLUSÕES

A padronização da amplificação e sequenciamento do gene *DNMT3A* foram definidos e analisados 4 fragmentos para as mutações no gene do *DNMT3A*.

Foram identificadas 45 tipos de mutações somáticas no gene *DNMT3A* na população de pacientes adultos com LMA analisados.

As mutações no *DNMT3A* são freqüentes no grupo de risco citogenético intermediário e estão associadas a outras alterações moleculares recorrentes, tais como mutações em *NPM1*, *IDH1*, *IDH2* e *FLT3-ITD*, bem como ao subtipo FAB-M5 e CN-LMA.

Encontraram-se mutações em 96 (23.1%) dos 415 pacientes adultos com LMA *de novo*, não-*APL* e idade inferior a 60 anos do grupo do *HOVON*, sendo 58 mutações *missense* na posição R882 e 38 mutações em outras posições. A freqüência das mutações evidenciadas aqui foi semelhante às freqüências relatadas em outros estudos sendo a maioria das mutações do tipo *missense* na posição R882, sugerindo que se conseguiu identificar as mutações no *DNMT3A* das LMAs desta coorte com a técnica utilizada e que as conclusões desse estudo são válidas.

O presente estudo demonstrou que as LMA com *DNMT3A*^{mut} não apresentaram um padrão/perfil bem definido de metilação nem perfil único de expressão gênica.

Foi demonstrado aqui efeito prognóstico da mutação no gene *DNMT3A* na LMA e o importante valor preditivo das mutações no *DNMT3A* para resposta inferior ao tratamento também foi encontrado no subgrupo de risco intermediário *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type}/*CEBPA*^{wild-type}.

PARTE 2

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo geral

Avaliar o prognóstico de portadores de LMA atendidos no HC/UFGM baseando-se na associação entre a presença de mutações nos genes *NPM1* e *IDH1* e de *FLT3*-ITD com características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico.

8.2 Objetivos específicos

Verificar a frequência de mutações nos genes *NPM1* e *IDH1* e de *FLT3*-ITD ao diagnóstico em portadores de LMA atendidos no HC/UFGM.

Determinar a SG e SLR dos portadores de LMA atendidos no HC/UFGM.

Avaliar a associação entre a presença das alterações genéticas estudadas com o *clearance* de blastos na medula óssea avaliado 15 dias após o início do tratamento quimioterápico de indução.

9 MATERIAIS E MÉTODO

9.1 Tipo de estudo

O estudo é uma coorte retrospectiva que foi conduzido nos Serviços de Hematologia e Laboratórios de Biologia Molecular do HC/UFGM em Belo Horizonte, Minas Gerais e da *Erasmus University Medical Center, Rotterdam, Holanda*.

9.2 População de estudo

Foram identificados 233 portadores de LMA e idade superior a 16 anos que foram identificados no banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular do HC/UFGM, diagnosticados e tratados entre Abril de 2004 a Março de 2013 no Hospital das Clínicas do HC/UFGM, em Belo Horizonte. O Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais é uma instituição pública e referência para tratamento de doenças hematológicas para as pessoas que vivem em Belo Horizonte e em outras cidades do Estado. Os pacientes foram incluídos consecutivamente, mas não representam a totalidade dos pacientes diagnosticados no Estado.

Dos 233 pacientes, 52 (22.6%) apresentaram *APL* e foram excluídos deste estudo. Trinta e um pacientes (31/233; 13.3%) foram excluídos por não apresentarem amostra de medula óssea, colhida ao diagnóstico, armazenada no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço. Outro paciente foi excluído devido à falta de dados clínicos essenciais. Portanto, para o propósito deste estudo, 149 pacientes foram analisados retrospectivamente. Não houve exclusão devido à idade, presença de comorbidades, *status performance*, condições socioeconômicas, LMA secundária, estratégia de tratamento, nem devido à ocorrência de óbito precoce antes do início da quimioterapia. O Fluxograma de inclusão e exclusão dos pacientes do presente estudo está representado na Figura 20.

As informações sobre o quadro clínico-hematológico e evolução dos pacientes foram obtidas pela análise dos prontuários.

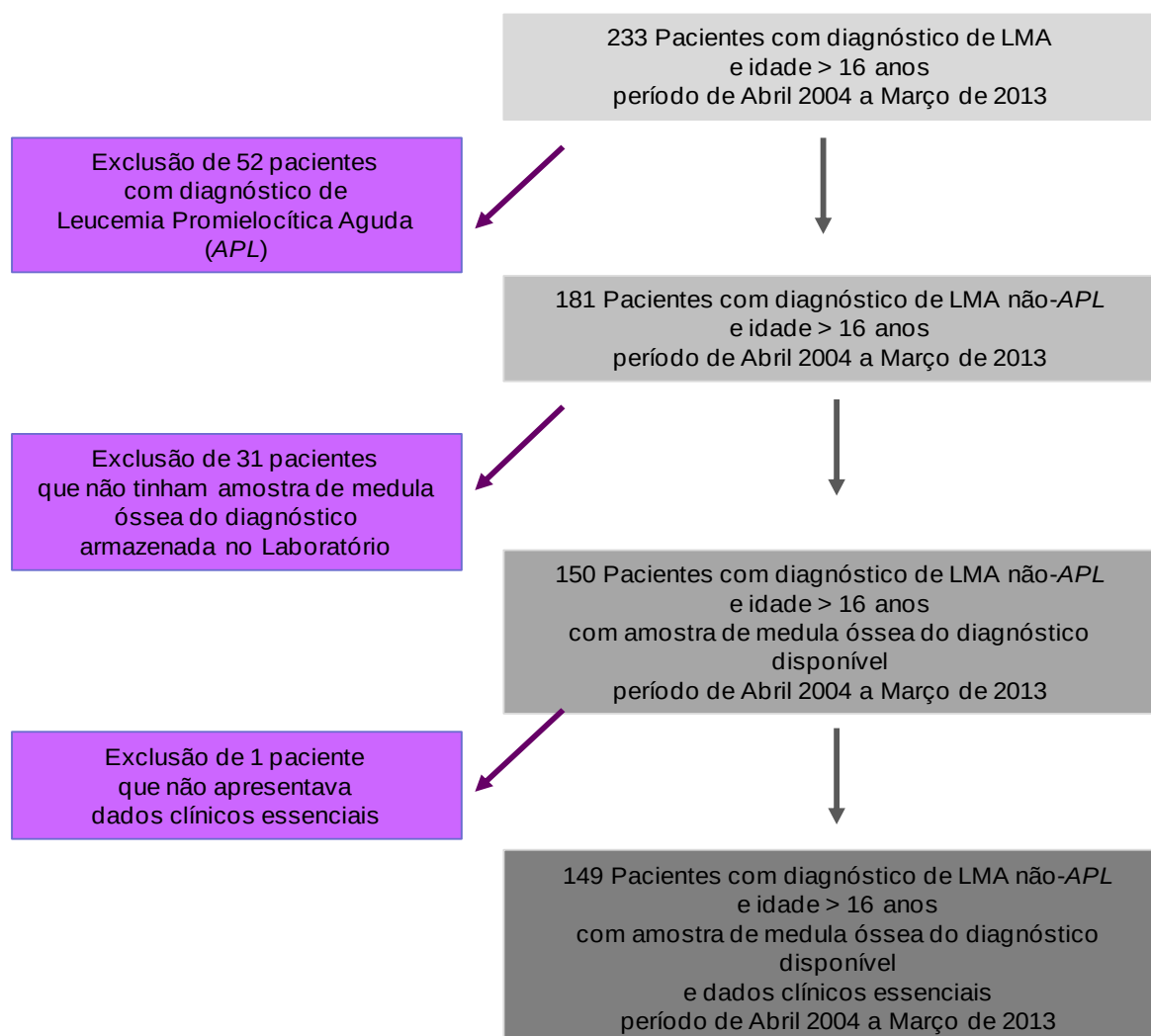


Figura 20. Fluxograma de inclusão e exclusão dos portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) estudados.

Os pacientes receberam quimioterapia com intenção de alcançar a RC se eles tinham menos de 60 anos, ou entre 60 e 70 anos, mas sem comorbidades graves. A quimioterapia consistiu em daunorrubicina 60 mg/m²/dia por 3 dias associada a *cytosina arabinoside* (Ara-C) 200 mg/m²/dia em infusão intravenosa contínua durante 7 dias, conhecido como esquema "7+3 de indução". Um segundo curso inicial precoce de quimioterapia com altas doses de Ara-C 3 g/m² (*Hidac*), administrado a cada 12 horas nos dias 1, 3 e 5 e associado ou não a 60 mg/m²/dia de daunorrubicina durante 3 dias consecutivos, conhecido como "dupla indução",

foi oferecido para os pacientes com idade inferior a 65 anos, nos quais a avaliação precoce da medula óssea realizada por mielograma entre os dias 14 e 17 (D15) do início da quimioterapia de indução convencional (*clearance* precoce de blastos na medula óssea avaliado no D15) mostrou leucemia persistente e boas condições clínicas. Leucemia persistente foi definida como a presença de mais de 5% de células blásticas no aspirado de medula óssea no D15. Para doentes com menos de 5% de células blásticas no aspirado de medula óssea do D15, porém com mais do que 5% de células blásticas no D35 do início da quimioterapia, um segundo tratamento de indução com *Hidac* foi realizado. A terapia pós-remissão variou de acordo com o risco citogenético e a idade. Para pacientes jovens (< 60 anos), consistiu de dois cursos de *Hidac* associado a daunorrubicina para pacientes de baixo risco citogenético; e um curso de dose padrão de Ara-C e daunorrubicina mais etoposídeo, seguido por um curso de *Hidac* e daunorrubicina para pacientes de risco citogenético intermediário ou alto. O TMO alogênico foi oferecido para os pacientes do grupo citogenético de risco intermediário e alto em primeira RC, caso houvesse doador disponível. Para pacientes idosos (> 60 anos), a terapia pós-remissão foi definida de acordo com as condições clínicas e a presença de comorbidades. Para os pacientes sem a intenção de alcançar RC, definidos como pacientes acima de 60 anos e/ou portadores de comorbidades graves e/ou *performance status* igual ou superior a 2, as abordagens alternativas foram o uso de baixas doses de citarabina (20 mg duas vezes por dia, durante 10 dias, por via subcutânea), hidroxiureia ou cuidado de suporte.

9.2.1 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo COEP-UFMG como adendo ao projeto "*Desenvolvimento de metodologia para caracterização e quantificação das alterações genéticas no gene NPM-1 em pacientes com leucemia mielóide aguda*", (aprovação no COEP 98/10; CAAE – 0098.0.203.000 - 10). As análises foram realizadas mediante consentimento informado, em conformidade com a Declaração de Helsinki.

9.2.2 Critérios de inclusão

- Pacientes com data de diagnóstico de LMA entre Abril de 2004 a Março de 2013, confirmada por citopatologia (Classificação FAB de LMA FAB-M0-M2 e FAB-M4-M7) durante o período de 2004 a 2008, ou baseado na classificação da OMS após 2008, ou pela detecção das alterações citogenéticas $t(8;21)(q22;q22)$ ou $inv(16)(p13;q22)$;
- Idade igual ou superior a 16 anos;
- Assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável em caso de óbito (Anexo 4);
- Disponibilidade de DNA, RNA total ou DNA complementar obtidos das amostras colhidas ao diagnóstico, com qualidade e concentração adequadas para a análise.

9.2.3 Critérios de exclusão ou de não-inclusão

- LMA FAB-M3 ou LMA com $t(15;17)$ ou LMA com *PML/RAR α* ;
- Pacientes com dados clínicos essenciais incompletos;
- Crise blástica de leucemia mielóide crônica;
- LMA recidivada.

9.2.4 Variáveis em estudo

- Idade ao diagnóstico
- Sexo
- Número de GL e blastos no sangue periférico ao diagnóstico
- Níveis séricos de LDH
- Percentual de células blásticas apresentando o antígeno CD34[¥]
- Subtipos de LMA (*de novo* versus LMA secundária[§])

- Classificação FAB
- Citogenética
- Presença de mutações no gene *NPM1* e de *FLT3*-ITD
- *Clearance* precoce de blastos na medula óssea avaliado no D15
- Número de ciclos de quimioterapia de indução (dupla indução)
- Quimioterapia com intenção de atingir RC ou outro tipo de tratamento
- Evolução clínica (RC, SG, SLR, mortalidade precoce, refratariedade)^ϕ

9.2.5 Definição de algumas variáveis em estudo

[¥]A expressão do antígeno CD34 foi considerada positiva quando presente em mais de 20% das células blásticas da medula óssea analisadas ao diagnóstico ¹¹.

[§]LMA secundária foi definida como qualquer citopenia persistente e anterior ao diagnóstico, bem documentada, de etiologia desconhecida e com duração superior a 6 meses, ou evolução para LMA quando ocorrer no contexto de uma SMD diagnosticada anteriormente ou neoplasia mieloproliferativa, ou se ela ocorreu após qualquer tratamento anterior com quimioterapia para a outra doença neoplásica ¹⁹. Todos os outros casos foram definidos como LMA *de novo*.

^ϕOs critérios para a definição de RC foram contagens normais de GL, neutrófilos e plaquetas e ausência de células blásticas no sangue periférico; mielograma mostrando medula óssea com porcentagem inferior a 5% de blastos no D35; e ausência de leucemia extramedular. Falhas na remissão foram classificadas como (i) óbito precoce, definido como óbito por qualquer causa que ocorra entre o diagnóstico e a normalização das contagens de células no sangue periférico ou (ii) LMA refratária, definida como a incapacidade de alcançar RC após o segundo curso de indução devido à doença persistente (>5% de células blásticas na medula óssea no D35 da terapia de indução). SLR foi definida como o período de tempo entre

a RC até a recaída ou óbito por qualquer causa, e a SG como o período a partir do diagnóstico da LMA até o óbito ou último contato.

9.2.6 Desfechos do estudo

- a. Mortalidade precoce
- b. *Clearance* precoce de blastos na medula óssea avaliado no D15
- c. Remissão Completa
- d. Sobrevida Livre de Recidiva
- e. Sobrevida Geral
- f. Refratariedade

9.3 Metodologia

9.3.1 Amostras biológicas e testes moleculares

9.3.1.1 Extração de DNA e RNA

Foram usadas como material primário neste estudo amostras de DNA e RNA extraídas de leucócitos de sangue venoso e medular colhidas ao diagnóstico, em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), utilizando o reagente TRIzol[®] (*Invitrogen*) ou kits comerciais (*Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA*), seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes. O cDNA usado na reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) foi obtido utilizando a enzima *MMLV* (*Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA*).

9.3.1.2 Quantificação de ácidos nucleicos e síntese de cDNA

Para mensurar a concentração de ácidos nucleicos, alíquotas de 2 µl de cada amostra foram submetidas à leitura da densidade ótica a 260 nm (DO_{260}) utilizando-se um espectrofotômetro Biophotometer (*Eppendorf*). Nesse comprimento de onda, os ácidos nucleicos apresentam absorvância máxima de radiação UV, de modo que as concentrações foram estimadas por meio da relação 1U de $A_{260} = 40 \mu\text{g}$ de RNA/mL e 1U de $A_{260} = 50 \mu\text{g}$ de DNA/mL. A razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) foi considerada como indicativo de pureza das amostras, uma vez que a leitura a 280 nm (DO_{280}) permite estimar a contaminação com proteínas. Foram utilizadas preparações apresentando razão A_{260}/A_{280} entre 1.7 e 2.0.

Uma vez extraído e quantificado, o RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA com o kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (*Applied Biosystems, USA*), seguindo as instruções do fabricante.

9.3.1.3 Pesquisa de mutações do gene *IDH1*

A pesquisa das mutações do gene *IDH1* foi realizada parcialmente no *Erasmus University Medical Center, Rotterdam*, Holanda. As amostras de cDNA coletadas durante o período de 2004 a 2010 foram transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular da *Erasmus University Medical Center* para a análise do gene *IDH1*. Inicialmente, as amostras foram validadas para análise após serem testadas para o gene constitutivo *PBGD* (*Porphobilinogen deaminase*) por PCR em tempo real (*ABI Prism 7500 Real Time PCR System*), usando células das linhagens *SKOV3* e *HL60* como controles e *primers* descritos anteriormente²²⁵. Portanto, as amostras coletadas entre os anos 2004 a 2010 foram analisadas pela pesquisadora através da reação de sequenciamento descrita por Abbas *et al*¹⁵¹, como indicado abaixo:

A pesquisa das mutações no gene *IDH1* foi determinada por amplificações de cDNA usando os *primers* FW1-IDH1 cDNA WAVE 5'-CTTCAGAGAAGCCATTATCTG-3' e REV2-IDH1 cDNA WAVE 5'-TCACTTGGTGTGTAGGTTATC-3'. Todas as reações de PCR foram realizadas a uma temperatura de 60°C, na presença de trifosfato de desoxinucleósido 25 mM, 15 pM de *primers*, 2 mM de MgCl₂, Taq polimerase, e 1X tampão (Invitrogen). As condições de amplificação foram como se segue: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 72°C, e um ciclo de 7 minutos a 72°C. Em seguida, os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento utilizando o sequenciador da ABI-PRISM3100 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram seqüenciados com o *primer* FW-IDH1 cDNA WAVE (IDH1 R132) (Tabela 6).

As amostras coletadas entre os anos 2010 a 2013 foram analisadas no Laboratório de Hematologia Molecular do HC/UFGM, pela mestrandia Nathália Gomide Cruz, utilizando a reação descrita a seguir:

Para o sequenciamento da região do exon 4 do gene *IDH1* foi feita uma reação de PCR prévia para amplificação da região de interesse, utilizando-se o par de *primers* IDH-F e IDH-R, gerando um produto de 420 pb, como descrito por Patel *et al* ²²⁶. A cada um dos *primers* foi adicionada uma "cauda" M13, a fim de criar sítio de ligação para os oligonucleotídeos a serem utilizados na reação de sequenciamento, deixando livre a sequência alvo amplificada. As sequências dos oligonucleotídeos estão apresentadas na Tabela 6. Para a mistura desta reação de PCR foram utilizados 20 pM de cada um dos oligonucleotídeos, 0.2 mM de *dNTP* de cada *dNTP* (*dATP*, *dCTP*, *dGTP* e *dTTP*), 2.0 mM de MgCl₂, tampão 10X PCR Buffer e 1.0 U de Taq DNA Polymerase Platinum (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), que foram adicionados a 0.75 µg de DNA para um volume final de 50 µL.

Tabela 6- Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR, RT-PCR e sequenciamento

Genes	Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Reação
IDH1	FW1-IDH1 cDNA WAVE	CTTCAGAGAAGCCATTATCTG	PCR e sequenciamento
	REV2-IDH1 cDNA WAVE	TCACTTGGTGTGTAGGTTATC	
IDH1	IDH-F	TGTAAAACGACGGCCAGTGTACTCAGAGCCTTCGCTTTCTGC	PCR
	IDH-R	CAGGAA ACAGCTATGACCGCAACATGACTTACTTGATCCCC	
IDH1	M13 F	TGTAAAACGACGGCCAGT	Sequenciamento
	M13 R	CAGGAAACAGCTATGACC	
NPM1	FORW6	GTTCTCTCCCAAAGTGAAGC	RT-PCR
	NPM-REV6	ACCATTTCATGTCTGAGCACC	
NPM1	FORW6	GTTCTCTCCCAAAGTGAAGC	Sequenciamento
	REV-B	TTCTTGGCAATAGAACCTGGAC	
FLT3-ITD	FLT3-11	GCAATTTAGGTATGAAAG CCAGC	PCR
	FLT3-12	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC	

A desnaturação inicial foi realizada em um ciclo de 95°C por 7 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 64°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A última etapa consistiu de uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. Foram utilizados os termocicladores *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Germany) e *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Nas reações de sequenciamento, foi utilizado o kit comercial *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Para a preparação da mistura da reação foram utilizados 1.1 pM de oligonucleotídeo senso ou reverso, tampão de sequenciamento 5X e 1.0 µL de *Big Dye®*, que foram adicionados a 5-10 ng de produto de PCR purificado, para um volume final de 10.5 µL.

A desnaturação inicial foi realizada em um ciclo de 96°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 45 segundos. A última etapa consistiu de uma etapa de extensão final a 60°C por 4 minutos. Foram utilizados os termocicladores *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Germany) e *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Os produtos de PCR foram purificados com o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) e, em seguida, realizado o sequenciamento no *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, USA). As reações de sequenciamento

foram realizadas utilizando o *Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As seqüências geradas foram analisadas usando o *software Sequencher 5.1* (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA).

9.3.1.4 Pesquisa de *FLT3*-ITD

A pesquisa da duplicação interna em tandem do gene *FLT3* foi realizada por PCR convencional, como parte do protocolo rotineiro do Serviço, no Setor de Biologia Molecular do Laboratório Central do HC/UFG.

Foram utilizados *primers* previamente descritos por Nakao *et al* ²²⁷ (Tabela 6) e as condições da reação foram: desnaturação a 94°C durante 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 40 segundos, hibridação a 63°C durante 40 segundos e extensão a 72°C durante 90 segundos, com extensão final a 72°C durante 5 minutos.

A presença de *FLT3*-ITD foi verificada pela presença de banda (s) adicional (is) à de 329 pb, correspondente ao fragmento selvagem ^{99; 228}. Devido à rotineira utilização dessa técnica na pesquisa de mutações *FLT3*-ITD, os resultados visualizados em gel de agarose foram considerados definitivos, sem a necessidade de validação adicional.

9.3.1.5 Pesquisa de mutações no gene *NPM1*

As amostras foram testadas para a pesquisa de mutações no gene *NPM1* em projeto de colaboração (pós-doutorado da aluna Juliana Godoy Assumpção e mestrado da aluna Nathália Gomide Cruz).

Resumidamente, para o sequenciamento dos exons 11 e 12 do gene *NPM1* foi realizada uma reação de RT-PCR prévia para amplificação da região de interesse, usando o par de *primers* FORW6, desenhado pelas pesquisadoras, e NPM-REV6, descrito por Ottone *et al* (Tabela 6), gerando um produto de 378 pb ²²⁸. As condições da reação foram: desnaturação inicial de 95°C por 7 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos,

anelamento a 64°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados com o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) e, em seguida, realizado o sequenciamento no *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, USA).

As reações de sequenciamento foram realizadas usando o *Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As seqüências dos *primers* senso (FORW6) e reverso (REVB) usados estão descritas na Tabela 6. As condições da reação foram: desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 45 segundos, e extensão final a 60°C por 4 minutos.

As seqüências geradas foram analisadas usando o *software Sequencher 5.1* (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA).

9.3.2 Mielograma e Cariótipo

A avaliação de resposta precoce na medula óssea ao tratamento vem sendo adotada pelo HC/UFGM desde 1998 e é feita pela contagem de blastos na medula óssea obtida no D15 do início da quimioterapia, através do mielograma. Os esfregaços de medula óssea colhidos ao diagnóstico e no D15 do início da quimioterapia não foram revisados para os fins deste estudo. A análise citogenética foi realizada utilizando o método padrão *reverse hot Giemsa (RHG)-banding*. A definição do clone citogenético e a descrição do cariótipo seguiram a Nomenclatura do Sistema Internacional de Citogenética Humana ²²⁹. Cariótipos foram rotineiramente analisados no momento do diagnóstico e não foram revistos. Para esta análise, o risco citogenético foi definido de acordo com os critérios de classificação definidos pelo MRC ⁶⁴.

9.4 Estatística

Foram utilizados o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher para avaliação das associações não-aleatórias entre as variáveis categóricas e o teste de Mann-Whitney para as variáveis quantitativas. O desfecho para SG foram óbito ou vivo na última data do seguimento (censurado), medido a partir da entrada no estudo. Os desfechos para SLR foram recidiva da doença ou óbito por qualquer causa, medidos a partir da RC. As estimativas da distribuição de SG e SLR foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier. Modelo de regressão de Cox (*Cox's proportional hazards model*) foi usado nas análises uni e multivariada, sendo os valores de *P* relatados correspondentes ao Teste de Wald. Todas as comparações estatísticas usaram valor de *P* bicaudal. O valor de *P* utilizado para definir a significância estatística foi de 0.05.

A análise estatística foi realizada usando o *IBM SPSS Statistics Standard* (*International Business Machines, Armonk, USA*), versão 18.0.

10 RESULTADOS

10.1 Características dos pacientes

Dos 233 pacientes com diagnóstico de LMA, foram excluídos 52/233 (22.6%) casos de APL, 31/233 (13.3%) por não apresentarem amostra de medula óssea armazenada no Laboratório do Serviço e outro paciente devido à falta de dados clínicos essenciais. O grupo de 31 portadores de LMA não incluídos devido à falta de amostra não apresentava a maioria dos dados clínicos essenciais, o que tornaria a inclusão desses pacientes desvantajosa às análises estatísticas. A mediana de idade nesse grupo foi de 73 anos (variação: 19 a 89 anos), sendo 24/31 (77.7%) pacientes com idade $\geq$ a 60 anos. Os dados disponíveis para análise nessa população foram: mediana de GL, de blastos no sangue periférico e de LDH de $5.3 \times 10^9/L$ (n = 20), $4.1 \times 10^9/L$ (n = 12) e 739 UI/ μL (n = 10), respectivamente. A classificação FAB foi avaliada somente em três pacientes (um FAB-M2 e um FAB-M4) e, a citogenética, em 21 casos, sendo 16/21 (76.2%) de risco intermediário e 5/21 (23.8%) de risco adverso. Dos 23 casos analisados, 5/23 (21.7%) eram LMA *de novo* e 18/23 (74%) LMA secundária. A SG dessa população foi de 2.2 meses para 22 portadores com dados disponíveis para cálculo de sobrevida.

Este estudo avaliou 149 pacientes e os dados demográficos clínicos e laboratoriais estão detalhados na Tabela 7. A mediana de idade dos pacientes foi de 49 anos, 74/149 (49.7%) eram do sexo masculino e 113/149 (75.8%) tinham LMA *de novo*.

Um total de 122/149 (81.9%) pacientes receberam quimioterapia com o intuito de alcançar a RC. Dos 27/149 (18.1%) portadores de LMA que não receberam quimioterapia com intenção de alcançar a RC, 21/27 (77.8%) não foram tratados porque apresentaram idade > 65 anos e comorbidades significativas que contra indicaram o tratamento intensivo. Dentre os 6/27 (22.2%) pacientes com menos de 65 anos, apenas um era *de novo* LMA e foi a óbito no dia seguinte ao diagnóstico, devido a condições clínicas precárias. Uma paciente de 17

anos com LMA secundária à anemia de Fanconi, apresentava comorbidades graves que contra indicavam o tratamento intensivo. Os outros quatro pacientes (4/27; 14.8%) com LMA secundária (variação: 51 a 63 anos) apresentaram doenças concomitantes e/ou *status performance* igual ou superior a 2 e foram tratados com citarabina em dose baixa (20 mg por via subcutânea, duas vezes por dia, durante 10 dias), hidroxiureia ou cuidado de suporte. As razões para a não utilização de quimioterapia intensiva estão detalhadas na Tabela 8.

Tabela 7- Características pré-tratamento dos portadores de leucemia mielóide aguda (LMA)

Características	Todos os casos de LMA (n=149)	Pacientes tratados com intenção de alcançar a RC (n=122)
Idade ao diagnóstico, mediana em anos (variação)	49 (18-84)	43 (18-69)
< 60 anos, n (%)	101 (67.8)	97 (79.5)
≥ 60 anos, n (%)	48 (32.2)	25 (20.5)
Sexo masculino, n (%)	74 (49.7)	63 (51.6)
GL no SP, mediana $\times 10^9/L$ (variação)	21.5 (0.5-380.2)	21.5 (0.5-380.2)
Total, n	147	122
GL > $100 \times 10^9/L$, n (%)	25 (17.0)	21 (17.2)
Total, n	147	122
Blastos no SP, mediana $\times 10^9/L$ (variação)	11.0 (0-319.4)	10.4 (0.0-319.4)
Total, n	146	121
LDH sérico, mediana UI/μL (variação)	1181 (237-12013)	1255 (237-11205)
Total, n	127	109
FAB subtipo, n (%)		
FAB-M0	8 (6.7)	7 (6.6)
FAB-M1	35 (29.2)	31 (29.2)
FAB-M2	36 (30.0)	28 (26.4)
FAB-M4	27 (22.5)	26 (24.5)
FAB-M5	10 (8.3)	10 (9.4)
FAB-M6	2 (1.7)	2 (1.9)
FAB-M7	2 (1.7)	2 (1.9)
Total, n	120	106
Grupo de risco citogenético, n (%)		
Favorável	11 (9.2)	11 (11.1)
Intermediário	79 (66.4)	66 (66.7)
Cariótipo Normal	58 (73.4)	49 (48.5)
Adverso	29 (24.4)	22 (22.2)
Total, n	119	99
Antígeno CD34, n (%)		
Positivo	52 (54.7)	45 (55.6)
Negativo	43 (45.3)	36 (44.4)
Total, n	95	81
Tipo de LMA, n (%)		
<i>de novo</i> LMA	113 (75.8)	103 (84.4)
LMA secundária	36 (24.2)	19 (15.6)

LMA, leucemia mielóide aguda; GL no PB, global de leucócitos no sangue periférico; FAB, *French-American-British*; LDH, lactato desidrogenase; Classificação citogenética de risco de acordo com os critérios do MRC⁶⁴. A porcentagem do cariótipo normal se refere ao grupo de risco citogenético intermediário.

Tabela 8. Características clínicas dos 27 portadores de leukemia mielóide aguda (LMA) eleitos para o tratamento paliativo

Características	Casos de LMA (n=27)
Idade ao diagnóstico , mediana em anos (variação)	73.7 (17.8-84.0)
< 65 anos, n (%)	6 (22.2)
≥ 65 anos, n (%)	21 (77.8)
Sexo masculino , n (%)	15 (55.6)
GL no SP , mediana x10 ⁹ /L (variação)	19.9 (1.6-335.6)
Total, n	25
Blastos no SP , mediana x10 ⁹ /L (variação)	12.1 (0.0-189.5)
Total, n	25
LDH sérica , mediana UI/μL (variação)	975.5 (431-12013)
Total, n	18
FAB subtipo , n (%)	
FAB-M0	1 (7.1)
FAB-M1	4 (28.6)
FAB-M2	8 (57.1)
FAB-M4	1 (7.1)
FAB-M5	0
FAB-M6	0
FAB-M7	0
Total, n	14
Grupo de risco citogenético , n (%)	
Favorável	0
Intermediário	13 (65)
Cariótipo Normal	8 (40)*
Adverso	7 (35)
Total, n	20
Tipo de LMA , n (%)	
<i>de novo</i> LMA	10 (37)
LMA secundária	17 (63)
<i>NPM1</i> , n (%)	
<i>NPM1</i> ^{wild-type}	21 (80.8)
<i>NPM1</i> ^{mut}	5 (19.2)
Total, n	26
<i>FLT3</i> , n (%)	
<i>FLT3</i> ^{wild-type}	19 (82.6)
<i>FLT3</i> -ITD	4 (17.4)
Total, n	23
<i>IDH1</i> , n (%)	
<i>IDH1</i> ^{wild-type}	14 (100)
<i>IDH1</i> ^{mut}	0
Total, n	14

LMA, leucemia mielóide aguda; GL no SP, global de leucócitos no sangue periférico; FAB, French-American-British; LDH, lactato desidrogenase; Classificação citogenética de risco de acordo como os critérios do MRC⁶⁴. *Porcentagem relativa ao número total de amostras avaliadas em relação à citogenética. *NPM1*^{mut}, mutação no gene da *nucleophosmin*; *FLT3*-ITD, duplicação interna em tandem no gene do *fms-related tyrosine kinase*; *IDH1*^{mut}, mutação no gene do *isocitrate dehydrogenase 1*.

10.2 A prevalência das mutações nos genes *IDH1* e *NPM1* e da *FLT3*-ITD e suas associações com características clínicas e laboratoriais

10.2.1 *IDH1*

A mutação R132 no *IDH1* foi encontrada em 7/114 (6.1%) dos pacientes (Tabela 9 e Anexo 5). Em 35/149 (23.4%) pacientes não se conseguiu amplificar o cDNA adequadamente. Dentre os 7 portadores de *IDH1*^{mut}, 6 foram classificados como LMA *de novo*, 6 tinham idade inferior a 60 anos, 5 apresentavam CN-LMA e 1 foi classificado como risco citogenético favorável. A mediana dos níveis de GL e blastos no sangue periférico no grupo *IDH1*^{mut} foram de $21.5 \times 10^9/L$ e $10.9 \times 10^9/L$, respectivamente, e a mediana dos valores séricos de LDH foi de 1181 UI/ μ L. Um paciente com *IDH1*^{mut} apresentava, concomitantemente, o genótipo *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD.

10.2.2 *NPM1*

O exon 12 do gene *NPM1* foi sequenciado na amostra de 144/149 (96.6%) pacientes, e mutação foi encontrada em 31 (21.5%) delas (Tabela 9). *NPM1*^{mut} foi detectado em todos os subtipos FAB, exceto FAB-M0 e FAB-M7. Os portadores de *NPM1*^{mut} apresentaram valores significativamente maiores de GL ($P = 0.007$) e contagens de blastos no sangue periférico ($P = 0.003$) ao diagnóstico, quando comparados com pacientes com *NPM1* do tipo selvagem. No entanto, apenas 6/31 (19.4%) dos pacientes apresentou *NPM1*^{mut} e GL acima de $100.0 \times 10^9/L$. Valores séricos de LDH estavam disponíveis em 25/31 pacientes *NPM1*^{mut} e todos apresentaram níveis de LDH acima do limite superior do valor de referência ($P = 0.007$), embora as medianas dos níveis de LDH entre os grupos mutado e selvagem não tenham sido diferentes. A maioria dos pacientes *NPM1*^{mut} apresentavam $< 20\%$ de células blásticas que apresentavam o antígeno CD34 ($P < 0.001$). A presença de *NPM1*^{mut} foi associada à CN-LMA (18/22, $P = 0.001$), bem como à *FLT3*-ITD ($P = 0.040$), mas não se associou com

mutações recorrentes no *IDH1* ($P = 1.000$), nem com o subtipo de LMA (*de novo* ou secundária, $P = 0.105$). Os dados citogenéticos estavam disponíveis para 114/149 (76.5%) pacientes e o *NPM1*^{mut} foi associado com a categoria de risco citogenético intermediário (20/22, $P = 0.022$). Nenhum paciente com *NPM1*^{mut} foi encontrado no grupo citogenético de risco favorável.

10.2.3 *FLT3*

A *FLT3*-ITD foi avaliada em 144/149 (96.6%) pacientes e 20/144 (13.9%) apresentaram a ITD (Tabela 9). Não houve associação do *status* do *FLT3* e idade ($P = 0.204$), sexo ($P = 0.229$), LMA *de novo* ou secundária ($P = 0.164$), subtipos FAB ($P = 0.476$), ou com antígeno CD34 ($P = 0.372$). Os valores das medianas de GL e blastos no sangue periférico no grupo *FLT3*-ITD foram 3 vezes superiores ao do grupo *FLT3*^{wild-type} ($P = 0.008$ e $P = 0.001$, respectivamente). Níveis de LDH estavam disponíveis para 19/20 (95%) pacientes com *FLT3*-ITD e todos eles apresentaram níveis acima do valor de referência ($P = 0.023$). Todos os pacientes *FLT3*-ITD com citogenética disponível ($n = 14$) pertenciam ao grupo de risco citogenético intermediário ($P = 0.014$). A combinação dos genótipos do *FLT3* e do *NPM1* foi observada como se segue: 22/140 (15.7%) eram *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type}, 98/140 (70.0%) *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type}, 12/140 (8.6%) *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*-ITD e 8/140 (5.7%) pacientes apresentavam composição genotípica *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD.

Tabela 9- Associação entre características pré-tratamento e o status de marcadores moleculares em 149 portadores de LMA

Características	NPM1			FLT3			IDH1		
	Mutado (n=31)	wild-type (n=113)	P	Mutado (n=20)	wild-type (n=124)	P	Mutado (n=7)	wild-type (n=107)	P [†]
Idade ao diagnóstico , mediana em anos (variação)	52 (22-78)	49 (18-84)	0.21*	51 (20-77)	47 (17-84)	0.20*	34 (24-65)	48 (17-84)	0.49*
<60 anos, n (%)	20 (64.5)	80 (70.8)	0.52	11 (55.0)	89 (71.8)		6 (85.7)	75 (70.1)	0.67
≥60 anos, n (%)	11 (35.5)	33 (29.2)		9 (45.0)	35 (28.2)	0.19	1 (14.3)	32 (29.9)	
Sexo masculino , n (%)	11 (35.5)	58 (51.3)	0.16	7 (35.0)	64 (51.6)	0.23	5 (71.4)	53 (49.5)	0.43
GL no SP , mediana x10 ⁹ /L (variação)	51.0 (2.2-244.0)	18.0 (0.5-376.0)	<0.01*	69.9 (1.8-223.0)	20.0 (0.49-380.2)	<0.01*	21.8 (0.8-117.0)	26.2 (0.5-380.2)	0.11*
Total, n	31	112		20	123		7	105	
Blastos no SP , mediana x10 ⁹ /L (variação)	40.3 (0.0-231.8)	7.8 (0.0-259.4)	<0.01*	33.9 (0.9-215.9)	8.5 (0.0-319.3)	<0.01*	1.4 (0.0-75.7)	14.0 (0.0-319.3)	0.17*
Total, n	30	112		20	122		7	104	
LDH sérica , mediana UI/μL (variação)	1357 (638-9596)	1138 (237-12013)	0.27*	1747 (687-8758)	1165 (237-12013)	0.06*	794 (508-1077)	1278 (237-9596)	0.05*
Total, n	25	98		19	106		6	93	
LDH sérica , n (%)			0.01†			0.02†			0.27†
≤618 UI/L	0	21 (21.4)		0	23 (21.7)		2 (33.3)	15 (16.1)	
>618 UI/L	25 (100.0)	77 (78.6)		19 (100.0)	83 (78.3)		4 (66.7)	78 (83.9)	
Total, n	25	98		19	106		6	93	
Tipo de LMA , n (%)			0.11†			0.16†			1.00†
de novo LMA	27 (87.1)	82 (72.6)		18 (90.0)	93 (75.0)		6 (85.7)	83 (77.6)	
LMA secundária	4 (12.9)	31 (27.4)		2 (10.0)	31 (25.0)		1 (14.3)	24 (22.4)	
FAB subtipo , n (%)			0.10†			0.48†			0.26†
FAB-M0	0	8 (8.7)		0	8 (7.9)		0	6 (7.0)	
FAB-M1	9 (37.5)	26 (28.3)		7 (41.2)	28 (27.7)		2 (28.6)	25 (29.1)	
FAB-M2	3 (12.5)	31 (33.7)		5 (29.4)	29 (28.7)		2 (28.6)	23 (26.7)	
FAB-M4	8 (33.3)	17 (18.5)		2 (11.8)	25 (24.8)		1 (14.3)	22 (25.6)	
FAB-M5	3 (12.5)	7 (7.6)		3 (17.6)	7 (6.9)		1 (14.3)	8 (9.3)	
FAB-M6	1 (4.2)	1 (1.1)		0	2 (2.0)		0	2 (2.3)	
FAB-M7	0	2 (2.2)		0	2 (2.0)		1 (14.3)	0	
Total, n	24	92		17	101		7	86	
Antígeno CD34 , n (%)			<0.01†			0.37†			0.64†
Positivo	3 (14.3)	47 (66.2)		5 (41.7)	46 (56.1)		2 (40.0)	42 (58.3)	
Negativo	18 (85.7)	24 (33.8)		7 (58.3)	36 (43.9)		3 (60.0)	30 (41.7)	
Total, n	21	71		12	82		5	72	
Grupo de risco citogenético , n (%)			0.02†			0.01†			0.30†
Favorável	0	10 (10.9)		0	11 (11.0)		1 (16.7)	8 (9.3)	
Intermediário	20 (90.9)	55 (59.8)		14 (100.0)	62 (62.0)		5 (83.3)	58 (67.4)	
Adverso	2 (9.1)	27 (29.3)		0	27 (27.0)		0	20 (23.3)	
Total, n	22	92		14	100		6	86	

LMA, leucemia mieloide aguda; GL no SP, global de leucócitos no sangue periférico; FAB, French-American-British; LDH, lactato desidrogenase; Classificação citogenética de risco de acordo como os critérios do MRC⁶⁴. FLT3 mutado, duplicação interna em tandem no gene FLT3; Valor de P não indicados foram calculados utilizando o teste do qui-quadrado 2-sided.*Valores de P foram calculados usando o teste de Mann-Whitney. †Valores de P foram calculados pelo teste exato de Fisher. P[‡] os números eram demasiado baixos para análise estatística confiável.

10.2.4 CN-LMA e subgrupos genotípicos compostos

Uma vez que o principal objetivo da análise destas mutações é refinar o prognóstico dentre os portadores de CN-LMA, foram avaliadas as possíveis associações nesta população específica. Foram identificados 58/119 (48.7%) portadores de CN-AML nesta coorte. Neste subgrupo, *NPM1*^{mut}, *FLT3*-ITD e *IDH1*^{mut} foram encontrados em 18/55 pacientes (32.7%), 9/56 (16.1%) e 5/46 (10.9%), respectivamente (Tabela 10 e Tabela 11).

Valores séricos de LDH estavam disponíveis em 13/18 (72.2%) pacientes *NPM1*^{mut} e todos apresentaram níveis de LDH acima do limite superior do valor de referência ($P = 0.042$), embora as medianas dos níveis de LDH entre os subgrupos *NPM1*^{mut} e *NPM1*^{wild-type} não tenham sido diferentes. A maioria dos pacientes *NPM1*^{mut} eram CD34 negativas ($P = 0.001$). Não houve diferenças nos valores de GL e de blastos no sangue periférico ao diagnóstico, quando comparados os subgrupos *NPM1*^{mut} e *NPM1*^{wild-type}.

A mediana dos valores da contagem de blastos no sangue periférico no subgrupo *FLT3*-ITD foi 4 vezes superior à do subgrupo *FLT3*^{wild-type} ($P = 0.070$), embora também não tenham sido observadas diferenças nos valores das medianas de GL entre esses subgrupos. Apesar de todos os pacientes *FLT3*-ITD terem apresentado níveis de LDH acima do valor de referência, não houve diferenças estatísticas em relação ao subgrupo *FLT3*^{wild-type}. Não foi observado nenhum paciente com *FLT3*-ITD e CN-LMA no subgrupo das LMAs secundárias (Tabela 11).

Considerando-se os subgrupos genotípicos compostos, a presença de *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type} foi detectada em 13/54 (24.1%) pacientes, *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD em 4 (7.4%), *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*-ITD em 5 (9.2%) e *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type} em 32 (59.3%) pacientes. Somente 1/43 (2.3%) paciente apresentou a composição genotípica *NPM1*^{mut}/*IDH1*^{mut}.

Tabela 10- Associação entre características pré-tratamento e o *status* de marcadores moleculares em 58 pacientes LMA e cariótipo normal

Características	<i>NPM1</i>			<i>FLT3</i>			<i>IDH1</i>		
	Mutado (n=18)	wild-type (n=37)	<i>P</i>	Mutado (n=9)	wild-type (n=47)	<i>P</i>	Mutado (n=5)	wild-type (n=41)	<i>P</i> [†]
Idade ao diagnóstico , mediana em anos (variação)	44 (25-78)	49 (17-74)	0.69*	44 (27-67)	47 (18-74)	0.98*	34 (24-59)	48 (17-74)	0.35*
< 60 anos, n (%)	13 (72.2)	29 (78.4)	0.74†	7 (77.8)	36 (76.6)	1.00†	5 (100.0)	29 (70.7)	0.30†
≥ 60 anos, n (%)	5 (27.8)	8 (21.6)		2 (22.2)	11 (23.4)		0	12 (29.3)	
Sexo masculino , n (%)	6 (33.3)	14 (37.8)	1.00	2 (22.2)	20 (42.6)	0.46	5 (100.0)	13 (31.7)	0.06
GL no SP , mediana x10 ⁹ /L (variação)	20.8 (2.2-146.0)	11.3 (0.9-335.6)	0.26*	29.4 (1.8-154.0)	17.6 (0.9-380.2)	0.22*	2.1 (1.4-75.7)	18.1 (0.9-380.2)	0.19*
Total, n	18	37	9	47		5	40		
Blastos no SP , mediana x10 ⁹ /L (variação)	12.2 (0.0-126.8)	3.9 (0-137.1)	0.12*	18.5 (0.9-137.1)	4.6 (0.0-319.3)	0.07*	1.1 (0.1-75.7)	9.3 (0.0-319.3)	0.30*
Total, n	17	37	9	46		5	39		
LDH sérica , mediana UI/μL (variação)	1.050 (638-2.838)	1.082 (269-12.013)	0.91*	1.081 (687-2.150)	1.053 (269-12.013)	0.17*	794 (578-1.053)	1.039 (368-3.796)	0.36*
Total, n	13	32	8	39		4	34		
LDH sérica , n (%)			0.04†			0.17†			1.00†
≤618 UI/L	0	9 (28.1)		0	10 (25.6)		1 (25.0)	7 (20.6)	
>618 UI/L	13 (100.0)	23 (71.9)		8 (100.0)	29 (74.4)		3 (75.0)	27 (79.4)	
Total, n	13	22	8	39		4	34		
Tipo de LMA , n (%)			0.11†			0.09†			1.00†
<i>de novo</i> LMA	16 (88.9)	24 (64.9)		9 (100.0)	33 (70.2)		4 (80.0)	31 (75.6)	
LMA secundária	2 (11.1)	13 (35.1)		0	14 (29.8)		1 (20.0)	10 (24.4)	
FAB subtipo , n (%)			0.90†			0.30†			0.24†
FAB-M0	0	0	0	0		0	0		
FAB-M1	4 (28.7)	9 (30.0)		2 (25.0)	11 (28.9)		1 (20.0)	9 (28.1)	
FAB-M2	3 (21.4)	10 (33.3)		3 (37.5)	10 (26.3)		2 (40.0)	7 (21.9)	
FAB-M4	3 (21.4)	5 (16.7)		0	10 (26.3)		0	8 (25.0)	
FAB-M5	3 (21.4)	4 (13.3)		3 (37.5)	4 (10.5)		1 (20.0)	6 (18.8)	
FAB-M6	1 (7.1)	1 (3.3)		0	2 (5.3)		0	2 (6.3)	
FAB-M7	0	1 (3.3)		0	1 (2.6)		1 (20.0)	0	
Total, n	14	30	8	38		5	32		
Antígeno CD34 , n (%)			<0.01†			0.69†			1.00†
Positivo	1 (8.3)	16 (64.0)		4 (57.1)	14 (45.2)		2 (40.0)	14 (50.0)	
Negativo	11 (91.7)	9 (36)		3 (42.9)	17 (54.8)		3 (60.0)	14 (50.0)	
Total, n	12	25	7	31		5	28		

LMA, leucemia mieloide aguda; GL no SP, global de leucócitos no sangue periférico; FAB, French-American-British; LDH, lactato desidrogenase. *FLT3* mutado, duplicação interna em tandem no gene do *FLT3*; Valor de *P* não indicados foram calculados utilizando o teste do qui-quadrado 2-sided. *Valores de *P* foram calculados usando o teste de Mann-Whitney. †Valores de *P* foram calculados pelo teste exato de Fisher. *P*[†] os números eram demasiado baixos para análise estatística confiável.

Tabela 11- Comparação entre o *status* da mutação nos genes *NPM1*, *FLT3* e *IDH1* entre LMA *de novo* e LMA secundária.

Status mutacional dos genes	Todas LMAs (n=149)	<i>de novo</i> LMA (n=113)	LMA secundária (n=36)	<i>P</i>
<i>NPM1</i>, n (%)				0.105
<i>NPM1</i> ^{wild-type}	113 (78.5)	82 (75.2)	31 (88.6)	
<i>NPM1</i> ^{mut}	31 (21.5)	27 (24.8)	4 (11.4)	
Total, n	144	109	35	
<i>NPM1</i> in NK-AML, n (%)				0.105
<i>NPM1</i> ^{wild-type}	37 (67.3)	24 (60.0)	13 (86.7)	
<i>NPM1</i> ^{mut}	18 (32.7)	16 (40.0)	2 (13.3)	
Total, n	55	40	15	
<i>FLT3</i>, n (%)				0.164
<i>FLT3</i> ^{wild-type}	124 (86.1)	93 (83.8)	31 (93.9)	
<i>FLT3</i> -ITD	20 (13.9)	18 (16.2)	2 (6.1)	
Total, n	144	111	33	
<i>FLT3</i> in NK-AML, n (%)				0.093
<i>FLT3</i> ^{wild-type}	47 (83.9)	33 (78.6)	14 (100.0)	
<i>FLT3</i> -ITD	9 (16.1)	9 (21.4)	0	
Total, n	56	42	14	
<i>IDH1</i>, n (%)				1000 [‡]
<i>IDH1</i> ^{wild-type}	107 (93.9)	83 (93.3)	24 (96.0)	
<i>IDH1</i> ^{mut}	7 (6.1)	6 (6.7)	1 (4.0)	
Total, n	114	89	25	
<i>IDH1</i> in NK-AML, n (%)				1000 [‡]
<i>IDH1</i> ^{wild-type}	41 (89.1)	31 (88.6)	10 (90.0)	
<i>IDH1</i> ^{mut}	5 (10.9)	4 (11.4)	1 (9.1)	
Total, n	46	35	11	

LMA, leucemia mieloide aguda; *NPM1*^{mut}, mutação no gene *NPM1*; *FLT3*^{mut}, duplicação interna em tandem no gene do *FLT3*; *IDH1*^{mut}, mutação no gene *IDH1*. Valores de *P* foram calculados pelo teste exato de Fisher e se referem às comparações entre o grupo de LMA *de novo* e LMA secundária. [‡]Os números eram demasiado baixos para análise estatística confiável.

10.3 Análise da remissão completa, do *clearance* precoce de blastos na medula óssea avaliado no D15 de indução e da sobrevida em 122 pacientes tratados com intenção de alcançar RC

As possíveis interações das mutações genéticas identificadas e a evolução clínica dos pacientes estudados é parte fundamental do estudo. No entanto, a análise da evolução somente faz sentido em pacientes que receberam tratamento quimioterápico com intenção de alcançar RC e, conseqüentemente, têm chance de sobrevida prolongada. Por isso, analisou-se separadamente o subgrupo de 122 pacientes (122/149; 81.8%) que receberam quimioterapia de indução com intenção de alcançar RC.

Neste subgrupo, foram identificados *NPM1*^{mut}, *FLT3*-ITD e *IDH1*^{mut} em 26/118 (22.0%), 16/121 (13.2%) e 7/100 (7.0%) pacientes, respectivamente (Tabela 12). A mediana de idade foi de 43 anos (variação: 18 a 69 anos) e 103/122 (84.4%) tinham LMA *de novo* (Tabela 7). Em relação à classificação de risco citogenética e idade <60 anos, 9/11 (81.8%) pacientes do grupo de risco favorável apresentavam idade <60 anos, 50/66 (75.8%) do grupo de risco intermediário e 21/22 (95.5%) do grupo de risco adverso também tinham idade inferior a 60 anos, embora sem diferenças estatísticas ($P = 0.120$).

10.3.1 Remissão Completa

Um dos 122 pacientes foi excluído dessa análise devido à falta de dados essenciais para avaliar RC. Neste subgrupo, 51/121 (42.1%) pacientes atingiram a RC, 53/121 (43.8%) morreram antes ou durante a indução e 17/121 (14.0%) foram refratários ao tratamento.

Nem o *status* mutacional do *NPM1*, *FLT3* ou do *IDH1*, sozinhos ou em combinação, foram associados com a capacidade de entrar em RC ($P = 0.267$, $P = 0.424$, $P = 0.464$, respectivamente). Outras variáveis, como a idade ($P = 0.265$), idade < ou ≥ 60 anos ($P = 0.507$), LMA *de novo* versus LMA secundária ($P = 0.802$), contagem de GL (P

= 0.939), subtipos FAB ($P = 0.400$), categorias de risco citogenética ($P = 0.104$), antígeno CD34 ($P = 1.000$) e níveis de LDH ($P = 0.274$) não se associaram com a RC.

Tabela 12- Comparação de características pré-tratamento de 122 portadores de LMA tratados com intenção de atingir a remissão completa (n = 122)

Características	NPM1			FLT3			IDH1		
	Mutado (n=26)	wild-type (n=92)	P	Mutado (n=16)	wild-type (n=105)	P	Mutado (n=7)	wild-type (n=93)	P [†]
Idade ao diagnóstico , mediana em anos (variação)	46 (22-68)	43 (18-69)	0.15*	47 (20-67)	43 (18-69)	0.42*	34 (24-65)	44 (17-67)	0.78*
< 60 anos, n (%)	20 (76.9)	76 (82.6)	0.57	11 (68.8)	85 (81.0)	0.32	6 (85.7)	73 (78.5)	1.00
≥ 60 anos, n (%)	6 (23.1)	16 (17.4)		5 (31.2)	20 (19.0)		1 (14.3)	20 (21.5)	
Sexo masculino , n (%)	10 (38.5)	45 (48.9)	0.38	6 (37.5)	52 (49.5)	0.42	5 (71.4)	45 (48.4)	0.43†
GL no SP , mediana x10 ⁹ /L (variação)	52.3 (3.1-244.0)	17.6 (0.5-376.0)	<0.01*	56.8 (1.8-218.0)	21.3 (0.5-380.2)	0.04*	2.1 (0.8-117.0)	28.2 (0.4-380.2)	0.10*
Total, n	31	112		16	105		7	93	
Blastos no SP , mediana x10 ⁹ /L (variação)	43.0 (0.5-231.8)	7.8 (0.0-259.4)	<0.01*	22.1 (0.1-215.9)	8.6 (0.0-319.4)	0.02*	1.1 (24.0-75.7)	13.5 (0.0-319.3)	0.15*
Total, n	25	92		16	104		7	92	
LDH sérica , mediana UI/μL (variação)	1.365 (638-9.596)	1.212 (237-11.205)	0.29*	1.357 (687-8.758)	1.238 (237-11.205)	0.24*	794 (508-1.077)	1357 (237-9596)	0.03*
Total, n	22	83		15	94		6	85	
LDH sérica , n (%)			0.01†			0.07†			0.25†
≤618 UI/L	0	18 (21.7)		0	20 (21.3)		2 (33.3)	13 (15.3)	
>618 UI/L	22 (100.0)	65 (78.3)		15 (100.0)	74 (78.7)		4 (66.7)	72 (84.7)	
Total, n	22	83		15	94		6	85	
Tipo de LMA , n (%)			0.07†			0.46†			1.00†
de novo LMA	25 (96.2)	74 (80.4)		15 (93.8)	87 (82.9)		6 (85.7)	79 (92.9)	
LMA secundária	1 (3.8)	18 (19.6)		1 (6.3)	18 (17.1)		1 (14.3)	14 (15.1)	
FAB subtipo , n (%)			0.11†			0.59†			0.28†
FAB-M0	0	7 (8.9)		0	7 (7.7)		0	5 (6.3)	
FAB-M1	9 (39.1)	22 (27.8)		5 (33.3)	26 (28.6)		2 (28.6)	23 (28.8)	
FAB-M2	2 (8.7)	24 (30.4)		5 (33.3)	23 (25.3)		2 (28.6)	20 (25.0)	
FAB-M4	8 (34.8)	16 (20.3)		2 (13.3)	24 (26.4)		1 (14.3)	22 (27.5)	
FAB-M5	3 (13.0)	7 (8.9)		3 (20.0)	7 (7.7)		1 (14.3)	8 (10.0)	
FAB-M6	1 (4.3)	1 (1.3)		0	2 (2.2)		0	2 (2.5)	
FAB-M7	0	2 (2.5)		0	2 (2.2)		1 (14.3)	0	
Total, n	23	79		15	91		7	80	
Antígeno CD34 , n (%)			<0.01†			0.75†			0.64†
Positivo	3 (15.8)	40 (67.8)		5 (50.0)	40 (56.3)		2 (40.0)	36 (59.0)	
Negativo	16 (84.2)	19 (32.2)		5 (50.0)	31 (43.7)		3 (60.0)	25 (41.0)	
Total, n	19	59		10	71		5	61	
Grupo de risco citogenético , n (%)			0.08†			0.03†			0.50†
Favorável	0	10 (13.0)		0	11 (12.8)		1 (16.7)	8 (10.4)	
Intermediário	16 (88.9)	47 (61.0)		12 (100.0)	54 (62.8)		5 (83.3)	52 (67.5)	
Adverso	2 (11.1)	20 (26.0)		-	21 (24.4)		0	17 (22.1)	
Total, n	18	77		12	86		6	77	

LMA, leucemia mieloide aguda; GL no SP, global de leucócitos no sangue periférico; FAB, French-American-British; LDH, lactato desidrogenase; Classificação citogenética de risco de acordo como os critérios do MRC⁶⁴. FLT3 mutado, duplicação interna em tandem no gene do FLT3. Valor de P não indicados foram calculados utilizando o teste do qui-quadrado 2-sided. *Valores de P foram calculados usando o teste de Mann-Whitney. †Valores de P foram calculados pelo teste exato de Fisher. P[†] os números eram demasiado baixos para análise estatística confiável.

10.3.2 *Clearance* precoce de blastos na medula óssea avaliado no D15 da indução

Um total de 79/122 (64.7%) pacientes apresentavam amostras de esfregaços de medula óssea colhidos no D15 do início da quimioterapia de indução para a avaliação precoce do *clearance* de blastos. As razões para que a medula óssea não tenha sido avaliada no D15 foram: óbito antes do D15 (24/43; 55.8%), condições clínicas que contra indicaram a realização do mielograma (9/43; 20.9%) e material inapropriado para a análise (10/43; 23.2%). A RC foi alcançada em 45/79 (57.0%) pacientes e 14/79 (17.7%) comportaram-se como doença refratária primária.

No D15, 34/79 (43.0%) pacientes apresentavam mais de 5% de blastos no mielograma e, desses, 16/34 (47.0%) entraram em RC. Somente 22/34 (64.7%) pacientes com mais de 5% de blastos no mielograma receberam dupla indução com altas doses de Ara-C como descrito na seção de Materiais e método. Dentre esses 22/34 (64.7%) pacientes que receberam dupla indução, 9/22 (40.9%) entraram em remissão.

Os outros 12/34 (35.2%) pacientes com mais de 5% de blastos no esfregaço da medula óssea não receberam dupla indução devido às condições clínicas que contra indicaram o tratamento, naquele momento. Observou-se que a maioria 9/12 (75.0%) desses pacientes não entrou em RC.

Neste subgrupo avaliado no D15, foram identificados *NPM1*^{mut}, *FLT3*-ITD e *IDH1*^{mut} em 18/77 (23.4%), 9/79 (11.4%) e 7/70 (10.0%) pacientes, respectivamente. O *status* das mutações nos genes do *NPM1*, *FLT3* (ITD) e *IDH1* não se associou ao *clearance* precoce de blastos na medula óssea avaliado no D15 quando se usou um ponto de corte de 5% de blastos no esfregaço ($P = 0.175$, $P = 0.725$ e $P = 0.452$, respectivamente). No entanto, quando usado o ponto de corte de 10% de blastos no esfregaço no D15, 16/18 (88.9%) pacientes *NPM1*^{mut} apresentaram menos de 10% de células blásticas na medula óssea quando comparados com

39/59 (61.6%) pacientes $NPM1^{wild-type}$ ($P = 0.077$). O *status* das mutações nos genes *FLT3* (ITD) e *IDH1* não se associou ao *clearance* precoce de blastos na medula óssea avaliado no D15, mesmo quando usado o ponto de corte de 10% de blastos ($P = 0.432$, $P = 0.379$, respectivamente). No subgrupo de 32 portadores de CN-LMA que tiveram a medula óssea avaliada no D15, também não se observaram associações das mutações nos genes *NPM1*, *FLT3* (ITD) e *IDH1* com o ponto de corte de 10% para o *clearance* precoce de blastos ($P = 0.372$, $P = 0.560$ e $P = 0.269$, respectivamente).

10.3.3 Mortalidade precoce

O total de 53/122 (43.4%) pacientes morreram durante a terapia de indução. A idade mediana desse grupo foi de 48 anos (variação: 20 a 66 anos) sendo que a maioria (40/53; 75.5%) apresentava menos de 60 anos e LMA *de novo* (46/53; 86.8%). De acordo com a análise citogenética disponível para 42 pacientes, 21/42 (50.0%) tinham CN-LMA, 27/42 (64.3%) estavam no grupo de risco intermediário, 11/42 (26.2%) no adverso e 4/42 (9.5%) no grupo favorável.

Mutações no gene *NPM1* foram detectadas em 10/50 (20.0%) pacientes, *FLT3*-ITD em 9/53 (17.0%) e *IDH1* em 2/39 (5.1%). Trinta e quatro (34/50; 68.0%) casos apresentaram $NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}$ e 7 (7/20; 35.0%) $NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}$.

O *status* mutacional dos genes *NPM1* e *FLT3* (ITD) ($P = 0.418$, $P = 0.662$, respectivamente) e *IDH1* não se correlacionou com mortalidade precoce. Não foram encontradas diferenças entre as medianas de idade ($P = 0.078$), de contagem de GL ($P = 0.381$), de blastos no sangue periférico ($P = 0.707$) e de LDH ($P = 0.089$) entre o grupo que faleceu precocemente e o restante dos pacientes. Além disso, idade ≥ 60 anos ($P = 0.371$), níveis de GL $> 100.0 \times 10^9/L$ ($P = 0.226$), LMA secundária ($P = 0.619$) e grupo de risco citogenético adverso ($P = 0.755$) não se associaram com mortalidade precoce, bem como sexo, classificação FAB, *clearance* precoce de blastos na medula óssea ou números de ciclos

de indução. Quando considerado o ponto de corte de 50 anos, foi observada associação entre idade ≥ 50 anos e mortalidade precoce ($P = 0.004$).

10.3.4 Análise de sobrevida

As medianas de SG e SLR para os 122 pacientes tratados com intenção de alcançar a RC foram 3.6 meses (variação: 0.0 a 106.5 meses) e 13.8 meses (variação: 0.6 a 101.1 meses), respectivamente. As medianas de SG e SLR dentre os pacientes tratados com intenção de alcançar a RC e que estavam vivos no último contato foram 50.8 meses ($n = 18$; variação: 9.3 a 106.5 meses) e 49.4 meses ($n = 16$; variação: 7.9 a 101.1 meses), respectivamente.

Na análise univariada, a idade ($P = 0.039$; HR = 1.014; 95% IC, 1.001-1.028), idade < 50 anos ($n = 72$; mediana = 4.7 meses versus idade ≥ 50 anos: $n = 46$; mediana = 0.8 meses; $P = 0.011$; HR = 1.690; 95% IC, 1.129-2.527), níveis de LDH abaixo do dobro do valor de referência ($n = 51$; mediana = 4.0 meses versus LDH ≥ 1236 UI/ μ L: $n = 55$; mediana = 1.4 meses; $P = 0.039$; HR = 1.551; 95% IC, 1.023-2.352) foram associados com SG (Figura 21).

A presença de menos de 10% de blastos no mielograma do D15 ($P = 0.022$; HR = 1.928; 95% IC, 1.098-3.384), alcançar a RC ($n = 49$; mediana = 21.9 meses versus não alcançar a RC: $n=68$; mediana = 0.6 meses; $P < 0.001$; HR = 0.162; 95% IC, 0.102-0.258) e as categorias de risco de citogenético baseados nos critérios do *MRC* ($P = 0.032$; HR 1.610; 95% IC, 1.042-2.485) também se apresentaram associados à SG (Figura 21). Os pacientes classificados com citogenética de risco intermediário ($n = 65$; mediana = 5.2 meses) apresentaram uma SG melhor quando comparados com o grupo favorável ($n = 10$; mediana = 2.9 meses) e o grupo de risco adverso ($n = 21$; mediana = 1.0 meses).

Na análise univariada, níveis de GL $> 100.0 \times 10^9/L$ não se associaram à SG ($P = 0.071$; HR = 1.588; 95% IC, 0.961-2.624).

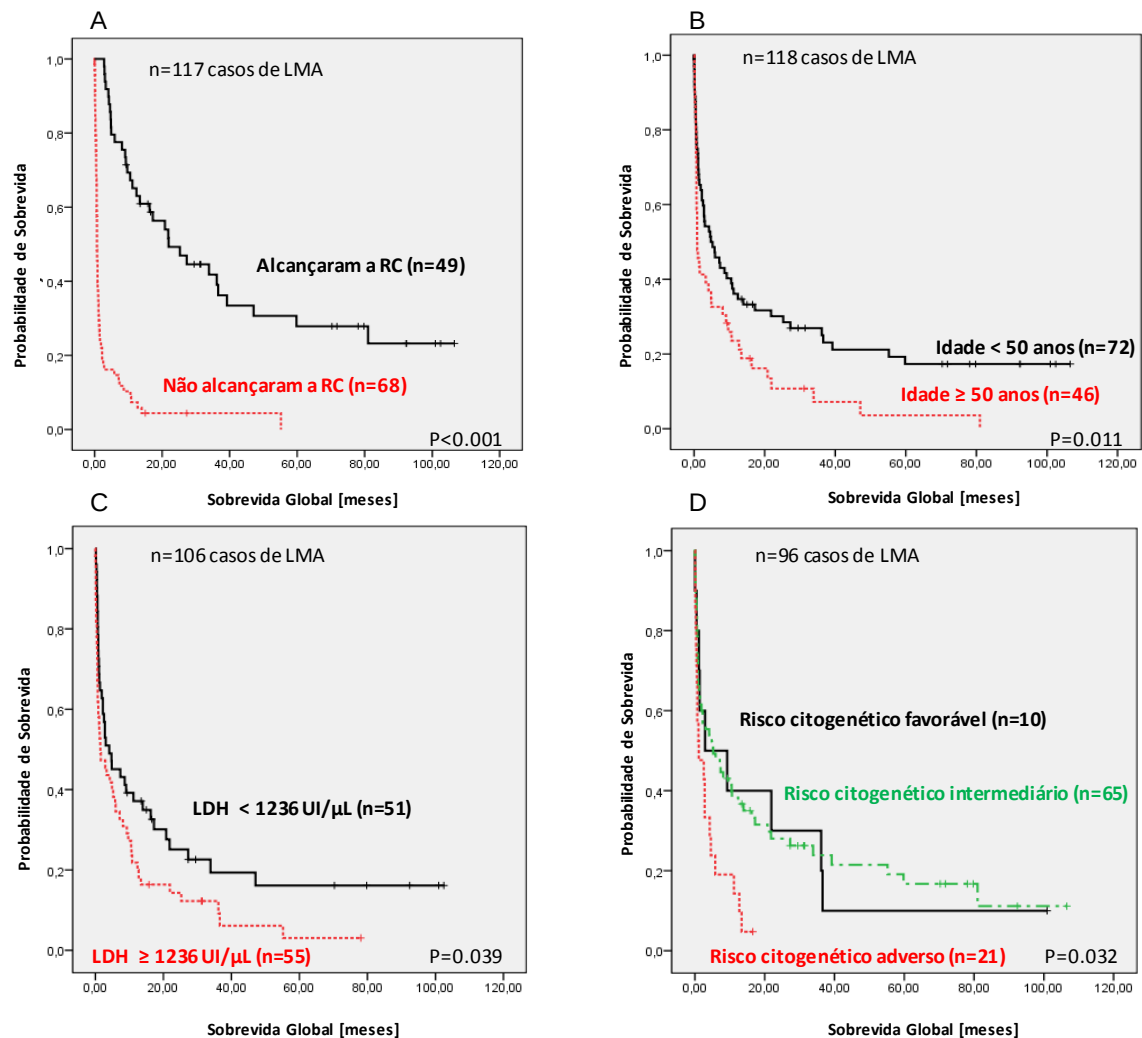


Figura 21. Análise de sobrevida global (SG) de portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) quanto às características clínicas e laboratoriais

(A) SG entre 117 portadores de LMA, que alcançaram ou não a remissão completa (RC). As curvas de sobrevida em preto representam casos de LMA que alcançaram a RC; aqueles em vermelho são pacientes que não alcançaram a RC, respectivamente. (B) SG de 118 pacientes estratificados de acordo com idade de 50 anos, em preto estão os casos de LMA com < 50 anos de idade; aqueles em vermelho são os com 50 anos ou mais (C) SG entre 106 pacientes que apresentaram séricos valores de lactato desidrogenase (LDH). As curvas de sobrevida em preto representam casos de LMA que tinham níveis de LDH < 1236 UI/μL (valor de referência = 618); aqueles em vermelho são pacientes que tinham níveis de LDH ≥ 1236 UI/μL, respectivamente. (D) SG entre 96 pacientes classificados de acordo com grupo de risco citogenético segundo o grupo do MRC⁶⁴. As curvas de sobrevida em preto representam casos de LMA com risco citogenético favorável; aqueles em vermelho são de risco citogenético adverso; em verde são os pacientes com risco citogenética intermediários, respectivamente. O valor log-rank *P* é indicado por análise de Kaplan-Meier.

Em relação às mutações avaliadas, a mediana de SG foi de 20.8 meses para os pacientes *NPM1*^{mut} (26/114; 22.8%) e 2.7 meses para *NPM1*^{wild-type} (88/114; 77.2 %; *P* = 0.007; HR = 0.474; 95% IC, 0.275-0.817), independentemente do *status FLT3*.

Não foi observada diferença na SG entre pacientes com *FLT3*^{wild-type} e aqueles com *FLT3*-ITD (*FLT3*^{wild-type}: n = 101; mediana = 3.0 meses versus *FLT3*-ITD: n = 16; mediana =

0.6 meses; $P = 0.313$) e entre os pacientes com $IDH1^{wild-type}$ e os com $IDH1^{mut}$ ($IDH1^{wild-type}$: $n = 89$; mediana = 4.8 meses versus $IDH1^{mut}$: $n = 7$; mediana = 4.0 meses; $P = 0.326$). De acordo com os diferentes subgrupos genotípicos compostos para o *status* dos genes *NPM1* e *FLT3*, a mediana de SG foi como segue: $NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}$ ($n = 20$; mediana = 25.2 meses), $NPM1^{mut}/FLT3-ITD$ ($n = 6$; mediana = 0.8 meses), $NPM1^{wild-type}/FLT3-ITD$ ($n = 10$; mediana = 0.6 meses) e $NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}$ ($n = 77$; mediana = 2.9 meses; $P = 0.002$; HR = 1.526; 95% IC, 1.166-1.997) (Figura 22).

No grupo do CN-LMA, os pacientes com $NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}$ ($n = 11$) apresentaram melhor SG em comparação com todas as outras combinações do *status* das mutações no *NPM1* e *FLT3* ($n = 36$; $P = 0.004$; HR = 4.765; 95% IC, 1.664-13.647). Os valores das contagens do GL superior ou inferior a $100.0 \times 10^9/L$, LMA *de novo* ou secundária, classificação FAB, CD34 positivo, números de ciclos de indução, valor superior ou inferior a 5% de blastos na medula óssea avaliado no D15, não foram associados com a SG. Não houve diferença entre as medianas de SG do subgrupo CN-LMA $NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}/IDH1^{mut}$ ($n=4$, mediana = 1.6 meses) e do $NPM1^{wild-type}/FLT3^{wild-type}/IDH1^{wild-type}$ ($n=16$, mediana = 3.6 meses; $P = 0.685$; HR = 1.266; 95% IC, 0.404-3.966).

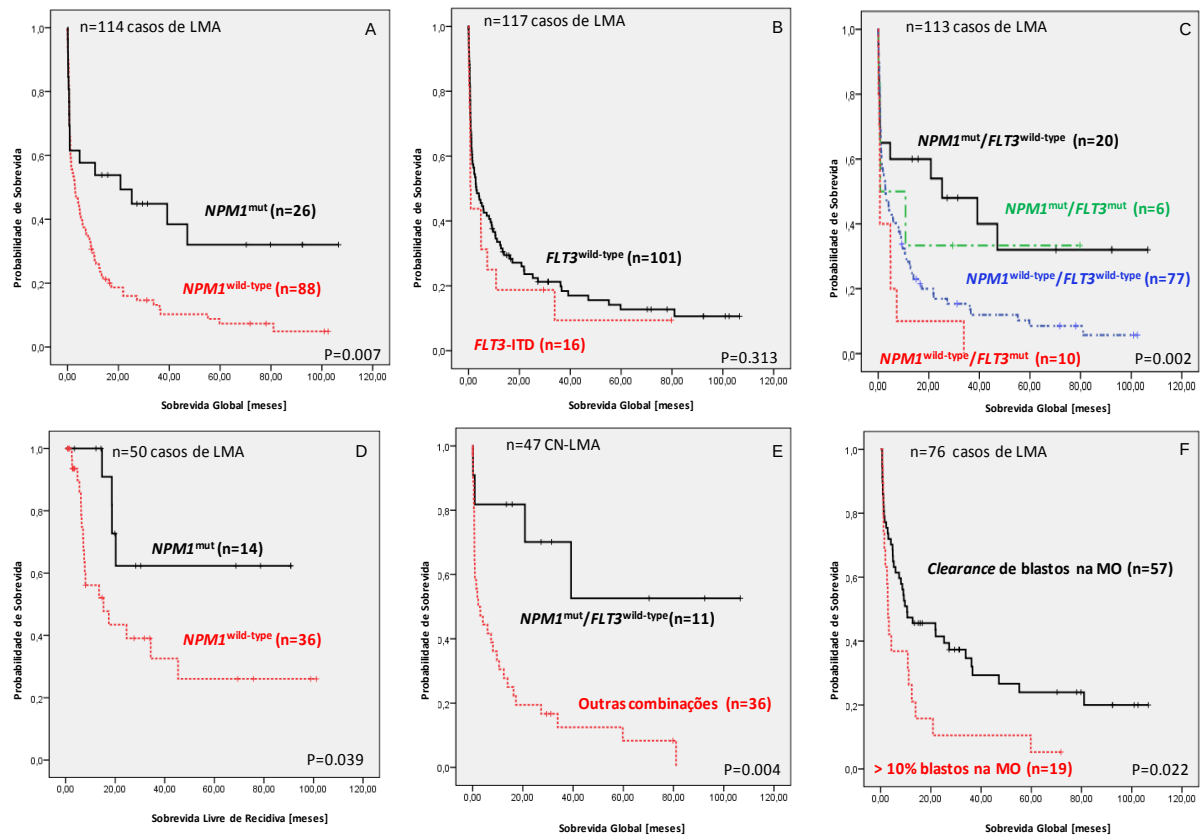


Figura 22. Análise de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de recidiva (SLR) de portadores de leucemia mieloide aguda (LMA) quanto às características clínicas e laboratoriais

(A) SG entre 114 portadores de LMA em relação à presença de mutação no gene *NPM1*. (B) SG entre 117 portadores de LMA em relação à presença de duplicação interna em tandem no gene *FLT3*. (C) SG 113 pacientes em relação aos compostos genótipos de mutações no *NPM1* e *FLT3*. (D) SLR entre 50 pacientes de acordo com a presença da mutação *NPM1*. (E) SG de 47 portadores de cariótipo normal e mutações no *NPM1* e *FLT3*. As curvas de sobrevida em preto representam casos de LMA *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type} e a curva vermelha representam *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD, *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type} e *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*-ITD analisados em conjunto. (F) SG entre 76 pacientes com análise precoce da medula óssea (MO) no D15 da indução. As curvas de sobrevida em preto representam casos que apresentaram ≤ 10% de blastos na MO no D15; aqueles em vermelho são os que tinham > 10% de blastos na MO após tratamento de indução, respectivamente. O valor log-rank *P* é indicado por análise de Kaplan-Meier.

A SLR foi associada com idade ≥ 60 anos (*n*=9; mediana = 7.1 meses versus idade < 60 anos: *n*=41; mediana = 34.3 meses, *P* = 0.021; HR = 3.129; 95% IC, 1.185-8.265) e CD34 positivo (*P* = 0.013; HR = 4.307; 95% IC, 1.368-13.554). SLR não foi associada à LMA *de novo* ou secundária (*P* = 0.111), GL abaixo de 100.0 x 10⁹/L, (*P* = 0.795), níveis de LDH abaixo do dobro do valor de referência (*P* = 0.064), classificação de risco citogenética baseada nos critérios do *MRC* (*P* = 0.366), um ou dois ciclos de indução (*P* = 0.201) e *clearance* de blastos avaliado no D15 usando tanto os pontos de cortes de 5% ou 10% (*P* = 0.706; *P* = 0.147, respectivamente). A mediana de SLR para pacientes *NPM1*^{mut} (*n* = 14/50;

28.0%) ainda não foi alcançada, ao mesmo tempo que foi de 15.2 meses para os pacientes com *NPM1*^{wild-type} (n = 36/50; 72.0%; *P* = 0.039; HR = 0.318; 95% IC, 0.107-0.943). Nenhum dos pacientes com a mutação *FLT3*-ITD recaiu da LMA até agora, apesar disso, não houve diferença estatística quando comparado com a SLR dos pacientes sem a mutação ITD (*P* = 0.275). Apenas 4/7 (57.1.0%) pacientes *IDH1*^{mut} encontravam-se em RC, por isso não foi possível estudar formalmente SLR neste grupo.

Na análise multivariada, a SG foi afetada pela idade (variável contínua), *status* da mutação no gene *NPM1* e pelo *clearance* de blastos na medula óssea avaliado no D15 quando utilizado o ponto de corte de 10%. Essas variáveis se mostaram como fatores de risco independentes quando consideramos a classificação de risco citogenético baseada no *MRC*, o *status* do *FLT3* (ITD), a contagem de GL abaixo de $100.0 \times 10^9/L$ no sangue periférico e os níveis de LDH abaixo do dobro do valor de referência (Tabela 13). Na análise multivariada, a SLR foi afetada pela idade < 60 anos e pelo *status* do *NPM1* como fatores de risco independentes quando considerados a presença do antígeno CD34 e níveis de LDH abaixo do dobro do valor de referência (Tabela 13).

Tabela 13- Análise Multivariada para Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Recidiva em 122 portadores de leucemia mielóide aguda tratados com intenção de atingir a remissão completa.

	Sobrevida Geral				Sobrevida Livre de Recidiva		
	HR	(95% IC)	<i>P</i>		HR	(95% CI)	<i>P</i>
<i>NPM1</i>	0.175	(0.051-0.603)	0.006	<i>NPM1</i>	0.019	(0.002-0.222)	0.002
Idade	1.027	(1.002-1.052)	0.031	Idade ^{II}	9.995	(2.508-39.833)	0.001
LDH ^J	1.091	(0.521-2.288)	0.817	LDH ^J	1.436	(0.407-4.387)	0.525
GL ^K	1.684	(0.498-5.698)	0.402	CD34	2.792	(0.546-14.288)	0.218
Clearance de blastos na MO no D15 ^Φ	3.114	(1.295-7.489)	0.011				
Grupo de risco citogenético*	1.069	(0.435-2.627)	0.885				
<i>FLT3</i> -ITD	1.008	(0.339-2.994)	0.989				

NPM1, gene da *nucleophosmin*; LDH^J, desidrogenase láctica < ou ≥ 1236 UI/μL; GL^K, glogal de leucócitos ≤ ou > $100.0 \times 10^9/L$; MO, indica medula óssea; ^Φ Avaliação precoce do *clearance* de blastos na MO realizada no D15 do início da quimioterapia de indução utilizando-se do ponto de corte de 10%; *Classificação citogenética de risco de acordo com critérios do *MRC*⁶⁴; *FLT3*-ITD, duplicação interna em tandem do gene *FLT3*; Idade^{II} < ou ≥ 60 anos Idade. HR, indica Hazard ratio; IC, indica intervalo de confiança.

10.4 Análises no subgrupo de 74 portadores de LMA *de novo* e idade inferior a 60 anos que completaram o tratamento de indução “7+3”

Com a finalidade de melhor comparação com resultados obtidos em ensaios clínicos internacionais, foi realizada subanálise de 74 pacientes com menos de 60 anos e LMA *de novo* que completaram o tratamento de indução proposto. Neste subgrupo, 38/74 (51.4%) pacientes alcançaram a RC, 26/74 (35.1%) morreram durante a indução (mortalidade precoce) e 10/74 (13.5%) foram considerados refratários primários.

De acordo com a análise citogenética disponível para 60 pacientes, 32/60 (53.3%) apresentaram CN-LMA, 40/60 (66.7%) estavam no grupo de risco citogenético intermediário, 13/60 (21.7%) no adverso e 7/60 (11.7%) no grupo favorável. Vinte e oito (28/50; 56.0%) apresentaram blastos CD34 positivos, 11/74 (14.9%) tinham níveis de GL acima de $100.0 \times 10^9/L$, e 30/65 (46.2%) tinham níveis de LDH maior do que duas vezes o valor de referência.

Mutações no *NPM1* foram encontradas em 18/73 (24.7%) dos pacientes, *FLT3*-ITD em 9/73 (12.3%), e no *IDH1* em 5/62 (8.1%) e não estavam associadas com a RC ($P = 0.153$, $P = 0.308$, $P = 1.000$, respectivamente). Entre 14/72 (19.4%) pacientes com *status NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type}, 10/14 (71.4%) alcançaram RC.

Quando se analisou o subgrupo de CN-LMA, as mutações no *NPM1* foram identificadas em 12/31 (38.7%) dos pacientes, *FLT3*-ITD em 6/32 (18.8%), e no *IDH1* em 4/27 (14.8%). Neste grupo, foram identificados os binômios *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type} em 9/31 (29%), *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD em 3/31 (9.7%), *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*-ITD em 3/31 (9.7%), e *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type} em 16/31 (51.6%).

Em relação à análise precoce do *clearance* de blastos na medula óssea, 29/57 (50.9%) apresentaram > 5% de blastos no D15. A minoria de 20/73 (27.4%) recebeu dupla indução, e 16/74 (21.6%) recidivaram.

A RC não foi associada com idade ≥ 50 anos ($P = 0.339$), subtipo FAB ($P = 0.581$), classificação de risco citogenético ($P = 0.623$), CD34 positivo ($P = 1.000$), níveis de GL >

100.0 x 10⁹/L ($P = 0.672$), níveis de LDH acima de duas vezes o valor de referência ($P = 0.379$) e *clearance* de blastos na medula óssea considerando os pontos de corte de 5% ou 10% ($P = 0.134$ e $P = 0.412$, respectivamente).

A mediana de SG desse subgrupo foi de 6.5 meses e para a SLR, 14.6 meses. As medianas de SG e SLR que estavam vivos no último contato foram 71.0 meses ($n = 16$; variação: 9.3 a 106.5 meses) e 68.6 meses ($n = 15$; variação: 7.9 a 101.1 meses), respectivamente. A mediana de SG foi de 39.1 meses para os pacientes *NPM1*^{mut} (18/71; 25.3%) e 4.0 meses para *NPM1*^{wild-type} (53/71; 74.6 %; $P = 0.005$; HR = 0.350; 95% IC, 0.169-0.722), independentemente do *status FLT3*. Não foi observada diferença na SG entre pacientes com *FLT3*^{wild-type} e aqueles com *FLT3*-ITD ($P = 0.592$) e entre os pacientes com *IDH1*^{wild-type} e os com *IDH1*^{mut} ($P = 0.580$). De acordo com os diferentes subgrupos genotípicos compostos para o *status* dos genes *NPM1* e *FLT3*, a mediana de SG foi como segue: *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type} ($n = 14$; mediana = 81.9 meses), *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD ($n = 4$; mediana = 79.2 meses), *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*-ITD ($n = 5$; mediana = 5.5 meses) e *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type} ($n = 47$; mediana = 28.9 meses; $P = 0.002$; HR = 1.819; 95% IC, 1.246-2.654).

Não foram observadas associações com a SG ou SLR considerando o ponto de corte de 5% ($P = 0.067$ e $P = 0.976$, respectivamente). O *clearance* de blastos na medula óssea > 10% se associou à SG ($n = 39$; mediana = 12.7 meses; versus $\leq 10\%$ $n=16$; mediana = 2.9 meses; $P = 0.016$; HR = 2.237; 95% IC, 1.159-4.307), mas não se associou à SLR ($P = 0.177$).

11 DISCUSSÃO

As novas tecnologias nos métodos de diagnóstico, como imunofenotipagem, citogenética e testes moleculares permitiram que o diagnóstico de LMA e seus subtipos não seja mais baseado apenas na morfologia celular e citoquímica. Consequentemente, o diagnóstico tornou-se mais preciso e permitiu classificar os pacientes em diferentes grupos de risco que definem melhor o prognóstico e as estratégias terapêuticas ^{37; 71; 72}. Algumas categorias moleculares de LMA estão agora tão bem definidas que foram alocadas em um subgrupo específico na classificação da OMS para doenças neoplásicas hematológicas ^{19; 21}. O melhor exemplo é a *APL*, caracterizada pela presença do gene de fusão *PML/RARα*, que é aceita como uma categoria independente com prognóstico e tratamento distintos das demais LMA ^{19; 21}.

A identificação de algumas mutações genéticas tem refinado as classificações de risco e o prognóstico das LMAs ^{26; 138; 230}. A pesquisa das mutações nos genes *NPM1* e *FLT3* é de grande importância para os pacientes do grupo CN-LMA, pois permite a sua categorização em grupos de risco favorável e intermediário ^{89; 94}. A combinação genotípica do tipo *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type}, por exemplo, confere aos pacientes um bom prognóstico, enquanto o tipo *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type} está associado a um risco intermediário ³⁷. Neste sentido, o presente estudo analisou retrospectivamente 149 pacientes adultos com LMA não-*APL*, não selecionados por idade, presença de comorbidades, situação socioeconômica, LMA secundária ou tipo de tratamento, para determinar a frequência e as associações entre as alterações moleculares nos genes *NPM1*, *FLT3* e *IDH1* e características clínico-laboratoriais e evolução em único centro de referência brasileiro para o tratamento de LMA.

Durante o período do estudo, foram identificados 233 pacientes com idade superior a 16 anos diagnosticados e tratados em nossa instituição. Destes, 52/233 (22.6%) pacientes apresentaram *APL* e foram excluídos. Observou-se uma incidência de *APL* superior ao

relatado na literatura o que, no entanto, está em acordo com a incidência de *APL* em latinos previamente descrita^{30; 229; 231; 232; 233; 234}.

No presente estudo, a mutação no gene do *NPM1* foi identificada em 21.5% dos casos e a *FLT3*-ITD em 13.9%. Considerando-se apenas os portadores de CN-LMA, 32.7% dos pacientes apresentavam o *NPM1*^{mut} e, 16.1%, a *FLT3*-ITD. Essas frequências foram inferiores às relatadas pelos ensaios clínicos multicêntricos feitos, em sua maioria, em populações de origem Européia e Norte Americana: para o *NPM1*^{mut}, 35% a 45% nos portadores de LMA e 46% a 64% com CN-LMA^{235; 236} e, para *FLT3*-ITD, 25% a 30% na LMA e 28% a 45% na CN-LMA^{174; 235; 236; 237}.

A menor frequência encontrada no nosso estudo pode ser devida, pelo menos em parte, à inclusão de pacientes com mais de 60 anos e com LMA secundária^{236; 238}. Aproximadamente um terço da população desse estudo (32.2%) tinha idade igual ou superior a 60 anos. A frequência de ambas as mutações, *FLT3*-ITD e *NPM1*^{mut}, parece ser menor em pacientes idosos²³⁶ Daver *et al* relataram frequência de 14% de *FLT3*-ITD e 16% de *NPM1*^{mut} em pacientes com mais de 60 anos com LMA⁹⁵. Schneider *et al* mostraram também que a presença de mutações no *NPM1* (de 60% para 40%) e *FLT3*-ITD (de 50% para 20%) diminuiu significativamente com o avançar da idade em portadores de CN-LMA²³⁶. Curiosamente, na população de estudo, a frequência do *NPM1*^{mut} em pacientes ≥ 60 anos foi maior do que no grupo com idade < 60 anos (38.4% versus 30.9%, respectivamente), porém sem diferenças estatísticas significativas.

A população deste estudo foi composta por 24.2% de portadores de LMA secundária, em sua maioria devido à presença prévia de síndrome mielodisplásica ou antecedente hematológico (dados não mostrados). A *FLT3*-ITD e as mutações no *NPM1* parecem ser raras em portadores de SMD^{95; 100; 239; 240; 241}.

Porém, quando analisou-se as mutações no subgrupo mais jovem (< 60 anos), com LMA *de novo* e que completou o tratamento inicial da indução ($n = 74$), as mutações no

NPM1 foram encontradas em 24.7% do total de pacientes e em 38.7% no grupo de CN-LMA, e a *FLT3*-ITD em 12.3% dos pacientes e em 18.8% dos CN-LMA. Portanto, mesmo na população jovem com LMA *de novo*, as frequências de *FLT3*-ITD e *NPM1*^{mut} neste estudo foram mais baixas em relação às descritas em grandes ensaios clínicos^{174; 235; 236; 237}.

Etnia é uma característica importante, que pode ser responsável por diferenças na incidência de características biológicas e prognóstico de várias doenças neoplásicas, incluindo LMA^{242; 243; 244; 245}. Diferenças étnicas parecem impactar também a frequência de mutações em *NPM1* e *FLT3*, especialmente quando se comparam grupos asiáticos e europeus^{92; 246; 247; 248; 249; 250; 251}.

No Brasil, estudo realizado por Velloso *et al* em 30 portadores de LMA *de novo* (6 a 94 anos), incluindo 4/30 (13.3%) casos de *APL* e 5/30 (16.6%) pacientes com menos de 16 anos, mostrou que a frequência de mutações tanto no gene *NPM1* quanto da *FLT3*-ITD foi de 33.3%²⁵². No grupo de CN-LMA, as frequências de *NPM1*^{mut} e *FLT3*-ITD foram de 50.0% e 40.0%, respectivamente²⁵². Apesar da menor prevalência de *NPM1*^{mut} e *FLT3*-ITD em crianças com LMA (6.5% e 15.0%, respectivamente)^{99; 253}, da ocorrência rara de *NPM1*^{mut} mas comum da *FLT3*-ITD (22.0%) em adultos com *APL*^{89; 254}, as frequências dessas mutações descritas por Velloso *et al* foram semelhantes às relatadas em caucasianos^{174; 235; 236; 237; 252}.

Lucena-Araújo *et al* analisaram 169 pacientes Brasileiros com LMA *de novo* (2 a 91 anos), incluindo 31/169 (18.3%) casos de *APL*, e encontraram frequência de *NPM1*^{mut} de 43.7% entre os portadores de CN-LMA, o que está de acordo com a literatura, mesmo com a inclusão de pacientes com < 16 anos, o que pode ter subestimado este valor^{236; 253; 255}. A análise do subgrupo de 40 pacientes adultos (15 a 65 anos) com LMA *de novo* não-*APL* identificou a *FLT3*-ITD em 30.0% dos casos, o que também está de acordo com a literatura^{236; 255}.

Outro estudo brasileiro encontrou *FLT3*-ITD em 25.0% de 40 pacientes adultos com LMA *de novo* (21 a 91 anos). No entanto, a inclusão de 4/40 (10.0%) casos de *APL* poderia ser a razão para valores semelhantes aos descritos pela literatura atual, uma vez que esta é uma mutação recorrente em *APL* ^{254; 256}.

Um estudo multicêntrico recente da América Latina, realizado no México e na Colômbia, analisou 138 portadores de LMA (5 a 96 anos), incluindo apenas 4/138 (2.9%) casos de *APL*, e mostrou prevalência de 24/138 (17.3%) para *FLT3*-ITD ²⁵⁷. A prevalência de *FLT3*-ITD na coorte descrita por Cuervo-Sierra *et al* poderia ter sido maior se não tivesse incluído pacientes com menos de 16 anos de idade ^{99; 254; 257}.

Em 2011, Benício avaliou, em sua dissertação de mestrado, 221 portadores de LMA *de novo*, incluindo *APL*, e idade mediana de 42 anos (15 a 65 anos), atendidos em dois Hospitais Universitários da região Sudeste do país (81 pacientes provenientes do HC/UFGM e 140 pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo), casuística que inclui parte dos pacientes avaliados no presente estudo, diagnosticados entre 2001 e 2010. Foi observada uma frequência de mutações no gene *NPM1* e de *FLT3*-ITD de 16.6% e 28.8%, respectivamente ²⁵⁸. Já no grupo de CN-LMA, a frequência de *NPM1*^{mut} e de *FLT3*-ITD foi de 24.6% e 42.3%, respectivamente, sendo, para a *FLT3*-ITD, semelhante à descrita na maioria dos estudos ^{174; 235; 236; 237}.

O advento das tecnologias de sequenciamento forneceu mais eficiência na identificação das mutação genéticas ^{259; 260}. Neste estudo, a pesquisa das mutações nos genes do *NPM1* e *IDH1* foi feita por sequenciamento e a da *FLT3*-ITD foi avaliada por PCR convencional, abordagens semelhantes ao que vem sendo utilizado em outros centros ^{99; 151; 226; 227; 228}. Então, acredita-se que essas técnicas moleculares não devam ser consideradas como fonte das reduzidas frequências encontradas.

A frequência de 15.7% observada neste estudo para pacientes com o binômio *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type} está em acordo com dados anteriormente relatados ^{261; 262}. Em contraste,

a frequência de 5.7% para o *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD é inferior à frequência de 30% a 60% encontrada em outros estudos ^{37; 262}, o que poderia ser resultado das baixas frequências de ambas as mutações observadas pelo nosso grupo.

No presente estudo, foram identificadas mutações no gene *IDH1* em 6.6% dos portadores de LMA e 10.9% no grupo com CN-LMA. Em grandes coortes, a mutação no *IDH1* está presente em 6% a 14% dos portadores de LMA *de novo* e em 10% a 15% com CN-LMA ^{86; 151; 263; 264; 265}. Quando analisou-se as mutações no subgrupo com idade < 60 anos e com LMA *de novo* (n = 74), as mutações no *IDH1* foram identificadas em 8.1% dos portadores de LMA e 14.8% com CN-LMA, o que está de acordo com a literatura ¹⁵¹.

NPM1^{mut} foi associado a contagens elevadas de GL e blastos no sangue periférico, ausência do antígeno CD34, *FLT3*-ITD, CN-LMA e sobrevida mais longa. A maioria dos pacientes foram classificados no grupo citogenético de risco intermediário de acordo com a classificação do *MRC* e tinham CN-LMA. A associação entre a presença de mutação no *NPM1* e categoria citogenética de risco intermediária foi relatada em diversos estudos, especialmente para pacientes CN-LMA ^{89; 266}. O elevado número de GL ao diagnóstico é considerado fator independente de prognóstico adverso na LMA ^{37; 267; 268; 269}. A aparente contradição da associação entre um fator de bom prognóstico (*NPM1*^{mut}) com um de mau prognóstico (elevada contagem de GL ao diagnóstico) pode ser consequência da maior suscetibilidade dos blastos *NPM1*^{mut} à quimioterapia ^{104; 270; 271}.

O *FLT3*-ITD foi associado a contagens elevadas de GL e blastos no sangue periférico, altos níveis séricos de LDH, risco citogenético intermediário. Estes achados corroboram os resultados de outros estudos ^{71; 72; 93; 235; 237; 272; 273}.

As análises mostraram que as mutações nos genes *NPM1*, *IDH1* ou a *FLT3*-ITD não tiveram impacto prognóstico na RC nesta coorte, ao contrário do que é descrito por muitos grupos para o *NPM1*^{mut} ^{37; 85; 92}. Dohner *et al* não observaram associação de mutações nos genes *NPM1* ou *FLT3* como marcadores prognósticos independentes de RC quando testadas

como variáveis individuais ⁹³. Curiosamente, 12/20 (60%) pacientes com binômio $NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}$ alcançaram a RC, mas não houve associação estatística ($P = 0.093$), o que pode se dever ao reduzido número de pacientes estudados.

O *status* mutacional do $NPM1$, mas não os do $FLT3$ ou $IDH1$, foi preditor independente de SG e SLR para todos os pacientes neste estudo, bem como nas análises de subgrupos (CN-LMA). A presença de $NPM1^{mut}$ foi associada com melhor SG, independentemente do *status* de $FLT3$. Como esperado, os portadores de CN-LMA e $NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}$ mostraram melhor SG em comparação com todos os outros genótipos compostos estudados aqui. Mutações no gene $CEBPA$ não foram avaliadas mas, considerando a composição genotípica $NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}$ no grupo CN-LMA de risco citogenético intermediário de acordo com o *MRC*, seria possível identificar os pacientes com $NPM1^{mut}$ que, em teoria, apresentariam um prognóstico melhor ^{37; 85; 138; 237; 274}.

Vários estudos demonstraram o impacto significativo do $FLT3$ -ITD e sua associação com pior prognóstico, com menores SG e SLR e elevadas taxas de recidiva ^{96; 98; 275}. Interessantemente, nenhum dos pacientes $FLT3$ -ITD estudados recaiu até agora, apesar desse número de pacientes ser pequeno ($n = 20$). A estimativa da proporção de alelos mutantes em relação aos do tipo selvagem não foi padronizada em nosso laboratório, portanto, não se pode avaliar se existe uma reduzida razão nesta coorte, proporcionando a fraqueza do impacto negativo do *status* $FLT3$ -ITD sobre as mutações do $NPM1$ ¹⁰⁶.

O $IDH1$ não teve impacto sobre os resultados clínicos neste estudo, mas o pequeno número de pacientes pode ter influenciado a análise. A importância da mutação $IDH1$ R132 na estratificação de risco dos portadores de LMA ainda é controversa ³⁷, bem como seu impacto prognóstico ^{86; 151; 161; 162; 163; 164}. Até o presente momento, não temos conhecimento de outro estudo que tenha avaliado a mutação do $IDH1$ na população brasileira com LMA.

A LMA é uma doença que afeta principalmente adultos mais velhos e a mediana de idade ao diagnóstico descrita na literatura é de mais de 65 anos ^{276; 277; 278; 279}. Portanto, o

grupo de pacientes aqui estudado foi mais jovem (mediana de 49 anos) que o esperado em relação aos grandes estudos conduzidos em países sócio-economicamente desenvolvidos, embora semelhante aos descritos por outros estudos brasileiros^{255; 280; 281}. Apesar da modificação da estrutura etária e declínio do ritmo de crescimento da população brasileira descritos nos últimos anos, com tendência ao aumento da população idosa (> 65 anos), a população de adultos jovens ainda é a maioria e isso poderia se refletir na mediana de idade ao diagnóstico de doenças como a LMA²⁸².

Na análise multivariada, a idade foi identificada como fator independente de SG e SLR. O ponto de corte para diferenciar pacientes portadores de LMA mais jovens dos mais velhos é arbitrária e alguns grupos tem escolhido, dentre outros, 60 anos ou mais, 70 anos ou mais, e até 50 anos ou mais^{283; 284}. Estudos com base populacional mostraram que as taxas de sobrevida em três anos foram de apenas 9% a 10% e, em cinco anos, de 3% a 8% em pacientes com ≥ 60 anos, em comparação com as taxas de sobrevida em cinco anos de até 50% para pacientes mais jovens^{81; 210; 211; 279}.

Foram demonstradas reduzidas taxas de RC (41.8%) associada à reduzida duração da remissão e baixas taxas de SG nos 122 casos de LMA tratados com quimioterapia de indução convencional visando alcançar a RC, independentemente da idade. Isso ocorreu em parte, devido à elevada taxa de mortalidade precoce (43.4%). A idade ≥ 50 anos foi a única característica analisada neste estudo que poderia ser um marcador pré-tratamento associado à mortalidade precoce. A coorte estudada não foi limitada pela idade do paciente e é evidente que o prognóstico da LMA em idosos é pior devido à presença de resistência a múltiplas drogas, alta frequência de cariótipos adversos, frequência elevada de marcadores moleculares com impacto desfavorável e várias comorbidades associadas^{78; 285; 286}. Porém, considerando-se apenas os casos de portadores de LMA *de novo* e < 60 anos de idade que completaram tratamento de indução (n = 74), a taxa de RC também foi baixa (51.4%) em comparação com a literatura^{35; 287; 288}. As taxas de RC para este grupo mais jovem foram inferiores até às dos

ensaios clínicos com pacientes idosos, que mostraram valores em torno de 50%^{276; 278; 279; 289}, o que pode denotar a gravidade com que os pacientes chegam ao centro de referência. Pagnano *et al* avaliaram 61 pacientes brasileiros adultos jovens com LMA *de novo* e observaram taxa de RC de 63.6% e recidiva de 30.7%, estimativa de SG em cinco anos foi de 20.5%²⁸¹. Vale lembrar que baixas taxas de RC e menor de sobrevida já foram relatadas em estudos que compararam pacientes tratados em ensaios clínicos com aqueles tratados “fora” de protocolos de pesquisa, ou seja, na “vida real”²⁹⁰. Da mesma forma, estudos populacionais apresentam dados de sobrevida inferiores aos apresentados nos grandes ensaios clínicos²⁹¹. Este estudo, que é retrospectivo e que analisou uma população não selecionada de LMA pode estar mais próximo de estudos da “vida real” do que de ensaios clínicos. As outras possíveis causas de reduzidas taxas de RC, SG e SLR, extrapolam o objetivo desse estudo embora já tenham sido descritas previamente pelo nosso grupo^{215; 292}. As taxas de mortalidade precoce, RC, SG e SLR em pacientes brasileiros com LMA não-APL permanecem desconhecidas, devido à escassez de dados sobre resultados disponíveis para os pacientes tratados dentro e fora de ensaios clínicos.

Identificaram-se alterações citogenéticas em 61/145 (42.0%) pacientes estudados e, em 26/145 (17.9%) pacientes, não houve metáfases para análise nas amostras coletadas. Alterações cromossômicas são detectadas em cerca de 55% dos adultos com LMA e a taxa de cariotipagem sem sucesso nesses pacientes é de aproximadamente 10%^{56; 57; 293}. As diferenças observadas em relação à literatura podem se dever ao pequeno número de pacientes estudados, bem como as características biológicas da doença em nossa população e à uma maior taxa de cariotipagem sem sucesso observada neste grupo. Um aspecto interessante é que a dificuldade em se obter metáfases para análise citogenética ao diagnóstico parece estar associada a LMA de pior prognóstico e menores taxas de RC (43.0%)²⁹⁴. Não foi encontrada aqui nenhuma associação de pacientes com cariotipagem sem sucesso e RC ou SG (dados não mostrados). O reduzido número de pacientes provenientes de estudo unicêntrico de população

não selecionada por idade ou subtipo de LMA, podem ter prejudicado a análise. Dentre os 119 cariótipos analisados, 58/122 (48.7%) foram CN-LMA o que está de acordo com os achados de grandes coortes de adultos com LMA ⁶⁴.

Observaram-se diferenças significativas na sobrevida entre os três grupos de risco citogenéticos definidos de acordo com os critérios do *MRC* no presente estudo ⁶⁴. Curiosamente, os pacientes do grupo de risco intermediário apresentaram uma SG melhor que aqueles do grupo favorável. Não houve diferenças em relação à idade entre os 3 grupos de risco que justificasse a melhor sobrevida do grupo intermediário. Possivelmente, isso aconteceu por causa das taxas elevadas de mortalidade precoce, que provavelmente prejudicaram a análise de sobrevida. Quando se analisou o subgrupo de portadores de CN-LMA mais jovem (< 60 anos), com LMA *de novo* e que completaram o tratamento inicial da indução (n = 74), foi identificado o binômio *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type} em 9 pacientes e, de acordo com a Classificação do *LeukemiaNet*, seria possível reclassificá-los do grupo de risco citogenético intermediário segundo o *MRC* para um grupo de risco favorável.

Em relação aos níveis de LDH, foi descrito neste estudo sua associação com mutações nos genes do *NPM1* e *FLT3*-ITD, mas não com do *IDH1*. A literatura mostra associação das mutações no *NPM1* e *FLT3*-ITD e níveis elevados de LDH, porém não há relatos sobre o *IDH1*^{mut} ^{93; 98}. Incrementos no nível de LDH sérico indicam agressividade clínica da LMA *per si* e estão relacionados a resultado clínico adverso em relação à SG e SLR ^{93; 198}. A utilização desses níveis de LDH (duas vezes o valor de referência) também foi utilizado por Chen *et al*, que mostraram associação com SG em idosos com LMA ²⁹⁵. No nosso estudo, não houve associação com RC, mortalidade precoce ou SLR, mas quando analisou-se a SG, os pacientes com níveis de LDH superiores a duas vezes o valor de referência apresentavam pior SG. Na análise multivariada, entretanto, o nível sérico de LDH ao diagnóstico não apareceu como variável independente para SG.

No presente estudo, em 95/149 (63.7%) amostras analisadas, 52/95 (54.7%) foram consideradas positivas para o CD34. Portadores de LMA CD34 positivas estão associadas a pior sobrevida^{289; 296; 297; 298; 299; 300}. Na casuística aqui mostrada, a presença de CD34 se associou a reduzida SLR somente, em parte, devido ao grande número de mortes durante a indução e ao número de pacientes incluídos para esta análise.

A avaliação de resposta precoce na medula óssea e/ou sangue periférico é um importante marcador para sensibilidade ao tratamento^{83; 301; 302}. A avaliação precoce da medula óssea, realizada entre os dias 12 e 17 após o início da terapia de indução, é utilizada por muitos grupos^{35; 36; 271; 303; 304}. O grupo *German AML Cooperative Group (AMLCG)* mostrou que o ponto de corte de $\geq 10\%$ de blastos da medula óssea colhida no dia 15 se associou a uma sobrevida reduzida^{35; 36}. Em uma análise de 82 pacientes com menos de 60 anos e com LMA de novo tratados no nosso serviço entre 2001 e 2011, a presença de $\geq 10\%$ de blastos na medula óssea do D15 foi fator independente para menor SG na análise multivariada³⁰⁵. Na população do presente estudo, demonstramos maiores taxas de SG dentre os pacientes que apresentaram contagens $\leq 10\%$ de blastos na medula óssea avaliada no D15 da quimioterapia de indução, mas nenhuma associação foi encontrada em relação à SLR o que, em parte, está em acordo com o grupo do *AMLCG*. Pacientes com $> 10\%$ de blastos na medula óssea avaliada precocemente tiveram 3.1 vezes mais chances de evoluir a óbito do que pacientes com $\leq 10\%$ de blastos na medula óssea no D15. O *status* mutacional do *NPM1*, *FLT3* ou *IDH1* não se correlacionou com o *clearance* de 5% ou 10% de blastos na medula óssea no D15, mesmo quando avaliado somente o grupo de CN-LMA, como fizeram Schneider *et al*²⁷¹. Possivelmente, o pequeno número de pacientes prejudicou as análises estatísticas.

Uma das limitações deste estudo foi o desenho retrospectivo, que pode proporcionar viés de seleção dos pacientes. Por exemplo, 31 pacientes não foram incluídos devido à falta de amostra de medula óssea coletada ao diagnóstico. Este grupo apresentava mediana de idade

de 73 anos e 74.0% eram LMA secundárias, o que provavelmente elevaria ainda mais o risco de mortalidade precoce e sobrevida reduzida. O estudo foi realizado em único centro hospitalar de referência para tratamento de doenças hematológicas do Estado e a população não foi selecionada pela idade, tipo de LMA, presença de comorbidades, *status performance*, condições socioeconômicas, estratégia de tratamento, nem devido à ocorrência de óbito precoce antes do início da quimioterapia. Não foram revisados para os fins deste estudo os esfregaços de medula óssea colhidos ao diagnóstico e no D15, bem como a análise citogenética. Ainda assim, o pequeno tamanho da amostra, dados clínicos e laboratoriais não essenciais parcialmente incompletos, a alta taxa de mortalidade precoce e as reduzidas taxas de RC podem ter prejudicado a análise do resultado do tratamento.

Alguns pontos fortes deste estudo precisam ser ressaltados. De nosso conhecimento, este é o maior grupo de portadores de LMA da América Latina avaliados para as mutações nos genes *NPM1*, *FLT3* e *IDH1* e sua associação com características clínicas ao diagnóstico e com os resultados do tratamento. Desta forma, o estudo auxilia no conhecimento sobre a prevalência de mutações genéticas e suas associações em portadores de LMA brasileiros, visto que a grande maioria das informações de que dispomos baseiam-se, principalmente, em dados de ensaios clínicos europeus e americanos. É importante salientar sobre a demonstração de reduzidas taxas de RC e sobrevida e altas taxas de mortalidade precoce em coorte de portadores de LMA de centro de referência brasileiro contribui como fonte de dados para a literatura nacional.

Mais estudos em grandes coortes multicêntricos da América Latina são necessários para elucidar a frequência e a relevância das mutações nos genes *NPM1*, *FLT3* e *IDH1* em adultos com LMA.

12 CONCLUSÕES

NPM1^{mut} foi associado a contagens elevadas de GL e blastos no sangue periférico, ausência do antígeno CD34, *FLT3*-ITD, CN-LMA. O *FLT3*-ITD foi associado a contagens elevadas de GL e blastos no sangue periférico, altos níveis séricos de LDH e grupo risco citogenético intermediário. Não foram observadas associações do *IDH1*^{mut} com características clínico-laboratoriais. Em uma população não selecionada de pacientes portadores de LMA, mesmo com altas taxas de mortalidade precoce, foi demonstrado o valor prognóstico da mutação *NPM1* como um marcador de sobrevida em LMA, e o mesmo não foi verificado para a *FLT3*-ITD nem para o *IDH1*^{mut}.

Foi demonstrada uma frequência menor de mutações nos genes *NPM1* e *FLT3* na população estudada em comparação com a população caucasiana em todos os subgrupos analisados. Já a frequência da mutação no gene *IDH1* foi semelhante à dos grandes coortes de portadores de LMA.

Foram demonstradas reduzidas taxas de RC associada à reduzida SLR e SG nos portadores de LMA tratados com quimioterapia de indução convencional bem como elevada taxa de mortalidade precoce.

A avaliação precoce do *clearance* de blastos na medula óssea mostrou-se ferramenta útil como preditor de sobrevida em portadores de LMA, porém não foi associada ao *status* mutacional do *NPM1*, *FLT3* ou *IDH1*.

13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ YUNIS, J. J.; BLOOMFIELD, C. D.; ENSRUD, K. All patients with acute nonlymphocytic leukemia may have a chromosomal defect. **N Engl J Med**, v. 305, n. 3, p. 135-9, Jul 16 1981. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6941081> >.
- ² HAASE, D. et al. Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. **Blood**, v. 86, n. 8, p. 2906-12, Oct 15 1995. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579382> >.
- ³ FROHLING, S. et al. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 26, p. 6285-95, Sep 10 2005. ISSN 0732-183X (Print)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155011> >.
- ⁴ SONG, W. J. et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. **Nat Genet**, v. 23, n. 2, p. 166-75, Oct 1999. ISSN 1061-4036 (Print)
1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508512> >.
- ⁵ OWEN, C.; BARNETT, M.; FITZGIBBON, J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia--a review. **Br J Haematol**, v. 140, n. 2, p. 123-32, Jan 2008. ISSN 1365-2141 (Electronic)
0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173751> >.
- ⁶ KELLY, L. M.; GILLILAND, D. G. Genetics of myeloid leukemias. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 3, p. 179-98, 2002. ISSN 1527-8204 (Print)
1527-8204 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194988> >.
- ⁷ BROWMAN, G. P.; NEAME, P. B.; SOAMBOONSRUP, P. The contribution of cytochemistry and immunophenotyping to the reproducibility of the FAB classification in acute leukemia. **Blood**, v. 68, n. 4, p. 900-5, Oct 1986. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3756352> >.
- ⁸ BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v. 33, n. 4, p. 451-8, Aug 1976. ISSN 0007-1048 (Print)
0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/188440> >.
- ⁹ _____. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann Intern Med**, v. 103, n. 3, p. 460-2, Sep 1985. ISSN 0003-4819 (Print)
0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2411180> >.
- ¹⁰ CHESON, B. D. et al. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, v. 8, n. 5, p. 813-9, May 1990. ISSN 0732-183X (Print)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2185339> >.
- ¹¹ BENE, M. C. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, v. 9, n. 10, p. 1783-6, Oct 1995. ISSN 0887-6924 (Print)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7564526> >.
- ¹² BENNETT, J. M. et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). **Br J Haematol**, v. 78, n. 3, p. 325-9, Jul 1991. ISSN 0007-1048 (Print)
0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1651754> >.

- 13 KRAUSE, J. R. et al. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. **Am J Clin Pathol**, v. 89, n. 3, p. 341-6, Mar 1988. ISSN 0002-9173 (Print)
0002-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3258116> >.
- 14 GARAND, R.; BENE, M. C. A new approach of acute lymphoblastic leukemia immunophenotypic classification: 1984-1994 the GEIL experience. Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies. **Leuk Lymphoma**, v. 13 Suppl 1, p. 1-5, 1994. ISSN 1042-8194 (Print)
1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915591> >.
- 15 RYAN, D. H. Phenotypic heterogeneity in acute leukemia. **Clin Chim Acta**, v. 206, n. 1-2, p. 9-23, Mar 13 1992. ISSN 0009-8981 (Print)
0009-8981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1572082> >.
- 16 LOWENBERG, B.; DOWNING, J. R.; BURNETT, A. Acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 341, n. 14, p. 1051-62, Sep 30 1999. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502596> >.
- 17 TALLMAN, M. S. et al. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 337, n. 15, p. 1021-8, Oct 9 1997. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9321529> >.
- 18 EDENFIELD, W. J.; GORE, S. D. Stage-specific application of allogeneic and autologous marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia. **Semin Oncol**, v. 26, n. 1, p. 21-34, Feb 1999. ISSN 0093-7754 (Print)
0093-7754 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073559> >.
- 19 VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, Jul 30 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357394> >.
- 20 BENNETT, J. M. et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann Intern Med**, v. 103, n. 4, p. 620-5, Oct 1985. ISSN 0003-4819 (Print)
0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3862359> >.
- 21 VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2292-302, Oct 1 2002. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239137> >.
- 22 NAOE, T.; KIYOI, H. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. **Int J Hematol**, v. 97, n. 2, p. 165-74, Feb 2013. ISSN 1865-3774 (Electronic)
0925-5710 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359299> >.
- 23 CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 368, n. 22, p. 2059-74, May 30 2013. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23634996> >.
- 24 PASTORE, F. et al. Combined Molecular and Clinical Prognostic Index for Relapse and Survival in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. **J Clin Oncol**, Apr 7 2014. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24711548> >.
- 25 LIERSCH, R. et al. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults - biological significance and clinical use. **Br J Haematol**, v. 165, n. 1, p. 17-38, Apr 2014. ISSN 1365-2141 (Electronic)
0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24484469> >.
- 26 ROCKOVA, V. et al. Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. **Blood**, v. 118, n. 4, p. 1069-76, Jul 28 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596848> >.

- 27 DAMM, F. et al. Integrative prognostic risk score in acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Blood**, v. 117, n. 17, p. 4561-8, Apr 28 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372155> >.
- 28 SANDLER, D. P.; ROSS, J. A. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. **Semin Oncol**, v. 24, n. 1, p. 3-16, Feb 1997. ISSN 0093-7754 (Print) 0093-7754 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9045302> >.
- 29 JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J Clin**, v. 58, n. 2, p. 71-96, Mar-Apr 2008. ISSN 0007-9235 (Print) 0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287387> >.
- 30 DOUER, D. et al. High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 87, n. 1, p. 308-13, Jan 1 1996. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8547657> >.
- 31 GROVES, F. D.; LINET, M. S.; DEVESA, S. S. Patterns of occurrence of the leukaemias. **Eur J Cancer**, v. 31A, n. 6, p. 941-9, Jun 1995. ISSN 0959-8049 (Print) 0959-8049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7646927> >.
- 32 GALE, R. P.; FOON, K. A. Therapy of acute myelogenous leukemia. **Semin Hematol**, v. 24, n. 1, p. 40-54, Jan 1987. ISSN 0037-1963 (Print) 0037-1963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3547672> >.
- 33 BLOOMFIELD, C. D. Post-remission therapy in acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, v. 3, n. 12, p. 1570-2, Dec 1985. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3906047> >.
- 34 CASSILETH, P. A. et al. A randomized study of the efficacy of consolidation therapy in adult acute nonlymphocytic leukemia. **Blood**, v. 63, n. 4, p. 843-7, Apr 1984. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6704545> >.
- 35 BUCHNER, T. et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. **Blood**, v. 93, n. 12, p. 4116-24, Jun 15 1999. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361108> >.
- 36 KERN, W. et al. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial. **Blood**, v. 101, n. 1, p. 64-70, Jan 1 2003. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12393605> >.
- 37 DOHNER, H. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 115, n. 3, p. 453-74, Jan 21 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880497> >.
- 38 PREISLER, H. D. Treatment failure in AML. **Blood Cells**, v. 8, n. 3, p. 585-602, 1982. ISSN 0340-4684 (Print) 0340-4684 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6760935> >.
- 39 HIDDEMANN, W. et al. Definition of refractoriness against conventional chemotherapy in acute myeloid leukemia: a proposal based on the results of retreatment by thioguanine, cytosine arabinoside, and daunorubicin (TAD 9) in 150 patients with relapse after standardized first line therapy. **Leukemia**, v. 4, n. 3, p. 184-8, Mar 1990. ISSN 0887-6924 (Print) 0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2314117> >.
- 40 ESTEY, E. H. et al. Causes of initial remission induction failure in acute myelogenous leukemia. **Blood**, v. 60, n. 2, p. 309-15, Aug 1982. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6953982> >.

- 41 BERMAN, E. et al. Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. **Blood**, v. 77, n. 8, p. 1666-74, Apr 15 1991. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2015395> >.
- 42 RAI, K. R. et al. Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. **Blood**, v. 58, n. 6, p. 1203-12, Dec 1981. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6946847> >.
- 43 FERRARA, F. Unanswered questions in acute myeloid leukaemia. **Lancet Oncol**, v. 5, n. 7, p. 443-50, Jul 2004. ISSN 1470-2045 (Print) 1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231251> >.
- 44 SHIPLEY, J. L.; BUTERA, J. N. Acute myelogenous leukemia. **Exp Hematol**, v. 37, n. 6, p. 649-58, Jun 2009. ISSN 1873-2399 (Electronic) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19463767> >.
- 45 HEEREMA-MCKENNEY, A.; ARBER, D. A. Acute myeloid leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 23, n. 4, p. 633-54, Aug 2009. ISSN 1558-1977 (Electronic) 0889-8588 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577162> >.
- 46 FENAUX, P. et al. A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. **Blood**, v. 94, n. 4, p. 1192-200, Aug 15 1999. ISSN 0006-4971 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10438706 >.
- 47 ZWIEBEL, J. A. New agents for acute myelogenous leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 3, p. 488-90, Mar 2000. ISSN 0887-6924 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10720147 >.
- 48 TERWIJN, M. et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 31, p. 3889-97, Nov 1 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24062400> >.
- 49 SAN MIGUEL, J. F. et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1746-51, Sep 15 2001. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535507> >.
- 50 LACOMBE, F. et al. Early clearance of peripheral blasts measured by flow cytometry during the first week of AML induction therapy as a new independent prognostic factor: a GOELAMS study. **Leukemia**, v. 23, n. 2, p. 350-7, Feb 2009. ISSN 1476-5551 (Electronic) 0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18987664> >.
- 51 FREEMAN, S. D.; JOVANOVIC, J. V.; GRIMWADE, D. Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. **Semin Oncol**, v. 35, n. 4, p. 388-400, Aug 2008. ISSN 0093-7754 (Print) 0093-7754 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692689> >.
- 52 OSSENKOPPELE, G. J.; VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; SCHUURHUIS, G. J. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. **Br J Haematol**, v. 153, n. 4, p. 421-36, May 2011. ISSN 1365-2141 (Electronic) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385170> >.
- 53 BUCCISANO, F. et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 332-41, Jan 12 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22039260> >.

- 54 MITELMAN, F.; HEIM, S. Quantitative acute leukemia cytogenetics. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 5, n. 1, p. 57-66, Jul 1992. ISSN 1045-2257 (Print) 1045-2257 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384663> >.
- 55 HEIM, S. Cytogenetics in the investigation of haematological disorders. **Baillieres Clin Haematol**, v. 3, n. 4, p. 921-48, Oct 1990. ISSN 0950-3536 (Print) 0950-3536 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2271796> >.
- 56 MROZEK, K.; HEEREMA, N. A.; BLOOMFIELD, C. D. Cytogenetics in acute leukemia. **Blood Rev**, v. 18, n. 2, p. 115-36, Jun 2004. ISSN 0268-960X (Print) 0268-960X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15010150> >.
- 57 GRIMWADE, D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 14, n. 3, p. 497-529, Sep 2001. ISSN 1521-6926 (Print) 1521-6926 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11640867> >.
- 58 MAROSI, C. et al. Prognostic impact of karyotype and immunologic phenotype in 125 adult patients with de novo AML. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 61, n. 1, p. 14-25, Jul 1 1992. ISSN 0165-4608 (Print) 0165-4608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638477> >.
- 59 MROZEK, K. et al. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. **Semin Oncol**, v. 24, n. 1, p. 17-31, Feb 1997. ISSN 0093-7754 (Print) 0093-7754 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9045301> >.
- 60 GOLOMB, H. M. et al. "Microgranular" acute promyelocytic leukemia: a distinct clinical, ultrastructural, and cytogenetic entity. **Blood**, v. 55, n. 2, p. 253-9, Feb 1980. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6928105> >.
- 61 GRIMWADE, D. et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2322-33, Oct 1 1998. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746770> >.
- 62 SLOVAK, M. L. et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4075-83, Dec 15 2000. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11110676> >.
- 63 BYRD, J. C. et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4325-36, Dec 15 2002. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12393746> >.
- 64 GRIMWADE, D. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. **Blood**, v. 116, n. 3, p. 354-65, Jul 22 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385793> >.
- 65 BLOOMFIELD, C. D. et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. **Cancer Res**, v. 58, n. 18, p. 4173-9, Sep 15 1998. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751631> >.
- 66 BREEMS, D. A.; LOWENBERG, B. Acute myeloid leukemia and the position of autologous stem cell transplantation. **Semin Hematol**, v. 44, n. 4, p. 259-66, Oct 2007. ISSN 0037-1963 (Print) 0037-1963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961725> >.
- 67 WHITMAN, S. P. et al. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5164-7, Jun 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print)

- 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341662> >.
- ⁶⁸ MROZEK, K.; HEINONEN, K.; BLOOMFIELD, C. D. Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 14, n. 1, p. 19-47, Mar 2001. ISSN 1521-6926 (Print)
1521-6926 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11355922> >.
- ⁶⁹ CORNELISSEN, J. J. et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3658-66, May 1 2007. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213292> >.
- ⁷⁰ MEIJER, E.; CORNELISSEN, J. J. Allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia in first or subsequent remission: weighing prognostic markers predicting relapse and risk factors for non-relapse mortality. **Semin Oncol**, v. 35, n. 4, p. 449-57, Aug 2008. ISSN 0093-7754 (Print)
0093-7754 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692695> >.
- ⁷¹ FERRARA, F.; SCHIFFER, C. A. Acute myeloid leukaemia in adults. **Lancet**, v. 381, n. 9865, p. 484-95, Feb 9 2013. ISSN 1474-547X (Electronic)
0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399072> >.
- ⁷² MARCUCCI, G.; HAFERLACH, T.; DOHNER, H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 475-86, Feb 10 2011. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220609> >.
- ⁷³ DOHNER, K.; DOHNER, H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 93, n. 7, p. 976-82, Jul 2008. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591623> >.
- ⁷⁴ MROZEK, K.; DOHNER, H.; BLOOMFIELD, C. D. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. **Curr Opin Hematol**, v. 14, n. 2, p. 106-14, Mar 2007. ISSN 1065-6251 (Print)
1065-6251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255787> >.
- ⁷⁵ SCHLENK, R. F. et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 358, n. 18, p. 1909-18, May 1 2008. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450602> >.
- ⁷⁶ IM, A. P. et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. **Leukemia**, Apr 4 2014. ISSN 1476-5551 (Electronic)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699305> >.
- ⁷⁷ GUENOUNOU, S.; DELABESSE, E.; RECHER, C. Sorafenib plus all-trans retinoic acid for AML patients with FLT3-ITD and NPM1 mutations. **Eur J Haematol**, Apr 2 2014. ISSN 1600-0609 (Electronic)
0902-4441 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24689895> >.
- ⁷⁸ APPELBAUM, F. R. et al. Age and acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3481-5, May 1 2006. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455952> >.
- ⁷⁹ SORROR, M. L. et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. **Blood**, v. 106, n. 8, p. 2912-9, Oct 15 2005. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994282> >.
- ⁸⁰ GRIMWADE, D.; HILLS, R. K. Independent prognostic factors for AML outcome. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 385-95, 2009. ISSN 1520-4383 (Electronic)
1520-4383 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008224> >.

- 81 JULIUSSON, G. et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. **Blood**, v. 113, n. 18, p. 4179-87, Apr 30 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008455> >.
- 82 KAYSER, S. et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. **Blood**, v. 117, n. 7, p. 2137-45, Feb 17 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127174> >.
- 83 ARELLANO, M. et al. Early clearance of peripheral blood blasts predicts response to induction chemotherapy in acute myeloid leukemia. **Cancer**, v. 118, n. 21, p. 5278-82, Nov 1 2012. ISSN 1097-0142 (Electronic)
0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517268> >.
- 84 GILES, F. J. et al. Acute myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 73-110, 2002. ISSN 1520-4391 (Print)
1520-4383 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446420> >.
- 85 SCHNITTGER, S. et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3733-9, Dec 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16076867> >.
- 86 MARCUCCI, G. et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 14, p. 2348-55, May 10 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368543> >.
- 87 ESTEY, E. H. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. **Am J Hematol**, v. 88, n. 4, p. 318-27, Apr 2013. ISSN 1096-8652 (Electronic)
0361-8609 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23526416> >.
- 88 ROLLIG, C. et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 20, p. 2758-65, Jul 10 2011. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21632498> >.
- 89 FALINI, B. et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. **N Engl J Med**, v. 352, n. 3, p. 254-66, Jan 20 2005. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659725> >.
- 90 GRISENDI, S. et al. Nucleophosmin and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 7, p. 493-505, Jul 2006. ISSN 1474-175X (Print)
1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16794633> >.
- 91 THIEDE, C. et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4011-20, May 15 2006. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455956> >.
- 92 VERHAAK, R. G. et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3747-54, Dec 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16109776> >.
- 93 DOHNER, K. et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3740-6, Dec 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051734> >.

- 94 BECKER, H. et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 4, p. 596-604, Feb 1 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026798> >.
- 95 DAVER, N. et al. Effect of NPM1 and FLT3 mutations on the outcomes of elderly patients with acute myeloid leukemia receiving standard chemotherapy. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 13, n. 4, p. 435-40, Aug 2013. ISSN 2152-2669 (Electronic)
2152-2669 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23763915> >.
- 96 KOTTARIDIS, P. D. et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1752-9, Sep 15 2001. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535508> >.
- 97 YAMAMOTO, Y. et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2434-9, Apr 15 2001. ISSN 0006-4971 (Print).
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11290608 >.
- 98 FROHLING, S. et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4372-80, Dec 15 2002. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12393388> >.
- 99 MESHINCHI, S. et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 89-94, Jan 1 2001. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133746> >.
- 100 SHIH, L. Y. et al. Internal tandem duplication of fms-like tyrosine kinase 3 is associated with poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome. **Cancer**, v. 101, n. 5, p. 989-98, Sep 1 2004. ISSN 0008-543X (Print)
0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15329908> >.
- 101 BOISSEL, N. et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). **Leukemia**, v. 20, n. 6, p. 965-70, Jun 2006. ISSN 0887-6924 (Print)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16598313> >.
- 102 BEITINJANEH, A. et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: a systematic review. **Leuk Res**, v. 34, n. 7, p. 831-6, Jul 2010. ISSN 1873-5835 (Electronic)
0145-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096459> >.
- 103 PASCHKA, P. et al. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AML SG). **Blood**, v. 121, n. 1, p. 170-7, Jan 3 2013. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23115274> >.
- 104 GALE, R. E. et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 111, n. 5, p. 2776-84, Mar 1 2008. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17957027> >.
- 105 DE JONGE, H. J. et al. Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. **Haematologica**, v. 96, n. 9, p. 1310-7, Sep 2011. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606167> >.

- 106 PRATCORONA, M. et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. **Blood**, v. 121, n. 14, p. 2734-8, Apr 4 2013. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377436> >.
- 107 KAYSER, S. et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. **Blood**, v. 114, n. 12, p. 2386-92, Sep 17 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602710> >.
- 108 KUSEC, R. et al. More on prognostic significance of FLT3/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). **Blood**, v. 108, n. 1, p. 405-6; author reply 406, Jul 1 2006. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790588> >.
- 109 STIREWALT, D. L. et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3589-95, Jun 1 2001. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369655> >.
- 110 WHITMAN, S. P. et al. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. **Blood**, v. 116, n. 18, p. 3622-6, Nov 4 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656931> >.
- 111 KNAPPER, S. et al. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3262-70, Nov 15 2006. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857985> >.
- 112 STONE, R. M. et al. Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 2061-8, Sep 2012. ISSN 1476-5551 (Electronic) 0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627678> >.
- 113 GALANIS, A. et al. Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. **Blood**, v. 123, n. 1, p. 94-100, Jan 2 2014. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227820> >.
- 114 CORTES, J. E. et al. Phase I study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 29, p. 3681-7, Oct 10 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002496> >.
- 115 RAVANDI, F. et al. Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation. **Blood**, v. 121, n. 23, p. 4655-62, Jun 6 2013. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613521> >.
- 116 SERVE, H. et al. Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 25, p. 3110-8, Sep 1 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897964> >.
- 117 KAMPA-SCHITTENHELM, K. M. et al. Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3, -PDGFRA and -KIT isoforms. **Mol Cancer**, v. 12, p. 19, 2013. ISSN 1476-4598 (Electronic) 1476-4598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23497317> >.
- 118 LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 9, p. 662-73, Sep 2002. ISSN 1471-0056 (Print) 1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209141> >.

- 119 JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet**, v. 33 Suppl, p. 245-54, Mar 2003. ISSN 1061-4036 (Print)
1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610534> >.
- 120 HERMAN, J. G. et al. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. **Cancer Res**, v. 57, n. 5, p. 837-41, Mar 1 1997. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041182> >.
- 121 HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med**, v. 349, n. 21, p. 2042-54, Nov 20 2003. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627790> >.
- 122 BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 16, p. 2395-402, Oct 2000. ISSN 0964-6906 (Print)
0964-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005794> >.
- 123 ROUNTREE, M. R. et al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene**, v. 20, n. 24, p. 3156-65, May 28 2001. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420732> >.
- 124 HERMANN, A.; GOWHER, H.; JELTSCH, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 19-20, p. 2571-87, Oct 2004. ISSN 1420-682X (Print)
1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15526163> >.
- 125 TOTH, M.; MULLER, U.; DOERFLER, W. Establishment of de novo DNA methylation patterns. Transcription factor binding and deoxycytidine methylation at CpG and non-CpG sequences in an integrated adenovirus promoter. **J Mol Biol**, v. 214, n. 3, p. 673-83, Aug 5 1990. ISSN 0022-2836 (Print)
0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2143784> >.
- 126 GOWHER, H.; JELTSCH, A. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites. **J Mol Biol**, v. 309, n. 5, p. 1201-8, Jun 22 2001. ISSN 0022-2836 (Print)
0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11399089> >.
- 127 HSIEH, C. L. Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 1, p. 46-56, Jan 1999. ISSN 0270-7306 (Print)
0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858530> >.
- 128 OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247-57, Oct 29 1999. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555141> >.
- 129 CHEN, Z. X.; RIGGS, A. D. Maintenance and regulation of DNA methylation patterns in mammals. **Biochem Cell Biol**, v. 83, n. 4, p. 438-48, Aug 2005. ISSN 0829-8211 (Print)
0829-8211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16094447> >.
- 130 BACHMAN, K. E.; ROUNTREE, M. R.; BAYLIN, S. B. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. **J Biol Chem**, v. 276, n. 34, p. 32282-7, Aug 24 2001. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11427539 >.
- 131 FUKS, F. et al. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. **EMBO J**, v. 20, n. 10, p. 2536-44, May 15 2001. ISSN 0261-4189 (Print)
0261-4189 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11350943 >.

- 132 YAMASHITA, Y. et al. Array-based genomic resequencing of human leukemia. **Oncogene**, v. 29, n. 25, p. 3723-31, Jun 24 2010. ISSN 1476-5594 (Electronic)
0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400977> >.
- 133 LEY, T. J. et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 363, n. 25, p. 2424-33, Dec 16 2010. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21067377> >.
- 134 THOL, F. et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 21, p. 2889-96, Jul 20 2011. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670448> >.
- 135 YAN, X. J. et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. **Nat Genet**, v. 43, n. 4, p. 309-15, Apr 2011. ISSN 1546-1718 (Electronic)
1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21399634> >.
- 136 HOLZ-SCHIETINGER, C.; MATJE, D. M.; REICH, N. O. Mutations in DNA methyltransferase (DNMT3A) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation. **J Biol Chem**, v. 287, n. 37, p. 30941-51, Sep 7 2012. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722925> >.
- 137 RUSSLER-GERMAIN, D. A. et al. The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers. **Cancer Cell**, v. 25, n. 4, p. 442-54, Apr 14 2014. ISSN 1878-3686 (Electronic)
1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656771> >.
- 138 PATEL, J. P. et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 366, n. 12, p. 1079-89, Mar 22 2012. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417203> >.
- 139 GROSSMANN, V. et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 2963-72, Oct 11 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915647> >.
- 140 GAIDZIK, V. I. et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). **Blood**, v. 121, n. 23, p. 4769-77, Jun 6 2013. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23632886> >.
- 141 RENNEVILLE, A. et al. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. **Leukemia**, v. 26, n. 6, p. 1247-54, Jun 2012. ISSN 1476-5551 (Electronic)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22289988> >.
- 142 METZELER, K. H. et al. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 26, n. 5, p. 1106-7, May 2012. ISSN 1476-5551 (Electronic)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124213> >.
- 143 XU, X. et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. **J Biol Chem**, v. 279, n. 32, p. 33946-57, Aug 6 2004. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173171> >.
- 144 KELLY, J. H.; PLAUT, G. W. Physical evidence for the dimerization of the triphosphopyridine-specific isocitrate dehydrogenase from pig heart. **J Biol Chem**, v. 256, n. 1, p. 330-4, Jan 10 1981. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7451441> >.
- 145 HASELBECK, R. J.; MCALISTER-HENN, L. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. **J Biol Chem**, v. 268, n. 16, p. 12116-22, Jun 5 1993. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099357> >.

- 146 GEISBRECHT, B. V.; GOULD, S. J. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. **J Biol Chem**, v. 274, n. 43, p. 30527-33, Oct 22 1999. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521434> >.
- 147 PARK, S. Y. et al. Inactivation of mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase by hypochlorous acid. **Free Radic Res**, v. 42, n. 5, p. 467-73, May 2008. ISSN 1029-2470 (Electronic)
1029-2470 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18484410> >.
- 148 PARSONS, D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1807-12, Sep 26 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772396> >.
- 149 BLEEKER, F. E. et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. **Hum Mutat**, v. 30, n. 1, p. 7-11, Jan 2009. ISSN 1098-1004 (Electronic)
1059-7794 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19117336> >.
- 150 YAN, H. et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med**, v. 360, n. 8, p. 765-73, Feb 19 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228619> >.
- 151 ABBAS, S. et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. **Blood**, v. 116, n. 12, p. 2122-6, Sep 23 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538800> >.
- 152 GREEN, C. L. et al. The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. **Blood**, v. 116, n. 15, p. 2779-82, Oct 14 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20651067> >.
- 153 GREEN, C. L. et al. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. **Blood**, v. 118, n. 2, p. 409-12, Jul 14 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596855> >.
- 154 CHOU, W. C. et al. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 25, n. 2, p. 246-53, Feb 2011. ISSN 1476-5551 (Electronic)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079611> >.
- 155 YANG, H. et al. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 20, p. 5562-71, Oct 15 2012. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071358> >.
- 156 DANG, L. et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. **Nature**, v. 462, n. 7274, p. 739-44, Dec 10 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935646> >.
- 157 WARD, P. S. et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. **Cancer Cell**, v. 17, n. 3, p. 225-34, Mar 16 2010. ISSN 1878-3686 (Electronic)
1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171147> >.
- 158 XU, W. et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 17-30, Jan 18 2011. ISSN 1878-3686 (Electronic)
1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21251613> >.
- 159 FIGUEROA, M. E. et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. **Cancer Cell**, v. 18, n. 6, p. 553-67, Dec 14 2010. ISSN 1878-3686 (Electronic)
1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130701> >.

- 160 SASAKI, M. et al. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. 656-9, Aug 30 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763442> >.
- 161 CHOTIRAT, S. et al. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. **J Hematol Oncol**, v. 5, p. 5, 2012. ISSN 1756-8722 (Electronic) 1756-8722 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22397365> >.
- 162 ZHOU, K. G. et al. Potential application of IDH1 and IDH2 mutations as prognostic indicators in non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a meta-analysis. **Leuk Lymphoma**, v. 53, n. 12, p. 2423-9, Dec 2012. ISSN 1029-2403 (Electronic) 1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22616558> >.
- 163 HO, P. A. et al. Molecular alterations of the IDH1 gene in AML: a Children's Oncology Group and Southwest Oncology Group study. **Leukemia**, v. 24, n. 5, p. 909-13, May 2010. ISSN 1476-5551 (Electronic) 0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376086> >.
- 164 FENG, J. H. et al. Prognostic significance of IDH1 mutations in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. **Am J Blood Res**, v. 2, n. 4, p. 254-64, 2012. ISSN 2160-1992 (Electronic) 2160-1992 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226625> >.
- 165 PASCHKA, P. et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 22, p. 3636-43, Aug 1 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567020> >.
- 166 RAVANDI, F. et al. Prognostic significance of alterations in IDH enzyme isoforms in patients with AML treated with high-dose cytarabine and idarubicin. **Cancer**, v. 118, n. 10, p. 2665-73, May 15 2012. ISSN 1097-0142 (Electronic) 0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020636> >.
- 167 NOMDEDEU, J. et al. Adverse impact of IDH1 and IDH2 mutations in primary AML: experience of the Spanish CETLAM group. **Leuk Res**, v. 36, n. 8, p. 990-7, Aug 2012. ISSN 1873-5835 (Electronic) 0145-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22520341> >.
- 168 CHALLEN, G. A. et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. **Nat Genet**, v. 44, n. 1, p. 23-31, Jan 2012. ISSN 1546-1718 (Electronic) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138693> >.
- 169 POPOVICI-MULLER, J. et al. Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-based inhibitors of HCV polymerase. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 22, p. 6331-6, Nov 15 2009. ISSN 1464-3405 (Electronic) 0960-894X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819138> >.
- 170 ROHLE, D. et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. **Science**, v. 340, n. 6132, p. 626-30, May 3 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558169> >.
- 171 EMADI, A. et al. Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid leukemia cells with IDH mutations. **Exp Hematol**, v. 42, n. 4, p. 247-51, Apr 2014. ISSN 1873-2399 (Electronic) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24333121> >.
- 172 GILLILAND, D. G. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. **Semin Hematol**, v. 39, n. 4 Suppl 3, p. 6-11, Oct 2002. ISSN 0037-1963 (Print) 0037-1963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447846> >.
- 173 GAIDZIK, V. I. et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 10, p. 1364-72, Apr 1 2011. ISSN 1527-7755 (Electronic)

- 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343560> >.
- 174 SCHNITTGER, S. et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. **Blood**, v. 100, n. 1, p. 59-66, Jul 1 2002. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12070009> >.
- 175 SCHNITTGER, S. et al. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. **Blood**, v. 117, n. 8, p. 2348-57, Feb 24 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148331> >.
- 176 PRATCORONA, M. et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. **Haematologica**, v. 97, n. 3, p. 388-92, Mar 2012. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22058207> >.
- 177 METZELER, K. H. et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. **Blood**, v. 118, n. 26, p. 6920-9, Dec 22 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031865> >.
- 178 TASKESSEN, E. et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. **Blood**, v. 117, n. 8, p. 2469-75, Feb 24 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177436> >.
- 179 WHEATLEY, K. et al. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. **Br J Haematol**, v. 107, n. 1, p. 69-79, Oct 1999. ISSN 0007-1048 (Print)
0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10520026> >.
- 180 KUBOWITZ, F. [Quantitative determination of lactic acid in blood; a new photoelectric (colorimetric) method]. **Z Gesamte Inn Med**, v. 7, n. 19, p. 865-82, Oct 1 1952. ISSN 0044-2542 (Print)
0044-2542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13006687> >.
- 181 WANG, X. C.; JIANG, L.; ZHOU, H. M. Minimal functional unit of lactate dehydrogenase. **J Protein Chem**, v. 16, n. 3, p. 227-31, Apr 1997. ISSN 0277-8033 (Print)
0277-8033 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9155093> >.
- 182 KOOLMAN, J. R., K. M. . **Color atlas of biochemistry**. 2005.
- 183 MARKERT, C. L.; MOLLER, F. Multiple Forms of Enzymes: Tissue, Ontogenetic, and Species Specific Patterns. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 45, n. 5, p. 753-63, May 1959. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16590440> >.
- 184 ELLIS, G. P. W., G. B. **Progress in medicinal chemistry**. Elsevier Science Health Science Div, 1998. ISBN 9780720474008.
- 185 VESELL, E. S.; BEARN, A. G. Isozymes of lactic dehydrogenase in human tissues. **J Clin Invest**, v. 40, p. 586-91, Mar 1961. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13781039> >.
- 186 WROBLEWSKI, F.; GREGORY, K. F. Lactic dehydrogenase isozymes and their distribution in normal tissues and plasma and in disease states. **Ann N Y Acad Sci**, v. 94, p. 912-32, Nov 2 1961. ISSN 0077-8923 (Print)
0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14008497> >.
- 187 REUSCH, C. S.; BUNCH, L. D. LDH isozymes. The diagnostic value of serum lactic dehydrogenase isozymes. **J Kans Med Soc**, v. 69, n. 5, p. 249-52, May 1968. ISSN 0022-8699 (Print)
0022-8699 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5648844> >.

- 188 HASEGAWA, H. Studies on the behavior of serum enzymes in human leukemia. II. Lactic dehydrogenase isozymes in serum and leukocytes. **Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi**, v. 29, n. 1, p. 86-98, Feb 1966. ISSN 0001-5806 (Print)
0001-5806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6006294> >.
- 189 RABINOWITZ, D. C.; PINES, D. J.; MAJEROWICZ, D. Lactic dehydrogenase isozymes: method of analysis and clinical application. **J Am Osteopath Assoc**, v. 66, n. 3, p. 278-86, Nov 1966. ISSN 0098-6151 (Print)
0098-6151 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5180826> >.
- 190 MIWA, S. et al. [Studies on serum and blood cell lactic dehydrogenase isozymes in hematologic diseases]. **Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi**, v. 30, n. 6, p. 834-54, Nov 1967. ISSN 0001-5806 (Print)
0001-5806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5242144> >.
- 191 CHENAULT, H. K. W., G.M. . Lactate Dehydrogenase-Catalyzed Regeneration of NAD from NADH for Use in Enzyme-Catalyzed Synthesis. **Bioorganic Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 400-409, 1989.
- 192 GOLDMAN, R. D.; KAPLAN, N. O.; HALL, T. C. Lactic Dehydrogenase in Human Neoplastic Tissues. **Cancer Res**, v. 24, p. 389-99, Apr 1964. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14147812> >.
- 193 STARKWEATHER, W. H.; SCHOCH, H. K. Some observations on the lactate dehydrogenase of human neoplastic tissue. **Biochim Biophys Acta**, v. 62, p. 440-2, Aug 13 1962. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13916345> >.
- 194 WHITE, L. P. Serum enzymes. II. Glycolytic enzymes in patients with cancer and other diseases. **J Natl Cancer Inst**, v. 21, n. 4, p. 671-84, Oct 1958. ISSN 0027-8874 (Print)
0027-8874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13588367> >.
- 195 COIFFIER, B. et al. Prognostic factors in aggressive malignant lymphomas: description and validation of a prognostic index that could identify patients requiring a more intensive therapy. The Groupe d'Etudes des Lymphomes Agressifs. **J Clin Oncol**, v. 9, n. 2, p. 211-9, Feb 1991. ISSN 0732-183X (Print)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1703226> >.
- 196 A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. **N Engl J Med**, v. 329, n. 14, p. 987-94, Sep 30 1993. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141877> >.
- 197 VON EYBEN, F. E. A systematic review of lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and germ cell tumors. **Clin Biochem**, v. 34, n. 6, p. 441-54, Sep 2001. ISSN 0009-9120 (Print)
0009-9120 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11676973> >.
- 198 FERRARA, F.; MIRTO, S. Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukaemia of the elderly. **Br J Haematol**, v. 92, n. 3, p. 627-31, Mar 1996. ISSN 0007-1048 (Print)
0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616027> >.
- 199 HAFIZ, M. G.; RAHMAN, M. M.; MANNAN, M. A. Serum lactate dehydrogenase as a prognostic marker of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Mymensingh Med J**, v. 17, n. 2, p. 169-73, Jul 2008. ISSN 1022-4742 (Print)
1022-4742 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18626453> >.
- 200 SCHNEIDER, R. J. et al. Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase in malignant lymphoma. **Cancer**, v. 46, n. 1, p. 139-43, Jul 1 1980. ISSN 0008-543X (Print)
0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6992974> >.
- 201 ARSENEAU, J. C. et al. American Burkitt's lymphoma: a clinicopathologic study of 30 cases. I. Clinical factors relating to prolonged survival. **Am J Med**, v. 58, n. 3, p. 314-21, Mar 1975. ISSN 0002-9343 (Print)
0002-9343 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1115074> >.

- 202 BRERETON, H. D.; SIMON, R.; POMEROY, T. C. Pretreatment serum lactate dehydrogenase predicting metastatic spread in Ewing's sarcoma. **Ann Intern Med**, v. 83, n. 3, p. 352-4, Sep 1975. ISSN 0003-4819 (Print)
0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1180431> >.
- 203 DIMOPOULOS, M. A. et al. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. **Ann Intern Med**, v. 115, n. 12, p. 931-5, Dec 15 1991. ISSN 0003-4819 (Print)
0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1952489> >.
- 204 WALTER, R. B. et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: a novel paradigm for treatment assignment. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 33, p. 4417-23, Nov 20 2011. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969499> >.
- 205 KERN, W. et al. Risk-adapted therapy of AML: the AMLCG experience. **Ann Hematol**, v. 83 Suppl 1, p. S49-51, 2004. ISSN 0939-5555 (Print)
0939-5555 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15124669> >.
- 206 HAFERLACH, T. et al. A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group. **Haematologica**, v. 89, n. 4, p. 408-18, Apr 2004. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075074> >.
- 207 BOUAFIA, F. et al. Profiles and prognostic values of serum LDH isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies. **Bull Cancer**, v. 91, n. 7-8, p. E229-40, Jul-Aug 2004. ISSN 1769-6917 (Electronic)
0007-4551 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381461> >.
- 208 PUI, C. H.; CAMPANA, D.; CRIST, W. M. Toward a clinically useful classification of the acute leukemias. **Leukemia**, v. 9, n. 12, p. 2154-7, Dec 1995. ISSN 0887-6924 (Print)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609736> >.
- 209 APPELBAUM, F. R. et al. Acute myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 62-86, 2001. ISSN 1520-4391 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11722979 >.
- 210 ALIBHAI, S. M. et al. Outcomes and quality of care in acute myeloid leukemia over 40 years. **Cancer**, v. 115, n. 13, p. 2903-11, Jul 1 2009. ISSN 0008-543X (Print)
0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19452536> >.
- 211 LERCH, E. et al. Prognosis of acute myeloid leukemia in the general population: data from southern Switzerland. **Tumori**, v. 95, n. 3, p. 303-10, May-Jun 2009. ISSN 0300-8916 (Print)
0300-8916 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19688968> >.
- 212 PULTE, D.; GONDOS, A.; BRENNER, H. Improvements in survival of adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia in the early 21st century. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 594-600, Apr 2008. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322250> >.
- 213 JULIUSSON, G. et al. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. **Blood**, v. 119, n. 17, p. 3890-9, Apr 26 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383796> >.
- 214 HELMAN, R., SANTOS, F.P.S., SIMÕES, B., ATTA, E.H., CALLERA, F., DOBBIN, J.A., MATTOS, É.R., ATALLA, A., MAIOLINO, A., Z., M.A., DIEFENBACH, C.F., DELAMAIN, M.T., HAMERSCHLAK, N. Leucemia mieloide aguda: atualidade brasileira de diagnóstico e tratamento. **Einstein**, v. 9 n. 2, p. 179-183, 2011.
- 215 FAGUNDES, E. M. et al. De novo acute myeloid leukemia in adults younger than 60 years of age: socioeconomic aspects and treatment results in a Brazilian university center. **Leuk Lymphoma**, v. 47, n. 8, p. 1557-64, Aug 2006. ISSN 1042-8194 (Print)

- 1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966267> >.
- 216 BREEMS, D. A. et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 29, p. 4791-7, Oct 10 2008. ISSN 1527-7755 (Electronic)
- 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695255> >.
- 217 VALK, P. J. et al. Second hit mutations in the RTK/RAS signaling pathway in acute myeloid leukemia with inv(16). **Haematologica**, v. 89, n. 1, p. 106, Jan 2004. ISSN 1592-8721 (Electronic)
- 0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754614> >.
- 218 BARJESTEHE VAN WAALWIJK VAN DOORN-KHOSROVANI, S. et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. **Hematol J**, v. 4, n. 1, p. 31-40, 2003. ISSN 1466-4860 (Print)
- 1466-4860 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692518> >.
- 219 CARE, R. S. et al. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. **Br J Haematol**, v. 121, n. 5, p. 775-7, Jun 2003. ISSN 0007-1048 (Print)
- 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12780793> >.
- 220 VERHAAK, R. G. et al. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. **Haematologica**, v. 94, n. 1, p. 131-4, Jan 2009. ISSN 1592-8721 (Electronic)
- 0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838472> >.
- 221 FIGUEROA, M. E. et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 13-27, Jan 19 2010. ISSN 1878-3686 (Electronic)
- 1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060365> >.
- 222 ALCALAY, M. et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. **Blood**, v. 106, n. 3, p. 899-902, Aug 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print)
- 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831697> >.
- 223 VALK, P. J. et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 350, n. 16, p. 1617-28, Apr 15 2004. ISSN 1533-4406 (Electronic)
- 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084694> >.
- 224 VASSILIOU, G. S. et al. Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. **Nat Genet**, v. 43, n. 5, p. 470-5, May 2011. ISSN 1546-1718 (Electronic)
- 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441929> >.
- 225 BINDELS, E. M. et al. EVI1 is critical for the pathogenesis of a subset of MLL-AF9-rearranged AMLs. **Blood**, v. 119, n. 24, p. 5838-49, Jun 14 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic)
- 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553314> >.
- 226 PATEL, K. P. et al. Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: frequency and clinicopathologic features. **Am J Clin Pathol**, v. 135, n. 1, p. 35-45, Jan 2011. ISSN 1943-7722 (Electronic)
- 0002-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21173122> >.
- 227 NAKAO, M. et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 10, n. 12, p. 1911-8, Dec 1996. ISSN 0887-6924 (Print)
- 0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8946930> >.
- 228 OTTONE, T. et al. An allele-specific rt-PCR assay to detect type A mutation of the nucleophosmin-1 gene in acute myeloid leukemia. **J Mol Diagn**, v. 10, n. 3, p. 212-6, May 2008. ISSN 1525-1578 (Print)
- 1525-1578 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403613> >.
- 229 An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1985) ISCN 1985. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. **Birth Defects Orig Artic Ser**, v. 21, n. 1, p. 1-117, 1985. ISSN 0547-6844 (Print)
- 0547-6844 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4041569> >.

- 230 PASCHKA, P. et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 24, p. 3904-11, Aug 20 2006. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921041> >.
- 231 KEUNG, Y. K. et al. Acute myeloid leukemia subtypes and response to treatment among ethnic minorities in a large US urban hospital. **Acta Haematol**, v. 92, n. 1, p. 18-22, 1994. ISSN 0001-5792 (Print)
0001-5792 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7985477> >.
- 232 DE LOURDES CHAUFFAILLE, M. et al. Acute promyelocytic leukemia with t(15;17): frequency of additional clonal chromosome abnormalities and FLT3 mutations. **Leuk Lymphoma**, v. 49, n. 12, p. 2387-9, Dec 2008. ISSN 1029-2403 (Electronic)
1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052993> >.
- 233 HEAD, D. et al. Effect of aggressive daunomycin therapy on survival in acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 1717-28, Sep 1 1995. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7655004> >.
- 234 BUCHNER, T. et al. Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML): two multicenter studies of the German AML Cooperative Group. **J Clin Oncol**, v. 3, n. 12, p. 1583-9, Dec 1985. ISSN 0732-183X (Print)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3906048> >.
- 235 FALINI, B. et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 874-85, Feb 1 2007. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008539> >.
- 236 SCHNEIDER, F. et al. Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML). **Ann Hematol**, v. 91, n. 1, p. 9-18, Jan 2012. ISSN 1432-0584 (Electronic)
0939-5555 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744003> >.
- 237 BACHER, U.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. **Curr Opin Oncol**, v. 22, n. 6, p. 646-55, Nov 2010. ISSN 1531-703X (Electronic)
1040-8746 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805748> >.
- 238 BEJAR, R.; LEVINE, R.; EBERT, B. L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 504-15, Feb 10 2011. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220588> >.
- 239 HORIIKE, S. et al. Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. **Leukemia**, v. 11, n. 9, p. 1442-6, Sep 1997. ISSN 0887-6924 (Print)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305595> >.
- 240 PINHEIRO, R. F. et al. FLT3 internal tandem duplication during myelodysplastic syndrome follow-up: a marker of transformation to acute myeloid leukemia. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 183, n. 2, p. 89-93, Jun 2008. ISSN 1873-4456 (Electronic)
0165-4608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18503825> >.
- 241 MACHADO-NETO, J. A. et al. Screening for hotspot mutations in PI3K, JAK2, FLT3 and NPM1 in patients with myelodysplastic syndromes. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 66, n. 5, p. 793-9, 2011. ISSN 1980-5322 (Electronic)
1807-5932 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21789382> >.
- 242 MATASAR, M. J. et al. Incidence rates of the major leukemia subtypes among US Hispanics, Blacks, and non-Hispanic Whites. **Leuk Lymphoma**, v. 47, n. 11, p. 2365-70, Nov 2006. ISSN 1042-8194 (Print)
1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17107911> >.

- 243 SEKERES, M. A. et al. Differences in prognostic factors and outcomes in African Americans and whites with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4036-42, Jun 1 2004. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976037> >.
- 244 PATEL, M. I. et al. Understanding disparities in leukemia: a national study. **Cancer Causes Control**, v. 23, n. 11, p. 1831-7, Nov 2012. ISSN 1573-7225 (Electronic)
0957-5243 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22971999> >.
- 245 NAKASE, K. et al. Geographic heterogeneity of cellular characteristics of acute myeloid leukemia: a comparative study of Australian and Japanese adult cases. **Leukemia**, v. 14, n. 1, p. 163-8, Jan 2000. ISSN 0887-6924 (Print)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637492> >.
- 246 RAU, R.; BROWN, P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. **Hematol Oncol**, v. 27, n. 4, p. 171-81, Dec 2009. ISSN 1099-1069 (Electronic)
0278-0232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19569254> >.
- 247 ZHANG, Y. et al. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Leuk Res**, v. 31, n. 1, p. 109-11, Jan 2007. ISSN 0145-2126 (Print)
0145-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678898> >.
- 248 CHOU, W. C. et al. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. **Cancer Res**, v. 66, n. 6, p. 3310-6, Mar 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540685> >.
- 249 WANG, L. et al. FLT3 and NPM1 mutations in Chinese patients with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 11, n. 10, p. 762-70, Oct 2010. ISSN 1862-1783 (Electronic)
1673-1581 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20872983> >.
- 250 MARSHALL, R. C. et al. Lower frequency of NPM1 and FLT3-ITD mutations in a South African adult de novo AML cohort. **Int J Lab Hematol**, Mar 25 2014. ISSN 1751-553X (Electronic)
1751-5521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666762> >.
- 251 AUEWARAKUL, C. U. et al. Mutations of the FLT3 gene in adult acute myeloid leukemia: determination of incidence and identification of a novel mutation in a Thai population. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 162, n. 2, p. 127-34, Oct 15 2005. ISSN 0165-4608 (Print)
0165-4608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213360> >.
- 252 VELLOSO, E. D. R. P. et al. **Alterações citogenéticas e moleculares em leucemia mieloide aguda: revisão e descrição de casos.** *Einstein*. São Paulo. 9(2 Pt 1): 184-9 p. 2011.
- 253 CAZZANIGA, G. et al. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1419-22, Aug 15 2005. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15870172> >.
- 254 BARRAGAN, E. et al. Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy. **Haematologica**, v. 96, n. 10, p. 1470-7, Oct 2011. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21685470> >.
- 255 LUCENA-ARAUJO, A. R. et al. Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. **Ann Hematol**, v. 89, n. 2, p. 225-8, Feb 2010. ISSN 1432-0584 (Electronic)
0939-5555 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19921191> >.
- 256 KRUM, E. A.; YAMAMOTO, M.; CHAUFFAILLE MDE, L. Prevalence of FMS-like tyrosine kinase 3/internal tandem duplication (FLT3/ITD+) in de novo acute myeloid leukemia patients categorized according to cytogenetic risk. **Sao Paulo Med J**, v. 127, n. 1, p. 23-7, Jan 2009. ISSN 1806-9460 (Electronic)

- 1516-3180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466291> >.
- 257 CUERVO-SIERRA, J., GÓMEZ-ALMAGUER, D., JAIME-PÉREZ, J.C. ET AL. Prevalence Of FLT3 Mutations In Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter Latin America Study **Blood** v. 122 n. 21 p. 4979, November 15, 2013 2013.
- 258 BENÍCIO, M. T. L. Caracterização de anormalidades citogenéticas e moleculares em 221 pacientes com Leucemia Mielóide Aguda *de novo*. 2011. 138f. **Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 2011.**
- 259 SANDERS, M. A.; VALK, P. J. The evolving molecular genetic landscape in acute myeloid leukaemia. **Curr Opin Hematol**, v. 20, n. 2, p. 79-85, Mar 2013. ISSN 1531-7048 (Electronic) 1065-6251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23380602> >.
- 260 BHATNAGAR, B.; GARZON, R. The Use of Molecular Genetics to Refine Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**, Mar 23 2014. ISSN 1558-822X (Electronic) 1558-8211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24659319> >.
- 261 GRIMWADE, D.; MROZEK, K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 25, n. 6, p. 1135-61, vii, Dec 2011. ISSN 1558-1977 (Electronic) 0889-8588 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093581> >.
- 262 SUZUKI, T. et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 106, n. 8, p. 2854-61, Oct 15 2005. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994285> >.
- 263 PATEL, K. P. et al. Diagnostic testing for IDH1 and IDH2 variants in acute myeloid leukemia an algorithmic approach using high-resolution melting curve analysis. **J Mol Diagn**, v. 13, n. 6, p. 678-86, Nov 2011. ISSN 1943-7811 (Electronic) 1525-1578 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889610> >.
- 264 WAGNER, K. et al. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 14, p. 2356-64, May 10 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368538> >.
- 265 SCHNITTGER, S. et al. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. **Blood**, v. 116, n. 25, p. 5486-96, Dec 16 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805365> >.
- 266 VERHAAK, C. M. et al. Predicting emotional response to unsuccessful fertility treatment: a prospective study. **J Behav Med**, v. 28, n. 2, p. 181-90, Apr 2005. ISSN 0160-7715 (Print) 0160-7715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15957573> >.
- 267 DALAL, B. I. et al. Detection of CD34, TdT, CD56, CD2, CD4, and CD14 by Flow Cytometry Is Associated With NPM1 and FLT3 Mutation Status in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 12, n. 4, p. 274-279, 2012. ISSN 2152-2650. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2152265012000043> >.
- 268 DANG, H. et al. CD34 expression predicts an adverse outcome in patients with NPM1-positive acute myeloid leukemia. **Human Pathology**, v. 44, n. 10, p. 2038-2046, 2013. ISSN 0046-8177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817713001196> >.
- 269 HASLAM, K. et al. Incidence and significance of FLT3-ITD and NPM1 mutations in patients with normal karyotype acute myeloid leukaemia. **Ir J Med Sci**, v. 179, n. 4, p. 507-10, Dec 2010. ISSN 1863-4362 (Electronic) 0021-1265 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803351> >.

- 270 CILLONI, D. et al. Increase sensitivity to chemotherapeutical agents and cytoplasmatic interaction between NPM leukemic mutant and NF-kappaB in AML carrying NPM1 mutations. **Leukemia**, v. 22, n. 6, p. 1234-40, Jun 2008. ISSN 1476-5551 (Electronic)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18401421> >.
- 271 SCHNEIDER, F. et al. NPM1 but not FLT3-ITD mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). **Blood**, v. 113, n. 21, p. 5250-3, May 21 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279329> >.
- 272 MARTELLI, M. P. et al. CD34+ cells from AML with mutated NPM1 harbor cytoplasmic mutated nucleophosmin and generate leukemia in immunocompromised mice. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3907-22, Nov 11 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20634376> >.
- 273 SU, L. et al. The Surface Molecular Signature of Leukemic Cells Is Associated with NPM1 Mutations and FLT3 -ITD in Patients with de novo Acute Myeloid Leukemia. **Acta Haematol**, v. 131, n. 3, p. 148-52, 2014. ISSN 1421-9662 (Electronic)
0001-5792 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192815> >.
- 274 KUHNL, A.; GRIMWADE, D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. **Int J Hematol**, v. 96, n. 2, p. 153-63, Aug 2012. ISSN 1865-3774 (Electronic)
0925-5710 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791509> >.
- 275 OZEKI, K. et al. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1901-8, Mar 1 2004. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604973> >.
- 276 POLLYEA, D. A.; KOHRT, H. E.; MEDEIROS, B. C. Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review. **Br J Haematol**, v. 152, n. 5, p. 524-42, Mar 2011. ISSN 1365-2141 (Electronic)
0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314823> >.
- 277 DOMBRET, H.; RAFFOUX, E.; GARDIN, C. Acute myeloid leukemia in the elderly. **Semin Oncol**, v. 35, n. 4, p. 430-8, Aug 2008. ISSN 0093-7754 (Print)
0093-7754 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692693> >.
- 278 ESTEY, E. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 14, p. 1908-15, May 10 2007. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488990> >.
- 279 ORAN, B.; WEISDORF, D. J. Survival for older patients with acute myeloid leukemia: a population-based study. **Haematologica**, v. 97, n. 12, p. 1916-24, Dec 2012. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773600> >.
- 280 CAPRA, M. et al. Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia between 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. **Leuk Lymphoma**, v. 48, n. 12, p. 2381-6, Dec 2007. ISSN 1042-8194 (Print)
1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18067014> >.
- 281 PAGNANO, K. B. et al. Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. **Sao Paulo Med J**, v. 118, n. 6, p. 173-8, Nov 9 2000. ISSN 1516-3180 (Print)
1516-3180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120548> >.
- 282 CARVALHO, J. A.; RODRIGUEZ-WONG, L. L. [The changing age distribution of the Brazilian population in the first half of the 21st century]. **Cad Saude Publica**, v. 24, n. 3, p. 597-605, Mar 2008. ISSN 0102-311X (Print)
0102-311X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18327447> >.
- 283 LIONBERGER, J. M. et al. Outpatient bendamustine and idarubicin for upfront therapy of elderly acute myeloid leukaemia/myelodysplastic syndrome: a phase I/II study using an innovative statistical design. **Br J Haematol**, Apr 18 2014. ISSN 1365-2141 (Electronic)
0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24749757> >.

- 284 MAYER, J. et al. Multivariate and subgroup analyses of a randomized, multinational, phase 3 trial of decitabine vs treatment choice of supportive care or cytarabine in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia and poor- or intermediate-risk cytogenetics. **BMC Cancer**, v. 14, p. 69, 2014. ISSN 1471-2407 (Electronic)
1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498872> >.
- 285 SCHOCH, C. et al. Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype. **Blood**, v. 98, n. 12, p. 3500, Dec 1 2001. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732508> >.
- 286 MENDLER, J. H. et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 25, p. 3109-18, Sep 1 2012. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753902> >.
- 287 MROZEK, K. et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 36, p. 4515-23, Dec 20 2012. ISSN 1527-7755 (Electronic)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987078> >.
- 288 FERNANDEZ, H. F. et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 361, n. 13, p. 1249-59, Sep 24 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776406> >.
- 289 ROLLIG, C. et al. A novel prognostic model in elderly patients with acute myeloid leukemia: results of 909 patients entered into the prospective AML96 trial. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 971-8, Aug 12 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442365> >.
- 290 MENGIS, C. et al. Assessment of differences in patient populations selected for excluded from participation in clinical phase III acute myelogenous leukemia trials. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 21, p. 3933-9, Nov 1 2003. ISSN 0732-183X (Print)
0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581417> >.
- 291 MATSUNAGA, T. et al. Acute myeloid leukemia in clinical practice: a retrospective population-based cohort study in Miyazaki Prefecture, Japan. **Int J Hematol**, v. 96, n. 3, p. 342-9, Sep 2012. ISSN 1865-3774 (Electronic)
0925-5710 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22825970> >.
- 292 FAGUNDES, E. M. et al. Leucemia mielóide aguda do adulto: análise retrospectiva de 99 casos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 17, n. 169, p. 33-39, 1995.
- 293 FISCHER, K. et al. Design and validation of DNA probe sets for a comprehensive interphase cytogenetic analysis of acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 88, n. 10, p. 3962-71, Nov 15 1996. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8916963> >.
- 294 MEDEIROS, B. C. et al. Unsuccessful diagnostic cytogenetic analysis is a poor prognostic feature in acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, v. 164, n. 2, p. 245-50, Jan 2014. ISSN 1365-2141 (Electronic)
0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24383844> >.
- 295 CHEN, C. C. et al. Pretreatment prognostic factors and treatment outcome in elderly patients with de novo acute myeloid leukemia. **Ann Oncol**, v. 16, n. 8, p. 1366-73, Aug 2005. ISSN 0923-7534 (Print)
0923-7534 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956039> >.
- 296 MYINT, H.; LUCIE, N. P. The prognostic significance of the CD34 antigen in acute myeloid leukaemia. **Leuk Lymphoma**, v. 7, n. 5-6, p. 425-9, Aug 1992. ISSN 1042-8194 (Print)
1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1283545> >.
- 297 CHANG, H. et al. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 28, n. 1, p. 43-8, Jan 2004. ISSN 0145-2126 (Print)
0145-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630079> >.

- 298 VAN RHENEN, A. et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 18, p. 6520-7, Sep 15 2005. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166428> >.
- 299 DANG, H. et al. CD34 expression predicts an adverse outcome in patients with NPM1-positive acute myeloid leukemia. **Hum Pathol**, v. 44, n. 10, p. 2038-46, Oct 2013. ISSN 1532-8392 (Electronic)
0046-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701943> >.
- 300 SOLARY, E. et al. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/DR--phenotypes with shorter survival. Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies (GEIL). **Leukemia**, v. 6, n. 5, p. 393-9, May 1992. ISSN 0887-6924 (Print)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375696> >.
- 301 BERTOLI, S. et al. Prognostic impact of day 15 blast clearance in risk-adapted remission induction chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: long-term results of the multicenter prospective LAM-2001 trial by the GOELAMS study group. **Haematologica**, v. 99, n. 1, p. 46-53, Jan 2014. ISSN 1592-8721 (Electronic)
0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23975179> >.
- 302 CREUTZIG, U. et al. Idarubicin improves blast cell clearance during induction therapy in children with AML: results of study AML-BFM 93. AML-BFM Study Group. **Leukemia**, v. 15, n. 3, p. 348-54, Mar 2001. ISSN 0887-6924 (Print)
0887-6924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237056> >.
- 303 BRAESS, J. et al. Dose-dense induction with sequential high-dose cytarabine and mitoxantone (S-HAM) and pegfilgrastim results in a high efficacy and a short duration of critical neutropenia in de novo acute myeloid leukemia: a pilot study of the AMLCG. **Blood**, v. 113, n. 17, p. 3903-10, Apr 23 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131552> >.
- 304 FERRARA, F. et al. Day 15 bone marrow driven double induction in young adult patients with acute myeloid leukemia: feasibility, toxicity, and therapeutic results. **Am J Hematol**, v. 85, n. 9, p. 687-90, Sep 2010. ISSN 1096-8652 (Electronic)
0361-8609 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20652967> >.
- 305 BASTOS, P. C., FIDELIS, F.H., SILVA, H.O.P.E, SANTANA, S., RICARDO, S., SANTOS, F.R., GUERRA, S., TIBÚRCIO, A.F., GLÓRIA, A.B.F.G., FAGUNDES, E. Cariótipo é o fator mais importante para a sobrevida em remissão completa para pacientes jovens com LMA *de novo* enquanto que a leucometria inicial é o principal fator para a sobrevida global: análise retrospectiva de 10 anos em um único centro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 2, p. 184, 2011. ISSN 1516-8484.

14 ANEXOS

14.1 Anexo 1

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA	
---	---	---

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA ANA FLÁVIA LEONARDI TIBURCIO RIBEIRO

Realizou-se, no dia 01 de julho de 2014, às 14:00 horas, sala 034, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS AO DIAGNÓSTICO E CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS E EVOLUÇÃO EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA**, apresentada por **ANA FLÁVIA LEONARDI TIBURCIO RIBEIRO**, número de registro 2010658536, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Silvana Maria Elói Santos - Orientador (UFMG), Prof(a). Sandra Guerra Xavier (UFMG), Prof(a). Carlos Alberto Scrideli (USPRP), Prof(a). Benigna Maria de Oliveira (UFMG), Prof(a). Rosa Malena Delbone de Faria (UFMG), Prof(a). Agdemir Waléria Aleixo (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

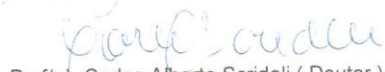
(X) Aprovada

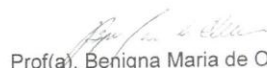
() Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 01 de julho de 2014.

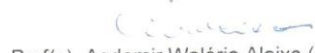

Prof(a). Silvana Maria Elói Santos (Doutora)


Prof(a). Sandra Guerra Xavier (Doutora)


Prof(a). Carlos Alberto Scrideli (Doutor)


Prof(a). Benigna Maria de Oliveira (Doutora)


Prof(a). Rosa Malena Delbone de Faria (Doutora)


Prof(a). Agdemir Waléria Aleixo (Doutora)

14.2 Anexo 2

R484i Ribeiro, Ana Flávia Leonardi Tibúrcio.
Identificação de alterações genéticas ao diagnóstico e correlação com características clínicas e laboratoriais e evolução em pacientes com leucemia mieloide aguda [manuscrito]. / Ana Flávia Leonardi Tibúrcio Ribeiro. -- Belo Horizonte: 2014.
206f.: il.
Orientador: Silvana Maria Elói Santos.
Coorientador: Sandra Guerra Xavier, Ruud Delwel.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Leucemia Mieloide Aguda. 2. Análise Mutacional de DNA. 3. Marcadores Biológicos. 4. Prognóstico. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Santos, Silvana Maria Elói. II. Xavier, Sandra Guerra. II. Delwel, Ruud. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: WH 250

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

14.3 Anexo 3

Números de amostras dos pacientes e respectivos locais de mutação no gene *DNMT3A*

Número da Amostra	Tipo de Mutação	Modificação no Alelo	Modificação no Aminoácido
1174	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
1747	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
1766	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2177	Missense	c.2651C>T	p.Ala884Val
2181	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2183	Missense	c.2644C>T	p.Arg882Cys
2185	Deleção Frameshift	c.2409_2478del70	p.Arg803fs
2187	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2188	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2191	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2195	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2198	Missense	c.2309C>T	p.Ser770Leu
2199	Missense	c.2245C>T	p.Arg749Cys
2206	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2225	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2226	Missense	c.2644C>T	p.Arg882Cys
2229	Missense	c.1904G>C	p.Arg635Pro
2231	Deleção In frame	c.2580_2597del18	p.Cys861if
2234	Missense	c.2312G>A	p.Arg771Gln
2239	Missense	c.1644G>A	p.Met548Ile
2244	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2255	Missense	c.2378A>C	p.Tyr793Ser
2256	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2257	Missense	c.2644C>T	p.Arg882Cys
2261	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2272	Missense	c.1741T>C	p.Trp581Arg
2282	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2283	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2284	Missense	c.1598A>G	p.Tyr533Cys
2289	Missense	c.1640T>A	p.Leu547His
2291	Missense	c.2605G>A	p.Gly869Ser
2296	Missense	c.2141C>G	p.Ser714Cys
2300	Missense	c.2057A>G	p.Asp686Gly
2467	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His
2550	Deleção Frameshift	c.1711delG	p.Ala571fs
2669	Missense	c.2645G>A	p.Arg882His

da Amostra	Tipo de Mutação	Modificação no Alelo	Modificação no Aminoácido
2672	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
2679	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
2683	Missense	c.2185C>T	<i>p.Arg729Trp</i>
2685	Missense	c.2644C>A	<i>p.Arg882Ser</i>
2687	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
2689	Missense	c.1627G>T	<i>p.Gly543Cys</i>
2692	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
2757	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
2771	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
3278	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
3310	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
3311	Missense	c.1741T>A	<i>p.Trp581Arg</i>
3321	Missense	c.1994T>G	<i>p.Val665Gys</i>
3331	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
3481	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
3491	Missense	c.2206C>T	<i>p.Arg736Cys</i>
4334	Deleção Frameshift	c.2196_2197insT	<i>p.Glu733X</i>
5285	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
5286	Missense	c.2512A>G	<i>p.Asn838Asp</i>
5349	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
5354	Missense	c.1627G>T	<i>p.Gly543Cys</i>
5355	Inserção e Deleção Frameshift	c.1656_1663del8+1656_1657insA	<i>p.Asn552fs</i>
5362	Missense	c.1903C>T	<i>p.Arg635Trp</i>
5363	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
6239	Deleção Frameshift	c.1872delA	<i>p.Pro624fs</i>
6245	Missense	c.2141C>G	<i>p.Ser714Cys</i>
6366	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
6368	Missense	c.2141C>G	<i>p.Ser714Cys</i>
6369	Missense	c.2729C>T	<i>p.Ala910Val</i>
6370	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
6371	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
6374	Nonsense	c.2311C>T	<i>p.Arg771X</i>
6724	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
6732	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
6734	Missense	c.1903C>T	<i>p.Arg635Trp</i>
6952	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
6979	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7057	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7065	In frame	c.1713_1721delTGCCAGGC	<i>p.Ala571if</i>
7067	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7074	Missense	c.1627G>T	<i>p.Gly543Cys</i>
7075	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7078	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7119	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>

Número da Amostra	Tipo de Mutação	Modificação no Alelo	Modificação no Aminoácido
7120	Deleção Frameshift	c.2203delT	<i>p.Tyr735fs</i>
7121	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7122	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7124	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
7131	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7144	Missense	c.1628G>T	<i>p.Gly543Val</i>
7145	Nonsense	c.2311C>T	<i>p.Arg771X</i>
7153	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7164	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7167	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
7168	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7172	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
7186	Missense	c.1903C>T	<i>p.Arg635Trp</i>
7188	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7276	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7309	Missense	c.2171A>G	<i>p.Tyr724Cys</i>
7311	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7313	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
7314	Missense	c.2314T>A	<i>p.Phe772Ile</i>
7316	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
7318	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
7319	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7322	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7327	Missense	c.2578T>C	<i>p.Trp860Arg</i>
7328	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7407	Missense	c.2644C>T	<i>p.Arg882Cys</i>
7408	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
7414	Missense	c.2645G>A	<i>p.Arg882His</i>
2541*	Missense	c.2135G>A	<i>p.Asp712Asn</i>
2541*	Missense	c.2353G>A	<i>p.Val785Met</i>
3483*	Missense	c.1502A>G	<i>p.Asn501Ser</i>
3483*	Deleção Frameshift	c.2407_2476del70	<i>p.Arg803fs</i>
7324*	Missense	c.1685G>A	<i>p.Cys562Tyr</i>
7324*	Missense	c.2146G>A	<i>p.Val716Ile</i>
7411*	Nonsense	c.1776C>G	<i>p.Tyr592X</i>
7411*	Deleção Frameshift	c.2307_2308insT	<i>p.Ile769fs</i>

*Um indivíduo tem mais do que uma mutação

14.4 Anexo 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Familiar)

Projetos de pesquisa “Correlação entre alterações genéticas e a evolução clínico/morfológica imediata pós-quimioterapia em pacientes com leucemia mielóide aguda *de novo*” e “Desenvolvimento de metodologia para caracterização e quantificação das alterações genéticas no gene *NPM-1* em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda”

Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você compreenda as explicações a seguir. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos durante o estudo. Também estabelece o seu direito de desistir da participação a qualquer momento.

Seu parente foi admitido no Hospital das Clínicas onde foi realizado o diagnóstico de Leucemia. Até o momento, quase todos os pacientes com diagnóstico de Leucemia mielóide aguda recebem o mesmo tipo de tratamento. Recentemente, novos testes vêm sendo descritos para auxiliar a identificação dos pacientes que apresentam certos tipos de leucemias, sendo a maioria destes testes realizados no mesmo exame de mielograma que é feito quando se descobre a doença. A presença de algumas alterações genéticas nesses exames, antes de se começar a quimioterapia, pode ser capaz de prever como esses pacientes irão evoluir após o tratamento. No futuro, a presença de algumas alterações genéticas no momento do diagnóstico poderá determinar qual tipo de tratamento será melhor para cada paciente. Desse modo, as descobertas dos diferentes tipos de leucemia mielóide aguda podem aumentar o tempo e a qualidade de vida dos pacientes.

Você está sendo convidado para autorizar a pesquisa que avalia a utilidade das alterações genéticas na evolução clínica dos pacientes após o início do tratamento quimioterápico. O objetivo é estudar se a presença das alterações genéticas em pacientes com

leucemia mielóide aguda consegue identificar rapidamente como esses pacientes irão evoluir após a quimioterapia.

Seu nome e o nome de seu familiar não serão utilizados, de forma que vocês permanecerão anônimos durante toda a pesquisa. Você poderá desistir da participação na pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo algum.

Será utilizada uma parte do material de medula óssea que foi extraída na época do diagnóstico da leucemia do seu familiar. Não será realizada nenhuma coleta adicional.

Não está previsto nenhum pagamento pela participação nesta pesquisa.

Os custos desse trabalho serão pagos integralmente pelos pesquisadores.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa, consinto em participar na qualidade de responsável pelo paciente _____, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

Ass. do responsável pelo paciente: _____

Ass. do pesquisador: _____

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. O telefone de contato é 34099229 (Dr^a. Sandra Guerra Xavier e Dr^a Juliana Godoy Assumpção). Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Telefone: 34094592).

14.5 Anexo 5

Números de amostras dos pacientes e respectivos locais de mutação no gene *DNMT3A*

Número da Amostra	Tipo de Mutação	Modificação no Alelo	Modificação no Aminoácido
137	Missense	c.628C>T	<i>p.Arg132Cys</i>
157	Missense	c.629G>T	<i>p.Arg132Leu</i>
329	Missense	c.628C>T	<i>p.Arg132Cys</i>
571	Missense	c.628C>T	<i>p.Arg132Cys</i>
715	Missense	c.629G>A	<i>p.Arg132His</i>
2408	Missense	c.628C>G	<i>p.Arg132Gly</i>
3035	Missense	c.628C>G	<i>p.Arg132Gly</i>

14.6 Anexo 6

14.7 Anexo 7