

Nathália Gomide Cruz

ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES *NPM1* E *IDH1* E SUA
ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS EM
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Belo Horizonte – MG

2014

Nathália Gomide Cruz

ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES *NPM1* E *IDH1* E SUA
ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS EM
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Orientador: Profa. Dra. Suely Meireles Rezende

Co-orientador: Profa. Dra. Sandra Guerra Xavier

Belo Horizonte – MG

2014

Cruz, Nathália Gomide.
C957a Análise de mutações nos genes NPM1 e IDH1 e sua associação com características clínicas e biológicas em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda [manuscrito]. / Nathália Gomide Cruz. - - Belo Horizonte: 2014. 146f.
Orientador: Suely Meireles Rezende.
Co-Orientador: Sandra Guerra Xavier.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leucemia Mieloide Aguda. 2. Mutação. 3. Genes. 4. Proteínas Nucleolares. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Rezende, Suely Meireles. II. Xavier, Sandra Guerra. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM : WH 250



FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES NPM1 E IDH1 E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

NATHÁLIA GOMIDE CRUZ

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS CLÍNICAS.

Aprovada em 09 de junho de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Profª. Suely Meireles Rezende - Orientadora
UFMG

Profª. Sandra Guerra Xavier - Coorientadora
UFMG

Profª. Karina Braga Gomes Borges
UFMG

Dr. Daniel Gonçalves Chaves
Hemominas

Belo Horizonte, 09 de junho de 2014.



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA NATHÁLIA GOMIDE CRUZ

Realizou-se, no dia 09 de junho de 2014, às 14:00 horas, Sala 062, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES NPM1 E IDH1 E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**, apresentada por **NATHÁLIA GOMIDE CRUZ**, número de registro 2012656115, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof^ª. Suely Meireles Rezende - Orientadora (UFMG), Prof^ª. Sandra Guerra Xavier - Coorientadora (UFMG), Prof^ª. Karina Braga Gomes Borges (UFMG), Dr. Daniel Gonçalves Chaves (Hemominas).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 09 de junho de 2014.

Prof^ª. Suely Meireles Rezende (Doutora)

Prof^ª. Sandra Guerra Xavier (Doutora)

Prof^ª. Karina Braga Gomes Borges (Doutora)

Dr. Daniel Gonçalves Chaves (Doutor)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitora de Pesquisa

Profa. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Prof. Francisco José Penna

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Prof. Ricardo de Menezes Macedo

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

Coordenadora

Profa. Teresa Cristina Abreu Ferrari

Sub-coordenador

Prof. Paulo Caramelli

Colegiado

Profa. Tereza Cristina Abreu Ferrari

Profa. Valéria Maria Azeredo Passos

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof. Paulo Caramelli

Prof. Francisco Eduardo Costa Cardoso

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço com carinho à todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a construção e finalização deste trabalho.

Aos meus pais e à minha avó Gercy (*in memoriam*) pelo incentivo ao saber e por apoiarem a minha jornada acadêmica.

Ao Alysson, o cientista da computação com maior conhecimento em biologia molecular que eu conheço, por estar sempre ao meu lado e também por todas as revisões.

Aos meus familiares e amigos, por entenderem todas as minhas ausências.

Aos pacientes com LMA atendidos no Serviço de Hematologia do HC-UFMG e seus familiares por tornarem este trabalho possível.

À professora Dra. Suely Rezende pela orientação e por ter acreditado neste projeto.

À professora Dra. Sandra Xavier pela co-orientação, incentivo e dedicação.

À Dra. Juliana Assumpção pelo incentivo, auxílio na padronização das reações e interpretação dos resultados.

Aos colegas do laboratório de Hematologia Molecular do HC-UFMG, em especial à Valéria Câmara, por todo o auxílio técnico e pelo convívio.

Aos alunos de iniciação científica, Diego Peixoto e Fabrício Braga pela colaboração na realização dos testes moleculares e coleta dos dados clínicos dos pacientes.

À equipe do Serviço de Hematologia do HC-UFMG em especial aos médicos hematologistas Ana Beatriz Firmato pela disponibilização do banco de dados clínicos dos pacientes com LMA, Evandro Fagundes pelo direcionamento e auxílio na interpretação dos dados e Ana Flávia Tibúrcio pela contribuição nos dados e interpretação dos resultados.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação da Faculdade de Medicina da UFMG por todo auxílio.

Aos funcionários do SAME, em especial à Maria Helena, pela ajuda na localização e separação dos prontuários dos pacientes.

À direção da Fundação Hemominas por acreditar e viabilizar a capacitação de seus servidores.

Aos colegas do Cetebio pela compreensão, convívio e oportunidade de aprendizado diário.

Ao CNPQ, FAPEMIG e Fundo Nacional de Saúde pelo apoio e financiamento.

"Digo: o real não está na saída nem na chegada: Ele se dispõe para a gente é no meio da travessia."

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

Nos pacientes adultos com LMA e cariótipo normal, a estratificação de risco, que orienta a seleção do tratamento mais apropriado para a doença, é um desafio. Neste grupo, mutações nos genes *NPM1* e *IDH1* têm sido analisadas como fatores preditivos de prognóstico. O objetivo do presente estudo foi investigar a frequência destas mutações em pacientes com LMA e relacioná-las com as suas características demográficas, clínicas e biológicas. Neste trabalho, foram analisados retrospectivamente 149 pacientes adultos com LMA primária e secundária diagnosticados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG entre abril de 2004 e março de 2013. Os pacientes apresentaram mediana de idade de 49 anos (18 a 84 anos) e 50,3% (n = 75) eram mulheres. Em 113 casos (75,8%), a LMA foi classificada como primária e em 36 (24,2%) como secundária. A mediana do número de leucócitos foi de 21,5 (0,5 a 380,2) $\times 10^9/L$ e de blastos foi de 11,0 (0 a 319,4) $\times 10^9/L$. A enzima LDH encontrava-se aumentada em 104/127 (81,9%) pacientes, sendo mais de duas vezes maior que o limite superior do intervalo de referência (>1.236 UI/ μL) em 61/127 (48,0%). O marcador CD34 foi positivo em 52/95 (54,7%) pacientes. Onze de 119 pacientes (9,2%) apresentaram cariótipo favorável, 79/119 (66,4%) apresentaram cariótipo intermediário, 29/119 (24,4%) cariótipo desfavorável e em 30/149 (20,1%) não foi possível fazer essa análise. A DIT-*FLT3* foi detectada em 20/144 (13,9%) pacientes. As mutações em *NPM1* e a mutação *IDH1(R132)* foram detectadas em 31/144 (21,5%) e 7/114 (6,1%) pacientes, respectivamente. No grupo com cariótipo normal, essas mutações foram observadas em 9/56 (16,1%), 18/55 (32,7%) e 5/46 (10,9%) pacientes, respectivamente. Houve associação entre as mutações em *NPM1* e classificação de risco intermediária ($p = 0,02$), presença de cariótipo normal ($p < 0,01$), ausência de marcador CD34 ($p < 0,01$), número aumentado de leucócitos ($p < 0,01$) e blastos no sangue periférico ($p < 0,01$), enzima LDH sérica > 618 UI/ μL ($p = 0,01$) e DIT-*FLT3* ($p = 0,04$). Essas associações não foram observadas para a mutação *IDH1(R132)*. Em conclusão, as mutações em *NPM1* foram identificadas com menor frequência em nossa população enquanto a mutação *IDH1(R132)* apresentou frequência semelhante ao descrito para a população caucasiana. As mutações em *NPM1* estiveram associadas a fatores prognósticos em pacientes adultos com LMA, tais como maior número de leucócitos e de blastos ao diagnóstico, risco citogenético intermediário, cariótipo normal e DIT-*FLT3*.

Palavras chaves: Leucemia Mielóide Aguda, estratificação de risco, *NPM1*, *IDH1*

ABSTRACT

In adults patients with AML and normal karyotype, risk stratification is a challenge. In this group, mutations in the genes *NPM1* and *IDH1* have been analyzed for their prognostic value. This work aimed to evaluate the presence of *NPM1* and *IDH1* mutations in patients with AML and their association with clinical and biological features in this population. We retrospectively analyzed 149 newly diagnosed adult AML patients admitted in a single center between April 2004 and March 2013. Patients had a median age of 49 years (18 to 84 years) and 75 (50.3%) were female. In 113 (75.8%) cases AML was classified as primary and in 36 (24.2%) as secondary. The median value of WBC was 21.5 (0.5 to 380.2) $\times 10^9/L$ and blasts was 11.0 (0.0 to 319.4) $\times 10^9/L$. The LDH was increased in 104/127 (81.9%) patients, and reached more than twice the upper limit of the reference range ($>1,236$ IU/ μL) in 61/127 (48.0%). The CD34 marker was positive in 52/95 (54.7%) patients. Eleven out of 119 (9.2%) patients had a favorable karyotype, 79/119 (66.4%) had an intermediate karyotype, 29/119 (24.4%) had an unfavorable karyotype and in 30/149 (20.1) karyotype was not performed. ITD-*FLT3* was detected in 20/144 (13.9%) patients. Mutations in *NPM1* and *IDH1* were detected in 31/144 (21.5%) and 7/114 (6.1%) patients, respectively. In the normal karyotype group these mutations were observed in 9/56 (16.1), 18/55 (32.7%) and 5/46 (10.9%) patients, respectively. There was an association between mutations in *NPM1* and intermediate risk group ($p = 0.02$), presence of normal karyotype ($p < 0.01$), absence of CD34 marker ($p < 0.01$) elevated leukocyte counts ($p < 0.01$) and blasts in peripheral blood ($p < 0.01$), serum enzyme LDH > 618 IU/ μL ($p = 0.01$) and ITD-*FLT3* ($p = 0.04$). These associations were not observed for the *IDH1* (R132) mutation. In conclusion, mutations in *NPM1* were identified in a lower frequency in our population while the *IDH1*(R132) mutation showed a similar frequency to that described for the Caucasian population. Mutations in *NPM1* were associated with prognostic factors in adult patients with AML as increased number of leukocytes and peripheral blood blasts at diagnosis, cytogenetic intermediate risk group, presence of normal karyotype and ITD-*FLT3*.

Key words: Acute Myeloid Leukemia, risk stratification, *NPM1*, *IDH1*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das leucemias mielóides agudas pelos critérios <i>French-American-Britain</i>	22
Tabela 2. Classificação das leucemias mielóides agudas segundo a Organização Mundial de Saúde em 2002.....	23
Tabela 3. Classificação das leucemias mielóides agudas segundo a Organização Mundial de Saúde em 2008.....	24
Tabela 4. Estratificação de risco para as leucemias mielóides agudas segundo a citogenética e marcadores moleculares.	38
Tabela 5. Estudos moleculares em leucemia mielóide aguda no Brasil.....	39
Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados nos testes moleculares.....	44
Tabela 7. Variáveis demográficas, clínicas e biológicas avaliadas.	51
Tabela 8. Características demográficas, clínicas e biológicas no grupo de pacientes estudados.	56
Tabela 9. Características demográficas, clínicas e biológicas nos subgrupos de pacientes com leucemia mielóide aguda primária e secundária.....	57
Tabela 10. Características demográficas, clínicas e biológicas no grupo de pacientes excluídos por indisponibilidade de amostras para testes moleculares.....	59
Tabela 11. Frequência das alterações moleculares para os genes <i>FLT3</i> , <i>NPM1</i> e <i>IDH1</i>	60
Tabela 12. Padrões de sequências consideradas na análise do gene <i>NPM1</i>	63
Tabela 13. Padrões de sequências consideradas na análise do gene <i>IDH1</i>	66
Tabela 14. Associação entre as variáveis analisadas com as mutações no gene <i>NPM1</i>	68
Tabela 15. Associação entre as variáveis analisadas com as mutações no gene <i>IDH1</i>	70
Tabela 16. Associação entre as mutações em <i>NPM1</i> e variáveis analisadas em pacientes com cariótipo normal.....	71
Tabela 17. Associação entre as mutações em <i>IDH1</i> e variáveis analisadas em pacientes com cariótipo normal.....	72
Tabela 18. Concordância entre testes moleculares para <i>NPM1-A</i>	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratificação de risco para pacientes com leucemia mielóide aguda segundo características citogenéticas e moleculares.....	36
Figura 2. Fluxograma do estudo.	54
Figura 3. Padrão de eletroforese da reação de PCR Multiplex DIT- <i>FLT3/NPM1-A</i>	62
Figura 4. Padrão de eletroforese para a reação de RT-PCR para <i>NPM1-A</i>	62
Figura 5. Padrão de eletroforese para a reação de RT-PCR para o sequenciamento dos exons 11 e 12 do gene <i>NPM1</i>	63
Figura 6. Cromatograma com a presença da sequência selvagem para os dois alelos do gene <i>NPM1</i>	64
Figura 7. Cromatograma com a presença da inserção <i>NPM1-A</i> em um alelo do gene <i>NPM1</i>	64
Figura 8. Cromatograma com a presença da inserção diferente da <i>NPM1-A</i> em um alelo do gene <i>NPM1</i>	64
Figura 9. Padrão de eletroforese da reação de PCR para sequenciamento do exon 4 do gene <i>IDH1</i>	66
Figura 10. Cromatograma com a presença da sequência selvagem para os dois alelos do gene <i>IDH1</i>	67
Figura 11. Cromatograma com a presença da mutação <i>IDH1</i> (R132) em um alelo do gene <i>IDH1</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-HG – 2-hidroxioglutarato

ABL1 – *Abl tyrosine kinase*

ANAE – Alfa-naftil acetato esterase

ASXL1 – *Additional sex combs like 1 (Drosophila)*

BAALC – *Brain and acute leukemia*

BCR – *Breakpoint cluster region*

CAE – Cloroacetato esterase

CALGB – *Cancer and Leukemia Group*

CBFb – *Core binding factor beta*

cdNA – Ácido desoxirribonucléico complementar

CEBPA – *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha*

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

DEK – *DEK oncogene*

DIT – Duplicações internas em tandem

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNMT3A – *DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha*

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DO – Densidade Ótica

ECOG – *Eastern Cooperative Oncology Group*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERG – *V-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*

ETO – *Eight twenty one*

EVII – *Ecotropic viral integration site 1*

FAB – *French-American-Britain*

FLT3 – *Fms-related tyrosine kinase 3*

HC – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HOX – *Homeobox gene*

HSC – Células Progenitoras Hematopoiéticas

IDH1 – *Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)*

IDH2 – *Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+)*

INCA – Instituto Nacional de Câncer

JM – Justamembrana

KIT – *Kit oncogene*

LDH – Lactato Desidrogenase

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LPA – Leucemia Promielocítica Aguda

MHSC – Células Progenitoras Multipotentes

MKL1 – *MKL (megakaryoblastic leukemia)/myocardin-like 1*

MLL – *Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*

MLLT3 – *Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila) translocated to, 3*

MNI – *Meningioma (disrupted in balanced translocation) 1*

MPO – Mieloperoxidase

MRC – *Medical Research Council*

MYH11 – *Myosin, heavy chain 11, smooth muscle*

NK – *Natural Killer*

NPM1 – *Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)*

NUP214 – *Nucleoporin 214kDa*

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

PAS – Ácido periódico de Schiff

PB – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDGF – *Platelet-derived growth factor*

PHF6 – *PHD finger protein 6*

PML – *Promyelocytic leukemia*

RAR α – *Retinoic acid receptor alpha*

RBM15 – *RNA binding motif protein 15*

RCBP – Registro de Câncer de Base Populacional

RNA – Ácido ribonucleico

RPNI – Ribophorin I

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase com transcrição reversa

RUNX1 – *Runt-related transcription factor 1*

RUNX1T1 – *Runt-related transcription factor 1 translocated to, 1 (cyclin D-related)*

SAME – Serviço de Arquivo Médico e Estatística

SBB – *Sudan black B*

SMD – Síndrome Mielodisplásica

SWOG – *Southwest Oncology Group*

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TdT – Desoxinucleotidil terminal transferase

TET2 – *Tet methylcytosine dioxygenase 2*

TKD – Domínios tirosina quinase

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WT-FLT3 – Alelo selvagem do gene *FLT3*

WT1 – *Wilms tumor 1*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1. Leucemias: Definição e Epidemiologia	20
2.2. Leucemia mielóide aguda	21
2.2.1. Classificação das leucemias mielóides agudas.....	22
2.2.2. Marcadores moleculares em LMA	25
2.2.3. Diagnóstico.....	30
2.2.4. Tratamento	31
2.2.5. Prognóstico.....	32
2.3. Desafio na estratificação de risco em pacientes com cariótipo normal	37
2.4. Diagnóstico molecular da leucemia mielóide aguda no Brasil.....	38
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral.....	41
3.2. Objetivos Específicos.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1. Desenho do Estudo	42
4.2. Local de Estudo.....	42
4.3. População de Estudo	42
4.4. Critérios de Inclusão	42
4.5. Critérios de Exclusão	42
4.6. Considerações éticas do estudo.....	42
4.7. Diagnóstico das leucemias mielóides agudas	43
4.8. Análise molecular das mutações nos genes <i>NPM1</i> e <i>IDH1</i>	43
4.8.1. Caracterização e identificação das amostras	44
4.8.2. Obtenção e quantificação do material genético.....	44
4.8.3. Testes moleculares para o gene <i>NPM1</i>	45
4.8.4. Teste molecular para o gene <i>IDH1</i>	47
4.8.5. Eletroforese	48
4.8.6. Purificação e quantificação de produtos de PCR para sequenciamento.....	49
4.8.7. Reações de amplificação para o sequenciamento dos genes <i>NPM1</i> e <i>IDH1</i>	49
4.8.8. Precipitação dos produtos de PCR para sequenciamento.....	50
4.8.9. Leitura e interpretação das sequências geradas.....	50
4.9. Variáveis demográficas, clínicas e biológicas	51
4.10. Análise Estatística.....	53
5. RESULTADOS	54
5.1. Pacientes	54
5.2. Características da população estudada.....	55
5.2.1. Variáveis demográficas	55
5.2.2. Variáveis biológicas	55
5.3. Análise molecular	60
5.4. Análise de associações entre variáveis	68

5.5. Análise de concordância e acurácia dos testes moleculares	74
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE A	90
APÊNDICE B.....	92
APÊNDICE C	93
APÊNDICE D	104
APÊNDICE E.....	140
ANEXO A.....	141
ANEXO B.....	142
ANEXO C.....	143
ANEXO D.....	144
ANEXO E.....	145
ANEXO F.....	146

1. INTRODUÇÃO

As leucemias mielóides agudas (LMA) são neoplasias malignas que acometem a medula óssea, impedindo a hematopoiese fisiológica devido ao acúmulo de células imaturas mielóides com alto potencial proliferativo (DESCHLER; LUBBERT, 2006). Os subtipos de LMA diferem quanto à patogênese, às anormalidades genéticas, às características clínicas e ao prognóstico (ESTEY, 2013; LOWENBERG; GRIFFIN; TALLMAN, 2003; MARCUCCI; HAFERLACH; DOHNER, 2011).

Atualmente os protocolos de tratamentos para LMA baseiam-se na presença de fatores prognósticos que podem contribuir para a estratificação dos pacientes em diferentes grupos de risco. Os principais fatores identificados até o momento incluem idade, contagem de leucócitos e blastos ao diagnóstico, histórico (se LMA primária ou secundária), ocorrência de citorredução precoce e presença de alterações ao cariótipo (DOHNER, H. et al., 2010; ESTEY, 2013; STONE, 2009). As alterações citogenéticas são consideradas o fator prognóstico de maior importância para a estratificação de risco na LMA quando analisadas individualmente e estão presentes em aproximadamente 55% dos pacientes (DOHNER, H. et al., 2010; GRIMWADE; MROZEK, 2011). A partir da pesquisa das alterações cromossômicas, os pacientes podem ser classificados em grupo de risco favorável, intermediário e desfavorável (GRIMWADE; MROZEK, 2011; STONE, 2009). Por outro lado, em pacientes com cariótipo normal a estratificação de risco ainda é um desafio (MAWAD; ESTEY, 2012).

Nas últimas três décadas, o advento de métodos diagnósticos mais refinados, como a imunofenotipagem e os testes moleculares, permitiu um progresso não apenas do diagnóstico, mas também da estratificação de risco em pacientes sem alterações de cariótipo (DOHNER, H. et al., 2010; FERRARA; SCHIFFER, 2013; MARCUCCI et al., 2011).

Neste sentido, inúmeros trabalhos buscaram determinar a frequência de mutações em marcadores moleculares relacionados a LMA e sua associação com fatores prognósticos, bem como com o desfecho da doença. O valor prognóstico de alguns deles ainda é discutido e existem apenas alguns com valor preditivo que podem auxiliar nas decisões terapêuticas em pacientes com LMA (DAMM et al., 2011; LIERSCH et al., 2014; ROCKOVA et al., 2011). Atualmente, é consenso que as mutações nos genes *FLT3*,

NPM1 e *CEBPA*, isoladas ou combinadas, têm valor prognóstico em pacientes adultos jovens, principalmente naqueles que apresentam cariótipo normal (DOHNER, H. et al., 2010; LIERSCH et al., 2014; MARCUCCI et al., 2011; SCHNITTGER et al., 2002; SCHNITTGER et al., 2005). Em contrapartida, o impacto da presença de mutações em *IDHI* em pacientes com LMA ainda é controverso e necessita melhor elucidação (DOHNER, H. et al., 2010).

No Brasil, dados referentes à caracterização dos pacientes com LMA, bem como à incidência de alterações genéticas associadas à doença são escassos (HELMAN et al., 2011). Assim, é justificada a necessidade de incrementar os estudos nacionais com foco molecular em LMA. Caracterizando melhor os pacientes com a doença quanto à sua biologia e a presença dos marcadores moleculares é possível melhorar a estratificação de risco e, conseqüentemente, estabelecer a melhor conduta terapêutica, principalmente para o grupo de pacientes com cariótipo normal.

Diante disso, o presente estudo avaliou a associação de mutações no gene *NPM1* e da mutação *IDHI*(R132) com as características demográficas, clínicas e biológicas dos pacientes com LMA atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM) e analisou a utilização de um método molecular de triagem para as mutações no gene *NPM1* em pacientes com LMA.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leucemias: Definição e Epidemiologia

As leucemias são neoplasias resultantes de alterações genéticas envolvendo as células progenitoras hematopoiéticas que impedem a hematopoiese normal, em consequência da desregulação de vias funcionais críticas do ciclo celular, da apoptose e do controle da diferenciação (CLINE, 1994; GILLILAND; JORDAN; FELIX, 2004; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004). Estas diferem quanto aos fatores etiológicos envolvidos, origens celulares, estágios de maturação, alterações genéticas, características clínicas e resposta à terapêutica.

No ano de 2012, segundo publicado pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), da Organização Mundial de Saúde (OMS), os 350 mil novos casos de leucemia contribuíram em 2,5% para o total de diagnósticos em câncer no mundo (FERLAY J, 2013). Com isso, as leucemias configuraram como o décimo terceiro tipo de câncer mais frequente no mundo, excluindo melanoma. Para este mesmo ano, 201 mil novos casos foram reportados em pacientes do sexo masculino e 151 mil em pacientes do sexo feminino (FERLAY J, 2013). No Brasil, as leucemias correspondem ao décimo segundo tipo mais prevalente de câncer na população feminina e masculina (FERLAY J, 2013), sendo estimados 5.050 casos novos em homens e 4.320 em mulheres, para o ano de 2014 (INCA, 2014). Em Minas Gerais, para o mesmo ano, estima-se 490 novos casos de leucemia em homens e 420 em mulheres (INCA, 2014).

Em 2012 foram reportados aproximadamente 266 mil óbitos por leucemia no mundo, correspondendo a 3,2% das mortes por câncer (FERLAY J, 2013). Nos países com nível de desenvolvimento humano (IDH) elevado como os Estados Unidos, França, Inglaterra e Japão a taxa de mortalidade no referido ano foi de 3,2% (FERLAY J, 2013). No Brasil, a taxa de mortalidade encontrada para o mesmo período foi de 3,3%, correspondendo à 7 mil óbitos (FERLAY J, 2013). Nas últimas décadas, em função das melhorias no acesso e da infraestrutura dos sistema de saúde, houve um considerável progresso no diagnóstico e tratamento das leucemias, com diminuição das taxas de mortalidade (DESCHLER; LUBBERT, 2006).

Em relação à faixa etária, as leucemias são o tipo de câncer mais comum em crianças com idade inferior a 15 anos. Em contrapartida, o mesmo não é observado em pacientes adultos, nos quais outros tipos de câncer tais como os de pulmão, mama e próstata são mais frequentes. Nos adultos, a leucemia mielóide aguda (LMA) é a leucemia aguda de maior frequência (DESCHLER; LUBBERT, 2006).

2.2. Leucemia mielóide aguda

O termo LMA se refere a um conjunto de doenças caracterizadas por acúmulo clonal de células mielóides imaturas na medula óssea, que diferem quanto à patogênese, às anormalidades genéticas, às características clínicas, à resposta terapêutica e ao prognóstico (ESTEY, 2013; LOWENBERG et al., 2003; MARCUCCI et al., 2011). A proliferação de células neoplásicas impede a hematopoiese fisiológica por acúmulo dessas na medula óssea. Como resultado, os pacientes podem apresentar citopenias com manifestações clínicas tais como fadiga e dispneia, infecções e hemorragias decorrentes da anemia, neutropenia e trombocitopenia, respectivamente (FERRARA; SCHIFFER, 2013). As células neoplásicas resultantes substituem as células medulares normais, migram para o sangue periférico e podem infiltrar outros órgãos tais como sistema nervoso central, pele, testículos, pulmões, entre outros (ESTEY, 2013).

A LMA é uma doença que ocorre sem distinção de faixa etária embora um maior número de novos casos da doença seja observado em pacientes com idade superior a 65 anos (AIVADO et al., 2005; DESCHLER; LUBBERT, 2006; FERRARA; SCHIFFER, 2013). Em relação ao gênero, é relatada uma frequência pouco maior nos indivíduos do sexo masculino em vários países (DESCHLER; LUBBERT, 2006). A mortalidade associada à LMA é maior na senilidade e em pacientes do sexo masculino (DESCHLER; LUBBERT, 2006).

O desenvolvimento da LMA tem sido associado à presença de alguns fatores de risco como a exposição prévia à radiação ionizante, aos agentes químicos como benzeno, aos quimioterápicos como os agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase II e desordens genéticas prévias como síndrome de Down, síndrome de Klinefelter e anemia de Fanconi. Porém, para a maioria dos pacientes com LMA a causa da doença é desconhecida (DESCHLER; LUBBERT, 2006; FERRARA; SCHIFFER, 2013). Em contrapartida, é reconhecido que a leucemogênese é um processo complexo que requer a susceptibilidade

das células progenitoras hematopoiéticas ao desenvolvimento de mutações em genes de classe I envolvidos com a indução da proliferação celular e mutações nos genes de classe II que afetam a diferenciação celular (FERRARA; SCHIFFER, 2013).

2.2.1. Classificação das leucemias mielóides agudas

Com os avanços nos métodos diagnósticos, vários sistemas de classificação das LMA foram propostos. A heterogeneidade característica da doença manifesta-se, do ponto de vista morfológico, pela variabilidade no acometimento e grau de maturação dos blastos mielóides. De acordo com os critérios FAB (*French-American-Britain*), que consideram características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas, as LMA são classificadas em oito subgrupos distintos (M0 a M7), (BENNETT et al., 1976;1985;1991) conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação das leucemias mielóides agudas pelos critérios *French-American-Britain*.

Classificação FAB		Características
M0	LMA com diferenciação mínima	MPO+ CD13+ ou CD33+ ou CD11b+
M1	LMA sem maturação	MPO+ em mais de 3% dos blastos Blastos: > 90% das células nucleadas da MO
M2	LMA com maturação	Blastos: > 30% e < 90% das células nucleadas da MO Componente monocítico < 20%
M3	Leucemia promielocítica aguda	Predomínio de promielócitos normais
M4	Leucemia mielomonocítica aguda	Blastos: > 30% e < 90% das células nucleadas da MO Componente monocítico > 20% e < 80% das células não eritróides e/ou > 5.000 monócitos/mm ³ no sangue periférico.
M5	Leucemia monocítica aguda	Componente monocítico > 80% das células não eritróides
M6	Leucemia eritróide aguda	Eritroblastos > 50% das células nucleadas da MO Blastos: > 30% das células não eritróides
M7	Leucemia megacariocítica aguda	Megacarioblastos > 30% das células nucleadas da MO

Adaptado de Bennett *et al.*, 1991.

MPO - Mieloperoxidase; MO - Medula óssea.

A evolução dos métodos de diagnóstico permitiu a classificação da LMA de acordo com a linhagem celular, o estágio de maturação e o tipo de anormalidade citogenética ou molecular envolvidas (MCKENNA, 2000), o que levou à elaboração de novos sistemas de classificação incorporando essas alterações. Diante disso, a OMS propôs, em 2002, a classificação da LMA incluindo alterações citogenéticas recorrentes. De acordo com esta classificação, os pacientes com LMA foram subdivididos em quatro subgrupos biológicos com prognósticos distintos: LMA com alterações genéticas recorrentes; LMA com

displasia de múltiplas linhagens; LMA e Síndrome Mielodisplásica (SMD) relacionadas à terapias e LMA sem categorização específica (VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação das leucemias mielóides agudas segundo a Organização Mundial de Saúde em 2002.

Grupo	Classificação
LMA com anormalidades genéticas recorrentes	LMA com t(8;21)(q22;q22), (<i>AML1</i> /ETO) LMA com eosinófilos anormais na medula óssea e inv(16)(p13q22) ou (t16;16)(p13;q22), (<i>CBFβ</i> / <i>MYH11</i>) LMA com t(15;17)(q22;q12), (<i>PML/RARα</i> _ e variantes) LMA com anormalidades 11q23 (<i>MLL</i>)
LMA com displasia multilinhagem	Após SMD ou SMD/DMP Sem SMD ou SMD/DMP, mas com displasia em pelo menos 50% das células em 2 ou mais linhagens mielóides
LMA e síndromes mielodisplásicas, relacionadas à terapias	Relacionadas a agente/radiação alquilante Tipos relacionados ao inibidor Topoisomerase II (alguns podem ser linfóides) Outros
LMA sem categorização específica	LMA com diferenciação mínima LMA sem maturação LMA com maturação Leucemia mielomonocítica aguda Leucemia monocítica aguda/monoblástica aguda Leucemia eritróide aguda (eritróide/mielóide e eritroleucemia pura) Leucemia megacarioblástica aguda Leucemia basofílica aguda Panmielose aguda com mielofibrose Sarcoma mielóide

Adaptado de Vardiman *et al.*, 2002.

LMA – Leucemia Mielóide Aguda; *AML1* – *Runt-related transcription factor 1*; *ETO* – *Eight twenty one*; *CBFβ* – *Core binding factor beta*; *MYH11* – Myosin, heavy chain 11, smooth muscle; *PML* – Promyelocytic leukemia; *RARα* – Retinoic acid receptor alpha; *MLL* – *Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*; SMD – Síndrome Mielodisplásica; DMP – Doenças Mieloproliferativas.

Em 2008, a OMS propôs a inclusão de duas entidades provisórias no grupo de LMA com anormalidades genéticas recorrentes, definidas pela presença de mutações nos genes *NPM1* e no *CEBPA*: LMA com mutação em *NPM1* e LMA com mutação em *CEBPA*, respectivamente (VARDIMAN *et al.*, 2009), conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação das leucemias mielóides agudas segundo a Organização Mundial de Saúde em 2008.

Grupo	Classificação
LMA e neoplasmas relacionados	LMA com anormalidades genéticas recorrentes
	LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFβ-MYH11</i>
	LMA com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARα</i>
	LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
	LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	LMA com inv(3)(q21 q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i>
	LMA (megacarioblástico) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLL1</i>
	Entidade provisória: LMA com mutação <i>NPM1</i>
	Entidade provisória: LMA com mutação <i>CEBPA</i>
	LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia
	Neoplasmas mielóides relacionados a terapia
	LMA sem outra classificação
	LMA com diferenciação mínima
	LMA sem maturação
	LMA com maturação
	Leucemia mielomonocítica aguda
	Leucemia monocítica aguda/monoblástica aguda
	Leucemia eritróide aguda
	Leucemia eritróide pura
	Eritroleucemia eritróide/mielóide
	Leucemia megacarioblástica aguda
	Leucemia basofílica aguda
	Panmielose aguda com mielofibrose
	Sarcoma mielóide
	Proliferações mielóides relacionadas à síndrome Down
Mielopoiese anormal transitória	
Leucemia mielóide associada à síndrome Down	
Neoplasma de células dendríticas plasmocitóides blásticas	
Leucemia não-diferenciada aguda	
Leucemia aguda de fenótipo misturado com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL 1	
Leucemia aguda de fenótipo misturado com t(v;11q23); MLL rearranjado	
Leucemia aguda de fenótipo misturado, B-mielóide, NOS	
Leucemia aguda de fenótipo misturado, T-mielóide, NOS	
Entidade provisória: leucemia/linfoma de células natural killer (NK)	
LMA de linhagem ambígua	

Adaptado de Vardiman *et al*, 2009.

RUNX1 - Runt-related transcription factor 1; *RUNX1T1* - Runt-related transcription factor 1 translocated; *CBFB* - Core binding factor beta; *MYH11* - Myosin, heavy chain 11, smooth muscle; *PML* - Promyelocytic leukemia; *RARα* - Retinoic acid receptor alpha; *MLLT3* - Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila) translocated to, 3; *MLL* - Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; *DEK* - DEK oncogene; *NUP214* - Nucleoporin 214kDa; *RPNI*-Ribophorin I; *EVII* - Ecotropic viral integration site 1; *RBM15* - RNA binding motif protein 15; *MKLL1* - MKL (megakaryoblastic leukemia)/myocardin-like 1; *NPM1* - Nucleophosmin; *CEBPA* - CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha; *BCR* - Breakpoint cluster region; *ABL1*- Abl tyrosine kinase; NOS – Not otherwise specified.

No grupo das LMA, a leucemia promielocítica aguda - LMA M3 (LPA) é considerada um subgrupo distinto. Esta é caracterizada por uma transformação maligna nas células mielóides imaturas, que bloqueia a diferenciação hematopoiética no estágio de promielócitos resultando em um aumento dessas células e de blastos, estes, de forma

menos significativa, na medula óssea e no sangue periférico. A LPA é responsável por 5% a 15% dos casos de LMA e até o ano de 1970, o diagnóstico e tratamento da LPA eram semelhantes aos adotados para as outras LMA. Entretanto, no final da década de 70, observou-se que, ao diagnóstico citogenético 50% a 80% dos pacientes apresentavam translocações no cromossomo 17 t(5;17) e t(11;17) e distúrbios de coagulação, ausentes em outros tipos de LMA. Desde então, os pacientes com LPA vem sendo submetidos à uma terapia diferenciada com ácido trans-retinóico (ATRA) o que melhorou o prognóstico dos pacientes, com taxas de remissão completa superiores a 85%, diminuição da incidência de coagulação intravascular disseminada e cura em 60% a 70% dos pacientes. Dessa forma, a LPA vem sido tratada e estudada como um grupo independente dentro das LMA (RANDOLPH, 2000).

2.2.2. Marcadores moleculares em LMA

As anormalidades genéticas observadas em pacientes com LMA podem ser decorrentes de alterações estruturais cromossômicas como inversões, translocações e deleções, bem como de alterações em pequena escala que acometem um ou vários nucleotídeos em um gene específico, como as mutações pontuais e as inserções, respectivamente. Algumas alterações genéticas recorrentes em LMA associam-se a fenótipos com subtipo morfológico específico, expressão de marcadores imunofenotípicos, apresentação clínica e resposta terapêutica distintos (FERRARA; SCHIFFER, 2013; MARTINS; FALCÃO, 2000).

2.2.2.1. Gene *FLT3*

O gene *FLT3*, localizado no cromossomo 13, posição 13q12, codifica uma proteína do tipo receptor tirosina quinase transmembrana pertencente à família de receptores de classe 3. Estes receptores são ativados em resposta à ligação em seu domínio extracelular de um fator de crescimento expresso nas células estromais medulares que, em conjunto com outros fatores de crescimento e citocinas, regula o processo de proliferação e diferenciação celular normal (KUHNL; GRIMWADE, 2012). Outros genes como *c-KIT* e *PDGF* também pertencem a esta família de receptores tirosina quinase.

As mutações em *FLT3* envolvem mutações de ponto ou duplicações internas em tandem (DIT) nos domínios tirosina quinase (TKD) e justamembrana (JM) do receptor, respectivamente. Estas mutações ocorrem em aproximadamente 30% dos pacientes com

LMA e estão associadas a uma ativação constitutiva do receptor, com consequente indução da proliferação, mediada pelas vias de transdução de sinais RAS e STAT (MARCUCCI et al., 2011).

Mutações em ponto no gene *FLT3*

As principais mutações em ponto no gene *FLT3* envolvem a alça de ativação do domínio quinase 2 e são representadas por modificações nos códons D835 e I836 que alteram a proteína codificada por substituição de um resíduo de ácido aspártico na posição 835 por um resíduo de tirosina (Asp835Tyr).

Aproximadamente 5% a 10% dos pacientes com LMA apresentam essas mutações, porém a influência no prognóstico ainda é indeterminada (KUHNL; GRIMWADE, 2012; MARCUCCI et al., 2011).

Duplicações internas em tandem no gene *FLT3*

As duplicações internas em tandem (DIT) no gene *FLT3*, descritas pela primeira vez por Nakao e colaboradores em 1996, correspondem à inserções nos exons 14 e 15 de uma sequência duplicada com 20 pb a 200 pb *in-frame*, ou seja, sem alteração do quadro de leitura do gene (NAKAO et al., 1996). Os receptores tirosina quinase com a DIT-*FLT3* perdem a atividade auto-inibitória do domínio de justamembrana e dimerizam-se na ausência do ligante, resultando em auto-fosforilação pela ativação constitutiva do receptor e consequente desregulação da proliferação celular (GILLILAND; GRIFFIN, 2002; KIYOI et al., 1998; KUHNL; GRIMWADE, 2012; MAWAD; ESTEY, 2012). Alguns estudos têm demonstrado que as DIT-*FLT3* também podem ocorrer no domínio TK1 do receptor em 30% dos casos (MARCUCCI et al., 2011).

A presença de DIT-*FLT3* é observada em aproximadamente 20% a 27% dos pacientes adultos com LMA e 35% a 45% se considerados os pacientes com cariótipo normal (BACHER; SCHNITTGER; HAFERLACH, 2010). Raramente é encontrada em pacientes com a t(8;21), inv(16)/t(16;16), e com alterações citogenéticas de pior prognóstico (BACHER et al., 2010; KOTTARIDIS et al., 2001; THIEDE et al., 2002). Além disso, essa alteração é comumente observada nos subtipos FAB M3, M3v e M5b. Estudos mais recentes têm demonstrado a sua associação com elevada contagem de leucócitos, blastos e LDH sérica ao diagnóstico (MAWAD; ESTEY, 2012).

Pacientes com DIT-*FLT3* apresentam um pior prognóstico com maior risco de recaída e menor sobrevida livre de doença (KOTTARIDIS et al., 2001; PATEL, J. P. et al., 2012; THIEDE et al., 2002). O prognóstico desfavorável está associado à ausência do alelo selvagem ou aumento da razão entre alelo mutado/alelo selvagem (DOHNER, H. et al., 2010; THIEDE et al., 2002; WHITMAN et al., 2001).

2.2.2.2. Gene *NPM1*

O gene *NPM1* está localizado no braço longo do cromossomo 5, posição 35.1, possui 12 exons e codifica um proteína nucleolar, a nucleofosmina (NPM) que transita entre o núcleo e o citoplasma celular. Diversos processos celulares são mediados pela nucleofosmina, como biogênese de ribossomos, resposta ao estresse, manutenção da estabilidade genômica, regulação da transcrição gênica, regulação do reparo de DNA, duplicação de centrômeros durante a mitose e regulação de genes supressores de tumor como p53 e p19Arf (FALINI et al., 2005; GRISENDI et al., 2006).

A descoberta das mutações em *NPM1* ocorreu, através da verificação da presença anormal da nucleofosmina no citoplasma celular (NPMc+), por métodos de imunohistoquímica (FALINI et al., 2005; MARCUCCI et al., 2011). O acúmulo citoplasmático de NPM nas células leucêmicas é consequência de mutações relacionadas ao domínio C-terminal da proteína, que criam um motivo de exportação (NES) adicional para o citoplasma e promovem a perda dos resíduos de triptofano nas posições 288 e 290, relacionados à posição nucleolar da proteína (FALINI et al., 2005; SUZUKI et al., 2005).

A alta expressão e a presença anômala de NPM citoplasmática podem contribuir para o desenvolvimento de LMA (FALINI et al., 2005; GRISENDI et al., 2006). Os principais efeitos biológicos de NPM em células neoplásicas estão relacionados ao aumento da proliferação e inibição das vias de diferenciação e apoptose celular (GRISENDI et al., 2006).

A expressão de NPM está intimamente relacionada com a proliferação celular em resposta à estímulos mitóticos. Nesta situação, o gene *NPM1* é considerado um alvo do proto-oncogene MYC, estando também relacionado à estimulação da DNA polimerase α . Acredita-se que a NPM possa estar relacionada ainda à proliferação celular, pela sua participação na síntese de ribossomos (GRISENDI et al., 2006). Em níveis elevados, a NPM funciona como uma proteína anti-apoptótica através de mecanismos indiretos de

supressão da apoptose ao se associar e inativar proteínas como PKR, NGF e p53. Além disso, a NPM mutada inativa ARF, limitando a sua capacidade de induzir a ubiquitinação de MDM2 com consequente atenuação da ativação pró-apoptótica de p53 ARF-dependente (FALINI et al., 2007; GALLAGHER; KEFFORD; RIZOS, 2006; GRISENDI et al., 2006).

As mutações no gene *NPM1* são heterozigóticas, estando presentes em 35% a 45% dos pacientes com LMA e em 46% a 64% dos pacientes com cariótipo normal (FALINI et al., 2007; VERHAAK et al., 2005). Na LMA, mais de 40 tipos de mutação foram descritas no gene *NPM1* até o momento, consistindo de pequenas inserções ou deleções de nucleotídeos de 1pb a 10 pb nas posições 956 a 971 do exon 12 que levam a um *frame shift*, ou seja a um erro no quadro de leitura, na porção C-terminal da proteína NPM1 (DOHNER, K. et al., 2005; FALINI et al., 2005; SUZUKI et al., 2005).

A alteração mais comum, denominada mutação A (*NPM1-A*), consiste na duplicação dos nucleotídeos TCTG nas posições 956 a 959 e corresponde a cerca de 80% do total de casos com a mutação (FALINI et al., 2005). As mutações B e D são observadas em aproximadamente 10% a 15% dos pacientes e as outras mutações são consideradas raras (FALINI et al., 2007).

As mutações no gene *NPM1* estão associadas a um melhor prognóstico, visto que seus portadores têm boa resposta à quimioterapia e melhor evolução, com maiores taxas de remissão completa e maior sobrevida livre de doença (DOHNER, H. et al., 2010; DOHNER, K. et al., 2005; SCHNITTGER et al., 2005).

O impacto favorável da mutação em *NPM1* deixa de existir na presença concomitante de *DIT-FLT3*, fato observado em aproximadamente 40% dos pacientes com a mutação (BACHER et al., 2010; DOHNER, H. et al., 2010; KUHNL; GRIMWADE, 2012; PATEL, J. P. et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2005). Nestes casos a presença de *DIT-FLT3* induz a ativação de vias antiapoptose e pró-proliferativas, especialmente a via STAT5, favorecendo o fenótipo leucêmico, de pior prognóstico (FALINI et al., 2007).

Diante dessas observações, recomenda-se que a análise mutacional para os genes *NPM1* e *FLT3* seja incorporada na rotina de exames dos pacientes com LMA (BACHER et al., 2010; DOHNER, H. et al., 2010; GORELLO et al., 2006; KUHNL; GRIMWADE, 2012; THIEDE et al., 2006). Atualmente, o Setor de Biologia Molecular do Laboratório

Central do HC-UFMG realiza a pesquisa de DIT-*FLT3* em todos os pacientes com LMA atendidos no Serviço de Hematologia desta instituição.

2.2.2.3. Gene *IDH1*

O gene *IDH1* é encontrado na posição 33.3 do braço longo do cromossomo 2 e sua expressão produz a enzima isocitrato desidrogenase 1, uma das três isoformas da isocitrato desidrogenase, envolvida no ciclo de krebs, participando da descarboxilação oxidativa do isocitrato.

As alterações funcionais proteicas relacionadas à presença de mutações no gene *IDH1* ainda precisam ser melhor elucidadas (MARCUCCI et al., 2011). Estudos recentes indicam que estas mutações estão associadas à leucemogênese por ganho de função enzimática, resultando em acúmulo de um oncometabólito, o 2-hidroxioglutarato (2-HG), aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), cooperação com oncogenes e hipermetilação do DNA, que interrompe a função de demetilases (KUHNL; GRIMWADE, 2012; LOSMAN et al., 2013; MARCUCCI et al., 2011). Acredita-se que o mecanismo de tumorigênese do 2-HG envolva a ativação de vias proliferativas, através da ativação de um fator de transcrição tumoral induzido por hipóxia (HIF) (GROSS et al., 2010; WARD et al., 2010) e inibição da diferenciação celular. O 2-HG pode inibir várias enzimas 2-OG-dependentes, incluindo vários demetilases de histonas e a hidroxilase TET2 5'-metilcitosina. A regulação negativa de TET2 promove o bloqueio da diferenciação celular (LOSMAN et al., 2013).

As mutações somáticas dos genes que codificam as isocitrato desidrogenases 1 e 2 (*IDH1* e *IDH2*) foram primeiramente descritas em mais de 70% dos pacientes com astrocitomas, oligodendrogliomas e glioblastomas de graus II e III da classificação OMS (BLEEKER et al., 2009; PARSONS et al., 2008; YAN, H. et al., 2009) e, mais recentemente, em pacientes com LMA (DOHNER, H. et al., 2010; MARCUCCI et al., 2011). As alterações são pontuais e envolvem o códon 132, com a troca do aminoácido arginina por cisteína (R132C), leucina (R132L), glicina (R132G), histidina (R132H) ou serina (R132S). Nestes pacientes, as mutações no exon 4 do gene *IDH1* foram observadas com frequência de 4% a 7% (PATEL et al., 2011; SCHNITTGER et al., 2010; WAGNER et al., 2010) e 10% a 15% naqueles com cariótipo normal (ABBAS et al., 2010; MARCUCCI et al., 2010) e comumente em pacientes com risco citogenético intermediário e *NPM1* mutado (ABBAS et al., 2010).

O impacto da presença de mutações em *IDH1* e *IDH2* em pacientes com LMA ainda é controverso e precisa ser melhor elucidado (DOHNER, H. et al., 2010). Alguns estudos demonstraram uma associação entre a presença de mutações em *IDH1* e um pior prognóstico, especialmente em pacientes com genótipo favorável, pela presença de mutações nos genes *NPM1* e *CEBPA* com *DIT-FLT3* selvagem (MARCUCCI et al., 2010; NOMDEDEU et al., 2012). Em contrapartida, outros trabalhos verificaram que a presença de mutações em *IDH1* não afetaria o prognóstico favorável em pacientes com *NPM1* mutado e *DIT-FLT3* selvagem (PATEL, J. P. et al., 2012). Alguns estudos ainda sugerem que o impacto desfavorável das mutações em *IDH1* seria evidente apenas no grupo de pacientes com LMA e cariótipo normal e *NPM1* não mutado (MARDIS et al., 2009; SCHNITTGER et al., 2010).

2.2.2.4. Gene *CEBPA*

O gene *CEBPA*, localizado no cromossomo 19, posição 19q13.1, codifica o fator de transcrição *CCAAT/enhancer binding protein α* (*CEBPA*), envolvido na mielopoiese normal. A presença de mutações, observadas em aproximadamente 10% a 15% dos pacientes com LMA e cariótipo normal, leva à formação de uma proteína truncada com perdas funcionais em regiões relacionadas à dimerização e ligação ao DNA (BACHER et al., 2010; FASAN et al., 2013; MAWAD; ESTEY, 2012).

Um prognóstico favorável é relacionado à presença de mutações no gene *CEBPA*, com sobrevida similar à dos pacientes com mutações isoladas em *NPM1*. Alguns estudos associam um maior nível de expressão da mutação em *CEBPA* com um melhor prognóstico. Porém, ao contrário do observado para *NPM1*, ainda é controverso o efeito de sua associação com a mutação *DIT-FLT3* (DOHNER, H. et al., 2010)

2.2.3. Diagnóstico

A realização do mielograma confirma o diagnóstico e permite, na maioria dos casos, a classificação da LMA em seus diversos subtipos, bem como a estratificação de risco. As análises realizadas na medula óssea incluem a avaliação morfológica, colorações citoquímicas, imunofenotipagem, análise citogenética e análise molecular (BAIN, 2003; DOHNER, H. et al., 2010).

A análise morfológica em aspirado de medula óssea é baseada na avaliação das células medulares em microscópio óptico utilizando a coloração May-Grunwald-Giemsa. Para a confirmação do diagnóstico de LMA uma contagem superior a 20% de blastos é requerida (DOHNER, H. et al., 2010), exceto na presença de alterações genéticas recorrentes como proposto pela OMS em 2008 (VARDIMAN et al., 2009). As colorações citoquímicas auxiliam na definição da linhagem da leucemia.

A imunofenotipagem objetiva a identificação do tipo celular envolvido, bem como o grau de maturação, através da utilização de anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos expressos nas superfícies celulares. A maioria dos marcadores requer, para o diagnóstico, a expressão em, pelo menos, 20% das células leucêmicas, exceção feita aos marcadores CD3, MPO, TdT, CD34 e CD117, cujo ponto de corte deve ser superior a 10% (DOHNER, H. et al., 2010).

A análise citogenética permite a verificação da presença de anormalidades cromossômicas, encontradas em aproximadamente 55% dos indivíduos com LMA (DOHNER, H. et al., 2010). A caracterização das alterações citogenéticas recorrentes possibilita a identificação de subgrupos biológicos com prognósticos distintos.

A análise molecular proporciona a identificação de alterações genéticas como mutações isoladas ou combinadas recorrentes em pacientes com LMA, auxiliando na estratificação de risco, especialmente nos casos em que o cariótipo é normal. (DOHNER, H. et al., 2010; ESTEY, 2013; FERRARA; SCHIFFER, 2013).

2.2.4. Tratamento

A escolha da conduta terapêutica para um paciente com LMA é baseada no subtipo e na estratificação de risco. De forma simplificada, em pacientes adultos, a terapia envolve inicialmente uma etapa de indução da remissão, durante a qual é realizada quimioterapia de três dias com fármacos do grupo dos antracíclicos (daunorubicina ou idarubicina) e de 7 dias com citarabina, combinados com o objetivo de controlar a doença e estabelecer a remissão completa.

A remissão completa é obtida com esta associação de fármacos em 70% a 80% dos pacientes com LMA e idade inferior a 60 anos (LOWENBERG et al., 2003). Considera-se como remissão completa a presença de blastos na medula óssea em percentual inferior

a 5% (FERRARA; SCHIFFER, 2013). Após a indução da remissão, uma terapia pós remissão deve ser realizada (consolidação) e consiste de ciclos adicionais de quimioterapia convencional ou quimioterapia em altas doses seguida ou não por transplante autólogo ou transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas (DOHNER, H. et al., 2010; LOWENBERG et al., 2003). No caso da leucemia promielocítica, o protocolo terapêutico brasileiro conjuga a utilização do ATRA e antracíclico (HELMAN et al., 2011).

A taxa de cura em pacientes adultos em grandes centros mundiais varia de 20% a 75% dependendo principalmente da citogenética apresentada pelo clone leucêmico (ESTEY; DOHNER, 2006). No Brasil, um estudo realizado por Souto Filho e colaboradores em um centro de referência, sem estratificação de risco pela citogenética, avaliou o desfecho de 227 pacientes com LMA em três décadas. Os resultados encontrados entre os anos de 2000 a 2008 foram uma sobrevida de 112 dias, uma sobrevida global em 5 anos de 22% e uma mediana de sobrevida livre de doença de 386 dias (SOUTO FILHO et al., 2011). Um outro estudo realizado por Helman e colaboradores em 11 centros brasileiros de referência para o tratamento para LMA indicou que o tratamento da doença no Brasil apresenta resultados inferiores se comparados a outros centros mundiais (HELMAN et al., 2011). A falta de informação citogenética e molecular para a estratificação dos pacientes com LMA em diferentes grupos de risco é apontada como principal responsável por essa discrepância (HELMAN et al., 2011).

2.2.5. Prognóstico

Em contradição ao desenvolvimento de novas tecnologias para diagnóstico e estratificação de risco dos pacientes, o prognóstico da LMA em adultos ainda é considerado ruim, uma vez que cerca da metade dos pacientes adultos jovens e 80% dos adultos com idade superior a 60 anos morre em decorrência da doença (FERRARA; SCHIFFER, 2013; GILES et al., 2002).

Os fatores prognósticos em LMA podem ser subdivididos em fatores relacionados ao paciente e aqueles diretamente dependentes das características do clone leucêmico.

2.2.5.1. Fatores prognósticos relacionados ao paciente

A idade influencia na saúde geral do indivíduo e na natureza da LMA, sendo um dos principais fatores de prognóstico da doença (STONE, 2009). Mesmo após o ajuste para outras variáveis como citogenética, genética molecular, mielodisplasia prévia e estado geral do indivíduo, a idade avançada ainda permanece como fator de pior prognóstico independente (DOHNER, H. et al., 2010). Vários estudos mostram maior incidência de morte na terapia de indução e menor sobrevida nos indivíduos mais idosos com a doença. (APPELBAUM et al., 2006; SCHOCH et al., 2004; STONE, 2009).

2.2.5.2. Fatores prognósticos relacionados à LMA

Os principais fatores prognósticos relacionados à LMA incluem a contagem de leucócitos ao diagnóstico, se a LMA é primária (*de novo*) ou secundária, a ocorrência ou não de citorredução precoce e a presença de alterações citogenéticas e moleculares ao diagnóstico (DOHNER, H. et al., 2010; GRIMWADE; HILLS, 2009).

O número elevado de leucócitos ao diagnóstico é considerado um fator independente para um prognóstico desfavorável em adultos com LMA e é mais evidente em pacientes pertencentes aos grupos com risco citogenético intermediário (DE JONGE et al., 2011; ESTEY; DOHNER, 2006). A hiperleucocitose ao diagnóstico (leucócitos em número superior a $100 \times 10^9/L$) vem sendo associada à menores taxas de remissão completa, sobrevida livre de doença e sobrevida global (DE JONGE et al., 2011).

O pior prognóstico associado à elevada contagem de leucócitos ao diagnóstico pode ser minimizado quando os blastos apresentam alterações moleculares intrínsecas, como mutações no gene *NPM1*, que os tornam mais susceptíveis à quimioterapia (CILLONI et al., 2008; GALE et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2009).

Os casos de LMA secundária são frequentes em indivíduos adultos idosos e são caracterizados pela presença de um evento prévio ao desenvolvimento da leucemia que pode ser a ocorrência de síndrome mielodisplásica (SMD), doença mieloproliferativa ou tratamentos com agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase e radioterapia. Observa-se que indivíduos com LMA secundária a SMD ou terapias prévias possuem um prognóstico pior se comparados àqueles com LMA primária, que pode ser influenciado diretamente pela idade que afeta a tolerância e a resposta positiva desses pacientes à quimioterapia (DELLA PORTA, 2013; LARSON, 2007).

Um outro fator prognóstico considerado independente e de grande importância para o prognóstico da doença é a resposta à terapia de indução. De acordo com a resposta terapêutica nesta fase é possível prever o risco de recidiva e a sobrevida global (DOHNER, H. et al., 2010; GRIMWADE; HILLS, 2009). Neste sentido, a citorredução precoce, caracterizada por uma diminuição de blastos na medula óssea a valores inferiores a 5% na avaliação do mielograma, normalmente com 7 a 10 dias de terapia de indução convencional, vem sendo reportada como um bom marcador prognóstico para a doença (DOHNER, H. et al., 2010; GRIMWADE; HILLS, 2009). Já a ausência de células blásticas no 15º dia de terapia de indução tem sido associado à uma maior sobrevida global e sobrevida livre de doença (ELLIOTT et al., 2007; FERRARA et al., 2010).

As alterações citogenéticas são consideradas o fator prognóstico mais importante para a estratificação de risco na LMA quando analisadas individualmente e estão presentes em aproximadamente 55% dos pacientes (DOHNER, H. et al., 2010). A estratificação dos pacientes em grupos de grupos de risco favorável, intermediário e desfavorável é amplamente aceita (GRIMWADE; MROZEK, 2011; STONE, 2009).

A estratificação de risco baseada na citogenética revisada do *Medical Research Council* (MRC) considera que o grupo de risco favorável inclui pacientes, com as seguintes alterações genéticas: $t(15;17)(q22;q21)$, $t(8;21)(q22;q22)$ e $inv(16)/t(16;16)$ (GRIMWADE et al., 1998). Este grupo apresenta uma maior taxa de remissão completa, baixo risco de recaída e taxa de sobrevida em 5 anos de 65% (STONE, 2009).

O grupo de risco desfavorável é representado pelas alterações no cromossomo 3 [excluindo $t(3;5)(q21_25;q31_35)$, $inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)$], no cromossomo 5 [-5, $add(5q)/del(5q)$], no cromossomo 7 [-7, $add(7q)/del(7q)$] e no cromossomo 17 [-17/ $abn(17p)$], além das translocações envolvendo o cromossomo 11 [$t(6;11)(q27;q23)$, $t(10;11)(p11_13;q23)$, $t(11q23)$ excluindo $t(9;11)(p21_22;q23)$ e $t(11;19)(q23;p13)$], a translocação $t(9;22)(q34;q11)$ e os cariótipos complexos (GRIMWADE et al., 1998). Este grupo apresenta taxa de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 10% a 15% (STONE, 2009). Os cariótipos complexos, observados em até 12% dos pacientes com LMA, são definidos como a presença de mais de 3 alterações no cariótipo, com exceção de $t(8;21)$, $inv(16)/t(16;16)$ e $t(15;17)$ (DOHNER, H. et al., 2010).

Na categoria com grupo de risco intermediário, a classificação e estratificação de risco permanecem ainda mal definidas. Nesse grupo há grande heterogeneidade e, conseqüentemente, considerável dificuldade para se estabelecer um prognóstico com a utilização da terapia convencional, uma vez que se observam variações significativas na resposta terapêutica e na evolução (MAWAD; ESTEY, 2012). Além dos pacientes com cariótipo normal, que correspondem a cerca de 40% a 45% dos pacientes com LMA (GRIMWADE; MROZEK, 2011), os que apresentam outras alterações cromossômicas não classificadas nos grupos de risco favorável ou desfavorável, como +8, +6, -Y e del(12p) estão incluídos neste grupo (GRIMWADE et al., 1998).

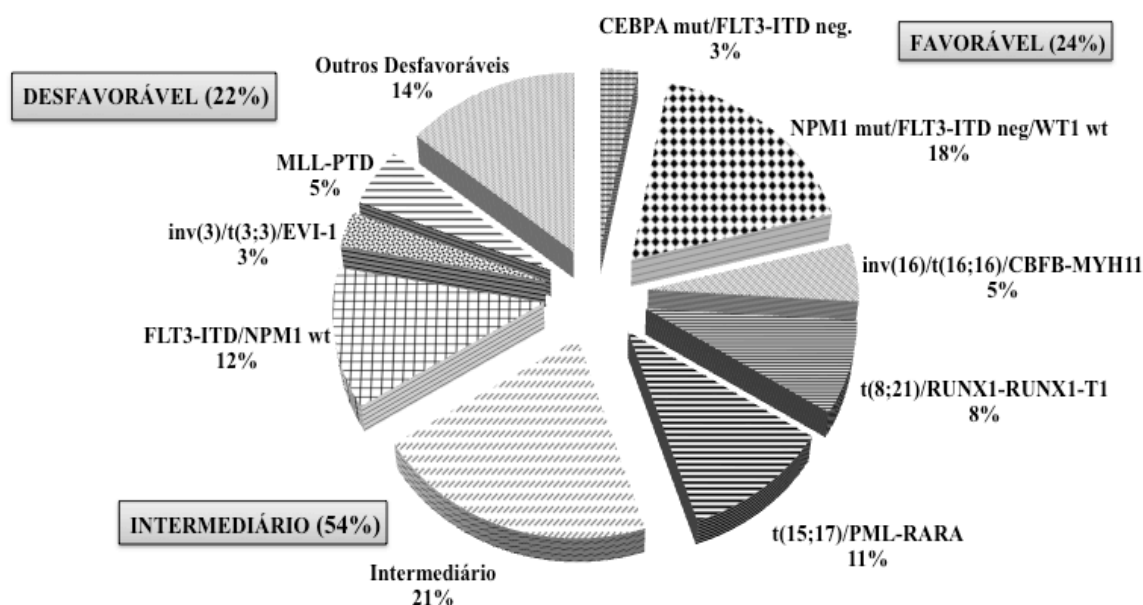
Nos últimos anos, grande esforço vem sendo feito para melhorar a estratificação de risco no grupo intermediário, em especial nos pacientes com cariótipo normal.

Mutações em vários genes como *FLT3*, *MLL*, *CEBPA*, *NPM1*, *ASLX1*, *WT1*, *ERG*, *IDH*, bem como expressão aberrante dos genes *EVII* e *BAALC*, têm sido avaliadas quanto ao seu valor prognóstico (WILLMAN, 2002). O valor prognóstico de alguns deles ainda não está claro e existem apenas alguns marcadores preditivos que podem realmente ajudar as decisões terapêuticas em pacientes com LMA (DAMM et al., 2011; LIERSCH et al., 2014; ROCKOVA et al., 2011). Na literatura, é consenso que as mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA*, isoladas ou combinadas, têm valor prognóstico em pacientes adultos jovens com cariótipo normal (DOHNER, H. et al., 2010; LIERSCH et al., 2014; MARCUCCI et al., 2011; SCHNITTGER et al., 2002; SCHNITTGER et al., 2005)

Já a influência no prognóstico de alterações em vários outros genes como *IDH1*, *WT1*, *RUNX1*, *TET2*, *EVII*, *ERG*, *MNI* e *BAALC* é ainda controversa (DAMM et al., 2011; DOHNER, H. et al., 2010; ROCKOVA et al., 2011). Alguns estudos sugerem ainda que mutações no gene *KIT* influenciam negativamente o prognóstico em pacientes com cariótipo t(8;21) ou inv(16)/t(16;16) (DOHNER, H. et al., 2010).

A Figura 1, adaptada do estudo de Grimwade e colaboradores (GRIMWADE; MROZEK, 2011) resume a estratificação de risco para pacientes adultos com LMA considerando as características citogenéticas e moleculares conjuntamente.

Figura 1. Estratificação de risco para pacientes com leucemia mieloide aguda segundo características citogenéticas e moleculares.



Adaptado de Grimwade *et al*, 2011.

RUNX1 - Runt-related transcription factor 1; *RUNX1T1* - Runt-related transcription factor 1 translocated to, 1 (cyclin D-related); *CBFB* - Core binding factor beta; *MYH11* - Myosin, heavy chain 11, smooth muscle; *PML* - Promyelocytic leukemia; *RARA* - Retinoic acid receptor alpha; *MLL* - Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, *Drosophila*); *EVI-1* - Ecotropic viral integration site 1; *NPM1* - Nucleophosmin (nuclear phosphoprotein B23, numatrin); *FLT3* - Fms-related tyrosine kinase 3; *CEBPA* - CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha.

A importância prognóstica de outros fatores como a presença de marcadores imunofenotípicos e elevados níveis séricos da enzima desidrogenase láctica (LDH) vem sendo descrita, porém os resultados encontrados na literatura ainda são controversos (DOHNER, H. et al., 2010).

Alguns marcadores de superfície celular como CD7, CD34, CD56 e HLA-DR são apontados com possível valor prognóstico. Neste sentido, a presença do antígeno CD34, uma glicoproteína transmembrana de cadeia simples expressa em células progenitoras hematopoéticas, tem sido associado à um pior prognóstico com redução na resposta à quimioterapia, menores sobrevida global e sobrevida livre de doença (CHANG et al., 2004; DANG et al., 2013).

A LDH elevada vem sendo associada à um pior prognóstico por favorecer a resistência das células tumorais à apoptose induzida por hipóxia, acarretando uma pior resposta à quimioterapia (LIERSCH et al., 2014; TENG et al., 2006).

2.3. Desafio na estratificação de risco em pacientes com cariótipo normal

Uma grande limitação à estratificação de risco citogenético são os pacientes com cariótipo normal. Diferenças significativas na resposta terapêutica e na evolução são observadas nesse grupo, sugerindo 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 DNA) também tenham impacto na biologia da doença (DAMM et al., 2011; FERRARA; SCHIFFER, 2013; WILLMAN, 2002).

Uma revisão da classificação de risco para o grupo citogenético intermediário, considerando achados moleculares, foi proposta por Patel, J.P. e colaboradores (PATEL, J. P. et al., 2012), conforme demonstrado na Tabela 4. Nesta proposta, foram considerados além dos genes *NPM1*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2* e *CEBPA*, destacados no presente trabalho, outros genes como *ASXL1* [*Additional sex combs like 1* (Drosophila)], *MLL* (*Myeloid/lymphoid* ou *mixed-lineage leukemia*), *PHF6* (*PHD finger protein 6*), *TET2* (*Tet methylcytosine dioxygenase 2*) e *DNMT3A* [*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha*)].

Pacientes sem a mutação DIT-*FLT3*, com *NPM1* e *IDH1* ou *IDH2* mutados, seriam classificados no grupo de risco favorável. O grupo de risco intermediário seria formado por pacientes DIT-*FLT3* negativo e *ASXL1*, *MLL-PTD*, *PHF6* e *TET2* selvagens; DIT-*FLT3* negativo ou positivo e *CEBPA* mutado; e DIT-*FLT3* positivo com *MLL-PTD*, *TET2*, *DNMT3A* selvagens e sem a trissomia do cromossomo 8 (PATEL, J. P. et al., 2012).

O grupo de risco desfavorável contemplaria DIT-*FLT3* negativo com *TET2*, *MLL-PTD*, *ASXL1* e *PHF6* mutados e DIT-*FLT3* positivo com *TET2*, *MLL-PTD*, *DNMT3A* mutados ou trissomia do cromossomo 8 presente sem *CEBPA* mutado (PATEL, J. P. et al., 2012).

Tabela 4. Estratificação de risco para as leucemias mielóides agudas segundo a citogenética e marcadores moleculares.

Classificação Citogenética	Mutações		Perfil Geral de Risco
Favorável	Quaisquer		Favorável
Intermediário	<i>FLT3</i> -ITD-negativo	<i>NPM1</i> mutante e <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i>	Intermediário
	<i>FLT3</i> -ITD-negativo	<i>ASXL1</i> tipo-selvagem, <i>MLL</i> -PTD, <i>PHF6</i> , <i>TET2</i>	
	<i>FLT3</i> -ITD-negativo ou positivo	<i>CEBPA</i> mutante	Desfavorável
	<i>FLT3</i> -ITD-positivo	<i>MLL</i> -PTD tipo-selvagem, <i>TET2</i> , <i>DNMT3A</i> e trissomia 8-negativa	
	<i>FLT3</i> -ITD-negativo	<i>TET2</i> mutante, <i>MLL</i> -PTD, <i>ASXL1</i> , ou <i>PHF6</i>	
<i>FLT3</i> -ITD-positivo	<i>TET2</i> mutante, <i>MLL</i> -PTD, <i>DNMT3A</i> , ou trissomia 8, sem <i>CEBPA</i> mutante		
Desfavorável	Quaisquer		

Adaptado de Patel *et al*, 2012.

ASXL1 [Additional sex combs like 1 (*Drosophila*)], *MLL* (Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia), *PHF6* (PHD finger protein 6), *TET2* (Tet methylcytosine dioxygenase 2); *FLT3*- *Fms*-related tyrosine kinase 3; *DNMT3A* [DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha)].

2.4. Diagnóstico molecular da leucemia mielóide aguda no Brasil

No Brasil, os estudos publicados referentes à incidência, caracterização clínica, biológica, citogenética e molecular de pacientes adultos com LMA são escassos, ainda que vários centros de Hematologia no país realizem algum tipo de teste molecular ao diagnóstico, principalmente para *PML-RAR α* e *FLT3* (HELMAN *et al.*, 2011).

Após busca em base de periódicos como o *PubMed*, Embase e LILACS foi possível verificar que os poucos trabalhos disponíveis abordam a caracterização dos pacientes atendidos em centros de referência no Brasil para LMA quanto a fatores prognósticos como idade, contagem de leucócitos ao diagnóstico e avaliação citogenética, bem como avaliação de desfechos da doença (HELMAN *et al.*, 2011; PAGNANO *et al.*, 2000; SOUTO FILHO *et al.*, 2011). Além disso, as publicações de grupos brasileiros em pacientes adultos com enfoque em características moleculares são ainda mais raras.

Em Minas Gerais, estudos publicados por Fagundes e colaboradores contribuíram para caracterização, bem como para a avaliação de desfechos dos pacientes com LMA atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) (FAGUNDES, E. M. *et al.*, 2006; FAGUNDES, EVANDRO M *et al.*, 1995).

Em estudo realizado no serviço de Hematologia do HC-UFMG por Bastos e colaboradores foram avaliados 201 pacientes adultos com LMA atendidos no HC-UFMG entre 2001 e 2011, com o objetivo de estudar o valor do cariótipo na sobrevida global e sobrevida livre de doença e identificar outros fatores prognósticos. Estes pacientes foram caracterizados quanto a classificação FAB (6% dos pacientes eram M0, 19% M1, 22% M2, 30% M4, 8% M5, 2% M6, 2% M7 e 11% LMA não classificada), quanto à citogenética (9 pacientes foram estratificados no grupo de risco favorável, 54 no grupo intermediário, 22 no grupo desfavorável e 8 apresentaram monossomias) e presença da DIT-*FLT3* (16,3% de 78 amostras analisadas). Neste estudo, também foram avaliadas: sobrevida global [4,2 meses (0-122)]; mortalidade na indução (21%); remissão completa (57%) e sobrevida em remissão completa [12 meses (0,4-119)] (BASTOS; et al., 2011).

As publicações com enfoque em características moleculares no Brasil buscaram relacionar a presença de alguns desses marcadores, principalmente das alterações em *FLT3*, a algumas características clínicas e biológicas dos pacientes (Tabela 5) (BASTOS; et al., 2011; DE SANTIS et al., 2013; KRUM; YAMAMOTO; CHAUFFAILLE MDE, 2009; LUCENA-ARAÚJO et al., 2010; VELLOSO et al., 2011).

Tabela 5. Estudos moleculares em leucemia mielóide aguda no Brasil.

Autores	Nº de Pacientes	Avaliação Citogenética	<i>FLT3</i> (%)	<i>NPM1</i> (%)	<i>IDH1</i> (%)
Krum <i>et al</i> (2009)	40	Favorável: 30 (32,5%) Intermediário: 11 (27,5%) Desfavorável: 9 (22,5%) Não avaliado: 50 (29,6%)	25.0	NA	NA
Lucena <i>et al</i> (2010)	169	Favorável: 54 (31,9%) Intermediário: 50 (29,6%) - Normal: 33 (19,5%) Desfavorável: 16 (9,4%) Não avaliado: 50 (29,6%)	23.6	NA	NA
Bastos <i>et al</i> (2011)	100	Favorável: 9 (10,6%) Intermediário: 54 (63,5%) Desfavorável: 22 (25,9%)	16.3	NA	NA

Autores	Nº de Pacientes	Avaliação Citogenética	<i>FLT3</i> (%)	<i>NPM1</i> (%)	<i>IDH1</i> (%)
Velloso <i>et al</i> (2011)	30	Favorável: 5 (16,6%); Intermediário: 15 (50%) - Normal: 10 (33,3%) Desfavorável: 5 (16,6%) Não avaliado: 5 (16,6%)	33.3	33.3	NA
Santis <i>et al</i> (2013)	Leucoestase:11	NA	54.5	36.4	NA
	Sem leucoestase:23	NA	26.1	17.4	NA

NPM1, nucleophosmin; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; *IDH1*, isocitrate dehydrogenase; NA, Não Avaliado.

É justificada a necessidade de incrementar os estudos nacionais com foco molecular em LMA. Caracterizando melhor os pacientes com a doença quanto à presença dos marcadores moleculares é possível melhorar a estratificação de risco e, conseqüentemente, estabelecer a melhor conduta terapêutica, principalmente para o grupo de pacientes com cariótipo normal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a associação das mutações no gene *NPM1* e no gene *IDH1* com características demográficas, clínicas e biológicas dos pacientes com LMA.

3.2. Objetivos Específicos

Determinar a frequência das mutações no exon 12 do gene *NPM1* e da mutação R132 no exon 4 do gene *IDH1* em pacientes com LMA atendidos no Serviço de Hematologia do HC-UFMG (Artigo 1).

Relacionar a presença das mutações no exon 12 do gene *NPM1* e da mutação R132 no exon 4 do gene *IDH1* com as características demográficas, clínicas e biológicas dos pacientes com LMA atendidos no Serviço de Hematologia do HC-UFMG (Artigo 1).

Analisar a acurácia dos testes PCR multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A* e RT-PCR *NPM1-A* para triagem da mutação A em *NPM1* e determinar a concordância destes com o método de referência - sequenciamento direto da regiões dos exons 11 e 12 do gene *NPM1* (Artigo 2).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho do Estudo

Este foi um estudo retrospectivo, não sequencial.

4.2. Local de Estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Hematologia Molecular do HC-UFMG. Os participantes do estudo foram atendidos no período de abril de 2004 a março de 2013 no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

4.3. População de Estudo

Foram elegíveis todos os pacientes adultos com diagnóstico confirmado de LMA admitidos no Serviço de Hematologia do HC-UFMG no período do estudo.

4.4. Critérios de Inclusão

Pacientes adultos (idade igual ou superior a 16 anos) com diagnóstico de LMA atendidos no Serviço de Hematologia do HC-UFMG no período do estudo.

4.5. Critérios de Exclusão

Pacientes com Leucemia Promielocítica Aguda (LPA).

Pacientes cujas amostras para a realização de testes moleculares estavam indisponíveis.

Pacientes com dados clínicos essenciais não disponíveis.

4.6. Considerações éticas do estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP-UFMG como um adendo ao projeto intitulado “Desenvolvimento de metodologia para a caracterização e quantificação das alterações genéticas no gene *NPM-1* em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda” e submetido à apreciação da Câmara do Departamento de Propeidêutica, do Serviço de Hematologia do HC-UFMG, da Diretoria de Ensino,

Pesquisa e Extensão do HC-UFMG e do COEP-UFMG (98/10) (Anexo A) e aprovado em todas essas instâncias.

A solicitação de adendo ao projeto mencionado foi enviada ao COEP-UFMG e deferida pela Profa. Maria Teresa Marques Amaral, coordenadora deste Comitê, em 04 de abril de 2012 (Anexo B).

Os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A) foram obtidos junto aos pacientes após a consulta de retorno no Ambulatório Borges da Costa. Para os pacientes falecidos no momento do início do projeto, foi feita uma solicitação ao COEP-UFMG para uso de dados e amostras biológicas destes pacientes sem a necessidade de assinatura do TCLE por parte dos familiares, tendo em vista a sobrecarga emocional a que estes são submetidos diante da perda de um ente querido. Esse pleito foi deferido pelo referido Comitê no dia 19 de junho de 2013 (Anexo C).

4.7. Diagnóstico das leucemias mielóides agudas

O diagnóstico dos pacientes participantes do estudo foi realizado por médicos hematologistas do Serviço de Hematologia do HC-UFMG através de análise do hemograma, mielograma, imunofenotipagem por citometria de fluxo, cariótipo e exame molecular de rotina (pesquisa de DIT-*FLT3*).

Todos estes testes foram realizados no Laboratório Central e no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

4.8. Análise molecular das mutações nos genes *NPM1* e *IDH1*

Os testes moleculares para a verificação da presença das alterações nos genes *NPM1* e *IDH1* foram realizados pela mestranda no Laboratório de Hematologia Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG.

Para a mutação *NPM1-A*, foram padronizadas reações de PCR e RT-PCR. Para amplificação parcial dos exons 11 e 12 do gene *NPM1*, foi padronizada reação de RT-PCR seguida de sequenciamento direto pelo método de Sanger. No caso da reação de PCR, foi utilizada uma estratégia de *multiplex* para a detecção simultânea da DIT-*FLT3* e da mutação *NPM1-A*, previamente padronizada pela Dra. Juliana Assumpção e otimizada

durante o presente estudo. Para a mutação *IDHI*(R132), foi padronizada reação de PCR para amplificação do exon 4, seguida de sequenciamento direto pelo método de Sanger

Na Tabela 6 estão descritos os oligonucleotídeos utilizados nestas reações.

Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados nos testes moleculares.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Reação
g-NPM1 F2	AGGCTATTCAAGATCTCTGTCTGG	
g-NPM1 R2	AAGTTCTCACTCTGCATTATAAAAAGGA	PCR multiplex
FLT3-11	GCAATTTAGGTATGAAAG CCAGC	DIT- <i>FLT3/NPM1-A</i>
FLT3-12	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC	
NPM-A	CCAAGAGGCTATTCAAGATCTCTCTC	
NPM-REV6	ACCATTTCATGTCTGAGCACC	RT-PCR <i>NPM1-A</i>
FORW6	GTTCTCTCCCAAAGTGGAAGC	RT-PCR <i>NPM1</i>
NPM-REV6	ACCATTTCATGTCTGAGCACC	pré sequenciamento
IDH-F	TGTAAAACGACGGCCAGTGTACTCAGAGCCTTCGCTTTCTGC	PCR <i>IDHI</i>
IDH-R	CAGGAA ACAGCTATGACCGCCAACATGACTTACTTGATCCCC	pré sequenciamento
FORW6	GTTCTCTCCCAAAGTGGAAGC	Sequenciamento
REV-B	TTCTTGGCAATAGAACCTGGAC	<i>NPM1</i>
M13 F	TGTAAAACGACGGCCAGT	Sequenciamento
M13 R	CAGGAAACAGCTATGACC	<i>IDHI</i>

PCR, reação em cadeia da polimerase; RT-PCR, reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa; *NPM1*, nucleophosmin; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; DIT, duplicação interna em tandem.

4.8.1. Caracterização e identificação das amostras

As amostras de medula óssea para a realização dos testes moleculares (rotineiros e específicos do estudo) foram coletadas em anticoagulante EDTA em volume de 4-5 mL. Esta punção é realizada rotineiramente por profissionais médicos habilitados, em geral hematologistas, para o diagnóstico de pacientes com suspeita de LMA.

Após identificação com o nome do paciente, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Hematologia Molecular em temperatura ambiente e devidamente registradas e identificadas com um número sequencial, de acordo com procedimentos de rotina do laboratório.

4.8.2. Obtenção e quantificação do material genético

A extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) e do ácido ribonucléico (RNA) foi realizada utilizando *kits* comerciais (Macherey-Nagel, Duren, Germany e Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes. O DNA complementar (cDNA) utilizado nas reações de RT-PCR foi obtido através de reação de retrotranscrição com a enzima *MMLV* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA).

As amostras de DNA e RNA foram quantificadas em leitura a 260 nm e avaliadas quanto a sua pureza em leitura a 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop2000 Spectrophotometer (ThermoFischer Scientific, Wilmington, USA). Foram consideradas puras as amostras que apresentaram valor para a razão entre a Densidade Ótica (DO) em 260 nm e 280 nm próximo de 1,8 para DNA e 2,0 para RNA.

Após quantificadas, as amostras de DNA foram armazenadas em refrigerador, as amostras de RNA em freezer -80°C e as amostras de cDNA em freezer -20°C, até o momento da realização dos testes moleculares.

4.8.3. Testes moleculares para o gene *NPM1*

4.8.3.1. Reação de PCR Multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A*

Na reação de PCR Multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A*, dois pares de oligonucleotídeos foram utilizados: um par alelo-específicos para a região gênica correspondente a uma porção do intron 11 e exon 12 do gene *NPM1* (g-NPM1 F2 e g-NPM1 R2), de acordo com Gorello e colaboradores (GORELLO et al., 2006); e outro par para a amplificação dos exons 11 e 12 do gene *FLT3* (FLT3-11 e FLT3-12), de acordo com Nakao e colaboradores (NAKAO et al., 1996), conforme demonstrado na Tabela 6.

Dessa forma, em uma mesma reação foram amplificadas as regiões de interesse para a mutação *NPM1-A* e para a DIT-*FLT3*. A presença da mutação A em *NPM1* foi verificada pela presença de um fragmento de 141 pb. A presença da DIT-*FLT3* foi verificada pela presença de banda(s) adicional(is) ao fragmento selvagem (WT-*FLT3*), de 329 pb. Os fragmentos maiores que o fragmento selvagem foram considerados como DIT-*FLT3* e apresentaram variação em seu tamanho, devido ao número de duplicações presentes.

Para a preparação da mistura da reação de PCR foram utilizados 10 pmol dos oligonucleotídeos g-NPM1 F2 e g-NPM1 R2, 7,5 pmol dos oligonucleotídeos FLT3-11 e FLT3-12, 0,16 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,2 mM de MgCl₂ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), tampão 10 X e 1,5 U de Tth DNA Polymerase (Biotools, Madrid, Spain). A esta mistura foi adicionado 0,3 µg de DNA genômico para um volume final de 25 µL.

A desnaturação inicial foi realizada em um ciclo de 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 63°C por 40 segundos e

extensão a 72°C por 90 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 PCR Multiplex foram incluídos um controle positivo de amostra de paciente com a mutação *NPM1-A* e com a *DIT-FLT3*, um controle negativo para estas alterações moleculares e um "branco da reação de PCR, contendo todos os reagentes da reação com exceção do DNA. O alelo selvagem do gene *FLT3* (*WT-FLT3*) funcionou como controle interno da reação.

4.8.3.2. Reação de RT-PCR *NPM1-A*

Para a reação de PCR após transcrição reversa (RT-PCR) para a mutação *NPM1-A* (RT-PCR *NPM1-A*), foi utilizado um par de oligonucleotídeos alelo-específicos para a região dos exons 11 e 12 do gene *NPM1* (*NPM-A* e *NPM-REV6*), previamente descritos por Ottone e colaboradores (OTTONE et al., 2008), gerando um produto de 314 pb. As sequências dos oligonucleotídeos estão apresentadas na Tabela 6.

Para a reação de RT-PCR foram utilizados 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,5 mM de MgCl₂ tampão 10X PCR Rxn Buffer e 1,0 U de Taq DNA Polymerase *Platinum* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). A esta mistura foi adicionado 0,3 µg de cDNA para um volume final de 25 µL. Optou-se, nesta reação, pela utilização de enzima de polimerização *hot start*, a fim de se obter maior sensibilidade e especificidade na reação.

A desnaturação inicial foi realizada em um ciclo de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 65,5°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 RT-PCR foi aplicado um controle positivo de amostra de paciente com a mutação *NPM1-A*, um controle negativo para esta alteração molecular e um controle "branco" da PCR, contendo todos os reagentes da reação com exceção do cDNA.

4.8.3.3. Reação de RT-PCR para sequenciamento dos exons 11 e 12 do gene *NPM1*

Para o sequenciamento da região dos exons 11 e 12 do gene *NPM1* foi realizada uma reação de RT-PCR prévia para amplificação da região de interesse, utilizando-se o par de oligonucleotídeos FORW6, desenhado para este estudo, e NPM-REV6, descrito por Ottone e colaboradores (OTTONE et al., 2008), gerando um produto de 378 pb. As sequências dos oligonucleotídeos estão apresentadas na Tabela 6.

Para a mistura da reação de PCR foram utilizados, 20 pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2,0 mM de MgCl₂, tampão 10X PCR RxnBuffer e 2,0 U de Taq DNA Polymerase *Platinum* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), que foram adicionados a 0,6 µg de cDNA para um volume final de 50 µL. Nesta reação optou-se também pela utilização da enzima de polimerização *hot start*.

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).

4.8.4. Teste molecular para o gene *IDH1*

A pesquisa da mutação *IDH1* (*R132*) foi feita pela amplificação do exon 4 por PCR convencional, seguida de sequenciamento direto pelo método de Sanger.

4.8.4.1. Reação de PCR para sequenciamento do exon 4 do gene *IDH1*

As amostras coletadas entre os anos 2004 a 2009 foram analisadas pela pesquisadora Ana Flavia Leonardi Tiburcio Ribeiro através da reação de sequenciamento descrita por Abbas e colaboradores (ABBAS et al., 2010).

As amostras coletadas após este período foram analisadas pela mestrandia 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 oligonucleotídeos IDH-F e IDH-R, descritas por Patel e colaboradores (PATEL et

al., 2011) (Tabela 6), gerando um produto de 420 pb. A cada um dos oligonucleotídeos foi adicionada uma "cauda" M13, a fim de criar um 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 pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 0,2 mM de DNTP de cada dNTP (100 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2,0 mM de MgCl₂, tampão 10X PCR Rxn Buffer e 1,0 U de Taq DNA Polymerase *Platinum* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), que foram adicionados a 0,75 µg de cDNA para um volume final de 50 µL. Nesta reação optou-se também pela utilização da enzima de polimerização *hot start*.

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).

4.8.5. Eletroforese

Os produtos obtidos nas reações descritas em 4.8.3.1, 4.8.3.2, 4.8.3.3 e 4.8.4.1 foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Uniscience, São Paulo, Brasil) 1,5% em solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) com incorporação do corante Sybr[®] Safe (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) a 100 V por 1 hora. Um volume de 8 µL de produto de PCR foi aplicado com 2 µL de tampão de corrida Azul de Bromofenol em cada uma das canaletas do gel. Um volume de 6 µL de marcador padrão de 100 pb *GeneRuler DNA Ladders* (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA) foi adicionado em uma das canaletas de cada gel de eletroforese, para controle do tamanho das bandas de interesse. Após o tempo de corrida, a migração dos produtos foi verificada sob luz ultra-violeta, em transiluminador acoplado ao sistema de captura de imagem e fotodocumentação KODAK EDAS 290 (Eastman Kodak Company, Rochester, USA).

4.8.6. Purificação e quantificação de produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos gerados nas reações de PCR convencional para amplificação dos exons de interesse dos genes *NPM1* e *IDH1* foram purificados, com o objetivo de se eliminar resquícios de oligonucleotídeos ou outros produtos inespecíficos, visando aumentar a qualidade das sequências a serem geradas. Para isso, utilizou-se o *kit* comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

Resumidamente, para purificar 40 μL de produto de PCR adicionou-se 200 μL de tampão e em seguida transferiu-se esta solução resultante para a coluna de adsorção. Nesta coluna, o DNA dos produtos de PCR é adsorvido para posteriormente ser eluído. Após centrifugação a 13.000 rpm em microcentrífuga por 60 segundos e descarte da solução resultante, adicionou-se 750 μL de solução de lavagem. Uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores foi realizada e a solução resultante foi novamente descartada. Em uma última etapa o produto purificado de PCR foi eluído, utilizando-se 50 μL do tampão de eluição. Uma nova centrifugação nas condições anteriores foi realizada e a solução resultante, contendo o produto de PCR purificado, foi recolhida.

Após a purificação, os produtos de PCR foram quantificados em leituras a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop2000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA). Para tal, uma alíquota de 3 μL das amostras de produto de PCR purificado foi retirada e quantificada após a calibração utilizando o tampão de eluição. Foram consideradas puras as amostras que apresentaram valor para a razão entre a Densidade Ótica (DO) em 260 nm e 280 nm de 1,8.

4.8.7. Reações de amplificação para o sequenciamento dos genes *NPM1* e *IDH1*

As reações de sequenciamento dos fragmentos dos genes *NPM1* e *IDH1* permitiram a detecção, a partir da análise individual das sequências geradas, da presença ou ausência de alterações nesses genes, nos pacientes estudados.

Para o gene *NPM1*, os oligonucleotídeos senso FORW6 e reverso REV-B foram utilizados. Uma tentativa de utilização do oligonucleotídeo reverso NPM-REV-6 foi feita, mas sem sucesso. Para o gene *IDH1*, foram testados os oligonucleotídeos senso M13F e

reverso M13R. A Tabela 6 apresenta as sequências dos oligonucleotídeos usados nas reações de sequenciamento.

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 pmol 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).

4.8.8. Precipitação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos obtidos nas reações de amplificação para o sequenciamento foram precipitados usando protocolo à base de EDTA/acetato de sódio/etanol. De acordo com este protocolo, aos produtos amplificados foram adicionados EDTA 125 mM, acetato de sódio 3 mM e etanol P.A. A solução resultante foi incubada em temperatura ambiente, na ausência de luz, por 15 minutos. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 3.000 x g, por 30 minutos, à temperatura ambiente. A placa foi então invertida e submetida a uma centrifugação adicional a 185 x g para retirada de sobrenadante. Ao material precipitado foi adicionado etanol 70% e realizada uma segunda centrifugação a 1.650 x g, por 15 minutos, a 4°C. A placa foi novamente invertida e submetida a uma centrifugação adicional a 185 x g para retirada de sobrenadante. O precipitado foi então ressuspensionado em 20 µL de formamida (Applied Biosystems, Foster City, USA), imediatamente antes da injeção da amostra no sequenciador automático de DNA ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

4.8.9. Leitura e interpretação das sequências geradas

As sequências geradas no sequenciador foram importadas para o programa Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA). As sequências de referência dos genes de interesse, disponíveis em bancos de dados genômicos como o *Ensembl*

(www.ensembl.org), também foram importadas. Neste programa, existem várias ferramentas que podem ser utilizadas para a leitura e interpretação de sequências. As sequências de interesse foram comparadas às de referência e, uma vez identificada similaridade entre elas, iniciou-se uma busca à presença das mutações de interesse na sequência.

4.9. Variáveis demográficas, clínicas e biológicas

No presente estudo, as características demográficas, clínicas e biológicas dos pacientes, coletadas e avaliadas ao diagnóstico, estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Variáveis demográficas, clínicas e biológicas avaliadas.

Variáveis demográficas, clínicas e biológicas	Classificação
Gênero	Masculino ou feminino
Idade	Não se aplica
Contagem de leucócitos no sangue periférico	Não se aplica
Contagem de blastos no sangue periférico	Não se aplica
Dosagem da enzima desidrogenase láctica (LDH)	Não se aplica
Tipo de LMA	Primária ou secundária
Classificação FAB	M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 ou M7
Cariótipo	Favorável, intermediário ou desfavorável
Marcador imunofenotípico CD34	Positivo ou Negativo
DIT- <i>FLT3</i>	Positivo ou Negativo

LMA, leucemia mielóide aguda; FAB, *French-American-British*; LDH, lactato desidrogenase; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; DIT, duplicação interna em tandem.

A obtenção dos dados foi possível pela busca direta no banco de dados do Serviço de Hematologia do HC-UFG, disponibilizado pela médica hematologista Ana Beatriz Firmato Glória, bem como pela busca ativa realizada pela mestranda e pelos alunos de iniciação científica em prontuários, sistema de informática e setores responsáveis pela realização das análises laboratoriais, quando necessário.

Os prontuários foram solicitados e analisados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME), localizado no Ambulatório Bias Fortes.

O número de leucócitos e blastos no sangue periférico ao diagnóstico foi verificado no laudo do hemograma realizado no Setor de Hematologia do Laboratório Central do HC-UFG presente no prontuário do paciente ou no sistema informatizado laboratorial Matrix. A variável “número de blastos ao diagnóstico” foi considerada somente quando o laudo apresentava a contagem diferencial de leucócitos feita por microscopia. Para as

duas variáveis, número de leucócitos e blastos no sangue periférico ao diagnóstico, considerou-se o resultado do hemograma colhido na data ou ± 3 dias da data de coleta do mielograma, desde que o paciente não tivesse iniciado a quimioterapia.

Para a LDH, também foi considerado o laudo da data ou ± 3 dias da data de coleta do mielograma desde que o paciente não tivesse iniciado a quimioterapia.

A classificação FAB foi realizada ao diagnóstico pelos médicos hematologistas do Serviço de Hematologia do HC-UFG, após análise da morfologia e contagem das células obtidas no mielograma e coradas por May-Grunwald-Giemsa, associada ao resultado da imunofenotipagem. Não foram feitas revisões das lâminas de mielograma, tendo sido utilizado o laudo emitido na data do diagnóstico como fonte dos dados.

A presença do marcador CD34 foi verificada utilizando-se o laudo da imunofenotipagem presente no prontuário do paciente ou no sistema informatizado laboratorial Matrix.

A determinação do cariótipo com banda G de células neoplásicas foi realizada no Setor de Citogenética do Laboratório Central do HC-UFG, sendo necessárias, no mínimo, 20 metáfases para essa avaliação. A coleta desses dados foi realizada utilizando-se o laudo presente no prontuário do paciente ou no sistema de informática Matrix. Com base nas alterações citogenéticas, os pacientes foram classificados em grupos de risco favorável, intermediário e desfavorável. O grupo de risco favorável inclui pacientes com $t(15;17)$, $t(8;21)$ e $inv(16)$ ou $t(16;16)$. No grupo intermediário estão presentes, além dos pacientes com cariótipo normal, outras alterações cromossômicas como $+8$, $+6$, $-Y$, $del(12p)$. Ao grupo de risco desfavorável pertencem pacientes com alterações do 3q, as deleções completas ou parciais dos cromossomos 5 e 7, $t(9;22)$, os cariótipos complexos e as monossomias. Os cariótipos complexos são definidos como a presença de mais de 3 alterações no cariótipo com exceção de $t(8;21)$, $inv(16)/t(16;16)$, $t(15;17)$, $t(9;11)$, $t(v;11)$, $inv(3)/t(3;3)$ e $t(6;9)$.

A presença de DIT-*FLT3* foi determinada no Setor de Biologia Molecular do Laboratório Central do HC-UFG, por PCR convencional. A coleta desses dados foi realizada utilizando-se o laudo presente no prontuário do paciente ou no sistema informatizado laboratorial Matrix.

4.10. Análise Estatística

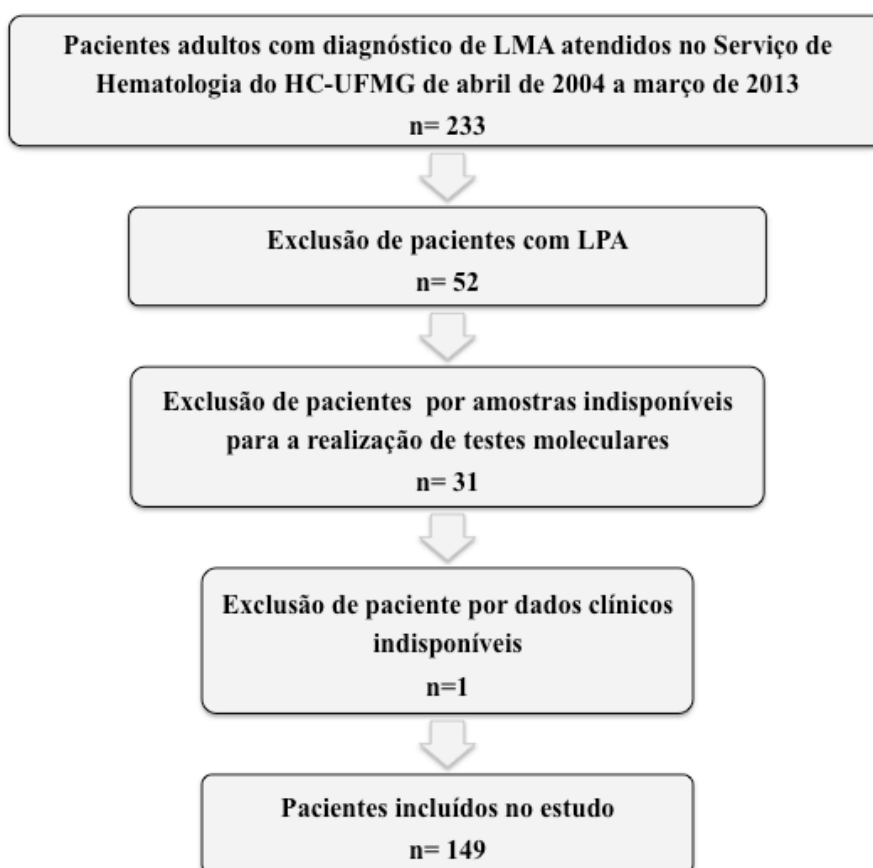
A análise estatística foi realizada utilizando o programa *IBM SPSS Statistics Standard*, versão 20.0 (International Business Machines, Armonk, EUA), disponibilizado aos alunos no laboratório de informática da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG. Os teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para as variáveis quantitativas.

As associações não casuais para as variáveis qualitativas foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fischer (quando ao menos um dos valores da tabela 2x2 era inferior a 5). O p-valor utilizado para definir significância estatística foi de 0,05. Para as variáveis quantitativas, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Para a análise de concordância entre os testes moleculares, utilizou-se a Estatística Kappa.

5. RESULTADOS

5.1. Pacientes

No período do estudo, 233 pacientes adultos com diagnóstico de LMA foram admitidos no Serviço de Hematologia do HC-UFMG. Destes, 52 (22,3%) foram diagnosticados com leucemia promielocítica aguda (LPA), em 31 (13,3%) não havia material disponível para análise molecular e em 1 paciente (0,4%) os dados clínicos não estavam disponíveis. Dessa forma, 84 pacientes foram excluídos da análise, totalizando 149 pacientes analisados neste estudo, conforme detalhado na Figura 2.



LMA - Leucemia Mielóide Aguda, LPA - Leucemia Promielocítica Aguda

Figura 2. Fluxograma do estudo.

5.2. Características da população estudada

5.2.1. Variáveis demográficas

O grupo de pacientes com LMA apresentou mediana de idade de 49 anos com variação de 18-84 anos. Cento e um pacientes (67,8%) apresentaram idade igual ou inferior a 60 anos com mediana de 38 anos e variação de 18 a 60 anos. Do total de pacientes com LMA, 75 (50,3%) eram do gênero feminino e 74 (49,7%) do masculino (Tabela 8).

5.2.2. Variáveis biológicas

Os pacientes apresentaram uma contagem global de leucócitos no sangue periférico ao diagnóstico com mediana de $21,5 \times 10^9/L$, com variação de 0,5 a $380,2 \times 10^9/L$. Destes, 25/147 pacientes (17,0%) apresentaram um número de leucócitos superior a $100 \times 10^9/L$. A contagem de blastos no sangue periférico nos pacientes estudados apresentou uma mediana de $11,0 \times 10^9/L$, com variação de 0,0 a $319,4 \times 10^9/L$ (Tabela 8).

A dosagem sérica da LDH apresentou mediana de 1.181 UI/ μL , variando de 237-12.013 UI/ μL (Tabela 8). Considerando o valor de referência de 618 UI/ μL , fornecido pelo Laboratório Central do HC-UFG, 104/127 pacientes (81,9%) apresentaram resultado superior ao valor de referência. Destes, 61/104 (58,6%) apresentaram um valor de LDH pelo menos 2 vezes maior que o limite superior ao intervalo de referência (1.236 UI/ μL).

Dentre os pacientes estudados, a maioria foi classificada como LMA-M1 e LMA-M2 correspondendo a 29,2% (n = 35) e 30,0% (n = 36), respectivamente. Em 29/149 pacientes (19,5%) não foi possível realizar a classificação do subtipo de LMA. Isso deveu-se à dificuldade de realizar a classificação pela morfologia e à não conclusão pela imunofenotipagem. Dos pacientes restantes, 8/120 (6,7%) foram classificados como LMA-M0; 27/120 (22,5%) como LMA-M4; 10/120 (8,2%) como LMA-M5; 2/120 (1,7%) como LMA-M6 e 2/120 (1,7%) como LMA-M7 (Tabela 8).

O marcador CD34 foi detectado em 52/95 pacientes (54,7%) (Tabela 8). Em 54/149 (36,2%) o marcador não foi pesquisado. O estabelecimento de uma rotina para a pesquisa dos marcadores imunofenotípicos no Serviço de Hematologia do laboratório do HC para os pacientes adultos com LMA ocorreu no ano de 2008. Diante disso, em vários pacientes com diagnóstico anterior à este ano a pesquisa do marcador CD34 não foi realizada.

Na avaliação do cariótipo, de um total de 149 pacientes, 119 (79,9%) possuíam amostras com metáfases disponíveis para análise. Destas, 58/119 (48,7%) apresentaram cariótipo normal e 61/119 (51,3%) apresentaram alguma alteração no cariótipo. Em 26/149 (17,4%) casos não foi possível analisar o cariótipo pela ausência de metáfases suficientes para a análise e, em 4/149 (2,7%) casos, a análise não foi realizada. De acordo com o cariótipo, 11/119 pacientes (9,2%) foram estratificados no grupo de risco favorável, 79/119 (66,4%) no intermediário e 29/119 (24,4%) no grupo de risco desfavorável (Tabela 8).

Um total de 113/149 (75,8%) pacientes estudados apresentaram LMA primária e 36/149 (24,2%) LMA secundária (Tabela 8).

Tabela 8. Características demográficas, clínicas e biológicas no grupo de pacientes estudados.

Características demográficas, clínicas e biológicas	Grupo LMA (n=149)
Idade em anos, mediana (variação)	49 (18-84)
Inferior a 60 anos, n (%)	101 (67,8)
Igual ou superior a 60 anos, n (%)	48 (32,2)
Gênero, n (%)	
Feminino	75 (50,3)
Masculino	74 (49,7)
Total, n	149
Leucócitos no sangue periférico $\times 10^9/L$, mediana (variação)	21,5 (0,5-380,2)
Total, n	147
Leucócitos no sangue periférico $> 100 \times 10^9/L$, n (%)	25 (17,0)
Total, n	147
Blastos no sangue periférico $\times 10^9/L$, mediana (variação)	11,0 (0-319,4)
Total, n	146
LDH sérica em UI/μL, mediana (variação)	1.181 (237-12.013)
Total, n	127
Histórico de LMA, n (%)	
LMA Primária	113 (75,8)
LMA Secundária	36 (24,2)
Total, n	149
Classificação FAB, n (%)	
LMA M0	8 (6,7)
LMA M1	35 (29,2)
LMA M2	36 (30,0)
LMA M4	27 (22,5)
LMA M5	10 (8,2)

Características demográficas, clínicas e biológicas	Grupo LMA (n=149)
LMA M6	2 (1,7)
LMA M7	2 (1,7)
Total, n	120
Classificação citogenética, n (%)	
Favorável	11 (9,2)
Intermediário	79 (66,4)
Desfavorável	29 (24,4)
Total, n	119
Status CD34, n (%)	
Positivo	52 (54,7)
Negativo	43(45,3)
Total, n	95

LMA, leucemia mielóide aguda; FAB, *French-American-British*; LDH, lactato desidrogenase. Classificação de risco citogenético (favorável, intermediário e desfavorável) conforme descrito na seção de Materiais e Métodos.

Na literatura, os trabalhos que buscaram analisar as características demográficas e biológicas apresentadas pelos pacientes com LMA consideram, em geral, dois grupos distintos de pacientes de acordo com o histórico da LMA, se primária ou secundária.

No presente estudo, para os dois grupos houve diferença estatística para as variáveis idade ($p < 0,01$) e contagem de blastos no sangue periférico ao diagnóstico ($p < 0,04$) conforme demonstrado na Tabela 9. Os pacientes com LMA primária apresentaram menor mediana para idade (44 anos, com variação de 18 a 84 anos) e maior mediana para a contagem de blastos ($13,1 \times 10^9/L$, com variação de 0 a $319,4 \times 10^9/L$) (Tabela 9).

Tabela 9. Características demográficas, clínicas e biológicas nos subgrupos de pacientes com leucemia mielóide aguda primária e secundária.

Características demográficas, clínicas e biológicas	LMA primária (n=113)	LMA secundária (n=36)	p-valor
Idade em anos, mediana (variação)	44 (18-84)	62 (18-80)	<0,01*
Inferior a 60 anos, n (%)	85 (75,2)	16 (44,4)	<0,01
Igual ou superior a 60 anos, n (%)	28 (24,8)	20 (55,6)	
Gênero, n(%)			0,45
Feminino	59 (52,2)	16 (44,4)	
Masculino	54 (47,8)	20 (55,6)	
Total, n	113	36	
Leucócitos no sangue periférico $\times 10^9/L$, mediana (variação)	21,6 (0,5-380,2)	18,1 (0,9-335,6)	0,14*
Total, n	113	34	
Leucócitos no sangue periférico $> 100 \times 10^9/L$, n (%)	22 (19,5)	3 (8,8)	0,20†

Características demográficas, clínicas e biológicas	LMA primária (n=113)	LMA secundária (n=36)	p-valor
Total, n	113	34	
Blastos no sangue periférico x10⁹/L, mediana (variação)	13,1 (0-319,4)	5,1 (0-146,0)	0,04*
Total, n	112	34	
LDH sérica em UI/μL, mediana (variação)	1.279 (237-	850 (410-12.013)	0,06*
Total, n	99	28	
Classificação FAB, n (%)			0,24†
LMA M0	8 (7,8)	-	
LMA M1	31 (30,1)	4 (23,5)	
LMA M2	26 (25,2)	10 (58,8)	
LMA M4	24 (23,3)	3 (17,6)	
LMA M5	10 (9,7)	-	
LMA M6	2 (1,9)	-	
LMA M7	2 (1,9)	-	
Total, n	103	17	
Classificação citogenética, n(%)			0,42†
Favorável	10 (11,5)	1 (3,1)	
Intermediário	57 (65,5)	22 (68,8)	
Desfavorável	20 (23,0)	9 (28,1)	
Total, n	87	32	
Status CD34, n(%)			0,61
Positivo	43 (56,6)	9 (47,4)	
Negativo	33 (43,4)	10 (52,6)	
Total, n	76	19	

LMA, leucemia mielóide aguda; FAB, *French-American-British*; LDH, lactato desidrogenase. Classificação de risco citogenético (favorável, intermediário e desfavorável) conforme descrito na seção de Materiais e Métodos; p-valor sem indicação - calculado por teste do Qui-quadrado; p-valor † - calculado pelo teste de exato de Fisher; p-valor * - calculado pelo teste de Mann-Whitney.

Uma análise comparativa foi realizada entre os pacientes incluídos no estudo e os pacientes excluídos por motivo de indisponibilidade de amostras para biologia molecular. Houve diferença entre os dois grupos para as variáveis idade ($p < 0,01$), contagem global de leucócitos ($p < 0,01$), dosagem da enzima LDH sérica ($p = 0,01$), classificação FAB ($p = 0,02$) e histórico de LMA ($p < 0,01$) (Tabela 10). Assim, os pacientes excluídos do estudo apresentaram idade mais avançada, com mediana de 73 anos (variação de 19 a 89 anos) e maior frequência de LMA secundária (78,3%). Este grupo de pacientes apresentou menor número de blastos ao diagnóstico, com mediana de $4,1 \times 10^9/L$ (variação de 0,0 a $98,0 \times 10^9/L$) e menor dosagem de LDH sérica, com mediana de 739 UI/μL (variação de 381 a 1.719 UI/μL) (Tabela 10).

Tabela 10. Características demográficas, clínicas e biológicas no grupo de pacientes excluídos por indisponibilidade de amostras para testes moleculares

Características demográficas, clínicas e biológicas	Pacientes incluídos no estudo (n=149)	Pacientes excluídos por indisponibilidade de amostras para testes moleculares (n=31)	p-valor
Idade, mediana, anos (variação)	49 (17-84)	73 (19-89)	<0.01*
Inferior a 60 anos, n (%)	101 (67.8)	7 (22.6)	<0.01
Igual ou superior a 60 anos, n (%)	48 (32.2)	24 (77.4)	
Gênero masculino, n (%)	74 (49.7)	20 (64.5)	0.17
Leucócitos x10⁹/L, mediana (variação)	21.5 (0.5-380.2)	5.3 (1.0-108.9)	0.01*
Total, n	147	20	
Blastos x10⁹/L, mediana (variação)	11,0 (0-319.4)	4,1 (0,0-98,0)	0,18*
Total, n	146	12	
LDH sérica em UI/μL, mediana (variação)	1.181 (237-12.013)	739 (381-1.719)	0,01*
Total, n	127	10	
Classificação FAB, n (%)			0,02†
AML M0	8 (5.4)	-	
AML M1	35 (23.5)	-	
AML M2	36 (24.2)	1 (2.9)	
AML M4	27 (18.1)	2 (5.9)	
AML M5	10 (6.7)	-	
AML M6	2 (1.3)	-	
AML M7	2 (1.3)	-	
Total, n	120	3	
Risco Citogenético, n (%)			0.41†
Favorável	11 (7.4)	-	
Intermediário	79 (53.0)	16 (76.2)	
Desfavorável	29 (19.5)	5 (23.8)	
Total, n	119	21	
Histórico de LMA, n (%)			<0.01
LMA Primária	113 (75.8)	5 (21.7)	
LMA Secundária	36 (24.2)	18 (78.3)	
Total, n	149	23	

LMA, leucemia mielóide aguda; FAB, French-American-British; LDH, lactato desidrogenase. Classificação de risco citogenético (favorável, intermediário e desfavorável) conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. p-valor não sinalizado foi calculado por teste do Qui-quadrado; p-valor † calculado pelo teste de exato de Fisher; p-valor * calculado pelo teste de Mann-Whitney.

5.3. Análise molecular

As frequências encontradas para as mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *IDH1* no grupo de pacientes com LMA e no grupo de pacientes com LMA com cariótipo normal estão demonstradas na Tabela 11. Nesta tabela, também estão apresentadas as frequências das alterações moleculares nos subgrupos com LMA primária e secundária.

Não houve diferença entre os grupos com LMA primária e LMA secundária para a presença das mutações nos genes *FLT3* ($p = 0,16$), *NPM1* ($p = 0,11$) e *IDH1* ($p = 1,00$) mesmo quando considerados os pacientes com cariótipo normal ($p = 0,09$; $p = 0,11$ e $p = 1,00$ respectivamente) (Tabela 11). Dessa forma, os dois grupos foram analisados em conjunto.

Tabela 11. Frequência das alterações moleculares para os genes *FLT3*, *NPM1* e *IDH1*

Frequência das mutações	Grupo LMA (n=149)	LMA primária (n=113)	LMA secundária (n=36)	p-valor
<i>NPM1</i>, n (%)				0,11†
Selvagem	113 (78,5)	82 (75,2)	31 (88,6)	
Mutado	31 (21,5)	27 (24,8)	4 (11,4)	
Total, n	144	109	35	
<i>NPM1</i> Cariótipo normal, n (%)				0,11†
Selvagem	37 (67,3)	24 (60,0)	13 (86,7)	
Mutado	18 (32,7)	16 (40,0)	2 (13,3)	
Total, n	55	40	15	
<i>IDH1</i>, n (%)				1,00†
Selvagem	107 (93,9)	83 (93,3)	24 (96,0)	
Mutado	7 (6,1)	6 (6,7)	1 (4,0)	
Total, n	114	89	25	
<i>IDH1</i> Cariótipo normal, n (%)				1,00†
Selvagem	41 (89,1)	31 (88,6)	10 (90,0)	
Mutado	5 (10,9)	4 (11,4)	1 (9,1)	
Total, n	46	35	11	
<i>FLT3</i>, n (%)				0,16†
Selvagem	124 (86,1)	93 (83,8)	31 (93,9)	
Mutado	20 (13,9)	18 (16,2)	2 (6,1)	
Total, n	144	111	33	

Frequência das mutações	Grupo LMA (n=149)	LMA primária (n=113)	LMA secundária (n=36)	p-valor
<i>FLT3</i> Cariótipo normal, n (%)				0,09†
Selvagem	47 (83,9)	33 (78,6)	14 (100,0)	
Mutado	9 (16,1)	9 (21,4)	-	
Total, n	56	42	14	

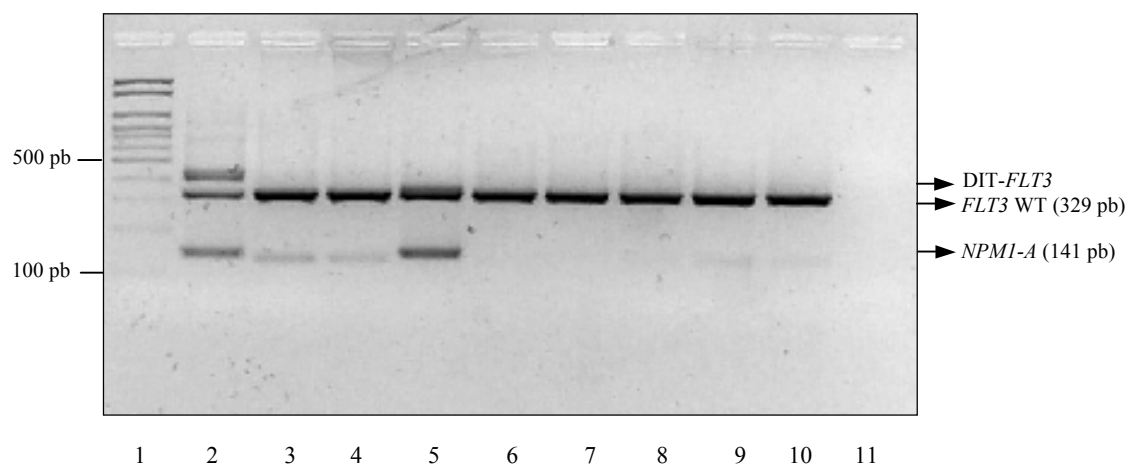
LMA, leucemia mieloide aguda; *NPM1*, nucleophosmin; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; IDT, internal tandem duplication; *IDH1*, isocitrate dehydrogenase 1. p-valor sem indicação - calculado por teste do Qui-quadrado; p-valor † - calculado pelo teste de exato de Fisher; p-valor * - calculado pelo teste de Mann-Whitney.

Na reação de PCR *Multiplex DIT-FLT3/NPM1-A*, dentre 143 amostras analisadas, 37 (25,8%) apresentaram-se positivas e 106 (74,2%) negativas para *NPM1-A*. Na reação de RT-PCR *NPM1-A*, dentre as 144 amostras analisadas, 28 (19,4%) apresentaram-se positivas e 116 (80,6%) negativas. Para a reação de sequenciamento, das 117 amostras analisadas, 24 (20,5%) apresentaram a mutação *NPM1-A*, 91 (77,8%) não a apresentaram e 2 (1,7%) pacientes apresentaram outras mutações no gene *NPM1* mas a inserção não foi caracterizada.

A reação de sequenciamento foi considerada a reação padrão-ouro para a determinação da presença de mutação no gene *NPM1*. Na ausência do resultado desta, o que ocorreu para 32 amostras (21,5%), por indisponibilidade de material para a realização do teste, considerou-se o resultado do teste de RT-PCR *NPM1-A*.

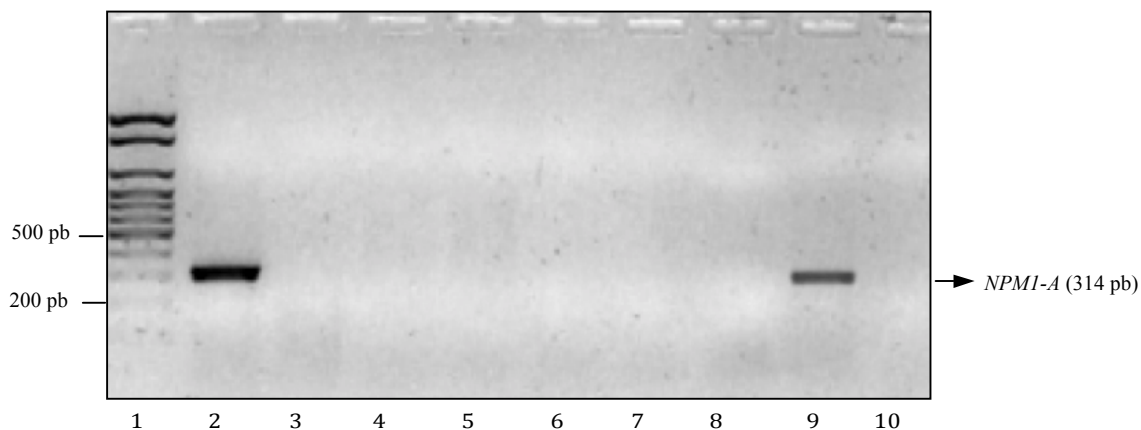
Dessa forma, considerando os resultados encontrados para as reações de sequenciamento e RT-PCR *NPM1-A*, 31/144 (21,5%) pacientes apresentaram *NPM1* mutado e 113/144 (78,5%) não apresentaram mutações neste gene. Para o grupo de pacientes com o cariótipo normal, 18/55 (32,7%) apresentaram mutações em *NPM1* (Tabela 11)

Os padrões eletroforéticos para cada uma das reações para o gene *NPM1* podem ser visualizados nas Figuras 3, 4 e 5.



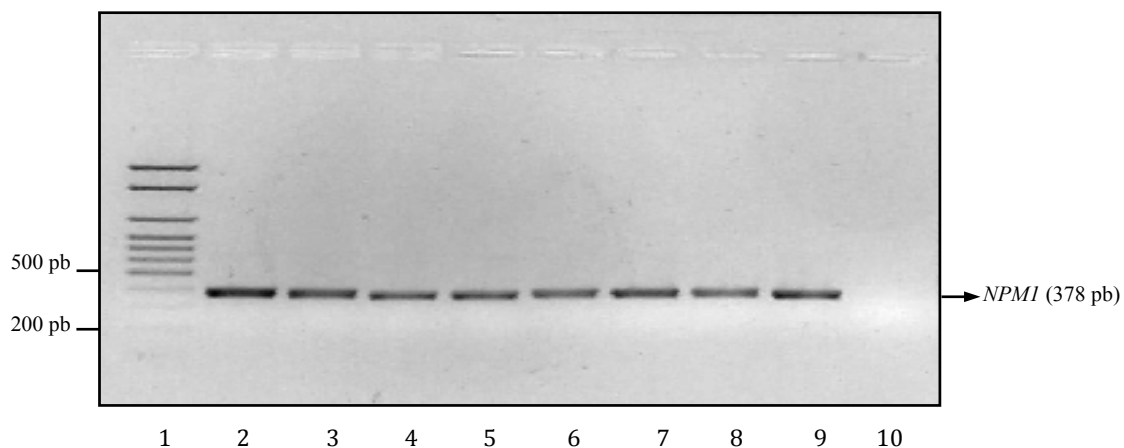
1- Padrão de peso molecular 100 pb; 2- Controle positivo para *DIT-FLT3* e *NPM1-A*; 3,4,5 - Amostras negativas para *DIT-FLT3* e positivas para *NPM1-A*; 6,7,8,9,10 - Amostras negativas para *DIT-FLT3* e *NPM1-A*; 11- Controle negativo da reação de PCR.

Figura 3. Padrão de eletroforese da reação de PCR Multiplex *DIT-FLT3/NPM1-A*.



1-Padrão de peso molecular de 100 pb ; 2- Controle positivo para *NPM1-A* (314 pb); 3- Controle negativo para *NPM1-A*; 4,5,6,7,8- Amostras negativas; 9- Amostra positiva para *NPM1-A* (314 bp); 10- Controle negativo da reação de PCR.

Figura 4. Padrão de eletroforese para a reação de RT-PCR para *NPM1-A*



1-Padrão de peso molecular 100 pb; 2,3,4,5,6,7,8,9-Amostras amplificadas; 10-Controle negativo da reação de PCR.

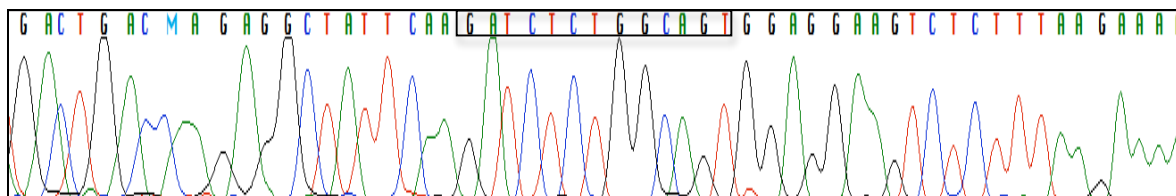
Figura 5. Padrão de eletroforese para a reação de RT-PCR para o sequenciamento dos exons 11 e 12 do gene *NPM1*.

Para a avaliação da presença de mutações no gene *NPM1*, foram considerados os seguintes padrões de sequências: sequência com os dois alelos selvagens - mutação ausente; sequência com a inserção A em um alelo e o outro alelo selvagem - mutação A e sequência com inserção não A em um alelo e o outro alelo selvagem, conforme Tabela 12.

Tabela 12. Padrões de sequências consideradas na análise do gene *NPM1*

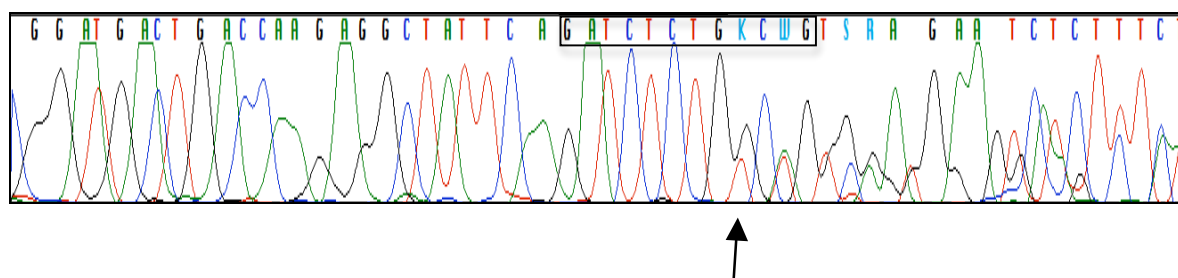
Alelo 1	Alelo 2	Sequência observada	Mutação
Selvagem	Selvagem	GATCTCTGGCAGT	Ausente
Selvagem	Inserção A	GATCTCTG <u>K</u> CWG	Mutação A em heterozigose
Selvagem	Inserção não A	GATCTCTG <u>S</u> CWG	Mutação não A em heterozigose

As figuras 6, 7 e 8 ilustram os cromatogramas relativos às sequências observadas neste estudo para o gene *NPM1*.



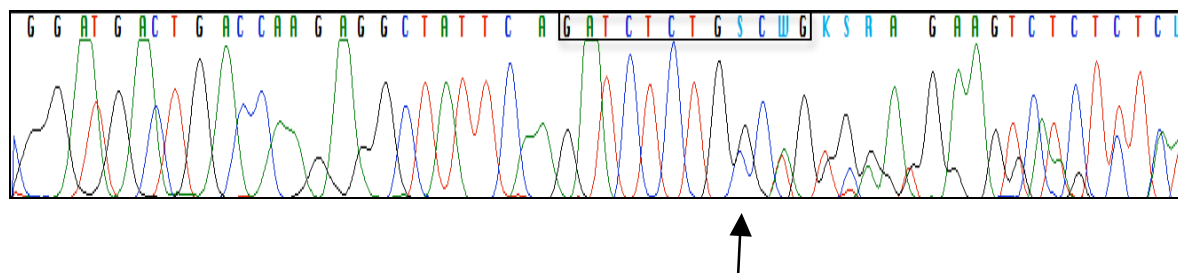
Sequência selvagem GATCTCTGGCAGT para os dois alelos do gene *NPM1*

Figura 6. Cromatograma com a presença da sequência selvagem para os dois alelos do gene *NPM1*.



Presença da inserção *NPM1-A* = GATCTCTGK CWG em um alelo do gene *NPM1*. A seta identifica o ponto de inserção representado pela letra **K**.

Figura 7. Cromatograma com a presença da inserção *NPM1-A* em um alelo do gene *NPM1*.



Presença da inserção diferente da *NPM1-A* = GATCTCTGSCWG em um alelo do gene *NPM1*. A seta identifica o ponto de inserção representado pela letra **S**.

Figura 8. Cromatograma com a presença da inserção diferente da *NPM1-A* em um alelo do gene *NPM1*

Os 31/144 pacientes com *NPM1* mutado (21,5%) apresentaram maior mediana de idade, isto é, 52 anos com variação de 22 a 78 anos. Destes, 20/31 (64,5%) apresentaram idade ao diagnóstico inferior a 60 anos. As mutações foram mais frequentes em pacientes do gênero feminino (20/31; 64,5%) e em pacientes com LMA primária, 27/31 (87,1%). A mutação em *NPM1* foi mais frequentemente encontrada em pacientes com o subtipo LMA-M1, isto é, 9/24 (37,5%). Em 7/31 pacientes (22,6%) a classificação FAB não foi determinada. Os pacientes com *NPM1* mutado apresentaram maior mediana para a

contagem de leucócitos ($51,0 \times 10^9/L$) e para a contagem de blastos ao diagnóstico ($40,3 \times 10^9/L$). A maior parte destes ou seja, 20/31 pacientes (64,5%) apresentaram a contagem de leucócitos inferior a $100 \times 10^9/L$ e apenas 6/31 pacientes (19,4%) apresentaram contagem de leucócitos superior à este valor. A expressão de CD34 foi positiva em 3/21 (14,3%) pacientes com a mutação. Dentre os pacientes mutados para *NPM1* com dosagem de LDH disponível, todos apresentaram dosagem para a enzima superior ao valor de referência (618 UI/ μ L). Vinte pacientes (90,9%) com a mutação foram classificados na categoria de risco citogenético intermediário e nenhum no grupo de risco favorável (Tabela 14).

O resultado do teste para a detecção de *FLT3*-ITD estava disponível para 144/149 pacientes (96,6%), dos quais 20/144 (13,9%) apresentaram resultado positivo. No grupo de pacientes com cariótipo normal, a mutação foi encontrada em 9/56 pacientes (16,1%) (Tabela 11).

A análise conjunta das mutações em *NPM1* e *DIT-FLT3* demonstrou que 8/140 (5,7%) pacientes apresentaram alteração para as duas mutações, 22/140 (15,7%) apresentaram *NPM1* mutado e *FLT3* selvagem e em 12/140 (8,6%) pacientes apenas a mutação *DIT-FLT3* foi observada. Para o grupo de pacientes com cariótipo normal a presença de *NPM1* mutado e *FLT3* selvagem foi detectada em 13/54 (24,1%), *NPM1* mutado e *DIT-FLT3* em 4/54 (7,4%), e 32/54 (59,3%) dos pacientes apresentaram apenas *DIT-FLT3*.

A análise geral de risco foi realizada para cada paciente, considerando o risco citogenético e o risco molecular pela pesquisa dos marcadores *NPM1* e *FLT3* (Apêndice C - Tabela suplementar 1). Após esta análise, 73/119 (61,3%) pacientes apresentaram um risco favorável, 3/119 (2,5%) intermediário e 43/119 (36,2%) desfavorável. Em 30/149 pacientes (20,1%) não foi possível realizar esta estratificação por ausência do exame citogenético.

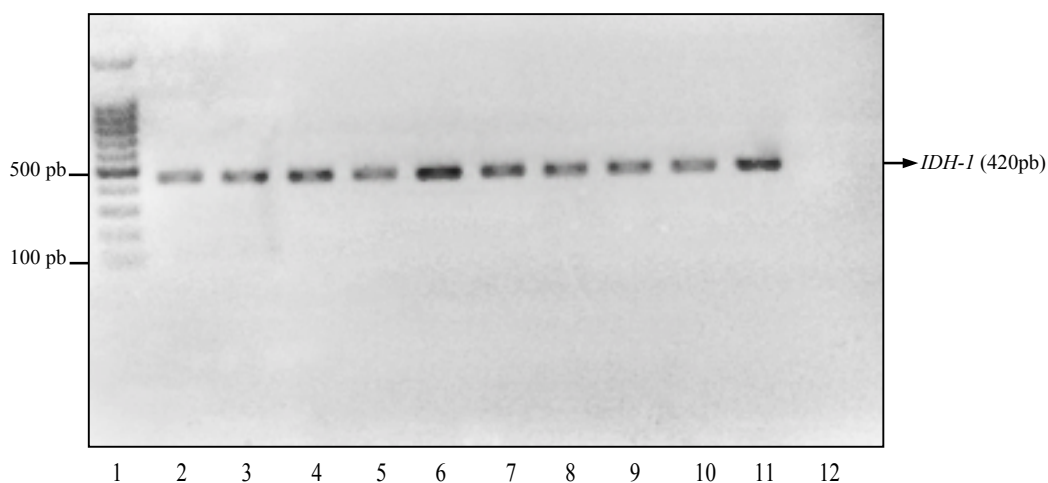
Para o gene *IDH1*, de 114 sequências analisadas, 7/114 (6,1%) apresentaram a mutação *IDH1*(R132) e 107/114 (93,6%) não a apresentaram. Não foi possível realizar a análise para *IDH1*(R132) em 36/149 pacientes (24,2%) por indisponibilidade de material para a realização do teste. No grupo de pacientes com cariótipo normal, 5/46 (10,9%) apresentaram a mutação R132 (Tabela 11).

Para a avaliação da presença da mutação *IDHI*(R132), foram considerados os seguintes padrões de seqüências: *IDHI* selvagem para os dois alelos e *IDHI* selvagem em um alelo e *IDHI*(R132) para o outro alelo, conforme observado na Tabela 13.

Tabela 13. Padrões de seqüências consideradas na análise do gene *IDHI*

Alelo 1	Alelo 2	Seqüência observada	Mutação
Selvagem	Selvagem	AGGTCGTC	Ausente
Selvagem	<i>IDHI</i> (R132)	AGGT <u>S</u> GTC	Mutação R132

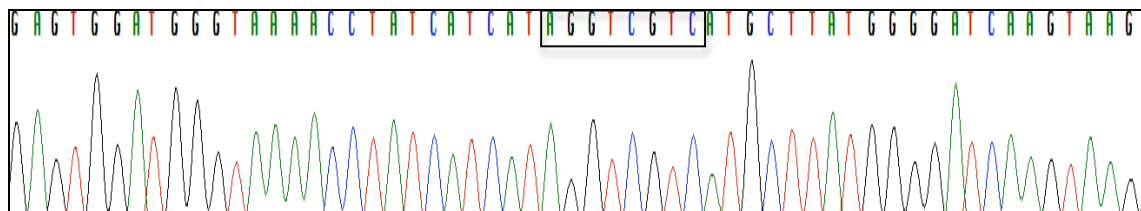
O padrão eletroforético para a reação de PCR prévia ao sequenciamento do gene *IDHI* pode ser visualizado na Figura 9.



1-Padrão de peso molecular 100 pb; 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11-Amostras amplificadas; 12-Controle negativo da reação de PCR.

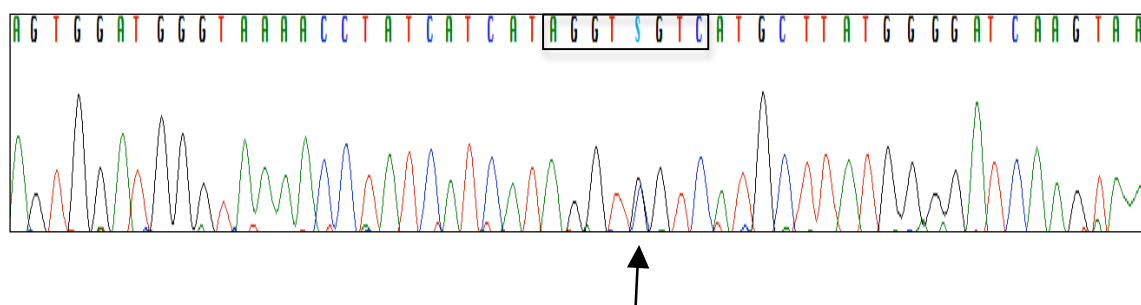
Figura 9. Padrão de eletroforese da reação de PCR para sequenciamento do exon 4 do gene *IDHI*.

As Figuras 10 e 11 ilustram os cromatogramas relativos às seqüências observadas na avaliação do gene *IDHI*.



Sequência selvagem AGGTCGTC para os dois alelos do gene *IDH1*.

Figura 10. Cromatograma com a presença da sequência selvagem para os dois alelos do gene *IDH1*.



Presença da mutação *IDH1*(R132) representada por AGGTS^SGTC em um alelo do gene *IDH1*. A seta identifica a troca do nucleotídeo citosina (C) por uma guanina (G), representada pela letra S.

Figura 11. Cromatograma com a presença da mutação *IDH1*(R132) em um alelo do gene *IDH1*.

Dos 7 pacientes com a mutação *IDH1*(R132), 6/7 (85,7) apresentaram LMA primária e idade igual ou inferior a 60 anos. A mutação foi mais frequente em pacientes do gênero masculino, sendo observada em 5/7 pacientes (71,4%). Em relação ao risco citogenético, 5/6 pacientes com a mutação (83,3%) apresentaram classificação de risco intermediária, tendo todos apresentado cariótipo normal ao diagnóstico. A expressão de CD34 foi positiva em apenas 2/5 (40,0%) dos paciente com a mutação (Tabela 15).

Dos pacientes analisados para as mutações em *NPM1* e *IDH1*, apenas 1/114 (0,9%) apresentou as duas alterações moleculares. Em análise conjunta para as mutações em *IDH1* e *DIT-FLT3*, foi verificado que 1/114 (0,9%) apresentou alteração para as duas mutações e 6/114 (5,3%) apresentaram *IDH1* mutado e *FLT3* selvagem.

5.4. Análise de associações entre variáveis

A análise de associações entre variáveis demográficas, clínicas e biológicas foi realizada com os marcadores moleculares para os genes *NPM1* e *IDH1* no grupo geral de pacientes com LMA tendo em vista que não houve diferença estatística entre os grupos de pacientes com LMA primária e secundária.

As mutações em *NPM1* se associaram ao risco citogenético intermediário ($p = 0,02$), à presença de cariótipo normal ($p < 0,01$), à ausência de marcador imunofenotípico CD34 ($p < 0,01$), ao elevado número de leucócitos no sangue periférico ($p < 0,01$), ao elevado número de blastos no sangue periférico ($p < 0,01$), ao aumento enzima LDH sérica em valor $> 618 \text{ UI}/\mu\text{L}$ ($p = 0,01$) e a *DIT-FLT3* ($p = 0,04$), como demonstrado na Tabela 14.

Tabela 14. Associação entre as variáveis analisadas com as mutações no gene *NPM1*.

Características demográficas, clínicas e biológicas	Mutado (n=31)	<i>NPM1</i>	
		Selvagem (n=113)	p-valor
Idade em anos, mediana (variação)	52 (22-78)	49 (18-84)	0,21*
Inferior a 60 anos, n (%)	20 (64,5)	80 (70,8)	0,52
Igual ou superior a 60 anos, n (%)	11 (35,5)	33 (29,2)	
Gênero, n (%)			0,16
Feminino	20 (64,5)	55 (48,7)	
Masculino	11 (35,5)	58 (51,3)	
Leucócitos no sangue periférico $\times 10^9/\text{L}$, mediana	51,0 (2,2-244,0)	18,0 (0,5-376,0)	$<0,01^*$
Total, n	31	112	
Blastos no sangue periférico $\times 10^9/\text{L}$, mediana (variação)	40,3 (0,0-231,8)	7,8 (0,0-259,4)	$<0,01^*$
Total, n	30	112	
LDH sérica em $\text{UI}/\mu\text{L}$, mediana (variação)	1.357 (638-9.596)	1.138 (237-12.013)	0,27*
Total, n	25	98	
LDH sérica, n (%)			0,01†
$\leq 618 \text{ UI}/\mu\text{L}$	-	21 (21,4)	
$> 618 \text{ UI}/\mu\text{L}$	25 (100,0)	77 (78,6)	
Total, n	25	98	
História de LMA, n (%)			0,11†
LMA primária	27 (87,1)	82 (72,6)	
LMA secundária	4 (12,9)	31 (27,4)	
Classificação FAB, n (%)			0,10†
LMA M0	-	8 (8,7)	
LMA M1	9 (37,5)	26 (28,3)	
LMA M2	3 (12,5)	31 (33,7)	

Características demográficas, clínicas e biológicas	Mutado (n=31)	<i>NPM1</i>	
		Selvagem (n=113)	p-valor
LMA M4	8 (33,3)	17 (18,5)	
LMA M5	3 (12,5)	7 (7,6)	
LMA M6	1 (4,2)	1 (1,1)	
LMA M7	-	2 (2,2)	
Total, n	24	92	
Risco Citogenético, n (%)			0,02†
Favorável	-	10 (10,9)	
Intermediário	20 (90,9)	55 (59,8)	
Desfavorável	2 (9,1)	27 (29,3)	
Total, n	22	92	
Cariótipo normal, n (%)			<0,01†
Sim	18 (81,8)	37 (40,2)	
Não	4 (18,2)	55 (59,8)	
Total, n	22	92	
Marcador CD34, n (%)			<0,01†
Positivo	3 (14,3)	47 (66,2)	
Negativo	18 (85,7)	24 (33,8)	
Total, n	21	71	
<i>FLT3</i>, n (%)			0,04
Selvagem	22 (73,3)	98 (89,1)	
DIT - <i>FLT3</i>	8 (26,7)	12 (10,9)	
Total, n	30	110	

LMA, leucemia mieloide aguda; FAB, French-American-British; LDH, lactato desidrogenase; classificação de risco citogenético (favorável, intermediário e desfavorável) conforme descrito na seção de Materiais e Métodos; *NPM1*, nucleophosmin; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; IDT, internal tandem duplication; *IDH1*, isocitrate dehydrogenase 1; p-valor sem indicação - calculado por teste do Qui-quadrado; p-valor † - calculado pelo teste de exato de Fisher; p-valor * - calculado pelo teste de Mann-Whitney.

Foi encontrada associação entre a presença da mutação R132 no gene *IDH1* com um aumento da LDH sérica ($p = 0,05$). Não foi encontrada associação com a presença de mutações no gene *NPM1* ($p = 1,00$), conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15. Associação entre as variáveis analisadas com as mutações no gene *IDHI*

Características demográficas, clínicas e biológicas	<i>IDHI</i>		p-valor
	Mutado (n=7)	Selvagem (n=107)	
Idade em anos , mediana (variação)	34 (24-65)	48 (17-84)	0,49*
Inferior a 60 anos, n (%)	6 (85,7)	75 (70,1)	0,67†
Igual ou superior a 60 anos, n (%)	1 (14,3)	32 (29,9)	
Gênero , n (%)			0,43†
Feminino	2 (28,6)	54 (40,5)	
Masculino	5 (71,4)	53 (59,5)	
Leucócitos no sangue periférico x10⁹/L , mediana (variação)	21,8 (0,8-117,0)	26,2 (0,5-380,2)	0,11*
Total, n	7	105	
Blastos no sangue periférico x10⁹/L , mediana (variação)	1,4 (0,0-75,7)	14,0 (0,0-319,3)	0,17*
Total, n	7	104	
LDH sérica em UI/μL , mediana (variação)	794 (508-1.077)	1.278 (237-9.596)	0,05*
Total, n	6	93	
LDH sérica , n (%)			0,27†
≤618 UI/ μL	2 (33,3)	15 (16,1)	
>618 UI/ μL	4 (66,7)	78 (83,9)	
Total, n	6	93	
História de LMA , n (%)			1,00†
LMA primária	6 (85,7)	83 (77,6)	
LMA secundária	1 (14,3)	24 (22,4)	
Classificação FAB n (%)			0,26†
LMA M0	-	6 (7,0)	
LMA M1	2 (28,6)	25 (29,1)	
LMA M2	2 (28,6)	23 (26,7)	
LMA M4	1 (14,3)	22 (25,6)	
LMA M5	1 (14,3)	8 (9,3)	
LMA M6	-	2 (2,3)	
LMA M7	1 (14,3)	-	
Total, n	7	86	
Risco Citogenético , n (%)			0,30†
Favorável	1 (16,7)	8 (9,3)	
Intermediário	5 (83,3)	59 (67,4)	
Desfavorável	-	20 (23,3)	
Total, n	6	86	
Cariótipo normal , n (%)			0,36†
Sim	5 (83,3)	44 (51,2)	
Não	2 (16,7)	42 (48,8)	
Total, n	6	86	

Características demográficas, clínicas e biológicas	<i>IDHI</i>		p-valor
	Mutado (n=7)	Selvagem (n=107)	
Marcador CD34, n (%)			0,64†
Positivo	2 (40,0)	42 (58,3)	
Negativo	3 (60,0)	30 (41,7)	
Total, n	5	72	
<i>FLT3</i>, n (%)			0,68†
Selvagem	6 (85,7)	91 (85,8)	
DIT - <i>FLT3</i>	1 (14,3)	15 (14,2)	
Total, n	7	106	

LMA, leucemia mielóide aguda; FAB, French-American-British; LDH, lactato desidrogenase; classificação de risco citogenético (favorável, intermediário e desfavorável) conforme descrito na seção de Materiais e Métodos; *NPM1*, nucleophosmin; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; IDT, internal tandem duplication; *IDHI*, isocitrate dehydrogenase 1; p-valor sem indicação - calculado por teste do Qui-quadrado; p-valor † - calculado pelo teste de exato de Fisher; p-valor * - calculado pelo teste de Mann-Whitney.

As tabelas 16 e 17 apresentam os resultados das análises dos marcadores moleculares para os genes *NPM1* e *IDHI* no grupo de pacientes com cariótipo normal e sua associação com as variáveis demográficas, clínicas e biológicas.

Para o gene *NPM1*, foi observada associação entre a presença de mutações e LDH sérica elevada em valores superiores a 618 UI/μL (p = 0,04) e ausência do marcador CD34 (p < 0,01) (Tabela 16).

Tabela 16. Associação entre as mutações em *NPM1* e variáveis analisadas em pacientes com cariótipo normal.

Características demográficas, clínicas e biológicas	<i>NPM1</i> - Cariótipo normal		
	Mutado (n=18)	Selvagem (n=37)	p-valor
Idade em anos, mediana (variação)	44 (25-78)	49 (17-74)	0,69*
Inferior a 60 anos, n (%)	13 (72,2)	29 (78,4)	0,74 †
Igual ou superior a 60 anos, n (%)	5 (27,8)	8 (21,6)	
Gênero, n (%)			1,00
Feminino	12 (66,7)	23 (62,2)	
Masculino	6 (33,3)	14 (37,8)	
Leucócitos no sangue periférico x10⁹/L, mediana (variação)	20,8 (2,2-146,0)	11,3 (0,9-335,6)	0,26*
Total, n	18	37	
Blastos no sangue periférico x10⁹/L, mediana (variação)	12,2 (0,0-126,8)	3,9 (0-137,1)	0,12*
Total, n	17	37	
LDH sérica em UI/μL, mediana (variação)	1.050 (638-2.838)	1.082 (269-12.013)	0,91*
Total, n	13	32	
LDH sérica, n (%)			0,04 †

Características demográficas, clínicas e biológicas	<i>NPM1</i> - Cariótipo normal		
	Mutado (n=18)	Selvagem (n=37)	p-valor
≤618 UI/ μL	-	9 (28,1)	
>618 UI/ μL	13 (100,0)	23 (71,9)	
Total, n	13	22	
Histórico de LMA, n (%)			0,11 †
LMA primária	16 (88,9)	24 (64,9)	
LMA secundária	2 (11,1)	13 (35,1)	
Classificação FAB, n (%)			0,90 †
LMA M0	-	-	
LMA M1	4 (28,7)	9 (30,0)	
LMA M2	3 (21,4)	10 (33,4)	
LMA M4	3 (21,4)	5 (16,7)	
LMA M5	3 (21,4)	4 (13,3)	
LMA M6	1 (7,1)	1 (3,3)	
LMA M7	-	1 (3,3)	
Total, n	14	30	
Marcador CD34, n (%)			<0,01 †
Positivo	1 (8,3)	16 (64,0)	
Negativo	11 (91,7)	9 (36,0)	
Total, n	12	25	
<i>FLT3</i>, n (%)			0,44 †
Selvagem	13 (76,5)	32 (86,5)	
DIT - <i>FLT3</i>	4 (23,5)	5 (13,5)	
Total, n	17	37	

LMA, leucemia mielóide aguda; FAB, French-American-British; LDH, lactato desidrogenase; classificação de risco citogenético (favorável, intermediário e desfavorável) conforme descrito na seção de Materiais e Métodos; *NPM1*, nucleophosmin; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; IDT, internal tandem duplication; *IDH1*, isocitrate dehydrogenase 1; p-valor sem indicação - calculado por teste do Qui-quadrado; p-valor † - calculado pelo teste de exato de Fisher; p-valor * - calculado pelo teste de Mann-Whitney.

Para o gene *IDH1* não foram encontradas associações entre a mutação *IDH1*(R132) com as variáveis analisadas, conforme apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Associação entre as mutações em *IDH1* e variáveis analisadas em pacientes com cariótipo normal.

Características demográficas, clínicas e biológicas	<i>IDH1</i> - Cariótipo normal		
	Mutado (n=5)	Selvagem (n=41)	p-valor
Idade em anos, mediana (variação)	34 (24-59)	48 (17-74)	0,35*
Inferior a 60 anos, n (%)	5 (100,0)	29 (70,7)	0,30 †
Igual ou superior a 60 anos, n (%)	-	12 (29,3)	

Características demográficas, clínicas e biológicas	<i>IDH1</i> - Cariótipo normal		
	Mutado (n=5)	Selvagem (n=41)	p-valor
Gênero, n (%)			0,06 †
Feminino	-	28 (62,3)	
Masculino	5 (100,0)	13 (31,7)	
Leucócitos no sangue periférico x10⁹/L, mediana (variação)	21,0 (1,4-75,7)	18,1 (0,9-380,2)	0,19*
Total, n	5	40	
Blastos no sangue periférico x10⁹/L, mediana (variação)	1,1 (0,1-75,7)	9,3 (0,0-319,3)	0,30*
Total, n	5	39	
LDH sérico em UI/μL, mediana (variação)	794(578-1.053)	1.039 (368-3.796)	0,36*
Total, n	4	34	
LDH sérica, n (%)			1,00 †
≤618 UI/ μL	1 (25,0)	7 (20,6)	
>618 UI/ μL	3 (75,0)	27 (79,4)	
Total, n	4	34	
História de LMA, n (%)			1,00 †
LMA primária	4 (80,0)	31 (75,6)	
LMA secundária	1 (20,0)	10 (24,4)	
Classificação FAB, n (%)			0,24 †
LMA M0	-	-	
LMA M1	1 (20,0)	9 (28,1)	
LMA M2	2 (40,0)	7 (21,9)	
LMA M4	-	8 (25,0)	
LMA M5	1 (20,0)	6 (18,8)	
LMA M6	-	2 (6,3)	
LMA M7	1 (20,0)	-	
Total, n	5	32	
Marcador CD34, n (%)			1,00†
Positivo	2 (40,0)	14 (50,0)	
Negativo	3 (60,0)	14 (50,0)	
Total, n	5	28	
<i>FLT3</i>, n (%)			1,00†
Selvagem	4 (80,0)	32 (80,0)	
DIT - <i>FLT3</i>	1 (20,0)	8 (20,0)	
Total, n	5	40	

LMA, leucemia mieloide aguda; FAB, French-American-British; LDH, lactato desidrogenase; classificação de risco citogenético (favorável, intermediário e desfavorável) conforme descrito na seção de Materiais e Métodos; *NPM1*, nucleophosmin; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; IDT, internal tandem duplication; *IDH1*, isocitrate dehydrogenase 1; p-valor sem indicação - calculado por teste do Qui-quadrado; p-valor † - calculado pelo teste de exato de Fisher; p-valor * - calculado pelo teste de Mann-Whitney.

5.5. Análise de concordância e acurácia dos testes moleculares

Para verificar a concordância entre os testes moleculares para a pesquisa da mutação *NPM1-A* (PCR Multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A*, *NPM1-A* RT-PCR e sequenciamento direto) utilizou-se a Estatística Kappa. Para isso, os resultados dos testes PCR Multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A* e *NPM1-A* RT-PCR foram comparados com os resultados obtidos pelo sequenciamento, considerado como teste confirmatório para a detecção da mutação.

Os dois testes apresentaram ótima concordância com o sequenciamento direto, com Kappa=0,85 para o teste PCR Multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A* e Kappa=0,92 para o teste *NPM1-A* RT-PCR, conforme apresentado na Tabela 18.

Tabela 18. Concordância entre testes moleculares para *NPM1-A*

Testes Moleculares	Sequenciamento <i>NPM1</i>		
	Positivo	Negativo	
PCR Multiplex DIT-<i>FLT3/NPM1-A</i>			
Positivo	23	6	29
Negativo	0	81	81
	23	87	Kappa= 0,85 (95%CI=0,72-0,96)
RT-PCR <i>NPM1-A</i>			
Positivo	22	1	23
Negativo	2	90	92
	24	91	Kappa= 0,92 (95%CI=0,81-1,00)

PCR, reação em cadeia da polimerase; *NPM1*, nucleophosmin; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; DIT, duplicação interna em tandem.

A sensibilidade encontrada para o teste de PCR Multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A* foi de 100% (23/23) e para o teste *NPM1-A* RT-PCR foi de 92% (22/24). A especificidade encontrada para o teste de PCR Multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A* foi de 93% (81/87) e para o teste *NPM1-A* RT-PCR foi de 99% (90/91). A acurácia dos testes foi calculada através da Razão de Probabilidade (*Likelihood Ratio*) positiva e negativa (RP+ e RP-). O teste de PCR Multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A* apresentou RP+ de 14,3 e RP- de 0,0. O teste *NPM1-A* RT-PCR apresentou RP+ de 92 e RP- de 0,08.

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi analisar a frequência das mutações nos genes *NPM1* e *IDH1*, bem como sua associação com características demográficas, clínicas e biológicas em 149 pacientes com LMA atendidos em um centro de referência. Os resultados demonstraram que em nossa população as mutações nestes genes são menos frequentes do que relatado para a população caucasiana. Além disso, observamos que as mutações no gene *NPM1* estão associadas a fatores prognósticos para a LMA tais como maior número de leucócitos e blastos no sangue periférico ao diagnóstico, grupo de risco citogenético intermediário, presença de cariótipo normal nas células leucêmicas ao diagnóstico e presença de marcador DIT-*FLT3*.

Os pacientes com LMA primária e LMA secundária foram analisados separadamente, conforme suas características demográficas, clínicas e biológicas, e diferiram para as variáveis referentes à contagem de blastos no sangue periférico ao diagnóstico ($p = 0,04$) e idade ao diagnóstico ($p < 0,01$). A associação com a idade mais avançada em pacientes com LMA secundária (mediana de idade de 62) deve-se provavelmente a uma maior incidência de síndrome mielodisplásica previamente ao desenvolvimento de LMA, que por sua vez apresenta maior frequência em indivíduos mais velhos (GERMING et al., 2005; LARSON, 2007). Em contrapartida, os pacientes com LMA secundária apresentaram uma mediana para contagem de blastos inferior à encontrada para o grupo com LMA primária, provavelmente devido à citopenia ao diagnóstico, usualmente relatada em pacientes com LMA secundária (GERMING et al., 2005; LARSON, 2007). Uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos de LMA primária e secundária para a presença de mutações nos genes *NPM1* e *IDH1*, ambos foram agrupados e analisados como um único grupo. Pacientes com LMA-M3 ($n = 52$; 22,3% dos pacientes com LMA) foram excluídos da análise por serem considerados um grupo diferenciado quanto ao diagnóstico, tratamento e prognóstico dentre as LMA (RANDOLPH, 2000; SMITH et al., 2004; WARRELL et al., 1993).

As mutações no gene *NPM1* são de valor prognóstico reconhecido em pacientes adultos com LMA, sendo definidas como entidade provisória no sistema de classificação proposto pela OMS em 2008 (VARDIMAN et al., 2009). Dentre estas mutações, a inserção A é a mais frequente, correspondendo a 80% das mutações, embora outras inserções como a B e D sejam também encontradas nestes pacientes (DOHNER, K. et al.,

2005; FALINI et al., 2005; SUZUKI et al., 2005). Em nosso estudo, encontramos uma frequência de 21,5% para as mutações em *NPM1* nos pacientes adultos com LMA, percentual inferior ao encontrado na literatura para a população caucasiana que varia entre 27% (THIEDE et al., 2006) a 48% (DOHNER, K. et al., 2005). O grupo de pacientes com LMA e cariótipo normal apresentou frequência de mutações em *NPM1* de 33%, inferior ao descrito na população caucasiana, que varia entre 46% (FALINI et al., 2007) e 79% (THIEDE et al., 2006). A discordância encontrada pode ser decorrente de: (i) menor número de pacientes analisados em nosso estudo, se comparado aos estudos internacionais que apresentam elevado número de participantes (ii) diferença no grupo de pacientes selecionados, tendo em vista que a maior parte dos estudos internacionais delimita o seu grupo de pacientes com idade inferior a 60 anos e LMA primária e (iii) diferenças populacionais. É relatado na literatura diferenças para a frequência das mutações em *NPM1* em diferentes grupos étnicos, ainda que estas diferenças sejam mais significativas entre grupos asiáticos e europeus (RAU; BROWN, 2009). Em países asiáticos, as mutações em *NPM1* são relatadas em 14% a 28% dos pacientes adultos com LMA (CHOU et al., 2006; SUZUKI et al., 2005; YAN, L. et al., 2007), enquanto que em países europeus estas mutações são encontradas em aproximadamente 35% dos pacientes (FALINI et al., 2005; GALE et al., 2008; VERHAAK et al., 2005). No Brasil, o único estudo molecular avaliou 30 pacientes e encontrou *NPM1* mutado em 33% dos pacientes com LMA e em 50% dos pacientes com LMA e cariótipo normal (VELLOSO et al., 2011). A diferença deste estudo em relação ao nosso pode ser decorrente do menor número de pacientes analisados no estudo de Velloso e colaboradores.

A realização dos testes moleculares em *NPM1*, *FLT3* e *CEBPA* é de reconhecida importância no grupo de risco citogenético intermediário, principalmente nos pacientes com cariótipo normal, pois permite classificar parte destes pacientes no grupo de risco favorável ou desfavorável (PATEL, J. P. et al., 2012). Em nosso estudo, um maior número de pacientes, i.e., 79/119 (66,4%) apresentou risco citogenético intermediário. Para estes pacientes, ao avaliarmos a presença das mutações em *NPM1* e *FLT3* identificamos que 14/73 (19%) apresentaram a combinação *NPM1* mutado - DIT-*FLT3* selvagem. Estes pacientes teriam, teoricamente, um melhor prognóstico, visto que não apresentam DIT-*FLT3* (BACHER et al., 2010; DOHNER, H. et al., 2010; KUHN; GRIMWADE, 2012; PATEL, J. P. et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2005), porém o desfecho da doença para estes pacientes não foi avaliado neste trabalho. A frequência

encontrada para a combinação *NPM1* mutado - *DIT-FLT3* foi inferior (8/140; 5,7%) aos dados mundiais, onde estas mutações em conjunto são encontradas em frequência de 30% a 60% (DOHNER, H. et al., 2010; SUZUKI et al., 2005). Esse resultado pode ser decorrente das menores frequências encontradas individualmente para essas mutações em nosso estudo.

A mutação R132 em *IDH1*, de reconhecido valor prognóstico em gliomas (BLEEKER et al., 2009; PARSONS et al., 2008; YAN, H. et al., 2009), vem sendo mais recentemente avaliada quanto ao seu valor prognóstico em pacientes com LMA. Não há ainda na literatura consenso sobre a real importância da determinação desse marcador, sendo que alguns trabalhos ainda divergem sobre a influência da mutação para a estratificação de risco e prognóstico em pacientes com LMA (DOHNER, H. et al., 2010). Em nosso estudo encontramos uma frequência da mutação R132 de 6,1%, semelhante ao relatado na literatura, que varia de 6% a 8% (WAGNER et al., 2010) (PATEL et al., 2011; SCHNITTGER et al., 2010). Já no grupo com LMA e cariótipo normal, a frequência encontrada foi de 5/46 (10,9%), também concordante com a frequência descrita na literatura, que varia de 10% a 15% (ABBAS et al., 2010; MARCUCCI et al., 2010).

Os resultados do presente estudo demonstram uma associação das mutações em *NPM1* com um maior número de leucócitos ($p < 0,01$) e de blastos ($p < 0,01$) no sangue periférico ao diagnóstico, com ausência do marcador CD34 ($p < 0,01$), com grupo de risco citogenético intermediário ($p = 0,02$), com a presença de cariótipo normal nas células leucêmicas ao diagnóstico ($p < 0,01$) e com o marcador *DIT-FLT3* ($p = 0,04$). Essas associações corroboram com os resultados reportados na literatura (BACHER et al., 2010; FERRARA; SCHIFFER, 2013). Em nosso estudo encontramos, ainda, associação entre a presença de mutações em *NPM1* e o aumento da enzima LDH sérica em valor > 618 UI/ μ L ($p = 0,01$), o que também foi relatada por Dohner e colaboradores (DOHNER, K. et al., 2005).

A associação entre a presença de *NPM1* mutado e risco citogenético intermediário é relatada em vários trabalhos, com maior frequência de mutações neste gene para os pacientes com cariótipo normal (FALINI et al., 2005; VERHAAK et al., 2005). O número elevado de leucócitos ao diagnóstico é considerado um fator adverso independente ao prognóstico da doença (DALAL et al., 2012; DANG et al., 2013; DOHNER, H. et al., 2010; HASLAM et al., 2010). A aparente contradição entre a

presença de mutações em *NPM1*, associada a um melhor prognóstico, e elevado número de leucócitos ao diagnóstico, associado a pior prognóstico, sugere que os blastos com *NPM1* mutado possam ser mais susceptíveis os efeitos da quimioterapia. Assim, nestas situações, um pior prognóstico associado à contagem elevada de leucócitos ao diagnóstico poderia ser compensado pela presença de mutação em *NPM1* (CILLONI et al., 2008; GALE et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2009). A menor expressão do marcador imunofenotípico CD34 tem sido relatado principalmente em pacientes com *NPM1* mutado com um número elevado de leucócitos e blastos no sangue periférico ao diagnóstico (DANG et al., 2013). Em nosso trabalho encontramos uma frequência de 3/29 células (14,3%) positivas para o marcador imunofenotípico CD34 em pacientes com *NPM1* mutado, concordante com a baixa expressão desse marcador relatada na literatura (DANG et al., 2013; FALINI; SPORTOLETTI; MARTELLI, 2009). A associação entre as mutações em *NPM1* e *DIT-FLT3* é frequentemente relatada na literatura. Vários estudos associam esta condição à um pior prognóstico, visto que outros pacientes, principalmente aqueles com cariótipo normal e *DIT-FLT3* negativo, apresentam maiores taxas de remissão completa, maior sobrevida global e maior sobrevida livre de doença (DOHNER, H. et al., 2010; DOHNER, K. et al., 2005; SCHNITTGER et al., 2005).

Para o gene *IDHI*, foi encontrada associação entre a presença da mutação R132 e aumento da LDH sérica ($p = 0,05$). Porém, esta diferença pode ser decorrente do pequeno número de pacientes mutados em nosso estudo.

Na literatura, outras associações entre as mutações *NPM1* e *IDHI* (R132) com características demográficas, clínicas e biológicas dos pacientes são descritas. Alguns trabalhos encontraram associação entre as mutações em *NPM1* e idade mais avançada (FALINI et al., 2005), ao gênero feminino e aos subtipos FAB LMA-M4 e LMA-M5 (DOHNER, K. et al., 2005). Para mutação R132 em *IDHI* tem sido relatada a associação com a presença de cariótipo normal, número elevado de leucócitos ao diagnóstico e *NPM1* mutado (LIERSCH et al., 2014; PATEL, J. P. et al., 2012). Porém, estas associações não foram observadas no presente trabalho. Uma potencial justificativa para a ausência destas associações pode se dever ao pequeno tamanho da amostra analisada e diferenças na seleção dos pacientes e na população de estudo.

Para a detecção das mutações em *NPM1* ao diagnóstico, várias técnicas tem sido propostas. Estas incluem sequenciamento direto, RT-PCR, cromatografia líquida de alta

eficiência e eletroforese capilar (GORELLO et al., 2006; OTTONE et al., 2008). Neste sentido, procuramos analisar a concordância e acurácia dos testes moleculares de triagem da mutação A em *NPM1*, i.e., PCR multiplex DIT-*FLT3/NPM1-A* e RT-PCR *NPM1-A* utilizando o sequenciamento direto das regiões dos exons 11 e 12 do gene *NPM1* como teste padrão-ouro.

A concordância entre os testes moleculares pode ser considerada muito boa, visto que a estatística Kappa foi superior a 80%. A maior concordância foi encontrada entre a reação de RT-PCR *NPM1-A* e a reação de sequenciamento *NPM1-A* (Kappa = 0,92). A acurácia dos testes para a detecção da mutação A do gene *NPM1* também pode ser considerada muito boa, visto que ambos apresentaram Razão de Probabilidade (*Likelihood Ratio*), $RP+ >10$ e $RP- <0,1$. Dessa forma, o teste de RT-PCR pode ser utilizado na rotina laboratorial para triagem da mutação *NPM1-A* em pacientes com LMA, pois além da alta concordância, sensibilidade e especificidade, apresenta menor custo, rápida execução e menor exigência de equipamentos sofisticados se comparado ao sequenciamento (OTTONE et al., 2008).

Por ser um trabalho retrospectivo e não consecutivo, este estudo apresenta algumas limitações, tais como: (i) possível viés de informação, uma vez que os dados sobre as características demográficas, clínicas e biológicas foram coletados dos prontuários dos pacientes (ii) possível viés de diagnóstico, visto que não foram feitas revisões das lâminas de mielograma. Ainda, como já discutido, o pequeno tamanho amostral bem como as diferenças de composição de pacientes do estudo podem ter influenciado nos resultados das associações. Entretanto, o tamanho amostral é o maior já avaliado quanto aos marcadores moleculares em pacientes com LMA estudados no Brasil e na América Latina. Por último, a indisponibilidade de amostras para a análise molecular bem como a não realização do teste citogenético em alguns pacientes podem ter contribuído para os resultados encontrados neste estudo.

7. CONCLUSÃO

Em nossa população, as mutações nos genes *NPM1* foram identificadas em menor frequência quando comparadas aos resultados na literatura para a população caucasiana. Para a mutação R132 no gene *IDH1*, a frequência encontrada é semelhante ao descrito na literatura para a população caucasiana. As mutações em *NPM1* estão associadas à fatores prognósticos de reconhecida importância em pacientes adultos com LMA, tais como maior número de leucócitos e de blastos no sangue periférico ao diagnóstico, presença de cariótipo normal nas células leucêmicas ao diagnóstico, grupo de risco citogenético intermediário e *DIT-FLT3* selvagem. A pesquisa conjunta de mutações em *NPM1* e *FLT3* pode contribuir para a determinação do grupo de risco dos pacientes, auxiliando na escolha terapêutica e avaliação prognóstica.

Os testes moleculares de rotina, em especial, o RT-PCR apresentaram boa acurácia e técnica simples podendo contribuir para a estratificação de risco nos pacientes adultos com LMA.

REFERÊNCIAS

- 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.
- APPELBAUM, F. R. et al. Age and acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3481-5, May 1 2006.
- BACHER, U.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. **Curr Opin Oncol**, v. 22, n. 6, p. 646-55, Nov 2010.
- BAIN, B. J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2ª. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
- BASTOS, P. et al. **Cariótipo é o fator mais importante para a sobrevida em remissão completa para pacientes jovens com LMA “de novo” enquanto a leucometria inicial é o principal fator para a sobrevida global. Análise retrospectiva de 10 anos em um único centro.** Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo 2011.
- 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.
- BENNETT, J. M. et al. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

CLINE, M. J. The molecular basis of leukemia. **N Engl J Med**, v. 330, n. 5, p. 328-36, Feb 3 1994.

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.

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.

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.

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.

DE SANTIS, G. C. et al. Genetic Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia and Leukostasis. **Acta Haematol**, v. 130, n. 2, p. 95-97, Mar 23 2013.

DELLA PORTA, M. G. Prognosis of secondary acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 37, n. 8, p. 857-8, Aug 2013.

DESCHLER, B.; LUBBERT, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. **Cancer**, v. 107, n. 9, p. 2099-107, Nov 1 2006.

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.

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.

ELLIOTT, M. A. et al. Early peripheral blood blast clearance during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia predicts superior relapse-free survival. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4172-4, Dec 15 2007.

ESTEY, E. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. **Am J Hematol**, v. 88, n. 4, p. 318-27, Apr 2013.

ESTEY, E.; DOHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 368, n. 9550, p. 1894-907, Nov 25 2006.

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.

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.

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.

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.

FALINI, B.; SPOROLETTI, P.; MARTELLI, M. P. Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives. **Curr Opin Oncol**, v. 21, n. 6, p. 573-81, Nov 2009.

FASAN, A. et al. Frequency and prognostic impact of CEBPA proximal, distal and core promoter methylation in normal karyotype AML: a study on 623 cases. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e54365, 2013.

FERLAY J, S. I., ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. **GLOBOCAN 2012**, v. 10, p. <http://globocan.iarc.fr>, 17/04/2013 2013.

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.

FERRARA, F.; SCHIFFER, C. A. Acute myeloid leukaemia in adults. **Lancet**, v. 381, n. 9865, p. 484-95, Feb 9 2013.

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.

GALLAGHER, S. J.; KEFFORD, R. F.; RIZOS, H. The ARF tumour suppressor. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, n. 10, p. 1637-41, 2006.

GERMING, U. et al. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). **Leukemia**, v. 19, n. 12, p. 2223-31, Dec 2005.

GILES, F. J. et al. Acute myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 73-110, 2002.

GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1532-42, Sep 1 2002.

GILLILAND, D. G.; JORDAN, C. T.; FELIX, C. A. The molecular basis of leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 80-97, 2004.

GORELLO, P. et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. **Leukemia**, v. 20, n. 6, p. 1103-8, Jun 2006.

GRIMWADE, D.; HILLS, R. K. Independent prognostic factors for AML outcome. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 385-95, 2009.

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.

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.

GRISENDI, S. et al. Nucleophosmin and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 7, p. 493-505, Jul 2006.

GROSS, S. et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. **J Exp Med**, v. 207, n. 2, p. 339-44, Feb 15 2010.

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.

HELMAN, R. et al. Leucemia mielóide aguda: atualidade brasileira de diagnóstico e tratamento. **Einstein**, v. 9(2 pt 1), p. 179-183, 2011.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, C. D. P. E. V. Rio de Janeiro: 159 p. 2014.

KIYOI, H. et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. **Leukemia**, v. 12, n. 9, p. 1333-7, Sep 1998.

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.

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.

KUHNL, A.; GRIMWADE, D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. **Int J Hematol**, v. 96, n. 2, p. 153-63, Aug 2012.

LARSON, R. A. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 20, n. 1, p. 29-37, Mar 2007.

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.

LOWENBERG, B.; GRIFFIN, J. D.; TALLMAN, M. S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 82-101, 2003.

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.

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.

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.

MARDIS, E. R. et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. **N Engl J Med**, v. 361, n. 11, p. 1058-66, Sep 10 2009.

MARTINS, S. L. R.; FALCÃO, R. P. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 57-62, 2000.

MAWAD, R.; ESTEY, E. H. Acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **Curr Oncol Rep**, v. 14, n. 5, p. 359-68, Oct 2012.

MCKENNA, R. W. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. **Clin Chem**, v. 46, n. 8 Pt 2, p. 1252-9, Aug 2000.

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.

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.

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.

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.

PARSONS, D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1807-12, Sep 26 2008.

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.

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.

RANDOLPH, T. R. Acute promyelocytic leukemia (AML-M3)--Part 1: Pathophysiology, clinical diagnosis, and differentiation therapy. **Clin Lab Sci**, v. 13, n. 2, p. 98-105, Spring 2000.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

SCHOCH, C. et al. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. **Haematologica**, v. 89, n. 9, p. 1082-90, Sep 2004.

SMITH, M. et al. Adult acute myeloid leukaemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 50, n. 3, p. 197-222, Jun 2004.

SOUTO FILHO, J. T. et al. Characterization and analysis of the outcome of adults with acute myeloid leukemia treated in a Brazilian University hospital over three decades. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 7, p. 660-5, Jul 2011.

STONE, R. M. Prognostic factors in AML in relation to (ab)normal karyotype. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 22, n. 4, p. 523-8, Dec 2009.

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.

TENG, C.-L. et al. Lactate Dehydrogenase, not Vascular Endothelial Growth Factor or Basic Fibroblast Growth Factor, Positively Correlates to Bone Marrow Vascularity in Acute Myeloid Leukemia. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 69, n. 11, p. 534-537, 2006.

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.

THIEDE, C. et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. **Blood**, v. 99, n. 12, p. 4326-35, Jun 15 2002.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

WARRELL, R. P., JR. et al. Acute promyelocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 329, n. 3, p. 177-89, Jul 15 1993.

WHITMAN, S. P. et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. **Cancer Res**, v. 61, n. 19, p. 7233-9, Oct 1 2001.

WILLMAN, C. L. **Biologic and genetic risk assessment of AML in the genomic era.** *Hematology*: 90-97 p. 2002.

YAN, H. et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med**, v. 360, n. 8, p. 765-73, Feb 19 2009.

YAN, L. et al. Analysis of NPM1 gene mutations in Chinese adults with acute myeloid leukemia. **Int J Hematol**, v. 86, n. 2, p. 143-6, Aug 2007.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática.** 1ª. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 1081

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: “O PAPEL DAS MUTAÇÕES NOS GENES *NPM1* E *IDH1* NA VARIABILIDADE CLÍNICO-BIOLÓGICA DA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA”

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

Até o momento, quase todos os pacientes com diagnóstico novo 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 assim que fosse feito o diagnóstico poderia determinar qual tipo de tratamento seria melhor para cada paciente. Desse modo, as descobertas dos diferentes tipos de leucemia mielóide aguda podem aumentar o tempo e a qualidade de vida destes pacientes.

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa que avalia a presença de alterações genéticas no gene *NPM-1* e *IDH1*. O objetivo é determinar se estas alterações estão correlacionadas com a evolução clínica dos pacientes após o início do tratamento quimioterápico.

O seu nome não será utilizado, de forma que você permanecerá anônimo durante toda a pesquisa.

Serão realizados procedimentos de acordo com a indicação do seu médico a partir de amostras de medula óssea coletadas ao diagnóstico da doença, para a realização de mielograma e outras avaliações genéticas de rotina para o tratamento. Você será submetido aos exames normalmente indicados como coleta de sangue de acordo com seu médico. Você será informado sobre todos os procedimentos realizados e poderá se recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo de seu tratamento. Esses

procedimentos apresentam riscos habituais relativos à coleta de amostras, como hematomas, sem que haja risco de vida. Será utilizada uma parte do material de medula óssea que rotineiramente já é extraído ao diagnóstico de toda leucemia, uma quantidade que não o prejudicará nem o seu tratamento. Nenhum destes exames irá retardar sua avaliação ou o início do tratamento pelo médico e qualquer conduta só será realizada se aprovada pela equipe responsável pelo tratamento. Além do mais, como a análise dessas alterações genéticas será realizada mais adiante no estudo, portanto não haverá benefício direto para você.

Não está previsto nenhum pagamento pela sua participação nesta pesquisa.

Os custos desse trabalho serão pagos integralmente pelos pesquisadores.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____, diante do que me foi esclarecido, consinto em participar do estudo “O PAPEL DE MUTAÇÕES NOS GENES *NPM1 E IDH1* NA VARIABILIDADE CLÍNICO-BIOLÓGICA DA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA”, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Ass. do responsável: _____

Ass. do paciente (16 a 18 anos): _____

Ass. do pesquisador: _____

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones de contato são os seguintes: 34099229 (Dr^a Juliana Godoy Assumpção e Dr^o. Sandra Guerra Xavier. 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).

APÊNDICE B**SOLUÇÕES DE USO NO LABORATÓRIO**

- I. Buffer TAE 50X (Solução Estoque)
TRIS – 242 g
Ácido Acético Glacial PA - 57,1 mL
EDTA – 19 g
Água Bidestilada QSP – 1000 ML

- II. Buffer TAE 50X (Solução de Trabalho)
Buffer TAE 50X – 20 mL
Água Bidestilada QSP – 1000 mL

- III. Solução de EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-aético) 125 mM
EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) – 3,65g
Água Bidestilada QSP – 10 mL

pH 8,0

- IV. Solução de Acetato de sódio 3M
Acetato de Sódio (CH_3COONa) – 24,6 g
Água Bidestilada QSP – 10 mL

- V. Solução de Etanol 70%
Etanol PA (C_2H_6O) – 70 mL
Água Bidestilada QSP – 100mL

APÊNDICE C

Tabela Suplementar 1. Classificação de risco geral para os pacientes adultos com LMA

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
1	47,XY,+8[9]	Intermediário	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
8	NOMA	Não determinado	Positivo	Positivo	Negativo	Desfavorável	Não determinado
11	46,XY,r(7),del(12)(p11;p13)[15]/46,XY,del(7)(p13),del(12)(p11;p13)[2]/46,XY[3]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Desfavorável
18	NOMA	Não determinado	Positivo	Negativo	Resultado indisponível	Desfavorável	Não determinado
19	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Não determinado
20	47,XY,+8;del(12)(p11;p12)[20]	Intermediário	Resultado indisponível	Negativo	Resultado indisponível	Não determinado	Intermediário
24	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
25	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
27	Não realizado	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
32	46,XY,del(11)(q23)[06]/46,XY[19]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
33	47,XY,+4,t(8;21)(q22;q22)[05]/46,XY,t(8;21)(q22;q22)[09]/46,XY[01]	Favorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
46	46,XX[08]	Intermediário	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
48	46,XY,t(18;21)(q11.2;p11.2)[19]/46,XY [1]	Intermediário	Positivo	Negativo	Resultado indisponível	Desfavorável	Desfavorável

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
54	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
56	NOMA	Não determinado	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Não determinado
78	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
83	47,XYY[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
84	46~47,X,-Y,del(5)(q22q33),del(7)(q32),+8,+mar,inc[20]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Desfavorável
91	46,XY,del(9)(q22;q32)[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
92	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Resultado indisponível	Negativo	Favorável	Favorável
97	47,XY,+21[18]/46,XY[01]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
110	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
111	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
114	47,XX,+8[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
115	46,XX,del(10)(q24)[16]/46,XX[04]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
120	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
127	44% metáfases analisadas são normais e 56%hiperdiploidia(84-88cromossomos) e destas 25% alterações estruturais	Desfavorável	Resultado indisponível	Negativo	Resultado indisponível	Não determinado	Desfavorável

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
132	46,XX[15]	Intermediário	Resultado indisponível	Positivo	Resultado indisponível	Não determinado	Intermediário
135	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Não determinado
137	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Positivo	Favorável	Favorável
141	46,XY [20]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
157	46,XX,inv(16)(p13q22)[18]/46,XX[02]	Favorável	Negativo	Negativo	Positivo	Favorável	Favorável
177	46,XX[30]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
178	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
200	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
203	NOMA	Não determinado	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Não determinado
204	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
224	46,XX,inv(16)(p13q22)[12]/46,XX[03]	Favorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
239	47XY,+10[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
245	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
247	46,XY[20]	Intermediário	Resultado indisponível	Resultado indisponível	Negativo	Não determinado	Intermediário
267	46,XY,t(3;3)(q21;q26)[20]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
274	46,XY,t(6;9)(p23;q34)[20]	Intermediário	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
275	46,XY[10]	Intermediário	Negativo	Positivo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
281	NOMA	Não determinado	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Não determinado
289	46,XX[19]	Intermediário	Positivo	Positivo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
316	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
329	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Positivo	Favorável	Não determinado
333	45,XX,-7[20]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
393	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
400	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
437	Não realizado	Não determinado	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Não determinado
458	46,XY,inv(16)(p13q22)[13]/46,XY[7]	Favorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
491	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
526	NOMA, pós indução 46,XX[25]	Não determinado	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Não determinado
556	46XX[20]	Intermediário	Positivo	Positivo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
558	Não realizado	Não determinado	Positivo	Positivo	Resultado indisponível	Desfavorável	Não determinado
564	46,XY,del(9)(p13),der(11),add(12)(q24)[06]/46,XY[24]	Intermediário	Negativo	Resultado indisponível	Negativo	Favorável	Favorável
571	46,XY,[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
591	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
611	46,XX[11]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
632	48~56,XX,+4,+5,der(7),+8,+10,+11,+12,+13,+14,i(17)(q10),+18,+der(19)t(19;?),+21,+22,+r[cp11]/46,XX[09]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
640	47,XY,+8,9qh+c[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
648	46,XY,del(7)(q22q32)[18]/46,XY[2]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
687	46,XY[20]	Intermediário	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
708	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
715	46,XY[19]	Intermediário	Negativo	Negativo	Positivo	Favorável	Favorável
728	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
730	46XX;t(6;11)(q27;q23)[20]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
764	Cariótipo complexo	Desfavorável	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Desfavorável
793	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
809	46,XX[28]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
824	46,XY,der(1;13)(p10;q10)[03]/47,idem,+mar[07]/48,idem,+6[03]/47,XY,der(1;15)(p10;q10),+mar[03]/46,XY[01]	Desfavorável	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Desfavorável
851	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
852	47,XX,+8[3]/46,XX[17]	Intermediário	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
858	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Resultado indisponível	Negativo	Favorável	Favorável
861	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
862	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
873	46~56,XY,+1,+3,+4,+6,+8,der(9)(p?),add(10)(p10),del(11)(q23),der(12)t(12;17)(q10;q11),-13,-17,+18,+19,+20,+22,+mar1,+mar2[cp11]/46,XY[01]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
909	45,XX,-7,del(20)(q11.2;q13.1),add21(q22)[7]/46,XX,del(7)(q21)-13,del(20),add(21)[12]/46,XX[1]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
911	NOMA em 11/03/2008 e 46,XX[15] em 12/03/08 e em 23/06/2008 46XX[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
973	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
1016	47,XY,+8[17]/46,XY[5]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
1019	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[1]/45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[14]/46,XY[5]	Favorável	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
1052	46,XY[20]	Intermediário	Negativo	Positivo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
1087	NOMA	Não determinado	Positivo	Positivo	Resultado indisponível	Desfavorável	Não determinado
1100	47,XY,inv(16)(p13q22),+21[18]/46,XY[2]	Favorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável

ID	Cariótipo	Risco citogenético	FLT3	NPM1	IDH1	Risco molecular	Classificação geral de risco
1127	44~46,XX,+X,der(1)del(1)(q31)add(1)(q31),inv dup(2)(p13p15),der(3;19)(q10;q10),-4,del(5)(q12q33),+8,-9,+11,+12,+13,-13,-16,der(17)t(9;17)(q12;p13),-22,+mar[cp20]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
1155	47-48,XY,inv(16)(p13q22),+der(17)t(17;?)(q10;?),+22[cp20]	Favorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
1182	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
1242	38~44,XX,t(4;6)(p16;p22.2),del(5)(q13q33),-12,t(17;22)(p11.2;q11.2),-18,dup(21)(q11.2),+mar[cp20]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Desfavorável
1413	46,XY,21stk[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
1485	46,XY	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
1488	46,XX,i(21)(q10)[8]/45,XX,idem,-7[22]/46,XX[2]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
1506	48~50,XY,del(3)(q12),del(4)(p15.1),del(5)(q12q33)x2,-7,der(10)t(?;10)(p10;q10)x2,+11,+13,add(17)(p13),-18,-20,-21,+mar1x2,+mar2,+r[cp14]/46,XY[6]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Desfavorável
1516	45,XY,-7[20]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Desfavorável
1521	46,XY,inv(16)(p13q22) [9] /46,XY [21]	Favorável	Negativo	Resultado indisponível	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
1533	46,XX,15cenh+pstk+ps+c[26]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
1687	NOMA	Não determinado	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Não determinado
1717	46,XX [30]	Intermediário	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
1832	46,XX [30]	Intermediário	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
1995	46,XX,del(16)(q22)[8]/46XX[14]	Intermediário	Positivo	Positivo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
2045	46,XX[30]	Intermediário	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
2070	46,XX[16]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
2160	46-47,XY,t(1;10)(q10,q10),del(6)(q21,q23),dup6(q21,q25),r(?7),del11(q23),t(15,18)(?q15q21)[18]/92,XXY Y,idemx2[10]/46,XY[2]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
2246	46,XY,t(3,16)(q21q22),9qh[19]/46,XY,9qh[1]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
2270	46,XX,inv(9)(p12q13)c[28]/48,XX,i(7)(q10)x2,+8,inv(9)(p12q13)c2[2]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
2340	46XX [21]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
2372	NOMA	Não determinado	Positivo	Negativo	Negativo	Desfavorável	Não determinado
2408	46,XY[20]	Intermediário	Positivo	Positivo	Positivo	Desfavorável	Desfavorável
2418	46,XX[30]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
2459	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
2464	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
2466	46,XX[30]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
2485	46,XX[26];45,X-X,del(4)(q21)[01]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
2494	46,XY,inv(16)(p13;q22)t(16;18)(p11.2;q21.1)[30]	Favorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
2502	45,XY,-7[20]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
2515	46,XX[30]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
2527	46,XY,1qh+c[30]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
2554	46,XY[30]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
2579	46,XY,del(1)(p36.1)[7]/44-45,idem,-10,-17[cp10]/46,XY[3]	Desfavorável	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Desfavorável
2602	46,XY,t(2;4)(q37;q31),del(11)(q23),del(12)(p11.2),del(13)(?q14;q22)[8]/46,XY[12]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
2605	46,XX[10]	Intermediário	Positivo	Positivo	Negativo	Desfavorável	Desfavorável
2648	46,XX,t(7,14)(p15;q32),+8,del(11)(q23)[10]/46,XX[3]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
2680	NOMA	Não determinado	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Não determinado
2682	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
2683	46,XX[23]	Favorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
2740	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
2764	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado
2790	NOMA	Não determinado	Negativo	Positivo	Resultado indisponível	Favorável	Não determinado

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
2863	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
2903	46,XX[30]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
2919	45-46,XX,-5,t(12;12)(p10;p10),-14,-18,+r(?20),+marx2[cp13]/67-72<3m>,XXXX,-5,t(12;12)(p10;p10),-14,-18,+r(?20),+marx2,34-65dmim[cp4]/46,XX[3]	Desfavorável	Resultado indisponível	Negativo	Resultado indisponível	Não determinado	Desfavorável
2938	45,XX,del(5)(q13),del(7)(p14), -18[20]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Desfavorável
2964	46,XX,del(11)(q13,q23)[22]/47-49,idem,+8,+13,+21[cp7]/46,XX[1]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
2996	47,XY,+4[2]/46,XY[11]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
3029	47,XY,dup(7)(q31q32),+8, del(9)(q22), inv(16)(p13q22)[20]	Favorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
3035	46,XY[27]	Intermediário	Negativo	Negativo	Positivo	Favorável	Favorável
3047	45,XX, t(3;21)(q26;q21), -5[6]/ 45, XX, t(3;21)(q26;q21), -5, +mar[3]/ 46,XX [11]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
3175	46,XX[30]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
3185	46,XX[20]	Intermediário	Negativo	Positivo	Negativo	Favorável	Favorável
3227	46,XY,-7,+11,del(20)(q11.2) [11]/46,XY[9]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
3242	47,XX,+ 8 [5] / 46,XX [8]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
3342	NOMA	Não determinado	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Não determinado

ID	Cariótipo	Risco citogenético	<i>FLT3</i>	<i>NPM1</i>	<i>IDH1</i>	Risco molecular	Classificação geral de risco
3325	48,XY,+8,+8,9qh-c[20]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
3363	46,XX[30]	Intermediário	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Favorável
3389	47,XX,t(4;6)(p16;q25),del(5)(q13q33),del(7)(q22),+8[18]/48,XX,idem,+8[2]	Desfavorável	Negativo	Negativo	Negativo	Favorável	Desfavorável
3427	46,XX[30]	Intermediário	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Favorável
3490	Não realizado	Não determinado	Negativo	Negativo	Resultado indisponível	Favorável	Não determinado

NOMA: Não foram obtidas metáfases para análise *NPM1*, nucleophosmin; *FLT3*, fms-related tyrosine kinase; DIT, duplicação interna em tandem.

APÊNDICE D**ARTIGO 1 (submetido)****Characterization of *NPM1*, *FLT3* and *IDH1* mutations in adult patients with acute myeloid leukemia: a Brazilian cohort study**

*Nathália Gomide Cruz¹, *Ana Flávia Tibúrcio Ribeiro^{2,3}, Ana Beatriz Firmato Glória³, Saman Abbas⁴, Juliana Godoy Assumpção⁵, Silvana Maria Eloí Santos⁶, Suely Meireles Rezende⁷, Sandra Guerra Xavier⁶, Evandro M. Fagundes³

¹Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais and Fundação HEMOMINAS, Belo Horizonte, Brazil

²Postgraduate Program in Pathology, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Hematology Unit, University Hospital, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁴Huffington Center on Aging, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, United States

⁵Molecular Hematology Laboratory, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁶Department of Clinical Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁷Department of Internal Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

*These authors contributed equally to the study

Running title: *NPM1*, *FLT3-ITD* and *IDH1* mutations in acute myeloid leukemia

Word count manuscript: (max:)

Word count abstract: (max:)

Corresponding author:

Evandro Maranhão Fagundes

Serviço de Hematologia – Ambulatório Borges da Costa

Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Alfredo Balena, 190 - Santa Efigênia

CEP: 30.130-100

Belo Horizonte - Minas Gerais - Brazil

E-mail: fagundes@hematologica.com.br

Phone: +55 31 34099397

ABSTRACT

We analyzed 149 AML Brazilian patients for *NPM1*, *FLT3-ITD* and *IDH1* mutations, of whom 36.0% were secondary AML and median age 49 years. *NPM1*^{mut}, *FLT3-ITD* and *IDH1*^{mut} were found in 21.5%, 13.9% 6.1% of patients, respectively. *NPM1*^{mut} was associated with high WBC and peripheral blast counts, CD34^{neg}, *FLT3-ITD*, NK-AML, better relapse-free survival (RFS; $P=0,039$;HR=0.318;95%CI=0.107-0.943) and overall survival (OS; $P=0.007$;HR=0.474;95%CI=0.275-0.817). *FLT3-ITD* was associated with high WBC and peripheral blast counts, intermediate-cytogenetic risk, and no impact on RFS and OS. *NPM1*^{mut} and *FLT3-ITD* frequency were lower than expected and *IDH1*^{mut} frequency was in accordance to literature. *NPM1* mutational status had impact on survival.

1.Introduction

Chromosomal abnormalities are the strongest prognostic factor for AML survival, although about half of patients have normal karyotype (NK-AML) and are categorized as intermediate-cytogenetic risk (GRIMWADE et al., 2010; VARDIMAN et al., 2002). Genetic mutations have been used to add prognostic value mainly in NK-AML. Approximately 30 recurrent mutations have been reported but the role of some in leukemogenesis and prognostic remains unclear (RIBEIRO et al., 2012; WOUTERS et al., 2009).

Screening for mutations in FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) and nucleophosmin (*NPM1*) are now part of the AML standard of care (DOHNER, H. et al., 2010). Mutations in *NPM1* (*NPM1^{mut}*) are one of the most common genetic alterations in AML and are associated with favorable prognosis, unless concomitant internal tandem duplication in *FLT3* gene (*FLT3-ITD*) is present (DOHNER, H. et al., 2010; FALINI et al., 2007). *FLT3-ITD* confers a negative prognostic impact and when only *FLT3-ITD* status is considered, this mutation associates with lower survival (PATEL, J. P. et al., 2012; THIEDE et al., 2002).

The impact of isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) mutations in AML prognosis is still controversial, although it has been associated with lower survival, especially in patients with *NPM1* mutations and absence of *FLT3-ITD* (*NPM1^{mut}/FLT3^{wild-type}*)(ABBAS et al., 2010; MARCUCCI et al., 2010; SCHNITTGER et al., 2010).

The present study aimed at evaluating the prevalence, the clinical-biological characteristics of patients related to *NPM1*, *FLT3* and *IDH1* genetic status and their association with treatment outcomes in a cohort of adult Brazilian patients with AML.

2. Material and methods

2.1 Patients

This retrospective cohort study was carried out at the University Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil.

We identified in our database 233 AML patients older than 16 years diagnosed from April 2004 to March 2013. A total of 52/233 (22.3%) patients had acute promyelocytic leukemia (APL) and were not included in the study, 31/233 (13.3%) were excluded due to unavailability of bone marrow (BM) samples and 1/233 patient was excluded due to lack of clinical data. For the purpose of this study, 149/233 (64%) patients were analyzed. There was no exclusion due to age, comorbidities, performance status, socioeconomic conditions, secondary AML, treatment strategy or occurrence of death before starting chemotherapy. The study was approved by institutional Ethics Committee and an informed consent was obtained accordingly.

2.2 Variables

Secondary AML was defined according to The World Health Organization (WHO) criteria (VARDIMAN et al., 2009). Patients with blast crisis of chronic myeloid leukemia were not included. The remaining patients were defined as *de novo* AML. The diagnosis was made according to WHO criteria (VARDIMAN et al., 2009) and the morphologic classification was in accord with the French-American-British (FAB) (BENNETT et al., 1976). BM *smears were not reviewed for the purpose of this study*. CD34 antigen present in less than 20% of blast cells count was considered a negative marker, by flow cytometry (CD34^{neg}) (BENE et al., 1995). Cytogenetic analysis was routinely performed using a standard (RHG)-banding. Karyotype description followed the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1985) ISCN 1985. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, 1985) and were not reviewed. Cytogenetic risk categories were defined according to Medical Research Council (MRC) classification (GRIMWADE et al., 2010).

2.3 Molecular tests

DNA was extracted from BM samples using a commercial kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). Complementary DNA was obtained *MMLV* enzyme (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA).

The presence of *FLT3*-ITD was evaluated by conventional PCR as described by Nakao *et al* and Meshinchi *et al* (MESHINCHI *et al.*, 2001; NAKAO *et al.*, 1996). *NPM1* exon 12 was amplified by RT-PCR and sequenced using primers and reaction described by Ottone *et al* (OTTONE *et al.*, 2008). For *IDH1*, in case of samples collected before 2009, PCR amplification and sequencing were performed according to Abbas *et al* (ABBAS *et al.*, 2010) and after that, we adopted the reaction described by Patel *et al* (PATEL *et al.*, 2011). Purified PCR products were sequenced using the Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA).

2.4 Treatment strategy

Patients received chemotherapy with intention-to-achieve complete remission (CR) if they were <60 years or between 60-70 years without severe comorbidities. Chemotherapy consisted of Daunorubicin (DNR) 60mg/m²/day for 3-days plus cytosine arabinoside (Ara-C) 200mg/m²/day as a 7-day continuous intravenous infusion (“7+3”). A second-course of chemotherapy with high-dose Ara-C 3g/m² (Hidac) was administered every 12 hours for 3 days with or without DNR 45mg/m²/day for 2-days, named “double induction-therapy” to patients ≤65 years in whom early BM assessment on day 14 to 17 (D15) showed persistent leukemia, defined as the presence of >5% blast cells in the BM aspirate on D15. For patients who presented ≤5% blast cells on D15, but >5% blast cells on day 35 (D35), a second induction-therapy with Hidac was administered.

2.5 Outcomes

CR and refractory disease were defined according to Cheson *et al* (CHESON *et al.*, 2003). Early-death (ED), was defined as death from any cause that occur between the diagnosis and PB recovery. Relapse-free survival (RFS) was defined as the time from CR achievement until relapse or death from any cause. Overall Survival (OS) was defined as the time from diagnosis to death. Patients were censored at the time of the last follow-up.

2.6 Statistical analysis

Chi-square test or Fisher exact test were used for evaluation of non-random associations between categorical variables, and the Mann-Whitney test for quantitative variables.

Estimates of the survival distribution for OS and RFS were calculated by the Kaplan-Meier method. Patients alive in CR were censored on the date of last follow-up for RFS and OS. Cox proportional model was used in univariate and multivariate analyses with P values <0.05 considered significant. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics Standard (International Business Machines, Armonk, USA), version 18.0.

3Results

3.1Prevalence of mutations in *NPM1* and *IDH1* genes and *FLT3-ITD*

The demographics, clinical and laboratory data of the 149 patients enrolled are detailed in Table 1. The median age of patients was 49 years, 49.7% were male and 75.8% had *de novo* AML.

Table 1. Pretreatment Characteristics of AML patients

Characteristics	All AML cases (n=149)	AML patients treated to achieve CR (n=122)
Age at diagnosis, median in years (range)	49 (18-84)	43 (18-69)
< 60 years, n (%)	101 (67.8)	97 (79.5)
≥ 60 years, n (%)	48 (32.2)	25 (20.5)
Male gender, n (%)	74 (49.7)	63 (51.6)
WBC count, median x10⁹/L (range)	21.5 (0.5-380.2)	21.5 (0.5-380.2)
Total, n	147	122
WBC count > 100x10⁹/L, n (%)	25 (17.0)	21 (17.2)
Total, n	147	122
Peripheral blood blasts, median x10⁹/L (range)	11.0 (0-319.4)	10.4 (0.0-319.4)
Total, n	146	121
Serum LDH, median UI/μL (range)	1181 (237-12013)	1255 (237-11205)
Total, n	127	109
FAB subtype, n (%)		
AML M0	8 (6.7)	7 (6.6)
AML M1	35 (29.2)	31 (29.2)
AML M2	36 (30.0)	28 (26.4)
AML M4	27 (22.5)	26 (24.5)
AML M5	10 (8.3)	10 (9.4)
AML M6	2 (1.7)	2 (1.9)
AML M7	2 (1.7)	2 (1.9)
Total, n	120	106
Cytogenetic risk group, n (%)		
Favorable	11 (9.2)	11 (11.1)
Intermediate	79 (66.4)	66 (66.7)
Normal Karyotype	58 (73.4)	49 (48.5)
Adverse	29 (24.4)	22 (22.2)
Total, n	119	99
CD34 marker, n (%)		
Positive	52 (54.7)	45 (55.6)
Negative	43 (45.3)	36 (44.4)
Total, n	95	81
Type of AML, n (%)		
<i>de novo</i> AML	113 (75.8)	103 (84.4)
Secondary AML	36 (24.2)	19 (15.6)

AML, acute myeloid leukemia; WBC, white blood cell; FAB, French-American-British; LDH, lactate dehydrogenase; Cytogenetic risk group classification (favorable, intermediate and adverse) is described according Grimwade *et al* (GRIMWADE *et al.*, 2010). CD34 antigen expressed above 20% of blast-count in peripheral blood was considered positive marker.

NPM1 exon 12 status was studied in 144/149 (96.6%) samples of which 31/144 (21.5%) carried a mutation (Table 2). *NPM1*^{mut} was detected in all FAB-subtypes except AML-M0 and AML-M7. Patients with *NPM1*^{mut} had a significant higher white blood count (WBC) ($P=0.007$) and PB blast-counts ($P=0.003$) when compared to patients without the mutation (*NPM1*^{wild-type}). However, only 6/31 (19.4%) patients with *NPM1*^{mut} presented WBC above $100 \times 10^9/L$. Serum lactate dehydrogenase (LDH) levels were available for 25/31 (80.6%) *NPM1*^{mut} patients and all 25 patients presented LDH levels above the upper limit (UL) ($P=0.007$), although no differences in LDH median levels were observed between the two groups. The majority of *NPM1*^{mut} patients were CD34^{neg} ($P<0.001$). *NPM1*^{mut} patients were associated with *FLT3*-ITD ($P=0.040$) but were not associated with recurrent mutations in *IDH1* (*IDH1*^{mut}; $P=1.000$), neither with subtype of AML (*de novo* versus secondary; $P=0.105$) (Supplemental Table A.3). Cytogenetic data were available for 114/149 (76.5%) patients. *NPM1*^{mut} was associated with intermediate-cytogenetic risk category (20/22; 90.9%; $P=0.022$) mainly NK-LMA (18/22; $P=0.001$). No patient with *NPM1*^{mut} was found in the favorable-risk group.

FLT3-ITD was evaluated in 144/149 (96.6%) patients and 20/144 (13.9%) presented the mutation (Table 2). There was no association of *FLT3* status and age ($P=0.204$), sex ($P=0.229$), *de novo* versus secondary AML ($P=0.164$), FAB-subtypes ($P=0.476$) or CD34 blast cells ($P=0.372$) (Supplemental Table A.3). Median WBC and PB blast in the *FLT3*-ITD group were more than 3 times higher than in the *FLT3*^{wild-type} group ($P=0.008$ and $P=0.001$, respectively). LDH levels were available for 19/20 (95%) *FLT3*-ITD patients and all of them presented levels above UL ($P=0.023$). The totality of *FLT3*-ITD patients with cytogenetic data available ($n=14$) belonged to the intermediate-risk group ($P=0.014$). The combination of *FLT3*-ITD with *NPM1* status was observed as follow: 22/140 (15.7%) *NPM1*^{mut}*FLT3*^{wild-type}, 98/140 (70.0%) *NPM1*^{wild-type}*FLT3*^{wild-type}, 12/140 (8.6%) *NPM1*^{wild-type}*FLT3*-ITD and 8/140 (5.7%) *NPM1*^{mut}*FLT3*-ITD.

IDH1 mutation was found in 7/114 (6.1%) patients (Table 2). Among the 7 *IDH1*^{mut} patients, 6 were classified as *de novo* AML, 6 were younger than 60 years, 5 carried NK-AML and 1 was categorized as favorable. (Supplemental Table A.3). Median WBC and PB blast in the *IDH1*^{mut} group were $21.5 \times 10^9/L$ and $10.9 \times 10^9/L$, respectively and median LDH was 1181 UI/ μL . One patient with *IDH1*^{mut} carried *NPM1*^{mut} and also *FLT3*-ITD.

Since the main relevance of these mutations is to refine the prognosis for NK-AML patients, we assessed this specific population. *NPM1*^{mut}, *FLT3*-ITD and *IDH1*^{mut} were found in 18/55 (32.7%), 9/56 (16.1%) and 5/46 (10.9%) patients, respectively (Supplemental Table A.1). Considering the composite mutation subgroups, the presence of *NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wild-type} was detected in 13/54 (24.1%), *NPM1*^{mut}/*FLT3*-ITD in 4 (7.4%), and *NPM1*^{wild-type}/*FLT3*^{wild-type} in 32 (59.3%) patients. Only 1/43 patients (2.3%) showed *NPM1*^{mut}/*IDH1*^{mut}/*FLT3*-ITD.

Table 2. Comparison of Pretreatment Characteristics and Molecular Markers Status in all 149 AML patients

Characteristics	<i>NPM1</i>			<i>FLT3</i>			<i>IDH1</i>		
	Mutated (n=31)	wild-type (n=113)	<i>P</i>	Mutated (n=20)	wild-type (n=124)	<i>P</i>	Mutated (n=7)	wild-type (n=107)	<i>P</i> [†]
Age at diagnosis, median in years (range)	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, n (%)	20 (64.5)	80 (70.8)	0.52	11 (55.0)	89 (71.8)		6 (85.7)	75 (70.1)	0.67
≥ 60, n (%)	11 (35.5)	33 (29.2)		9 (45.0)	35 (28.2)	0.19	1 (14.3)	32 (29.9)	
Male gender, 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
WBC x10⁹/L, median (range)	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	
Peripheral blood blasts x10⁹/L, median (range)	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	
Serum LDH, median UI/μL (range)	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	
Serum LDH 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	
AML type n (%)			0.11†			0.16†			1.00†
<i>de novo</i> AML	27 (87.1)	82 (72.6)		18 (90.0)	93 (75.0)		6 (85.7)	83 (77.6)	
Secondary AML	4 (12.9)	31 (27.4)		2 (10.0)	31 (25.0)		1 (14.3)	24 (22.4)	
FAB subtype, n (%)			0.10†			0.48†			0.26†
AML M0	0	8 (8.7)		0	8 (7.9)		0	6 (7.0)	
AML M1	9 (37.5)	26 (28.3)		7 (41.2)	28 (27.7)		2 (28.6)	25 (29.1)	
AML M2	3 (12.5)	31 (33.7)		5 (29.4)	29 (28.7)		2 (28.6)	23 (26.7)	
AML M4	8 (33.3)	17 (18.5)		2 (11.8)	25 (24.8)		1 (14.3)	22 (25.6)	
AML M5	3 (12.5)	7 (7.6)		3 (17.6)	7 (6.9)		1 (14.3)	8 (9.3)	
AML M6	1 (4.2)	1 (1.1)		0	2 (2.0)		0	2 (2.3)	
AML M7	0	2 (2.2)		0	2 (2.0)		1 (14.3)	0	
Total, n	24	92		17	101		7	86	
CD34 marker, n (%)			<0.01†			0.37†			0.64†
Positive	3 (14.3)	47 (66.2)		5 (41.7)	46 (56.1)		2 (40.0)	42 (58.3)	
Negative	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	
Cytogenetic risk group, n (%)			0.02†			0.01†			0.30†
Favorable	0	10 (10.9)		0	11 (11.0)		1 (16.7)	8 (9.3)	
Intermediate	20 (90.9)	55 (59.8)		14 (100.0)	62 (62.0)		5 (83.3)	58 (67.4)	
Adverse	2 (9.1)	27 (29.3)		0	27 (27.0)		0	20 (23.3)	
Total, n	22	92		14	100		6	86	

AML, acute myeloid leukemia; WBC, white blood cell; FAB, French-American-British; LDH, lactate dehydrogenase. Cytogenetic risk group classification (favorable, intermediate and unfavorable) according Grimwade *et al* (GRIMWADE *et al.*, 2010). CD34 antigen expressed above 20% of blast-count in peripheral blood was considered positive marker. IDT, internal tandem duplication; *FLT3*^{wild-type}, no ITD mutation. *P* values not otherwise indicated were calculated with the 2-sided χ^2 test; **P* values were calculated with Wilcoxon (Mann-Whitney) test; †*P* values were calculated with Fisher exact test; ‡Numbers were too low for reliable statistical analysis.

3.2 Remission, early BM blast clearance and survival analysis in 122 patients with intention-to-achieve CR

A total of 122/149 (81.9%) patients received chemotherapy with intention-to-achieve CR and were able to be evaluated for treatment outcomes. Their characteristics are detailed in Table 1. The median age was 43 years and 103/122 (84.4%) had *de novo* AML. The reasons for not using intensive chemotherapy are detailed in Supplemental Table A.2.

NPM1^{mut}, *FLT3*-ITD and *IDH1*^{mut} were found in 26/118 (22.0%), 16/121 (13.2%) and 7/100 (7.0%) patients, respectively (Table 3).

3.2.1 *NPM1*, *FLT3* nor *IDH1* status and achievement of CR

One patient was excluded from the analysis due to the lack of essential data to assess CR. A total of 51/121 (42.1%) patients reached CR, 53/121 (43.8%) died before or during induction-therapy and 17/121 (14.0%) became refractory to treatment. Neither *NPM1*, *FLT3* nor *IDH1* status alone or in combination were associated with CR ($P=0.267$; $P=0.424$; $P=0.464$, respectively). Other variables such as age, age < or ≥ 60 years, *de novo* versus secondary AML, WBC count, FAB-subtypes, cytogenetic risk categories, CD34 blast cells and LDH levels were also not associated with CR.

3.2.2 *NPM1*, *FLT3* and *IDH1* status and early BM blast clearance

A total of 79/122 (64.7%) patients were assessed for early blast clearance on D15. Reasons for not assessing BM on D15 were: death before D15 (24/122 19.7%), poor clinical conditions that precluded the BM collection (9/122; 7.4%) and inadequate material for analysis (10/122; 8.2%). On D15, 34/79 (43.0%) patients had >5% blast, and 22/34 (64.7%) received double-induction. Therefore, 45/79 (57.0%) patients reached CR and 14 (17.7%) behaved as primary refractory-disease.

NPM1, *FLT3* and *IDH1* mutation status did not associate with early BM blast clearance using a cut-off of 5% ($P=0.175$; $P=0.725$ and $P=0.452$, respectively). However, using a cut-off of 10% we found 16/18 (88.9%) *NPM1*^{mut} patients had less than 10% blast on D15 compared to 39/59 (61.6%) patients with *NPM1*^{wild-type} ($P = 0.077$).

Table 3. Comparison of Pretreatment Characteristics and Molecular Markers Status in 122 AML Patients Treated with Intension to Achieve the Complete Remission

Characteristics	<i>NPM1</i>			<i>FLT3</i>			<i>IDH1</i>		
	Mutated (n=26)	wild-type (n=92)	<i>P</i>	Mutated (n=16)	wild-type (n=105)	<i>P</i>	Mutated (n=7)	wild-type (n=93)	<i>P</i> '
Age at diagnosis , median in years (range)	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 years, 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 years, n (%)	6 (23.1)	16 (17.4)		5 (31.2)	20 (19.0)		1 (14.3)	20 (21.5)	
Male gender , 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†
WBC x10⁹/L , median (range)	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	
Peripheral blood blasts x10⁹/L , median (range)	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	
Serum LDH , median UI/μL (range)	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	
Serum LDH 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	
AML type n (%)			0.07†			0.46†			1.00†
<i>de novo</i> AML	25 (96.2)	74 (80.4)		15 (93.8)	87 (82.9)		6 (85.7)	79 (92.9)	
Secondary AML	1 (3.8)	18 (19.6)		1 (6.3)	18 (17.1)		1 (14.3)	14 (15.1)	
FAB subtype , n (%)			0.11†			0.59†			0.28†
AML M0	0	7 (8.9)		0	7 (7.7)		0	5 (6.3)	
AML M1	9 (39.1)	22 (27.8)		5 (33.3)	26 (28.6)		2 (28.6)	23 (28.8)	
AML M2	2 (8.7)	24 (30.4)		5 (33.3)	23 (25.3)		2 (28.6)	20 (25.0)	
AML M4	8 (34.8)	16 (20.3)		2 (13.3)	24 (26.4)		1 (14.3)	22 (27.5)	
AML M5	3 (13.0)	7 (8.9)		3 (20.0)	7 (7.7)		1 (14.3)	8 (10.0)	
AML M6	1 (4.3)	1 (1.3)		0	2 (2.2)		0	2 (2.5)	
AML M7	0	2 (2.5)		0	2 (2.2)		1 (14.3)	0	
Total, n	23	79		15	91		7	80	
CD34 marker , n (%)			<0.01†			0.75†			0.64†
Positive	3 (15.8)	40 (67.8)		5 (50.0)	40 (56.3)		2 (40.0)	36 (59.0)	
Negative	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	
Cytogenetic risk group , n (%)			0.08†			0.03†			0.50†
Favorable	0	10 (13.0)		0	11 (12.8)		1 (16.7)	8 (10.4)	
Intermediate	16 (88.9)	47 (61.0)		12 (100.0)	54 (62.8)		5 (83.3)	52 (67.5)	
Adverse	2 (11.1)	20 (26.0)		0	21 (24.4)		0	17 (22.1)	
Total, n	18	77		12	86		6	77	

AML, acute myeloid leukemia; WBC, white blood cell; FAB, French-American-British; LDH, lactate dehydrogenase. Cytogenetic risk group classification (favorable, intermediate and unfavorable) according Grimwade *et al* (GRIMWADE *et al.*, 2010). CD34 antigen expressed above 20% of blast-count in peripheral blood was considered positive marker. IDT, internal tandem duplication; *FLT3*^{wild-type}, no ITD mutation. *P* values not otherwise indicated were calculated with the 2-sided χ^2 test; **P* values were calculated with Wilcoxon (Mann-Whitney) test; †*P* values were calculated with Fisher exact test; ‡Numbers were too low for reliable statistical analysis.

3.2.3 *NPM1*, *FLT3* and *IDH1* status and survival

The median OS for the 122 patients treated with intention-to-achieve CR were 3.6 months (range, 0.0-106.5months).

In univariate analysis (i) age ($P=0.039$; HR=1.014; 95%CI=1.001-1.028), (ii) age <50 years (n=72; median=4.7 months versus age ≥ 50 years: n=46; median=0.8 months; $P=0.011$; HR=1.690; 95%CI=1.129-2.527), (iii) LDH levels below twice UL (n=51; median=4.0 months versus LDH ≥ 1236 UI/ μ L: n=55; median=1.4 months; $P=0.039$; HR=1.551; 95%CI=1.023-2.352), (iv) $\leq 10\%$ of BM blast at D15 ($P=0.022$; HR=1.928; 95%CI=1.098-3.384) and cytogenetic risk categories were associated with OS (Figure 1A). According to cytogenetic risk categories the median OS was 2.9 months, 5.2 months and 1.0 months respectively for favorable group (n=10), intermediate group (n=65) and adverse group (n=21) ($P=0.032$; HR=1.610; 95%CI=1.042-2.485).

Concerning the mutations evaluated, the median OS was 20.8 months for *NPM1*^{mut} patients (26/114; 22.8%) and 2.7 months for *NPM1*^{wild-type} (88/114; 77.2%; $P=0.007$; HR=0.474; 95%CI=0.275-0.817), independently of *FLT3* status (Figure 1B). No difference in OS was observed between *FLT3*^{wild-type} versus *FLT3*-ITD ($P=0.313$) and *IDH1*^{wild-type} versus *IDH1*^{mut} ($P=0.373$) patients (Figure 1C). According to different composite mutation subgroups, the median OS was as follow: *NPM1*^{mut}*FLT3*^{wild-type} (n=20; median=25.2 months), *NPM1*^{mut}*FLT3*-ITD (n=6; median=0.8 months), *NPM1*^{wild-type}*FLT3*-ITD (n=10; median=0.6 months) and *NPM1*^{wild-type}*FLT3*^{wild-type} (n=77; median=2.9 months; $P=0.002$; HR=1.526; 95%CI=1.166-1.997)(Figure 1D).

For NK-AML group, patients with *NPM1*^{mut}*FLT3*^{wild-type} (n=11) presented better OS when compared to all other combinations of *NPM1* and *FLT3* status (n=36; $P=0.004$; HR=4.765; 95%CI=1.664-13.647)(Figure 1E).

In the multivariate analysis, OS was affected by age (continuous variable), *NPM1* mutational status, and 10% BM blast clearance as independent prognostic variables when we consider *FLT3*-ITD, WBC count and LDH levels (Table 4).

The median RFS was 13.8 months (range, 0.6-101.1 months). In univariate analysis it was associated with age ≥ 60 years (median=7.1 months versus age <60 years: 34.3 months, respectively; $P=0.021$; HR=3.129; 95%CI=1.185-8.265) and CD34 blast cells ($P=0.013$; HR=4.307; 95%CI=1.368-13.554). The median RFS for *NPM1*^{mut} patients (n=14;

28.0%) has not been reached yet, while it was 15.2 months for $NPM1^{wild-type}$ ($n=36$; 72.0%; $P=0.039$; $HR=0.318$; $95\%CI=0.107-0.943$)(Figure1F). None of the patients with $FLT3$ -ITD has relapsed so far, although there was no statistical difference with patients carrying $FLT3^{wild-type}$ ($P=0.275$). Only four $IDHI^{mut}$ patients were in CR, therefore not allowing evaluation of RFS in this group.

In multivariate analysis, RFS was affected by age and $NPM1$ status as independent prognostic variables when we considered CD34 and LDH levels (Table4).

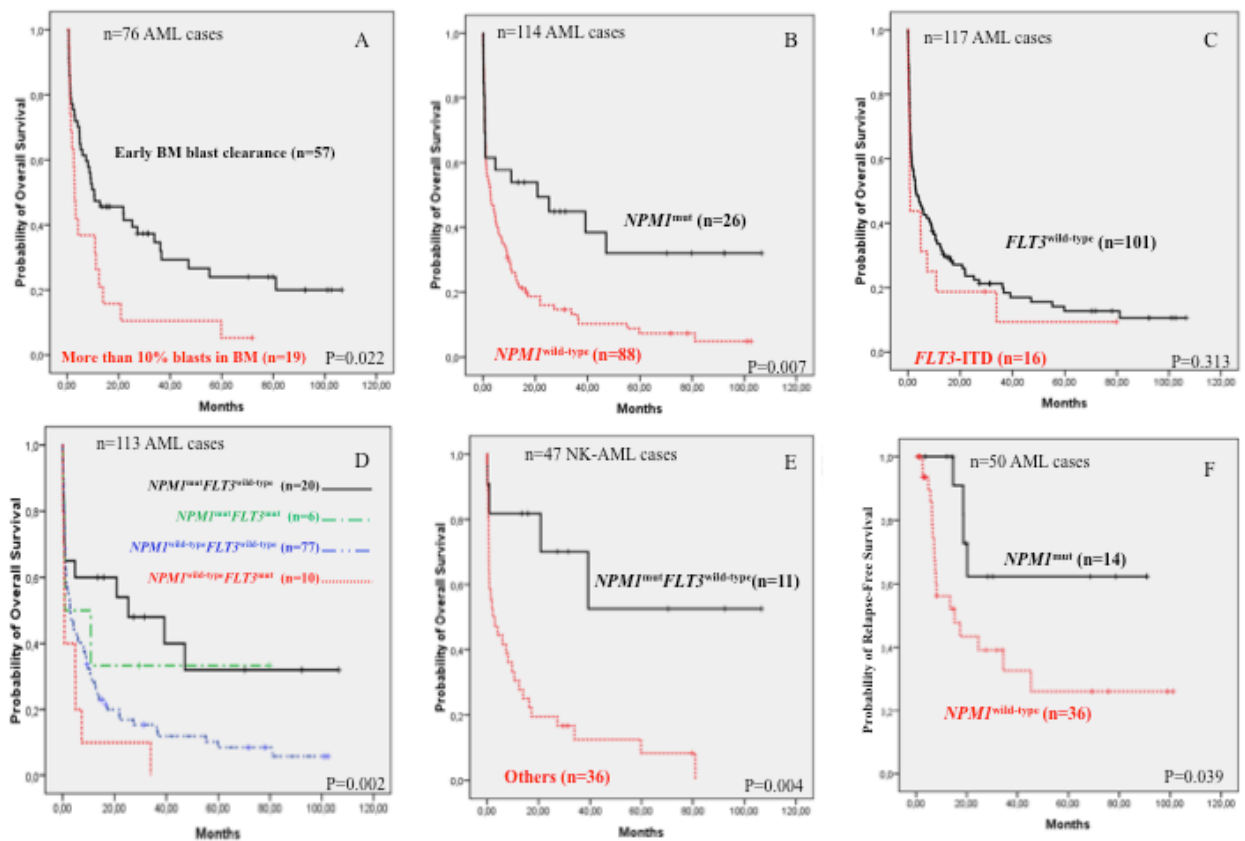


Figure 1: Survival analyses of AML patients in relation to clinical and biological characteristics. (A) Survival analysis among 76 AML patients considering early bone marrow (BM) clearance after induction treatment. Survival curves in black represent AML cases who presented early BM clearance; those in red refer to AML patients who present more than 10% blasts in the BM after induction treatment. (B) Survival analysis among 114 AML patients considering $NPM1$ mutation status. (C) Survival analysis among 117 AML patients considering ITD mutations in the $FLT3$ gene. (D) Survival analyses of 113 AML patients considering $NPM1$ and $FLT3$ composite mutations. (E) Survival analysis of 47 normal karyotype AML patients with $NPM1$ and $FLT3$ composite mutations. Survival curves in black represent $NPM1^{mut}FLT3^{wild-type}$ AML and the red curve represent $NPM1^{mut}FLT3^{mut}$, $NPM1^{wild-type}FLT3^{wild-type}$ and $NPM1^{wild-type}FLT3^{mut}$ AML patients analysed together. (F) Relapse-free survival analysis among 50 AML patients in relation to $NPM1$ mutation status. The log-rank P value is indicated per Kaplan-Meier analysis.

Table 4. Multivariate Analysis for Overall Survival in 122 Patients Treated with Intension to Achieve the Complete Remission

	Overall Survival			Relapse-Free Survival		
	HR	(95% CI)	<i>P</i>	HR	(95% CI)	<i>P</i>
<i>NPM1</i>	0.346	(0.157-0.763)	0.009	<i>NPM1</i>	0.019 (0.002-0.222)	0.002
Age	1.026	(1.007-1.045)	0.006	Age st	9.995 (2.508-39.833)	0.001
LDH [†]	1.173	(0.643-2.140)	0.603	LDH [†]	1.436 (0.407-4.387)	0.525
WBC count [‡]	1.068	(0.480-2.379)	0.872	CD34	2.792 (0.546-14.288)	0.218
BM blast Clearance [§]	3.796	(1.897-7.599)	<0.001			
<i>FLT3</i> -ITD	1.170	(0.499-2.744)	0.718			

AML, acute myeloid leukemia; WBC, white blood cell; LDH, lactate dehydrogenase. Cytogenetic risk group classification (favorable, intermediate and unfavorable) is described according Grimwade *et al* (GRIMWADE et al., 2010). ITD, internal tandem duplication; *FLT3*^{wild-type}, no ITD mutation. Age, WBC count and LDH levels were analyzed as continuous variables in the multivariate analysis. CI indicates confidence interval.

4. Discussion

We retrospectively analyzed the prevalence of mutations in the *NPM1*, *FLT3* and *IDH1* genes in a cohort of 149 unselected adult AML patients and their association with outcomes. We found *NPM1*^{mut} in 21.5%, *FLT3*-ITD in 13.9% and *IDH1*^{mut} in 6.6% of patients. Considering only NK-AML, we found 32.7%, 16.1% and 10.9% had *NPM1*^{mut}, *FLT3*-ITD and *IDH1*^{mut}, respectively. *NPM1*^{mut} was associated with high WBC and PB blast-counts, CD34^{neg}, *FLT3*-ITD, NK-AML and better RFS and OS. *FLT3*-ITD was associated with high WBC and PB blast-counts and intermediate-cytogenetic risk, but had no impact on OS or RFS. Only 7 patients had *IDH1*^{mut} and this small sample precluded an outcome analysis. The prevalence of *NPM1*^{mut} and *FLT3*-ITD were lower than expected and *IDH1*^{mut} frequency was in accordance to literature.

NPM1 mutations have been reported in 35%-45% of adult AML patients and in 46%-64% of NK-AML patients (FALINI et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2012) whereas *FLT3*-ITD has been observed in 25%-30% of AML patients and in 28%-45% of NK-AML (BACHER et al., 2010; SCHNEIDER et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2010; SCHNITTGER et al., 2002). Our lower frequency might be due to the enrollment of older patients and inclusion of secondary AML in our study. *FLT3*-ITD and *NPM1*^{mut} frequencies seem to be less prevalent in elderly patients and in MDS (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011). Daver *et al* reported frequencies of 16% and 14% of *NPM1*^{mut} and *FLT3*-ITD, respectively in patients older than 60 years (DAVER; LIU DUMLAO; et al., 2013). Furthermore, *NPM1* and *FLT3* mutations in MDS seem to be rare (DAVER; STRATI; et al., 2013; MACHADO-NETO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2008). In our study, 24.2% of patients had secondary AML and 32.2% of them were older than 60 years. Their inclusion, therefore, could partially explain the lower prevalence of these mutations. However, even when we studied the prevalence in younger (<60 years) *de novo* AML patients who had completed the induction therapy (n=74), we still found low frequencies of *NPM1*^{mut} (18/73; 24.7%) and *FLT3*-ITD (9/73; 12.3%). A similar pattern was also found in NK-AML for *NPM1*^{mut} (12/31; 38.7%) and *FLT3*-ITD (6/32; 18.8%) patients.

Ethnicity and/or geographic locations are important features accounting for differences in AML (MATASAR et al., 2006; PATEL, M. I. et al., 2012; SEKERES et al., 2004). The

frequencies of *NPM1*, *FLT3* and *IDH* mutations seem to be different within Asian and European populations (MARSHALL et al., 2014; NOMDEDEU et al., 2012; RAU; BROWN, 2009; WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2007). On the other hand, Brazilian studies that included APL and/or children and very elderly patients have shown similar frequencies for *NPM1*^{mut} and/or *FLT3*-ITD to those reported in European and US studies (KRUM et al., 2009; LUCENA-ARAÚJO et al., 2010; VELLOSO et al., 2011). Since the ethnicity of Brazilian population is complex and vary from region to region of the country, we believe that our study findings may add information and discussion about ethnical and geographic differences in frequencies of genetic mutations in AML. In this sense, a recent multicentric Latin America study, conducted in Mexico and Colombia, analyzed 138 AML (5-96 years) patients including APL showed prevalence of 17.3% for *FLT3*-ITD (CUERVO-SIERRA, 2013). The prevalence in some of these studies could have been different than that described in the developed countries if they had not included patients under age of 16 and APL cases since in pediatric AML large cohorts the prevalence of *NPM1*^{mut} and *FLT3*-ITD is lower than in adults (6.5% and 15.0%, respectively) (CAZZANIGA et al., 2005; MESHINCHI et al., 2001) and rarity *NPM1*^{mut} but recurrent *FLT3*-ITD (22.0%) in adult APL (BARRAGAN et al., 2011; FALINI et al., 2005; KRUM et al., 2009; VELLOSO et al., 2011).

The impact of *IDH1* mutation on AML prognosis remains to be defined. It has been reported in 6%-14% of *de novo* AML patients and in 10%-15% of NK-AML (ABBAS et al., 2010; MARCUCCI et al., 2010; PATEL et al., 2011; SCHNITTGER et al., 2010). In our study, 6.6% for all patients with AML and 10.9% in NK-AML carried this mutation, similar to that reported in literature (ABBAS et al., 2010; MARCUCCI et al., 2010; PATEL et al., 2011; SCHNITTGER et al., 2010). *IDH1*^{mut} had no impact on clinical outcomes in our study but the small number of patients might have biased the analysis. According to our knowledge, this is the first study reporting *IDH1* mutation status in the Brazilian AML population.

In our study, *NPM1*^{mut} was associated with high WBC and blast-counts, *FLT3*-ITD and CD34^{neg} blast cells. Most of patients were categorized in intermediate-cytogenetic risk group and had NK-AML. *FLT3*-ITD patients presented high WBC and blast-counts in PB and high LDH serum levels. These findings corroborate with results of other published

studies(BACHER et al., 2010; DOHNER, K. et al., 2005; FALINI et al., 2007; FERRARA; SCHIFFER, 2013; JIANG et al., 2011; MARTELLI et al., 2010; SU et al., 2014).

NPM1, *FLT3* or *IDH1* mutational status did not associate with clearance of blasts in the BM at D15 with cut-off values of either 5% or 10%, even when evaluated in NK-AML as did Schneider *et al* (SCHNEIDER et al., 2009). It might be due to the small sample size and deserves further study.

NPM1 but not *FLT3* or *IDH1* status was an independent predictor of OS and RFS for all AML patients as well as for NK-AML. *NPM1*^{mut} were associated with better OS than *NPM1*^{wild-type}, independently of *FLT3* status. As expected, patients with NK-AML and *NPM1*^{mut}*FLT3*^{wild-type} had better OS compared to all other mutation composites. Interestingly, none of *FLT3*-ITD patients have relapsed so far, in spite of the small sample size (n=20). Allelic mutant to wild-type ratio estimate was not standardized in our laboratory, therefore preventing us to evaluate whether a low allelic mutant/wild-type ratio exist in our cohort providing the weakness of the negative *FLT3*-ITD impact over *NPM1*^{mut}(PRATCORONA et al., 2013).

To our knowledge, this is the largest Latin America cohort with non-APL AML adult patients evaluated for *NPM1*, *FLT3* and *IDH1* mutations and their association with pre-treatment characteristics and treatment outcomes. However, the retrospective study design, the small sample size, the high ED and low CR rates might have jeopardized the treatment outcome analysis.

5. Conclusions

In conclusion, we have confirmed that *NPM1* mutation is an important marker for good prognostic for adult AML patients with intermediate cytogenetic-risk. We have found a lower frequency of *NPM1* mutations and *FLT3*-ITD in our population and a similar frequency of *IDH1*^{mut} in comparison to Caucasians.

Authorship

Contribution: N.G.C. and A.F.T.R. performed experiments, analyzed data and wrote the paper; S.A. and J.G.A. performed experiments; S.M.E.S. and A.B.F.G. analyzed data and wrote the paper; E.M.F., S.M.R. and S.G.X. designed research, analyzed data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

We thank the staff of the Hematology Unit for their help with patients' selection, Dra Cybele Andrade Paes, Francisco Danilo Ferreira Paula e Valéria Cristina Câmara for the technical assistance, Dra Mítiko Murao for flow cytometric analysis and Dr Enrico Antônio Colosimo for statistical assistance. We thank Bob Lowenberg, Ruud Delwel, Peter J. M. Valk and Claudia Erpelinck-Verschueren for support and technical assistance in *IDH1* sequencing. This work was supported by Capes/Brazil, PIBIC/CNPq, Fundo Nacional de Saúde and by Dutch Cancer Society.

REFERENCES

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.

AIVADO, M. et al. Optimization and evaluation of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) with reversed-phase protein arrays for protein profiling. **Clin Chem Lab Med**, v. 43, n. 2, p. 133-40, 2005.

APPELBAUM, F. R. et al. Age and acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3481-5, May 1 2006.

BACHER, U.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. **Curr Opin Oncol**, v. 22, n. 6, p. 646-55, Nov 2010.

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

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.

BASTOS, P. et al. **Cariótipo é o fator mais importante para a sobrevida em remissão completa para pacientes jovens com LMA “de novo” enquanto a leucometria inicial é o principal fator para a sobrevida global. Análise retrospectiva de 10 anos em um único centro.** Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo 2011.

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.

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.

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.

BENNETT, J. M. 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.

BENNETT, J. M. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). **Br J Haematol**, v. 78, n. 3, p. 325-9, Jul 1991.

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.

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.

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.

CHESON, B. D. et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 24, p. 4642-9, Dec 15 2003.

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.

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.

CLINE, M. J. The molecular basis of leukemia. **N Engl J Med**, v. 330, n. 5, p. 328-36, Feb 3 1994.

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.

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.

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.

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.

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.

DAVER, N. et al. FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. **Am J Hematol**, v. 88, n. 1, p. 56-9, Jan 2013.

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.

DE SANTIS, G. C. et al. Genetic Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia and Leukostasis. **Acta Haematol**, v. 130, n. 2, p. 95-97, Mar 23 2013.

DELLA PORTA, M. G. Prognosis of secondary acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 37, n. 8, p. 857-8, Aug 2013.

DESCHLER, B.; LUBBERT, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. **Cancer**, v. 107, n. 9, p. 2099-107, Nov 1 2006.

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.

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.

ELLIOTT, M. A. et al. Early peripheral blood blast clearance during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia predicts superior relapse-free survival. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4172-4, Dec 15 2007.

ESTEY, E. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. **Am J Hematol**, v. 88, n. 4, p. 318-27, Apr 2013.

ESTEY, E.; DOHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 368, n. 9550, p. 1894-907, Nov 25 2006.

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.

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.

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.

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.

FALINI, B.; SPORTOLETTI, P.; MARTELLI, M. P. Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives. **Curr Opin Oncol**, v. 21, n. 6, p. 573-81, Nov 2009.

FASAN, A. et al. Frequency and prognostic impact of CEBPA proximal, distal and core promoter methylation in normal karyotype AML: a study on 623 cases. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e54365, 2013.

FERLAY J, S. I., ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. **GLOBOCAN 2012**, v. 10, p. <http://globocan.iarc.fr>, 17/04/2013 2013.

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.

FERRARA, F.; SCHIFFER, C. A. Acute myeloid leukaemia in adults. **Lancet**, v. 381, n. 9865, p. 484-95, Feb 9 2013.

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.

GALLAGHER, S. J.; KEFFORD, R. F.; RIZOS, H. The ARF tumour suppressor. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, n. 10, p. 1637-41, 2006.

GERMING, U. et al. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). **Leukemia**, v. 19, n. 12, p. 2223-31, Dec 2005.

GILES, F. J. et al. Acute myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 73-110, 2002.

GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1532-42, Sep 1 2002.

GILLILAND, D. G.; JORDAN, C. T.; FELIX, C. A. The molecular basis of leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 80-97, 2004.

GORELLO, P. et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. **Leukemia**, v. 20, n. 6, p. 1103-8, Jun 2006.

GRIMWADE, D.; HILLS, R. K. Independent prognostic factors for AML outcome. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 385-95, 2009.

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.

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.

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.

GRISENDI, S. et al. Nucleophosmin and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 7, p. 493-505, Jul 2006.

GROSS, S. et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. **J Exp Med**, v. 207, n. 2, p. 339-44, Feb 15 2010.

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.

HELMAN, R. et al. Leucemia mielóide aguda: atualidade brasileira de diagnóstico e tratamento. **Einstein**, v. 9(2 pt 1), p. 179-183, 2011.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, C. D. P. E. V. Rio de Janeiro: 159 p. 2014.

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.

JIANG, A. et al. Prognostic factors in normal karyotype acute myeloid leukemia in the absence of the FLT3-ITD mutation. **Leuk Res**, v. 35, n. 4, p. 492-8, Apr 2011.

KIYOI, H. et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. **Leukemia**, v. 12, n. 9, p. 1333-7, Sep 1998.

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.

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.

KUHNL, A.; GRIMWADE, D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. **Int J Hematol**, v. 96, n. 2, p. 153-63, Aug 2012.

LARSON, R. A. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 20, n. 1, p. 29-37, Mar 2007.

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.

LOSMAN, J. A. et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1621-5, Mar 29 2013.

LOWENBERG, B.; GRIFFIN, J. D.; TALLMAN, M. S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 82-101, 2003.

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.

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.

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.

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.

MARDIS, E. R. et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. **N Engl J Med**, v. 361, n. 11, p. 1058-66, Sep 10 2009.

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.

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.

MARTINS, S. L. R.; FALCÃO, R. P. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 57-62, 2000.

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.

MAWAD, R.; ESTEY, E. H. Acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **Curr Oncol Rep**, v. 14, n. 5, p. 359-68, Oct 2012.

MCKENNA, R. W. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. **Clin Chem**, v. 46, n. 8 Pt 2, p. 1252-9, Aug 2000.

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.

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.

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.

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.

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.

PARSONS, D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1807-12, Sep 26 2008.

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.

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.

PATEL, M. I. et al. Understanding disparities in leukemia: a national study. **Cancer Causes Control**, v. 23, n. 11, p. 1831-7, Nov 2012.

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.

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.

RANDOLPH, T. R. Acute promyelocytic leukemia (AML-M3)--Part 1: Pathophysiology, clinical diagnosis, and differentiation therapy. **Clin Lab Sci**, v. 13, n. 2, p. 98-105, Spring 2000.

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.

RIBEIRO, A. F. et al. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 119, n. 24, p. 5824-31, Jun 14 2012.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

SCHOCH, C. et al. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. **Haematologica**, v. 89, n. 9, p. 1082-90, Sep 2004.

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.

SMITH, M. et al. Adult acute myeloid leukaemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 50, n. 3, p. 197-222, Jun 2004.

SOUTO FILHO, J. T. et al. Characterization and analysis of the outcome of adults with acute myeloid leukemia treated in a Brazilian University hospital over three decades. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 7, p. 660-5, Jul 2011.

STONE, R. M. Prognostic factors in AML in relation to (ab)normal karyotype. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 22, n. 4, p. 523-8, Dec 2009.

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.

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.

TENG, C.-L. et al. Lactate Dehydrogenase, not Vascular Endothelial Growth Factor or Basic Fibroblast Growth Factor, Positively Correlates to Bone Marrow Vascularity in Acute Myeloid Leukemia. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 69, n. 11, p. 534-537, 2006.

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.

THIEDE, C. et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. **Blood**, v. 99, n. 12, p. 4326-35, Jun 15 2002.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

WARRELL, R. P., JR. et al. Acute promyelocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 329, n. 3, p. 177-89, Jul 15 1993.

WHITMAN, S. P. et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. **Cancer Res**, v. 61, n. 19, p. 7233-9, Oct 1 2001.

WILLMAN, C. L. **Biologic and genetic risk assessment of AML in the genomic era.** Hematology: 90-97 p. 2002.

WOUTERS, B. J. et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 3088-91, Mar 26 2009.

YAN, H. et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med**, v. 360, n. 8, p. 765-73, Feb 19 2009.

YAN, L. et al. Analysis of NPM1 gene mutations in Chinese adults with acute myeloid leukemia. **Int J Hematol**, v. 86, n. 2, p. 143-6, Aug 2007.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. 1ª. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 1081

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.

Supplemental Material

Characterization of *NPM1*, *FLT3* and *IDH1* mutations in adult patients with acute myeloid leukemia: a Brazilian cohort study

Nathália Gomide^{1*}, Ana Flávia Tibúrcio Ribeiro^{2,3*}, Ana Beatriz Firmato Glória³, Saman Abbas^{4,5}, Juliana Godoy Assumpção⁶, Silvana Maria Eloi Santos⁷, Suely Meireles Rezende⁸, Sandra Guerra Xavier⁷, Evandro M. Fagundes³

2.4 Treatment strategy

The post-remission therapy varied according to the cytogenetic risk and age. For young patients (< 60 years), it was administered two-courses of high-dose Ara-C 3g/m² (Hidac) for low-cytogenetic risk patients and one-course of standard-dose of Ara-C and Daunorubicin plus etoposide followed by one-course of Hidac for intermediate or high-cytogenetic risk patients. Allogeneic bone marrow transplant was offered for intermediate and high-cytogenetic risk patients in first complete remission (CR) with an available donor. For elderly patients (> 60 years), the post-remission therapy was defined according to the clinical status and comorbidities. For patients with no intention-to-achieve CR, defined as patients older than 60 years and/or those with severe comorbidities and/or performance status ≥ 2 , alternative approaches consisted of low-dose cytarabine (20 mg twice daily subcutaneous, for 10-days), hydroxyurea or best supportive-care.

Among 27 acute myeloid leukemia (AML) patients who did not receive chemotherapy with intention-to-achieve CR, 21 (77.8) were not treated as they were older than 65 and most of them presented significant comorbidities that precluded intensive treatment. Among the other six patients, who were younger than 65, only one presented *de novo* AML and died in next day of diagnosis due to poor clinical conditions. One patient aged 17 had secondary AML due to Fanconi anemia and presented severe comorbidities. The others 4 patients with secondary AML aged between 51 and 63 years old presented concomitant diseases and/or performance status equal or higher than 2 and were treated with low-dose cytarabine (20 mg twice daily subcutaneous for 10 days), hydroxyurea or best supportive care (Table A.1).

Table A.1 Pretreatment characteristics of 27 AML patients eligible for palliative treatment or best supportive care

Characteristic	AML cases (n=27)
Age at diagnosis , median in years (range)	73.7 (17.8-84.0)
< 65 years, n (%)	6 (22.2)
≥ 65 years, n (%)	21 (77.8)
Male gender , n (%)	15 (55.6)
WBC count , median x10 ⁹ /L (range)	19.9 (1.6-335.6)
Total, n	25
Peripheral blood blasts , median x10 ⁹ /L (range)	12.1 (0.0-189.5)
Total, n	25
Serum LDH , median UI/μL (range)	975.5 (431-12013)
Total, n	18
FAB subtype , n (%)	
AML M0	1 (7.1)
AML M1	4 (28.6)
AML M2	8 (57.1)
AML M4	1 (7.1)
AML M5	0
AML M6	0
AML M7	0
Total, n	14
Cytogenetic risk group , n (%)	
Favorable	0
Intermediate	13 (65)
Normal Karyotype	8 (40)*
Adverse	7 (35)
Total, n	20
Type of AML , n (%)	
<i>de novo</i> AML	10 (37)
Secondary AML	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

AML, acute myeloid leukemia; WBC, white blood cell; FAB, French-American-British; LDH, lactate dehydrogenase; Cytogenetic risk group classification (favorable, intermediate and adverse) according Grimwade *et al* (GRIMWADE *et al.*, 2010). ITD, internal tandem duplication; *FLT3*^{wild-type}, no ITD mutation. *Percentage related to total of cytogenetic available.

Table A.2 Comparison of pretreatment characteristics and molecular markers status in NK-AML patients

Characteristics	NPM1			FLT3			IDH1		
	Mutated (n=18)	wild-type (n=37)	P	Mutated (n=9)	wild-type (n=47)	P	Mutated (n=5)	wild-type (n=41)	P [†]
Age at diagnosis , median in years (range)	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 years, 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†
≥ 60years, n (%)	5 (27.8)	8 (21.6)		2 (22.2)	11 (23.4)		0	12 (29.3)	
Male gender , 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
WBC x10⁹/L , median (range)	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	
Peripheral blood blasts x10⁹/L , median (range)	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	
Serum LDH , median UI/μL (range)	1.050 (638-2.838)	1.082 (269-12.013)	0.91*	1.081 (687-13.215)	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	
Serum LDH 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	
AML type n (%)			0.11†			0.09†			1.00†
<i>de novo</i> AML	16 (88.9)	24 (64.9)		9 (100.0)	33 (70.2)		4 (80.0)	31 (75.6)	
Secondary AML	2 (11.1)	13 (35.1)		0	14 (29.8)		1 (20.0)	10 (24.4)	
FAB subtype , n (%)			0.90†			0.30†			0.24†
AML M0	0	0		0	0		0	0	
AML M1	4 (28.7)	9 (30.0)		2 (25.0)	11 (28.9)		1 (20.0)	9 (28.1)	
AML M2	3 (21.4)	10 (33.3)		3 (37.5)	10 (26.3)		2 (40.0)	7 (21.9)	
AML M4	3 (21.4)	5 (16.7)		0	10 (26.3)		0	8 (25.0)	
AML M5	3 (21.4)	4 (13.3)		3 (37.5)	4 (10.5)		1 (20.0)	6 (18.8)	
AML M6	1 (7.1)	1 (3.3)		0	2 (5.3)		0	2 (6.3)	
AML M7	0	1 (3.3)		0	1 (2.6)		1 (20.0)	0	
Total, n	14	30		8	38		5	32	
CD34 marker , n (%)			<0.01†			0.69†			1.00†
Positive	1 (8.3)	16 (64.0)		4 (57.1)	14 (45.2)		2 (40.0)	14 (50.0)	
Negative	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	

AML, acute myeloid leukemia; WBC, white blood cell; FAB, French-American-British; LDH, lactate dehydrogenase. Cytogenetic risk group classification (favorable, intermediate and adverse) according Grimwade *et al* (GRIMWADE *et al.*, 2010). CD34 antigen present in more than 20% of blast cells count was considered a positive marker. IDT, internal tandem duplication; *FLT3*^{wild-type}, no ITD mutation. *P* values not otherwise indicated were calculated with the 2-sided χ^2 test; **P* values were calculated with Wilcoxon (Mann-Whitney) test; †*P* values were calculated with Fisher exact test; ‡Numbers were too low for reliable statistical analysis.

Table A.3 Comparison of molecular markers status and *de novo* or secondary AML patients

Molecular marker status	All AML group (n=149)	<i>de novo</i> AML (n=113)	Secondary AML (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	

AML, acute myeloid leukemia; NK-AML, normal karyotype; IDT, internal tandem duplication; *FLT3*^{wild-type}, no ITD mutation. *P* values were calculated with Fisher exact test for the comparison between *de novo* or Secondary AML Patients; [‡]Numbers were too low for reliable statistical analysis.

APÊNDICE E**ARTIGO 2 (em elaboração)****COMPARISON OF *NPM1* EXON 12 MUTATIONS SCREENING METHODS IN AML PATIENTS**

NATHÁLIA GOMIDE CRUZ¹, JULIANA GODOY ASSUMPÇÃO^{1;2}, SUELY MEIRELES REZENDE¹, DIEGO SOUZA PEIXOTO¹; FABRÍCIO BRAGA¹; LUCAS VIEIRA RODRIGUES¹, LUDMILA GOMES MUNIZ², JULIANA RODRIGUES², ALESSANDRO CLAYTON DE SOUZA FERREIRA³, SANDRA GUERRA XAVIER¹

¹FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS;

²LABORATÓRIO BIOCOD BIOTECNOLOGIA LTDA;

³SETOR DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO - INSTITUTO HERMES PARDINI

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0098.0.203.000-10

Interessado(a): **Profa. Sandra Guerra Xavier**
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 05 de maio de 2010, o projeto de pesquisa intitulado **"Desenvolvimento de metodologia para caracterização e quantificação das alterações genéticas no gene NPM-1 em pacientes com leucemia mieloide aguda"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over a horizontal line.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE - 0098.0.203.000-10

**Interessado(a): Profa. Sandra Guerra Xavier
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 04 de abril de 2012, a inclusão do projeto "**Identificação de mutações nos genes NPM1 e sua relação com a variabilidade clínico-biológica da leucemia mielóide aguda**" como subprojeto do projeto de pesquisa intitulado "**Desenvolvimento de metodologia para caracterização e quantificação das alterações genéticas no gene NPM-1 em pacientes com leucemia mielóide aguda**", com as seguintes alterações:

- A análise da frequência da mutação NPM1-mutA e das mutações no gene IDH1;
- A inclusão da mestranda Nathália Gomide Cruz na pesquisa.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over a horizontal line.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO C

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP****Projeto: CAAE - 0098.0.203.000-10****Interessado(a): Profa. Sandra Guerra Xavier
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG****DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 19 de junho de 2013, a alteração, abaixo relacionada, do projeto de pesquisa "Identificação de mutações nos genes NPM1 e sua relação com a variabilidade clínico-biológica da leucemia mielóide aguda" como subprojeto do projeto de pesquisa intitulado "Desenvolvimento de metodologia para caracterização e quantificação das alterações genéticas no gene NPM-1 em pacientes com leucemia mielóide aguda", com as seguintes alterações:

- Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos casos já falecidos;
- **Recomendação:** criação de um biorrepositório regulamentado conforme a Resolução 441/11.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO D

TERMO DE QUALIFICAÇÃO



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



Ata do exame de qualificação a que se submeteu a mestranda NATHÁLIA GOMIDE CRUZ

Aos vinte e nove dias do mês de outubro do ano de dois mil e treze, convocada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto – Área de Concentração em Ciências Clínicas – compareceu a mestranda **NATHÁLIA GOMIDE CRUZ** para submeter-se ao exame de qualificação com a dissertação intitulada: **“ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES NPM1 E IDH1 E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA”**, perante a comissão examinadora composta pelas professoras doutoras: Benigna Maria de Oliveira – UFMG e Juliana Godoy Assumpção – BIOCOD-Biotecnologia. A Prof^ª. Suely Meireles Rezende, orientadora da dissertação, participou da sessão como ouvinte. A sessão iniciou-se às sete horas e constou da exposição oral e projeção de vídeo com a presença das professoras doutoras acima citadas. Após a exposição da candidata, as professoras doutoras participantes da Comissão Examinadora fizeram comentários sobre a apresentação, o material didático utilizado e o conteúdo do trabalho. Após a arguição a banca examinadora do exame de qualificação considerou a aluna aprovada a se submeter à defesa de dissertação. Para constar, lavrou-se a presente ATA, que segue assinada pela comissão examinadora. Belo Horizonte, 29 de outubro de 2013.



Prof^ª. Benigna Maria de Oliveira

Prof^ª. Juliana Godoy Assumpção

Prof^ª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari/Coordenadora

ANEXO E

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO	
---	---	---

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA NATHÁLIA GOMIDE CRUZ

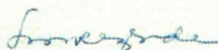
Realizou-se, no dia 09 de junho de 2014, às 14:00 horas, Sala 062, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES NPM1 E IDH1 E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**, apresentada por **NATHÁLIA GOMIDE CRUZ**, número de registro 2012656115, graduada no curso de FARMACIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof^ª. Suely Meireles Rezende - Orientadora (UFMG), Prof^ª. Sandra Guerra Xavier - Coorientadora (UFMG), Prof^ª. Karina Braga Gomes Borges (UFMG), Dr. Daniel Gonçalves Chaves (Hemominas).

A Comissão considerou a dissertação:

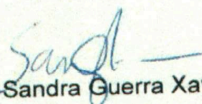
Aprovada

Reprovada

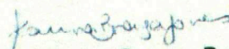
Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 09 de junho de 2014.



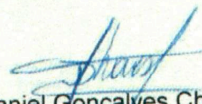
Prof^ª. Suely Meireles Rezende (Doutora)



Prof^ª. Sandra Guerra Xavier (Doutora)



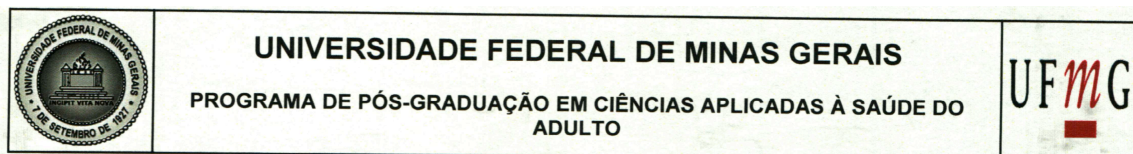
Prof^ª. Karina Braga Gomes Borges (Doutora)



Dr. Daniel Gonçalves Chaves (Doutor)

ANEXO F

FOLHA DE APROVAÇÃO



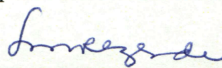
FOLHA DE APROVAÇÃO

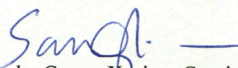
ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES NPM1 E IDH1 E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

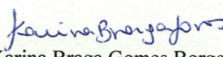
NATHÁLIA GOMIDE CRUZ

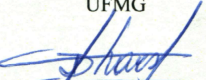
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS CLÍNICAS.

Aprovada em 09 de junho de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Profª. Suely Meireles Rezende - Orientadora
UFMG


Profª. Sandra Guerra Xavier - Coorientadora
UFMG


Profª. Karina Braga Gomes Borges
UFMG


Dr. Daniel Gonçalves Chaves
Hemominas

Belo Horizonte, 09 de junho de 2014.