Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Renata Lyrio Rafael Baptista

Leucemia mieloide aguda familiar

Rio de Janeiro
2018

Renata Lyrio Rafael Baptista

Leucemia mieloide aguda familiar

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Ilana Zalcberg Renault

Coorientadora: Prof.ª Dra. Cristiana Solza

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

B222 Baptista, Renata Lyrio Rafael.
Leucemia mieloide aguda familiar / Renata Lyrio Rafael Baptista – 2018.
88 f.

Orientadora: Ilana Zalcberg Renault.
Coorientadora: Cristiana Solza.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Leucemia aguda – Aspectos genéticos - Teses. 2. Mutagênese – Teses. 3. Leucemia Mieloide Aguda. 4. Sequenciamento Completo do Exoma. I. Renault, Ilana Zalcberg. II. Solza, Cristiana. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.155.392:575.224

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Renata Lyrio Rafael Baptista

Leucemia mieloide aguda familiar

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de março de 2018.

Coorientadora: Prof.ª Dra. Cristiana Solza
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Ilana Zalcberg Renault (Orientadora)
Instituto Nacional de Câncer

_____

Prof.ª Dra. Stella Beatriz Sampaio Gonçalves de Lucena
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof. Dr. André Luiz Mencalha
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Rodrigo Doyle Portugal
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof.ª Dra. Barbara da Costa Reis Monte-Mór
Instituto Nacional de Câncer

Rio de Janeiro
2018

DEDICATÓRIA

Às minhas filhas, Isabela e Manuela, meu eterno amor.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ilana Zalcberg por permitir que uma médica assistencialista se tornasse uma cientista, nem que por alguns poucos anos.

Aos profissionais do laboratório de biologia molecular do Centro de Medula Óssea-Instituto Nacional de Câncer (CEMO-INCA), e em especial a Luciana, por toda paciência e ajuda imensuráveis, e a Barbara e Natália pelos ensinamentos.

Aos queridos professores e médicos do Hospital Universitário Pedro Ernesto pela compreensão.

Aos meus pais por sempre me fazerem acreditar que é possível.

Ao Bruno por todo seu amor e parceria.

Às minhas filhas por me fazerem acreditar em um mundo melhor.

RESUMO

BAPTISTA, Renata Lyrio Rafael. **Leucemia mieloide aguda familiar**. 2018. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Introdução: Apesar da maioria dos casos de LMA serem esporádicos, um pequeno subgrupo está associado à presença de mutações germinativas. Na revisão de 2016 da Classificação da OMS de 2008 foram incluídas as neoplasias mieloides com presença de mutações germinativas. Esses pacientes devem ser submetidos a uma abordagem terapêutica diferenciada, uma vez que a indicação de TCTH alogênico aparentado torna obrigatória a exclusão da mutação no irmão doador. Além disso, os familiares devem receber aconselhamento genético. Objetivos: a) Estabelecer o status mutacional dos genes *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* em pacientes com LMA submetidos à TCTH alogênico no CEMO-INCA. No decorrer desse estudo foi identificado um par de gêmeos discordantes para o diagnóstico de LMA. A raridade desse fato e o potencial uso do modelo para tentar entender a patogênese da LMA fez com que um outro objetivo fosse desenvolvido; b) Avaliar os exomas de irmãos gêmeos idênticos discordantes para o diagnóstico de LMA identificados na coorte estudada. Métodos: A detecção de mutações nos genes *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, *TERT* e *TERC* em 58 pacientes com diagnóstico de LMA foi realizada pela técnica de MPLA (Amplificação de *primer* por ligação dependente multiplex). A avaliação dos exomas foi realizada por meio de análise bioinformática. Resultados: Na avaliação do status mutacional dos genes *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* através da técnica de MPLA não foi identificada nenhuma mutação. A comparação do exoma dos gêmeos idênticos discordantes para LMA identificou 116 variantes, dessas foram selecionadas mutações em nove genes no paciente e em dois genes no irmão saudável. A categoria funcional desses genes (*HJURP*, *ABCE1*, *PCDHA11*, *AJM1*, *TAS2R19*, *AMER2*, *FNDC3A*, *SIN3A* e *L1CAM*) e sua possível relevância no processo de transformação é discutida. *RBM5* e *ATXN3* sã mutados no gêmeo saudável. Conclusão: Na análise de exoma em par de gêmeos discordantes para LMA, as mutações encontradas podem ser o resultado da instabilidade genética gerada por malignidades. Mais estudos são necessários para conformar o papel de cada mutação encontrada na discordância entre o par de gêmeos neste rastreamento genético inicial.

Palavras-chave: LMA familiar. Sequenciamento de última geração. Exoma. *GATA2*. *CEBPA*. *RUNX1*. *TERT*. *TERC*.

ABSTRACT

BAPTISTA, Renata Lyrio Rafael. **Familial acute myeloid leukemia.** 2018. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Introduction: Although most cases of AML are sporadic, a small subgroup is associated with the presence of germ mutations. The 2016 review of the WHO Classification of 2008 included these cases in a session of myeloid neoplasia with presence of germ mutations. These patients should have a different management since the indication of related allogeneic HSCT makes it mandatory to exclude mutation in the donor sibling. In addition, family members should receive genetic counseling. Objectives: a) To establish the mutational status of the *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* genes in patients with AML undergoing allo-HSCT in CEMO-INCA. During this work, a pair of twins discordant for the diagnosis of AML was identified. The rarity of this fact and the potential use of the model to try to understand the pathogenesis of AML lead to another goal to be developed; b) To evaluate the exome of identical twin siblings discordant for the diagnosis of AML identified in the studied cohort. Methods: The detection of mutations in the genes *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *TERT* and *TERC* at 58 patients with the diagnosis of AML was performed with the implementation of the MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). The evaluation of exomes was performed through bioinformatic analysis. Results: The evaluation of the mutational status of the *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* genes did not identify any mutation. Comparison of the exomes of the identical twin discordant to AML identified 9 genes mutated in the patient and 2 genes mutated in the healthy sibling with possible clinical relevance. Genes *HJURP*, *ABCE1*, *PCDHA11*, *AJM1*, *TAS2R19*, *AMER2*, *FNDC3A*, *SIN3A* and *L1CAM* are mutated in the patient. *RBM5* and *ATXN3* are mutated in the health twin. Conclusion: At the exome analysis of the discordant twins pair in AML the mutations found in here could be the result of genetic instability lead by malignance. More experiments are needed to confirm the role of each mutation found in discordance between the pair of twins in this initial genetic screening.

Keywords: Familial AML. Whole exome sequencing. *GATA2*. *CEBPA*. *RUNX1*. *TERC*. *TERT*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Proteína esquemática do *CEBPA* (NP_004355.2) 32

Figura 2 – Proteína esquemática da isoforma B (NP_001001890.1) de *RUNX1* 35

Figura 3 – Estrutura genômica de *RUNX1* demonstrando locais da doença causando deleções. ATG1, o primeiro codon inicial correspondendo a isoforma C inteira de *RUNX1* e ATG2, o segundo codon inicial, corresponde a isoforma B de *RUNX1* 35

Figura 4 – Proteína esquemática de *GATA2* (NP_116027.2) 38

Figura 5 – Estrutura genômica de *GATA2* demonstrando locais de deleção 38

Figura 6 – Proteína esquemática de *TERT* (NP_937983.2) 40

Figura 7 – Estrutura genômica de *TERT* demonstrando locais de deleção 40

Figura 8 – Estrutura preditiva do RNA secundário de *TERC* RNA (NR_001566.1) . 41

Figura 9 – Guideline para a detecção clínica das síndromes de predisposição a Leucemia mieloide aguda (LMA) familiar 45

Figura 10 – Esquema da técnica de MLPA 49

Figura 11 – Sequenciamento pela plataforma Illumina 54

Figura 12 – Paciente com possível mutação em *GATA2* E2 57

Figura 13 – Paciente om possível mutação em *TERT* E6 57

Figura 14 – Porcentagem de variantes discordantes entre os gêmeos de acordo com as consequências relacionadas ao gene 59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação Britânica-Francês-Americana (FAB) 19

Quadro 2 – Classificação da Organização Mundial de Saúde - LMA e neoplasias precursoras relacionadas 21

Quadro 3 – Expressão de marcadores de superfície celular e citoplasmáticos para diagnóstico de Leucemia mielóide aguda (LMA) 23

Quadro 4 – Correlação dos dados clínicos, citogenéticos e moleculares na Leucemia mieloide aguda (LMA) 27

Quadro 5 – Classificação das neoplasias mieloides com predisposição germinativa 31

Quadro 6 – Recomendações para a detecção clínica da Leucemia mieloide aguda (LMA) familiar 44

Quadro 7 – Sondas para os genes *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* do *kit* SALSA P437 50

Quadro 8 – Genes mutados no gêmeo com diagnóstico de leucemia mielóide aguda (LMA) 60

Quadro 9 – Genes mutados no gêmeo saudável 60

Quadro 10 – Genotipos dos gêmeos discordantes 61

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ACMG	*American College of Genetics and Genomics*
CEMO	Centro de medula óssea
DC	Disceratose congênita
DCML	Deficiência de células dendríticas, monócitos e linfócitos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELN	*European Leukemia network*
FAB	Franco-britânico-americano
FISH	*Fluorescence in situ hybridization*
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ITD	*Internal tandem duplication*
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMA-CN	Leucemia mieloide aguda com cariótipo normal
LMA-SD	Síndrome de Down com LMA
LMA-t	LMA relacionada ao tratamento
LMMCJ	Leucemia mielomonocítica crônica juvenil
MAT-SD	Síndrome de Down com mielopoiese anormal transitória
MLPA	Amplificação de *primer* por ligação dependente multiplex
MPO	Mieloperoxidase
NMP	Neoplasias mieloproliferativas
NSE	*Non sterase especific*
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	*Acid-Schiff*
RC	Resposta completa
RNA	Ácido ribonucléico
RTA	Razão de taxa alélica
RT-PCR	*Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*
SBB	*Sudan-black*
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença

SMD	Síndrome mielodisplásica
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
THC2	Trombocitopenia não-sindrômica autossômica dominante
TKD	*Tyrosine kinase domain*

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	15
1.1	**Leucemia mieloide aguda (LMA)**	15
1.1.1	Histórico	15
1.1.2	Epidemiologia	15
1.1.3	Etiologia	16
1.1.3.1	Fatores genéticos	16
1.1.3.2	História à exposição	17
1.1.3.3	LMA relacionada a tratamento (LMA-t)	17
1.1.4	Classificação	18
1.1.5	Diagnóstico	22
1.1.5.1	Morfologia	22
1.1.5.2	Imunofenotipagem	23
1.1.5.3	Citogenética e citogenética molecular	24
1.1.5.4	Genética molecular	25
1.1.6	Fatores prognósticos	25
1.1.6.1	Fatores relacionados ao paciente	26
1.1.6.2	Fatores relacionados à LMA	26
1.1.6.2.1	Citogenética	26
1.1.6.2.2	Genética molecular	27
1.2	**LMA familiar**	30
1.2.1	Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *CEBPA*	31
1.2.2	Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *DDX41*	33
1.2.3	Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *RUNX1*	34
1.2.4	Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *ANKRD26*	36
1.2.5	Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *ETV6*	36
1.2.6	Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *GATA2*	37
1.2.7	Neoplasias mieloides associadas a distúrbios da biologia dos telômeros	39

1.2.8 Leucemia mielomonocítica crônica juvenil (LMMCJ) associada a neurofibromatose, Síndrome de Noonan ou transtornos semelhantes a Síndrome de Noonan 41
1.2.9 Neoplasias mieloides associadas à Síndrome de Down 42
2 **OBJETIVO** 46
2.1 **Objetivos primários** 46
2.2 **Objetivo secundário** 46
3 **MATERIAIS E MÉTODOS** 47
3.1 **População** 47
3.2 **Critérios de inclusão e exclusão** 47
3.3 **Coleta de dados** 47
3.4 **Metodologia** 48
3.4.1 Metodologia para determinação do *status* dos genes *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* 48
3.4.2 Metodologia para determinação do exoma dos irmãos gêmeos discordantes para o diagnóstico de LMA 52
3.4.2.1 Amostra 52
3.4.2.2 Exoma por sequenciamento na plataforma Ilummina 53
3.4.2.2.1 Construção da biblioteca genômica 53
3.4.2.2.2 Sequenciamento 53
3.4.2.2.3 Bioinformática 54
3.5 **Comitê de Ética em Pesquisa** 55
4 **RESULTADOS** 56
4.1 **Detecção de mutações nos genes *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* pela técnica de MLPA** 56
4.2 **Exoma de irmãos gêmeos discordantes para LMA** 58
4.2.1 Análise do sequenciamento do exoma 58
5 **DISCUSSÃO** 64
CONCLUSÃO 66
REFERÊNCIAS 67
APÊNDICE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 84
ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UERJ 87
ANEXO B - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do INCA 88

INTRODUÇÃO

A causa da maioria dos casos de neoplasias mieloides ainda é desconhecida, apesar de já serem estabelecidos alguns fatores etiológicos na doença como a exposição a benzeno, radioterapia e quimioterapia.[1]

Existe na literatura a descrição de famílias com múltiplos casos de leucemia mieloide aguda (LMA). A investigação genômica detalhada dessas famílias levou à identificação de mutações germinativas associadas a essa neoplasia.[2-4]

Em 2016, na revisão da classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) foi incluído o grupo das neoplasias mieloides com predisposição genética e associação a mutações germinativas. Essa nova entidade inclui: a) neoplasias mieloides com predisposição germinativa, na ausência de uma desordem ou disfunção orgânica prévia; b) neoplasias mieloides com predisposição germinativa e presença de desordem plaquetária prévia; c) neoplasias mieloides com predisposição germinativa e disfunção orgânica prévia. A identificação da mutação genética ou da síndrome predisponente é essencial para o diagnóstico desses casos familiares.[5,6]

A importância da identificação dessas famílias se torna mais clara devido à relevância das questões clínicas envolvidas. Por exemplo, pacientes com diagnóstico de LMA e síndrome mielodisplásica (SMD) com indicação de transplante de células tronco hematopoéticas alogênico (TCTH alo) não deveriam ter irmãos como doadores de medula óssea a não ser que a presença da mutação no gene em questão fosse excluída, já que a presença da mutação na medula doada está associada ao desenvolvimento da doença. Já no caso dos pacientes com distúrbios do tipo disfunção plaquetária familiar, é necessário o manejo específico e preventivo em relação a distúrbios de coagulação, principalmente em situações de trauma e pré-operatório, com objetivo de reduzir a morbidade nesses pacientes.[7-9]

Os objetivos primários desse estudo são estabelecer o *status* mutacional dos genes OS *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* em pacientes com LMA submetidos a alo-TCTH no Centro de Medula Óssea (CEMO)-Instituto Nacional de Câncer (INCA) e identificar novas mutações que possam estar envolvidas na patogênese da LMA em um par de gêmeos idênticos divergentes para o diagnóstico de LMA. O objetivo secundário é desenvolver uma plataforma genética diagnóstica para casos de LMA familiar.

A pesquisa de mutações nos genes *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *TERT* e *TERC* foi realizada em uma coorte retrospectiva de 58 pacientes com diagnóstico de LMA submetidos a transplante alogênico aparentado de medula óssea no CEMO-INCA.

O desenvolvimento dessa plataforma diagnóstica foi um possível piloto a ser expandido no Brasil. Este estudo permite a sugestão de algoritmos de diagnóstico e conduta específicos para cada mutação, permitindo, em futuro próximo, o desenvolvimento de protocolos de diagnóstico e acompanhamento de pacientes e familiares.

1 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

1.1 **Leucemia mieloide aguda (LMA)**

1.1.1 Histórico

O primeiro caso de leucemia aguda foi descrito na literatura médica por Alfred-Armand-Luis-Marie Velpeau, em 1827. Velpeau relatou o caso de uma senhora de 63 anos com febre, fraqueza e hepatoesplenomegalia e cujo sangue tinha uma consistência macroscópica diferente do normal, ao que ele chamou ao microscópio de corpúsculos brancos.[1]

Em 1845, Bennet descreveu uma série de pacientes que morreram com aumento do baço e mudanças na cor e consistência do sangue, denominada por de leucocitemia.[10]

O termo leucemia foi utilizado pela primeira vez por Rudolf Virchow, patologista pioneiro no uso do microscópio ótico, que descreveu o excesso de glóbulos brancos nos doentes como a síndrome clínica descrita por Velpeau e Bennet.[11]

Em 1869, Neumann reconheceu que os glóbulos brancos eram produzidos na medula óssea e foi, então, criado o termo mieloide, sendo posteriormente, em 1879, descrito o primeiro exame de medula óssea. E finalmente, em 1900, Naegeli classificou a leucemia em mieloide e linfoide.[12]

1.1.2 Epidemiologia

A LMA representa aproximadamente 1 a 2% de todas as causas de câncer nos Estados Unidos da América.[13] Não existe a descrição da incidência da doença no Brasil.

A idade média no diagnóstico é de 65 anos e a incidência aumenta com a idade. A LMA representa aproximadamente 90% das leucemias agudas em adultos, mas apenas 10% dos casos em crianças menores de 10 anos.[1]

A incidência de LMA secundária parece estar aumentando, e atualmente representa 10 a 20% dos casos de LMA no adulto.[14]

1.1.3 Etiologia

A leucemogênese é um processo múltiplo, no qual uma célula progenitora é suscetível a agentes indutivos em vários estágios. Drogas, fatores genéticos e exposição ambiental e ocupacional são possíveis agentes leucemogênicos.[15]

1.1.3.1 Fatores genéticos

A predisposição genética para LMA foi observada em estudos epidemiológicos e familiares.[16] Relatos de casos de LMA ocorridos na mesma família vêm sendo descritos, e a concordância do tipo de LMA entre famílias tem sido mais comum do que o esperado ao acaso.[17,18] Da mesma forma, existe um aumento da incidência de LMA em parentes de primeiro grau em todos os subtipos da doença. Esses dados sugerem que a mutação em genes suscetíveis a leucemia poderia ser um mecanismo comum de LMA "hereditária".[19,20]

O aumento da incidência de LMA em doenças congênitas também sugere uma predisposição genética para o desenvolvimento da doença. Na Síndrome de Down, por exemplo, a incidência de leucemia aguda antes dos cinco anos de idade chega a ser 150 vezes maior do que na população geral.[21,22]

As doenças associadas com instabilidade cromossômica como Anemia de Fanconi, Ataxia telagectásica, Síndrome de Bloom e Síndrome de Kostman também estão associadas a maior incidência de LMA.[23,24] Provavelmente, o "ambiente celular" nessas doenças resulta em instabilidade cromossômica, dano do ácido desoxirribonucléico (DNA) e maior suscetibilidade a mutações.[21]

1.1.3.2 História à exposição

A exposição à radiação ionizante e a produtos químicos está associada ao desenvolvimento de LMA. A associação entre irradiação e o desenvolvimento de leucemia aguda foi evidenciada em parte após o acompanhamento dos sobreviventes da explosão da bomba atômica em Hiroshima e Nagasaki.[25,26] O tempo de latência entre a exposição e o desenvolvimento da doença foi de 5 a 21 anos, e o risco estava relacionado com a idade no momento do acidente e ao tempo de exposição.[27]

O tratamento com radioterapia também aumenta o risco de LMA. Pacientes que receberam baixas doses de radioterapia para tratamento de doenças benignas, como espondilite anquilosante, tinea capis, timoma e artrite reumatoide, também desenvolveram LMA em uma incidência de 2 a 5 vezes maior do que a esperada, assim como militares que participaram de testes nucleares.[28] O uso de dióxido de torium como meio de contraste para exames radiológicos, na década de 40, foi associado a aumento da incidência de LMA eritroblástica cerca de 10 a 30 anos após a exposição.

A exposição crônica a alguns agentes químicos tem sido associada ao desenvolvimento de LMA, sendo o benzeno o mais estudado.[29-31] Dessa forma, trabalhadores da indústria petroquímica, do couro e da borracha, assim como pintores, agricultores expostos a herbicidas e frentistas tem maior chance de desenvolver a doença.

Os fumantes ativos e passivos parecem ter um risco aumentado de desenvolver LMA, provavelmente pela presença de derivados de benzeno na composição do cigarro.[32,33]

1.1.3.3 LMA relacionada ao tratamento (LMA-t)

O aumento na incidência de LMA tem sido relatado em pacientes que recebem quimioterapia para tratamento de algumas neoplasias. Geralmente, essas leucemias se desenvolvem após administração de agentes alquilantes ou inibidores da topoisomerase II.

A LMA-t está associada a anormalidades citogenéticas e a resposta ruim à quimioterapia. O risco de desenvolvimento de LMA é proporcional à idade do paciente, à dose cumulativa do agente alquilante administrado e à doença de base.[34]

Atualmente, a LMA-t representa cerca de 10 a 20% de todos os casos de LMA, sendo clinicamente diferente das leucemias de novo.

A LMA associada ao uso prévio de agente alquilante costuma ser precedida por um período variável de mielodisplasia ocorrendo anomalias genéticas nos cromossomos 7, 5 e 8 em 50 a 90% dos casos.[35]

Um grupo clínico e geneticamente distinto é formado por indivíduos tratados com inibidores de topoisomerase II (etoposide e antraciclínicos). Essa classe de drogas causa lesão do DNA por meio de uma enzima intranuclear, gerando uma doença caracterizada pelo curto de período de latência em torno de 2 a 3 anos.[36,37] A LMA associada à topoisomerase II está associada ao rearranjo cromossomial envolvendo os cromossomos, e caracteriza-se por uma translocação balanceada envolvendo bandas 11q23.[38]

Em paciente com câncer de mama o risco de desenvolvimento de síndrome mielodisplásica (SMD) está relacionado à dose de epirubicina e ciclofosfamida, parecendo haver maior associação com a intensidade da dose do que com a dose cumulativa.[39]

Algumas doenças adquiridas também estão associadas à evolução para LMA. Pacientes com neoplasia mieloproliferativa (NMP) tem maior incidência de transformação leucêmica, o que parece aumentar com a adição de quimioterapia e radioterapia.[40]

A anemia aplástica está relacionada ao desenvolvimento tardio de LMA, e o risco também parece ser maior após a exposição à radioterapia e produtos químicos.[41]

O mieloma múltiplo está associado com o desenvolvimento de LMA. Essa associação e a administração de agentes alquilantes são bem documentadas, mas a LMA pode acorrer mesmo sem tratamento prévio.[42,43]

1.1.4 Classificação

O primeiro sistema de classificação para LMA foi proposto em 1976 pelo Grupo Cooperativo Franco-americano-britânico (FAB)[44,45] (Quadro 1). A classificação FAB divide as LMAs em oito categorias com base na morfologia, citoquímica, utilizando a coloração de Wright e Giemsa.

Quadro 1 - Classificação Britânica-Francês-Americana (FAB)

Subtipo	Características
LMA-M0	≥30% de blastos; >3% blastos reativos para MPO, SBB, ou NSE
LMA-M1	≥30% blastos; ≥3% blastos reativos para MPO ou SBB; <10% das células nucleadas da medula óssea são promielócitos ou neutrófilos mais maduros.
LMA-M2	≥30% de blastos; ≥3% blastos reativos para MPO ou SBB; ≥10% das células nucleadas da medula óssea são promielócitos ou neutrófilos mais maduros; t(8:21) como anormalidade cromossômica.
LMA-M3	≥30% blastos e promielócitos anormais; intensa reatividade para MPO e SBB; promielócitos e blastos com múltiplos bastonetes de Auer; t(15:17) como anormalidade cromossômica.
LMA-M4	≥30% de mieloblastos, monoblastos e promonócitos; ≥20% de células monocíticas na medula; $\leq 5 \times 10^9$/L de monócitos no sangue; ≥20% de neutrófilos e precurssores na medula; células monocíticas reativas para NSE; eosinófilos anormais na LMA M4 quando associada inv(16).
LMA-M5a	≥80% de células monocíticas; monoblastos ≥80% das células monocíticas; monoblastos e monócitos reativos para NSE; manoblastos geralmente não reativos para MPO e SBB.
LMA-M5b	≥80% células monocíticas; monoblastos ≥80% das células monocíticas; monoblastos e monócitos reativos para NSE; promonócitos podem ter granulos positivos para MPO e SBB.
LMA-M6	≥50% de precurssores eritroides: ≥30% dos precursores não eritroides são mieloblastos; Bastonetes de Auer podem estar presentes nos mieloblastos; precurssores eritroides displásicos frequentemente são positivos para PAS.
LMA-M7	≥30% de blastos; ≥50% das células são megaloblastos pela morfologia; imunofenótipo CD41+, CD61+

Legenda: Leucemia mieloide aguda (LMA); mieloperoxidase (MPO); sudan-Black (SBB); *non sterase especific* (NSE).
Fonte: Bennett et al.[44]

Numa tentativa de se incorporar informações citogenéticas e clínicas na classificação das LMAs, foi desenvolvida em 2001uma nova classificação, a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS).[46,47] Essa classificação preservou o conteúdo da classificação anterior, mas definiu subgrupos únicos com importância clínica e biológica, com a incorporação da informação citogenética. Uma alteração fundamental introduzida foi a redução do número de blastos de 30% para 20% para determinação do diagnóstico.

A classificação da OMS tem sido amplamente aceita pela maioria dos grupos cooperativos e vem substituindo a classificação FAB. A versão de 2008 categoriza as leucemias agudas em entidades clinicopatogenéticas, baseando-se em alterações citogenéticas e moleculares.[48,49]

As alterações citogenéticas recorrentes caracterizam o diagnóstico de LMA independentemente do número de blastos na medula óssea. A LMA com t(9;11)(p22;q23) é considerada uma entidade única e foi incluída nesse subgrupo em conjunto com outras três entidades citogenéticas que são a LMA com t(6;9)(p23;q34), a LMA com inv(3)(q21;q26.2) e a LMA com t(1;22)(p13;q13), uma leucemia rara que quase só se manifesta em crianças. Duas entidades provisórias caracterizadas pela presença de mutações genéticas também foram incluídas nesse grupo, a LMA com o gene *NPM1* mutado e a LMA com o gene *CEBPA* mutado. Existem evidências de que essas duas mutações genéticas representam lesões genéticas primárias, as mutações do tipo classe 2.[50] As mutações no gene *fms-related tyrosine kinase 3* (*FLT3*) estão associadas a alguns subtipos de LMA. As LMAs com mutação em *FLT3* não são consideradas uma entidade, mas devem ser identificadas devido à sua importância prognóstica.

A LMA com achados relacionados à mielodisplasia se caracteriza: a) pela história prévia de SMD ou SMD/NMP; b) presença de alterações citogenéticas relacionadas à SMD como cariótipo complexo (definido como três ou mais alterações cromossômicas), alterações cromossômicas não e balanceadas; ou c) presença de mais de 50% das células de duas ou mais linhagens mieloides displásicas.

Já a LMA relacionada a tratamento (LMA-t) caracteriza-se pelo desenvolvimento da neoplasia após tratamento radioterápico ou quimioterápico.

Na versão revista em 2016 a OMS[5] continua a definir as entidades de LMA baseadas nos achados citogenéticos e moleculares (Quadro 2).

Quadro 2 - Classificação da Organização Mundial de Saúde - LMA e neoplasias precursoras relacionadas

Categorias
LMA com alterações citogenéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
LMA com inv(16)(p13;1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); *MLLT3-MLL*
LMA com t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
LMA com t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*
LMA com t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1*
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*
Entidade provisória: LMA com *BCR-ABL1*
LMA com *NPM1* mutada
LMA com *CEBPA* bialélico mutado
Entidade provisória: LMA com *RUNX1* mutado
LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia *
Neoplasia mieloide relacionada a tratamento
LMA não especificada
LMA com diferenciação mínima
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia eritroide aguda
Leucemia eritroide pura
Eritroleucemia, eritroide/mieloide
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielose aguda com mielofibrose
Sarcoma mieloide (tumor mieloide extramedular; sarcoma granulocítico)
Proliferação mieloide relacionada à Síndrome de Down
Mielopoise transitória anormal (desordem mieloproliferativa transitória)
Leucemia mieloide associada à Síndrome de Down

Legenda: Leucemia mieloide aguda (LMA).

Nota: *alterações cromossômicas não balanceadas como del(17) ou del(17q), del(5) ou del (5q), inv(17q) ou t(17p), del(13) ou del(13q), del(11q), del(12p) ou t(12p), del(9q), indic(X)(q13) e balanceadas como t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3;q21.1), t(2;11)(p21;q23), t(5;12)(q33;p12), t(5;7)(q33;p13), t(5;10)(q33;q21), t(3;5)(q25;q34).

Fonte: Arber et al.[5]

Um grande número de alterações citogenéticas balanceadas recorrentes é reconhecido, mas grande parte delas não são formalmente incorporadas por essa classificação. Alguns pequenos refinamentos relacionados à atualização de nomes de genes foram feitos como, por exemplo, a mudança do nome *LMM* para *KMT2A*, assim como o reconhecimento de que inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) não representam uma fusão de genes, mas sim uma reposição do *enhancer* distal do *GATA2* para ativar a expressão de *MECOM* e simultaneamente conferir uma haploinsuficiência de *GATA2*.[51,52] Para reforçar a significância

da fusão do PML-RARA, que pode ser cripita ou resultar de uma rearranjo citogenético complexo diferente da t(15;17)(q24.1; q21.2), a leucemia promielocítica aguda (LPA) com essa fusão foi renomeada como LPA com PML-RARA. Finalmente, uma nova categoria provisória de LMA com *BCR-ABL1* foi adicionada para reconhecer os raros casos de LMA de novo que podem se beneficiar da terapia com inibidor de tirosina quinase.[53,54] A definição da LMA com *CEBPA* foi modificada exigindo que essa mutação seja bialélica, já que o melhor prognóstico dessa entidade só se confirma nessa condição. Adicionalmente, na ausência de alteração citogenética associada à SMD, a presença de multilinhagem displasia deixa de ter papel prognóstico. E, finalmente, uma categoria provisória de LMA com *RUNX1* mutado foi adicionada a classificação de LMA de novo aos casos que não apresentam citogenética relacionada à SMD. Essa nova categoria provisória representa um grupo biológico distinto com um prognóstico possivelmente pior do que ou outros tipos de LMA.[55-57]

1.1.5 Diagnóstico

1.1.5.1 Morfologia

O mielograma é um exame essencial para definição do diagnóstico de LMA, sendo a biopsia de medula óssea necessária apenas quando o aspirado da medula óssea é seco. O sangue periférico e o mielograma devem ser corados com os corantes May-Grunwald e Giemsa ou Wright e Giemsa, para que seja realizada a análise morfológica, sendo recomendada a contagem de pelo menos 200 células no sangue periférico e 500 células na medula óssea.[1]

O diagnóstico de LMA é determinado pela presença de 20% ou mais de células blásticas no sangue periférico ou na medula óssea, exceto nos casos de LMA em que as t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16) são detectadas, já que essas alterações genéticas são suficientes para o diagnóstico de LMA.[1]

A citoquímica pode ser utilizada para definição da linhagem celular, sendo utilizados corantes tipo mieloperoxidase (MPO) ou *Sudan black B* (SBB) e esterase não específico. A detecção do corante MPO em 3% ou mais dos blastos indica diferenciação da célula em origem mieloide, mas sua ausência não pode excluir a origem mieloide, uma vez que

mieloblastos jovens e monoblastos podem não corar com esse corante. O corante SBB apresenta característica semelhante ao corante MPO, porém é menos sensível, e o de esterase não específico apresenta reação citoplasmática difusa nos monoblastos (geralmente positividade maior do que 80%) e nos monócitos (geralmente positividade maior do que 20%). Na eritroleucemia, o corante *acid-Schiff* (PAS) pode identificar grandes glóbulos positivos para a coloração nas células blásticas.[1]

1.1.5.2 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem utilizando a citometria de fluxo com multiparâmetros é utilizada para determinar a linhagem envolvida no diagnóstico de LMA[58,59] (Quadro 3).

Quadro 3 - Expressão de marcadores de superfície celular e citoplasmáticos para diagnóstico de Leucemia mielóide aguda (LMA)

Diagnóstico de LMA	
Precursor	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Marcadores ganulocíticos	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, cMPO
Marcadores monocíticos	Esterase não específica, CD11c, CD14, CD64, CD4, CD11b, CD36, NG2 homólogo
Marcadores megacariocíticos	CD41 (glicoproteína IIb/IIIa), CD61 (glicoproteína IIIa), CD42 (glicoproteína 1b)
Marcador eritroide	CD235a (glicoporina A)

Fonte: Craig e Foon[58].

Não existe consenso sobre o ponto de corte para se considerar um marcador positivo. Para a maioria dos marcadores é utilizado como critério de positividade sua expressão em mais de 20% das células leucêmicas, exceto para alguns marcadores selecionados (CD3 citoplasmático, MPO, TdT, CD34 e CD117), em que esse valor é de 10%.[53] A quantificação da expressão da vários antígenos de superfície e citoplasmáticos é necessária para: a) definição da linhagem celular; b) diagnosticar a leucemia com fenótipo misto; c) detectar fenótipos aberrantes que permitam mensurar a doença residual mínima.

A imunofenotipagem é essencial para diagnóstico de LMA com diferenciação mínima, leucemia megacarioblástica e leucemia de linhagem ambígua.[55] A LMA com diferenciação mínima é um tipo de leucemia sem evidência morfológica e citoquímica de diferenciação mieloide.[60] Muitos casos expressam antígenos associados a hematopoiese precoce (CD34, CD38 e LHA-DR) e não expressam marcadores de maturação mieloide e monocítica. A leucemia megacarioblástica é uma leucemia com mais de 20% de blastos, dos quais 50% ou mais são de linhagem megacariocítica. Os megacarioblastos tipicamente expressam uma ou mais glicoproteinas plaquetárias (CD41 e/ou CD61 e menos comumente CD42). As leucemias de linhagem ambígua são raras e representam os casos de leucemia sem evidência de diferenciação quanto à linhagem (leucemia indiferenciada) ou com expressão de antígenos de mais de uma linhagem. As leucemias indiferenciadas geralmente expressam HLA-DR, CD34 e/ou CD38. As leucemias de linhagem ambígua podem conter blastos de linhagens diferentes, uma população de blastos com marcadores de linhagens diferentes na mesma célula ou à combinação de ambas.[53]

Algumas LMAs com alteração citogenética recorrente estão associadas com características imunofenotípicas distintas. A LMA com t(8;21) frequentemente expressa o marcador linfoide CD19 ou em uma menor frequência, CD7 e CD56.[61,62] A LMA com inv(16) frequentemente expressa o marcador de linhagem T, CD2[63] e a LMA com mutação no gene da *NPM1* tipicamente apresenta forte expressão para CD33, e baixa ou ausente para CD34.[64]

1.1.5.3 Citogenética e citogenética molecular

A citogenética convencional é mandatória no diagnóstico de LMA. As alterações cromossômicas são detectadas em aproximadamente 55% dos adultos com LMA.[65,66] Além de algumas alterações citogenéticas serem consideradas entidades na classificação da OMS, algumas alterações específicas podem definir o diagnóstico de LMA independente da contagem de blastos, como explicado acima. A análise citogenética adequada exige que pelo menos 20 células da medula óssea em metáfase sejam analisadas.[7]

O exame de Hibridização fluorescente em tecido (*fluorescence in situ hybridization* (FISH)) é uma opção para a detecção de rearranjos genéticos quando a análise citogenética falha. Alguns rearranjos genéticos específicos são mais bem avaliados como a fusão dos

genes *RUNX1-RUNX1T1*, *MLLT3-MLL*, *MLL* e *EV11* e a perda de material cromossômico como a deleção do 5q e 7q.[67,68]

1.1.5.4 Genética molecular

Uma amostra de medula óssea e de sangue periférico deve ser disponível para análise molecular. Idealmente, DNA e ácido ribonucléico (RNA) devem ser extraídos, e células viáveis devem ser armazenadas. Se o número de células for limitado, a extração de RNA deve ser priorizada, porque o RNA permite o *screening* molecular para fusão de genes e para mutações associadas à leucemia.

A aplicação da Reação em cadeia da transcriptase-polimerase em tempo real (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR)) pode ser uma opção na identificação de fusão de genes como *RUNX1-RUNX1T1*, *MLLT3-MLL*, *MLLT3-MLL* e *DEK-NUP214*, quando a análise cromossômica é de má qualidade ou quando a morfologia da medula óssea é típica, mas a alteração citogenética suspeita não é detectada.[69,70]

Algumas mutações somáticas adquiridas têm sido identificadas em vários genes como o gene *NPM* [62], o gene *FLT3*[71,72], o gene *CEBPA*[73] e gene de linhagem leucêmica mista-*MLL*.[74] O *screening* para as mutações em *NPM1* e *CEBPA*, que foram incorporadas na classificação da OMS, e para a mutação do gene *FLT3*, deve ser realizado em estudos clínicos e de forma rotineira, pelo menos nos pacientes com LMA com cariótipo normal.

1.1.6 Fatores prognósticos

Os fatores prognósticos relacionados à LMA se dividem entre os relacionados às características do paciente e às características do clone da doença. Os fatores relacionados ao paciente, geralmente predizem a mortalidade relacionada ao tratamento, enquanto que os fatores relacionados ao clone leucêmico predizem resistência ao tratamento convencional.

1.1.6.1 Fatores relacionados ao paciente

A idade avançada é definida como acima de 60 anos e é considerada como fator prognóstico adverso. Mesmo após serem considerados fatores citogenéticos e moleculares e *performance status*, o paciente idoso tem pior prognóstico do que o jovem, o que sugere fatores relacionados a idade ainda não estudados.[75,76]

1.1.6.2 Fatores relacionados à LMA

Os fatores prognósticos relacionados à LMA incluem leucometria, existência prévia de SMD, uso de terapia citotóxica prévia e alterações citogenéticas e moleculares da célula leucêmica ao diagnóstico.

1.1.6.2.1 Citogenética

O cariótipo da célula leucêmica é o fator prognóstico mais forte para a resposta à terapia de indução e para a sobrevida.[63,64] Os pacientes adultos com diagnóstico de LMA são categorizados em 3 grupos de risco, de acordo com o cariótipo favorável, intermediário e adverso.[77-79]

A definição do grupo de risco para algumas alterações citogenéticas mais raras ainda não foi definida, devido ao pequeno número de pacientes e a não homogenização do tratamento entre os estudos. Da mesma forma, o impacto de alterações genéticas no caso de translocações balanceadas ou inversões também precisa ser estudado.

O cariótipo complexo, que está presente em 10 a 12% dos pacientes com diagnóstico de LMA, está associado a prognóstico ruim.[80] O cariótipo complexo tem sido definido pela presença de 3 ou mais alterações cromossômicas, na maioria dos estudos, na ausência de t(8;21), inv(16) ou t(16;16) e t(15;17), já que o cariótipo complexo nessas situações não parece influenciar o prognóstico de forma negativa. Na LMA com cariótipo complexo há predomínio das alterações cromossômicas não balanceadas. As perdas mais frequentes são do

17p e/ou da mutação do gene *TP53*,[81,82] ocorrendo em aproximadamente dois terços dos casos. Recentemente, uma nova categoria genética associada a risco desfavorável foi proposta, o cariótipo monossomal.[83]

O *European Leukemia Net* (ELN) propõe uma padronização entre a correlação citogenética e molecular com os dados clínicos[84,85] (Quadro 4).

Quadro 4 - Correlação dos dados clínicos, citogenéticos e moleculares na Leucemia mieloide aguda (LMA)

Grupo genético	
Favorável	t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1* inv(16)(p13;1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); *MLLT3-MLL* *NPM1* mutado sem *FLT3-ITD* ou *FLT3* mutado com baixa RTA *CEBPA* mutado de forma bialélica
Intermediário	*NPM1* mutado e *FLT3-ITD* mutado com alta RTA *NPM1* selvagem e *FLT3-ITD* mutado com baixa RTA *NPM1* selvagem sem *FLT3-ITD* t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL* Alterações citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas
Adverso	LMA com t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214* t(v;11)(v;q23); rearranjo *KMT2A* t(9;22)(q34.1:q11.2); *BCR-ABL1* LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2);*GATA2, MECOM* (*EVI1*) -5 ou del(5q); -7;abnl(17p); cariótipo complexo *RUNX1* mutado *ASXL1* mutado *TP53* mutado

Legenda: razão de taxa alélica (RTA).
Fonte: Döhner et al.[85]

1.1.6.2.2 Genética molecular

A identificação de mutação de genes e expressão genética desregulada permitiu decifrar, dentro de grupos citogenéticos definidos, a diversidade genética, particularmente no grupo de pacientes com LMA e com cariótipo normal (LMA-CN). Cerca de 40-50% dos casos de LMA de novo tem cariótipo normal,[76,77] e mesmo nesse grupo de pacientes o desfecho é heterogêneo. Os genes NMP1, *CEBPA*, *FLT3* e *c-kit* estão associados ao

prognóstico nesse grupo de pacientes com cariótipo normal.[86-88] As duas lesões moleculares mais frequentes em pacientes com LMA com impacto prognóstico são as mutações no gene *FLT3*, que codifica um receptor de tirosina quinase envolvido na hematopoiese (37-46% dos pacientes)[89] e mutações do gene *NPM1* (28-35% dos pacientes).

A mutação do gene *NPM1* tem sido associada a cariótipo normal em 48-53% dos casos de LMA.[85,90] A mutação isolada no gene *NPM1* confere uma alta taxa de resposta completa (RC), aumento da sobrevida livre de doença (SLD) e da sobrevida global (SG), desfechos semelhantes aos pacientes com LMA com citogenética favorável.

Duas classes de mutação ativa do gene *FLT3* foram identificadas em pacientes com LMA, e incluem os pontos de mutação em duplicação em tandem interna (*internal tandem duplication* (ITD)) e o domínio da tirosina quinase (*tyrosine kinase domain* (TKD)). A mutação *FLT3*-ITD acontece em 30% dos casos e é mais comum do que a mutação em *FLT3*-TKD, que ocorre em cerca de 10% dos pacientes.[91,92] Vários estudos tem demonstrado a influência prognóstica negativa do *FLT3*-ITD em pacientes com LMA resultando em um curto período de remissão e sobrevida reduzida, quando comparado com o gene selvagem.[93,94] Alguns estudos sugerem que o prognóstico parece estar mais relacionado com o nível do alelo mutado ou com o local de inserção do ITD, do que com a sua presença somente.[95,96] Apesar da presença da mutação *FLT3*-TKD estar sendo associada a pior prognóstico, em alguns estudos não é confirmado esse impacto prognóstico.[97] Alguns autores tem demonstrado que a mutação do *FLT3*-TKD pode acontecer num subgrupo de pacientes que também apresentam mutações nos genes *NPM1* ou *CEBPA*, que estão associados a prognóstico favorável. A mutação isolada do *FLT3*-TKD ou em associação com a t(15;17) ou com a mutação *FLT3*-ITD tem sido associada com prognóstico ruim.[85]

O gene *CEBPA* codifica uma proteína alfa ligadora que realça o CCAAT, um fator de transcrição que tem papel na diferenciação de granulócitos.[98] A mutação no gene *CEBPA* tem sido descrita em 7-11% dos pacientes com LMA (13-15% dos casos LMA-CN) e está associada a maior duração de remissão e SG quando comparada ao gene selvagem.[86,99-101] Porém, em um estudo, o benefício sobre a SG foi observado apenas para os pacientes com mutação dupla do *CEBPA*. A SG em 8 anos relatada nesse estudo para pacientes com a mutação dupla, mutação única e o gene selvagem foi de 54%, 31% e 34%, respectivamente.

Recentemente, outras lesões moleculares recorrentes com impacto prognóstico foram identificadas em pacientes com LMA. As mais comuns incluem mutações nos genes IDH1 e IDH2, que codificam isocitrato desidrogenase 1, e no gene *DNMT3A*, que codifica a DNA metiltransferase 3. As mutações em IDH1 têm sido reportadas em 6-9% dos casos de LMA

com uma maior frequência em paciente com LMA-CN (8-16%).[86,96,102-104] Essas mutações parecem ocorrer em conjunto tanto com LMA-CN como com mutações em *NPM1*, e também parecem estar associadas ao tipo selvagem dos genes *CEBPA* e *FLT3*.[58] As conclusões das publicações sobre o papel prognóstico das mutações no gene IDH1 tem sido inconsistentes. Embora alguns estudos mostrem ausência de influência prognóstica sobre a SG quando se avalia as mutações nos genes IDH, as mutações no gene IDH1 parecem estar associadas a pior prognóstico no subgrupo de pacientes com LMA-CN.[99-101] No subgrupo de pacientes com LMA e menos de 60 anos de idade, a mutação no gene *IDH1* foi associada à queda significativa na sobrevida livre de doença (SLD) em 8 anos quando comparada aos casos com o gene selvagem.

A mutação no gene DNMT3A tem sido reportada em 18-22% dos pacientes com LMA[105,106] com uma frequência de 29-34% nos pacientes com LMA-CN. Os dados sobre o seu papel prognóstico têm sido conflitantes. Em alguns estudos na população geral de LMA e em pacientes com risco intermediário não foi evidenciado efeito sobre a sobrevida,[86,107] enquanto que em outros estudos foi demonstrado impacto prognóstico negativo nessas mesmas populações.[108,109] A redução significativa da SG na presença da mutação no gene DNMT3A também tem sido descrita em um subgrupo de pacientes com LMA-CN de risco intermediário, mas não nos grupos de baixo risco.[103] Em estudo foi demonstrado que, em pacientes jovens com LMA-CN, a presença da mutação no gene *DNMT3A* estava associada à redução da SG quando comparado à pacientes com o gene selvagem.[66] Os autores têm concluído que a relevância prognóstica da mutação depende da idade do paciente e do tipo de mutação. Atualmente, a interação dos genes *IDH1* e 2 e do gene *DNMT3A* com outras alterações moleculares necessita ser determinada. Outros genes candidatos à avaliação prognóstica são o *TET2* e o *RUNX1*.

Como visto nas discussões anteriores, pacientes com LMA-CN podem apresentar múltiplas lesões moleculares. As mutações no gene *NPM1* podem ocorrer simultaneamente com mutações em *FLT3-ITD*, e pacientes que tem as duas alterações genéticas tem um desfecho mais semelhante ao de pacientes com a mutações isolada do *FLT3-ITD*.[87] Dessa forma, a mutação no gene *NPM1* confere melhor prognóstico apenas na ausência da mutação *FLT3-ITD*. Da mesma forma, o benefício na SG observado nos casos da mutação no gene *CEBPA* parece ser perdido na presença da mutação no *FLT3-ITD*.[110] Como mencionado previamente, *FLT3-TKD*, na presença do *FLT3-ITD* ou da translocação (15;17) parece estar associado a pior prognóstico. Em contraste, a mutação *FLT3-TKD* pode estar associada com prognóstico favorável na presença de mutações nos genes *NPM1* e *CEBPA*.[111]

Em pacientes com risco favorável, a presença da mutação c-kit aumenta o risco de recaída.[112,113] A mutação em *c-kit* também tem sido relatada em 20% dos pacientes com LMA do tipo *core binding factor* (CBF).[110]

Tem sido demonstrado que a mutação *c-kit* está associada à menor duração de remissão e menor SG. Os pacientes com LMA com translocação (8;21) ou inversão (16) ou translocação (16;16) com a presença da mutação *c-kit* são categorizados como tendo LMA com risco intermediário.

Existe uma lista crescente de alterações genéticas que vem sendo investigadas. Essas alterações genéticas incluem além das mutações descritas anteriormente mutações em *WT1*[114-117], *RUNX1*[118,119], *TET2*[120,121], análise de assinaturas de expressão gênica[122,123] ou expressão desrregulada de genes únicos como *EV11*, *ERG*[124], *MN1*[125,126] e *BAALC*[127].

1.2 **LMA familiar**

A revisão da classificação da OMS de 2016 introduziu uma sessão de neoplasias mieloides com predisposição germinativa, que inclui casos de SMD, SMD/Neoplasia mieloproliferativa (NMP) e LMA que ocorrem no contexto da presença de uma mutação germinativa. A presença da mutação específica ou da síndrome de predisposição deve ser parte do diagnóstico[5] (Quadro 5).

A mutação germinativa ocorre durante a replicação do DNA que precede a meiose. A mutação afeta os gametas e todas as células que deles descendem após a fecundação sendo transmitida à descendência.

Quadro 5 - Classificação das neoplasias mieloides com predisposição germinativa

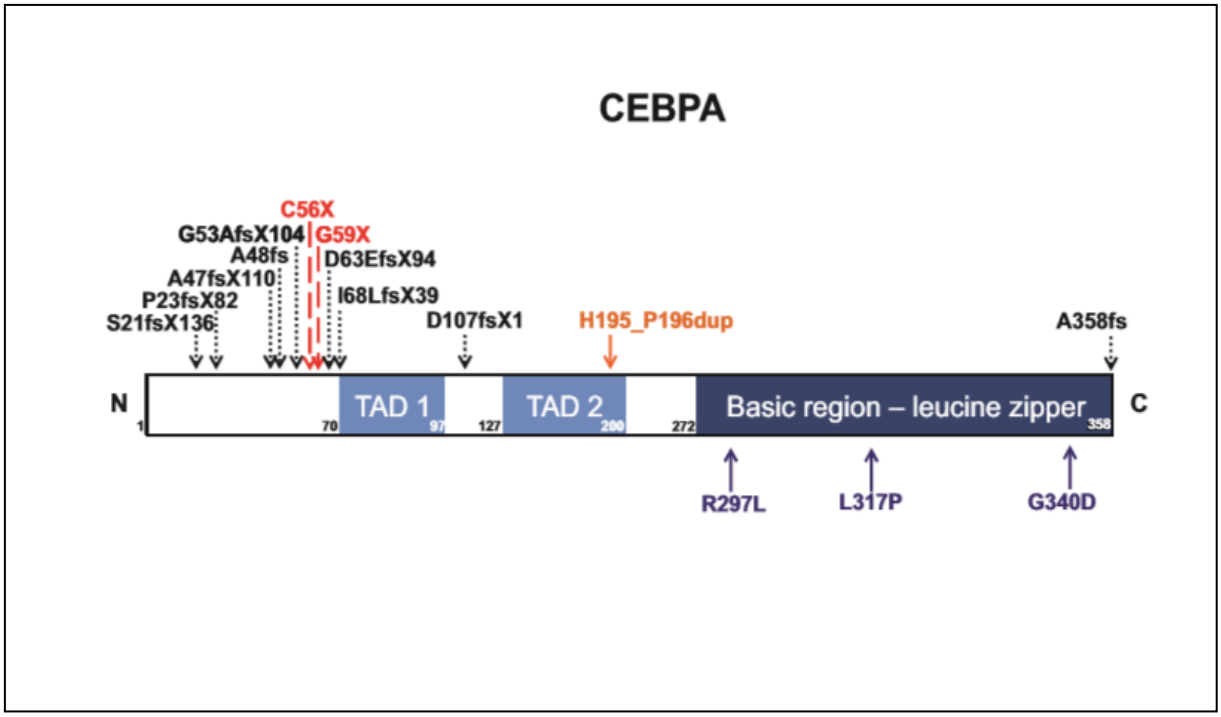
Neoplasia mieloide com predisposição germinativa e ausência de desordem plaquetária ou orgânica prévias
Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *CEBPA*
Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *DDX41*
Neoplasia mieloide com mutação germinativa e desordem plaquetária preexistente
Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *RUNX1*
Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *ANKRD26*
Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *ETV6*
Neoplasia mieloide com mutação germinativa e disfunção de outro órgão
Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *GATA2*
Neoplasia mieloide com mutação germinativa e falência medular
Neoplasia mieloide com mutação germinativa com desordem da biologia do telômero
LMMJ associada à neurofibromatose, Síndrome de Noonan ou Síndromes semelhantes a de Noonan
Neoplasia mieloide associada à Síndrome de Down

Fonte: Arber et al.[5]

1.2.1 Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *CEBPA*

O fator de transcrição CCAAT / proteína de ligação do intensificador-A (*CEBPA*) é alocado em 19q13.1 (Figura 1). Este gene não possui introns e desempenha um papel essencial na mediação da diferenciação granulocítica e do crescimento celular. A LMA familiar com *CEBPA* mutado é uma condição hereditária autossômica dominante com penetrância completa ou quase completa.[128] Não foram descritas correlações específicas de genótipo-fenótipo, e a maioria dos casos apresenta um cariótipo normal. A idade do início da leucemia é variável, variando de 2 a 59 anos. Por outro lado, as mutações somáticas de *CEBPA* também ocorrem em 10% a 15% dos casos de LMA-CN esporádicos, onde a presença de mutações bialélicas (*CEBPA*) é considerada uma entidade molecular única associada a um resultado clínico favorável. O teste de mutação *CEBPA* está atualmente incorporado no diagnóstico de rotina.[129]

Figura 1 - Proteína esquemática do *CEBPA* (NP_004355.2)



Nota: Mutações do tipo *missense, nonsense, frameshift*, duplicações e deleções que conferem uma predisposição familiar às leucemias hereditárias. As mutações tipo *missense* estão em azul, mutações *nonsense* estão em vermelho, mutações *frameshit* em preto, duplicações em laranja e deleções em verde.[4]
Fonte: Nickels et al. [4]

A identificação da origem germinativa das mutações em *CEBPA* é recomendável para discriminação entre casos esporádicos e familiares. O histórico familiar é útil porque as diferenças no tipo ou localização entre as mutações somáticas e germinativas são atualmente desconhecidas. O diagnóstico é desafiador, uma vez que a LMA é o principal recurso clínico sem qualquer anomalia hematológica ou física anterior, e a história familiar pode ser a principal informação para o diagnóstico. Embora todos os pacientes até agora tenham relato de um parente afetado, mutações de novo em um *proband* ou morte precoce de familiares por causas não relacionadas ao desenvolvimento de LMA podem prejudicar um diagnóstico preciso. O manejo da LMA familiar com *CEBPA* mutado pode incluir o transplante alogênico de células-tronco como a única maneira de substituir o alelo mutado na medula óssea, desde que essa mutação esteja ausente no doador relacionado.[130]

O aconselhamento genético é essencial para gerenciar esses casos porque a penetrância está quase completa. As implicações do risco de leucemia para membros adicionais da família fazem com que o reconhecimento da LMA familiar com *CEBPA* mutante seja importante.[131]

1.2.2 Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *DDX41*

O gene da helicase DEAD / H-box (*DDX41*), alocado em 5q35.3, contém 17 exons e codifica uma proteína de helicase de RNA aparentemente envolvida no *splicing* do RNA. O papel desse gene na hematopoiese e leucemogênese permanece desconhecido. Assim como a prevalência, a penetrância e o prognóstico das mutações em *DDX41* não são claras. No entanto, mutações em *DDX41* foram identificadas em 1,5% dos pacientes com neoplasia mieloide em uma coorte de mil pacientes. Cinquenta por cento das mutações *DDX41* foram germinativas sugerindo que uma análise da linha germinal deve ser considerada nestes casos.[132]

A LMA com mutação germinativa em *DDX41* exibe um padrão autossômico dominante e uma longa latência.[133] Além da história familiar, não há sinais clínicos anteriores ou sintomas sugerindo aumento do risco de malignidade hematológica. A maioria dos casos familiares anteriormente identificados com leucemia apresentam mutação tipo *DDX41* c.415_418dupGATG (p.D140Gfs * 2), embora as variantes de separação e de emenda também tenham sido descritas. Cinquenta por cento dos portadores da mutação que desenvolvem SMD ou LMA apresentam mutação no outro alelo *DDX41*, sugerindo que *DDX41* é um gene supressor.[134] O *DDX41* pode desempenhar um papel na patogênese de neoplasias mieloides com del (5q), uma vez que algumas dessas deleções incluem locus *DDX41*, levando a haploinsuficiência. Os defeitos no gene *DDX41* nos casos com del (5q) foram associados a doença avançada e à capacidade de resposta à lenalidomida, uma opção terapêutica para a doença.[135] A sobrevida global parece ser inferior na presença de mutações *DDX41*.

Infelizmente, a vigilância de indivíduos não afetados na população em geral não é possível. No entanto, um hemograma e uma biópsia da medula óssea com análise citogenética podem ser recomendados em intervalos regulares para familiares com mutações em *DDX41* conhecidas ou deleções, e outras síndromes de predisposição.[5]

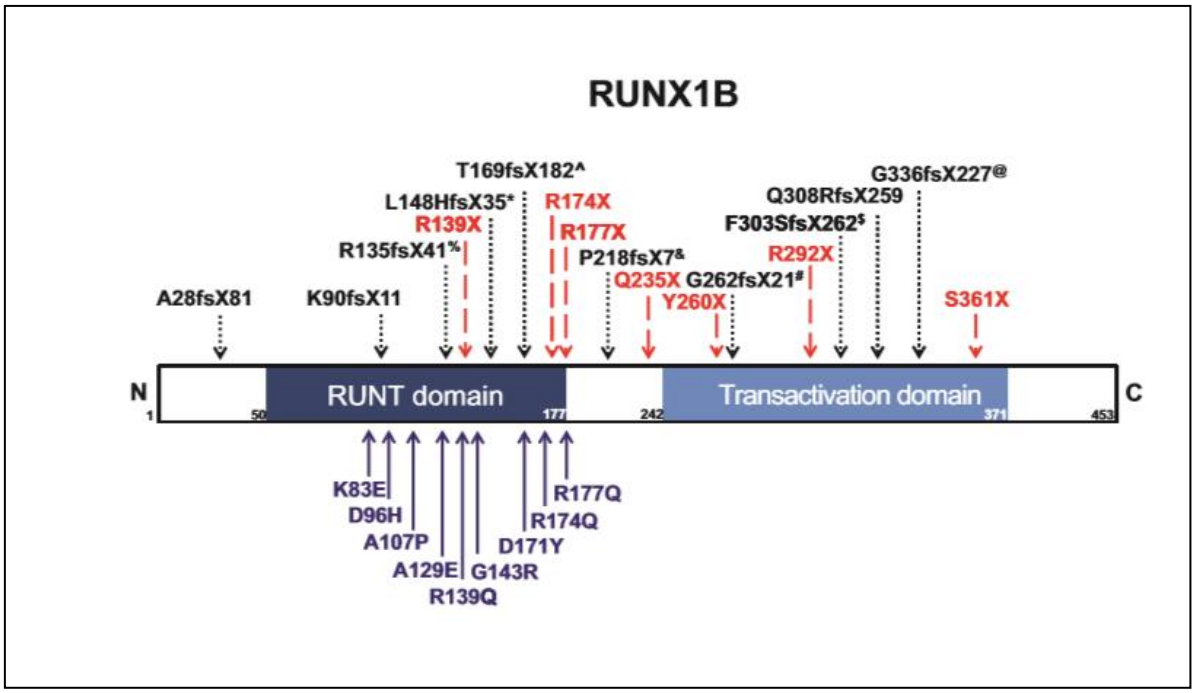
1.2.3 Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *RUNX1*

O fator de transcrição 1 relacionado à derivação (*RUNX1*) é um gene codificador de proteínas localizado no cromossomo 21q22.12 e contém nove exons. Ele codifica a subunidade de ligação ao DNA do núcleo ao complexo de transcrição do fator de ligação (CBF) que é essencial para a hematopoiese normal[136] (Figuras 2 e 3, a seguir). As neoplasias mieloides com mutações germinativa em *RUNX1* são consequências de mutações monoalélicas que ocorrem ao longo deste gene, incluindo *missense*, *frameshift*, inserções e deleções.[137]

Os portadores de mutações monoalélicas em *RUNX1* apresentam manifestações clínicas heterogêneas como trombocitopenia moderada, hemorragia ou neoplasia mieloide com frequente fenômeno de antecipação, que se caracteriza pelo diagnóstico da doença hereditária cada vez mais cedo nas gerações mais novas.[138]

O manejo de pacientes com neoplasias mieloides e mutação greminativa em *RUNX1* depende da apresentação clínica. No caso de LMA, a presença da mutação germinativa requer o *TCTH* alo como terapia de consolidação desde que a mutação seja exclúida no caso de doadores relacionados. O manejo de portadores assintomáticos da mutação em *RUNX1* é difícil porque não existem diretrizes disponíveis atualmente para esta condição.[7] Considerando que as neoplasias mieloides com mutação germinativa apresentam forte antecipação, o acompanhamento próximo dos familiares mais jovens é necessário. Um hemograma anual e uma biópsia da medula óssea no caso de alterações significativas no sangue periférico é o aconselhável.[7] Finalmente, como as mutações *RUNX1* são encontradas em 32% da LMA esporádica,[139,140] estudos são necessários para esclarecimento da leucemogênese em familiares com distúrbos plaquetários.

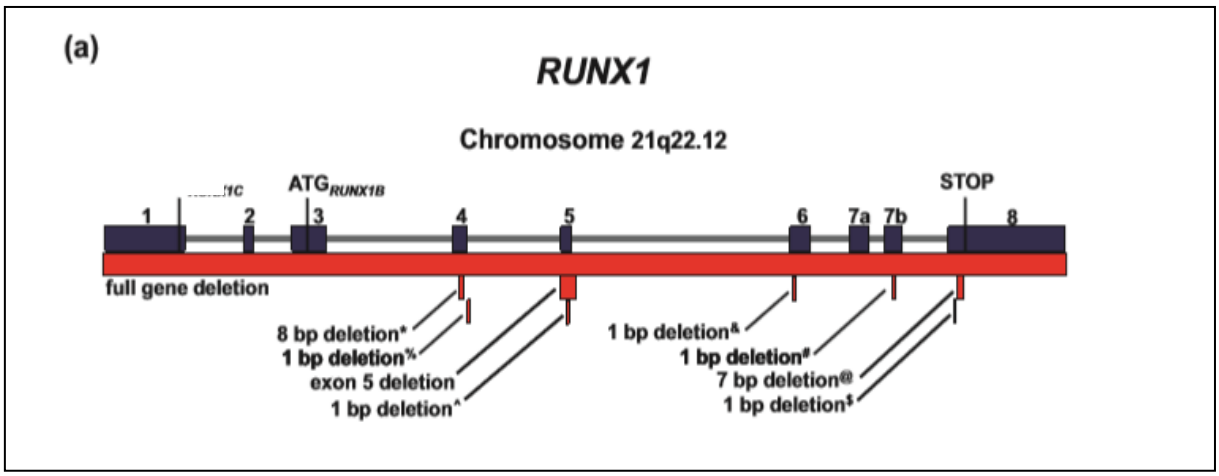
Figura 2 - Proteína esquemática da isoforma B (NP_001001890.1) de *RUNX1*



Nota: Mutações do tipo *missense, nonsense, frameshift*, duplicações e deleções que conferem uma predisposição familiar às leucemias hereditárias. As mutações tipo *missense* estão em azul, mutações *nonsense* estão em vermelho, mutações *frameshit* em preto, duplicações em laranja e deleções em verde.[4]

Fonte: Nickels et al. [4]

Figura 3 - Estrutura genômica de *RUNX1* demonstrando locais da doença causando deleções



Nota: ATG1, o primeiro codon inicial correspondendo a isoforma C inteira de *RUNX1* (NP_001116079.1) e ATG2, o segundo codon inicial, corresponde a isoforma B de *RUNX1* (NP_001001890.1);
Mutações do tipo *missense, nonsense, frameshift*, duplicações e deleções que conferem uma predisposição familiar às leucemias hereditárias. As mutações tipo *missense* estão em azul, mutações *nonsense* estão em vermelho, mutações *frameshit* em preto, duplicações em laranja e deleções em verde.[4]

Fonte: Nickels et al. [4]

1.2.4 Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *ANKRD26*

O gene da proteína 26 que contém o domínio Ankyrin repetido (*ANKRD26*) está localizado no cromossomo 10p12.1 e contém 34 exons. As mutações que afetam esse gene interferem nos mecanismos de controle da expressão do gene *ANKRD26*, impactando na produção de megacariócitos.[141] Em nove de 20 famílias estudadas com trombocitopenia não-sindrômica autossômica dominante (THC2), seis mutações diferentes foram localizadas na região 5` deste gene.[142] A incidência global de neoplasias hematológicas foi de 240 / 100.000, sendo a incidência de leucemia aguda de 167 / 100.000, ambas acima das incidências esperadas. A THC2 caracterizou-se por disfunção plaquetária. A trombocitopenia é moderada, o volume médio de plaquetas é normal com a presença de defeito de agregação e a medula óssea apresenta dismegacariopoiese.[143] Até o momento, a presença de casos familiares de trombocitopenia e predisposição a neoplasias malignas mieloides são os marcos para o diagnóstico de mutações em *ANKRD26.*[144]

As mutações em *RUNX1* ou *ANKRD26* devem ser suspeitadas em pacientes com trombocitopenia com história familiar de sangramento e / ou SMD / LMA. Se a presença das mutações é confirmada, os pacientes e os membros da família devem ser encaminhados para aconselhamento genético e avaliação do risco de desenvolvimento de neoplasias malignas mieloides.[7]

1.2.5 Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *ETV6*

O gene variante ETS (*ETV6*), localizado no cromossomo 12p13.2, contém 8 exons e é essencial no desenvolvimento do embrião e na regulação hematopoética.[145] As mutações em *ETV6* também desempenham um papel nas doenças malignas hematológicas.[146,147]

A síndrome hereditária de trombocitopenia com tamanho normal de plaquetas tem susceptibilidade ao desenvolvimento de diversas malignidades hematológicas. Essa síndorme é transmitida como uma característica dominante.[148] Os pacientes podem apresentar hemorragia e trombocitopenia e muitas vezes são diagnosticados com trombocitopenia imune.[149]

Três mutações foram identificadas em *ETV6*: p.A369G e p.A399C, no ETS altamente conservado, e p.Pro214L, afetando a ligação ao DNA. Essas mutações conferem perda da ligação do DNA, alteraram a localização subcelular e diminuem a supressão de transcrição em um padrão dominante negativo, prejudicando a hematopoiese. Mais recentemente, foram descritas cinco variantes possivelmente patogênicas: p.I358M, p.A377T, p.R396G, p.Y401N e p.Y401H.[150]

As mutações em *ETV6*, assim como as mutações *RUNX1* e *ANKRD26*, devem ser suspeitadas entre pacientes com trombocitopenia com história familiar de sangramento e / ou malignidades hematológicas.[151] Se a presença das mutações for confirmada, o paciente e os membros da família devem ser encaminhados para aconselhamento genético. No entanto, até agora, não há dados suficientes na literatura para sugerir diretrizes de tratamento padronizadas para esses pacientes e suas famílias.

1.2.6 Neoplasia mieloide com mutação germinativa em *GATA2*

O gene de ligação da proteina *GATA*-2 (*GATA2*), localizado no cromossomo 3q21.3, contém 7 exons e codifica a família de fatores de transcrição *GATA*, que é essencial na hematopoiese normal[152.153] (Figuras 4 e 5, a seguir).

Nas famílias afetadas, as mutações em *GATA2* foram transmitidas de forma autossômica dominates com início precoce do desenvolvimento de SMD ou LMA. O início em idade precoce foi relatado em pacientes com apresentações sindrômicas.[154] Várias famílias com mutações em *GATA2* não apresentavam qualquer anomalia fenotípica ou citogenética distinta.

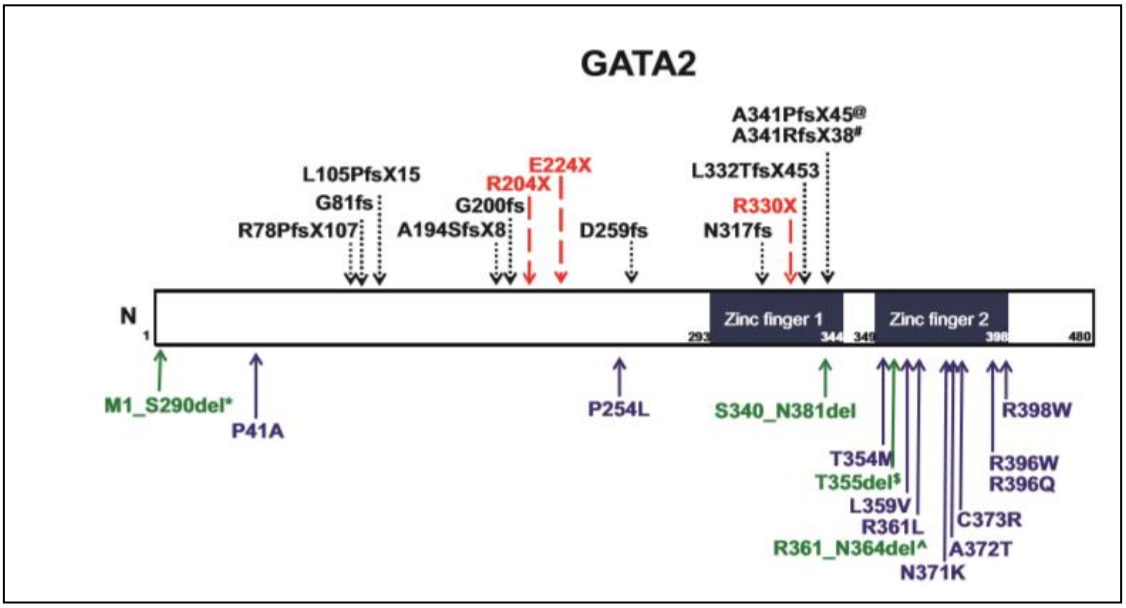
Algumas síndromes clínicas, como Emberger, MonoMAC, neutropenia congênita e deficiência de células dendríticas, monócitos e linfócitos (DCML) estão associadas a mutações germinativas em *GATA2*.[155] A síndrome de Emberger está relacionada à predisposição para SMD/LA e a presença de manifestações sistêmicas, como o linfedema primário confinado a extremidades inferiores e genitais, linfopenia com baixa razão de contagem de CD4 / CD8, verrugas cutâneas e surdez neurossensorial. A síndrome de Emberger também parece estar associada a oito variantes *GATA2* independentes.[156] A síndrome de MonoMAC esta associada à predisposição a SMD/LMA e defeitos imunológicos

como imunodeficiência, monocitopenia, células natural *killer*, deficiências de linfócitos B e macrófagos, que levam a predisposição a infecções atípicas e proteinose alveolar pulmonar.[157]

A análise de *pedigree* de algumas familias mostrou quatro mutações *GATA2* diferentes: duas na LMA familiar (p.T354M e p.T355del, ambos nos segundos domínios do zinco-dedo),[158] e outros dois em LMA de novo (p.R308P e p.A350N351ins8).

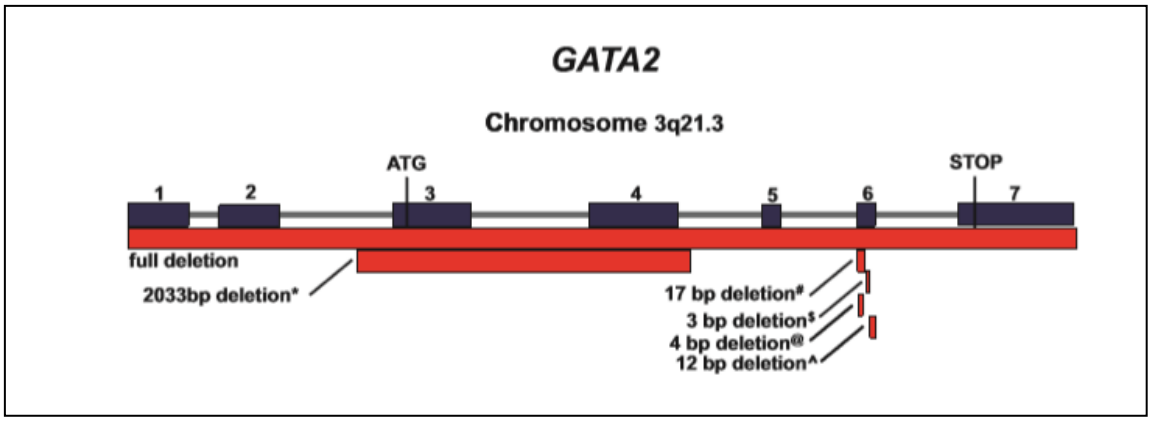
A transformação para MDS / LMA ocorre rapidamente, conferindo um prognóstico adverso, parecendo o TCTH alo o tratamento mais adequado.[159]

Figura 4 - Proteína esquemática de *GATA2* (NP_116027.2)



Nota: Mutações do tipo *missense, nonsense, frameshift*, duplicações e deleções que conferem uma predisposição familiar às leucemias hereditárias. As mutações tipo *missense* estão em azul, mutações *nonsense* estão em vermelho, mutações *frameshit* em preto, duplicações em laranja e deleções em verde.[4]
Fonte: Nickels et al. [4]

Figura 5 - Estrutura genômica de *GATA2* demonstrando locais de deleção



Nota: Mutações do tipo *missense, nonsense, frameshift*, duplicações e deleções que conferem uma predisposição familiar às leucemias hereditárias. As mutações tipo *missense* estão em azul, mutações *nonsense* estão em vermelho, mutações *frameshit* em preto, duplicações em laranja e deleções em verde.[4]
Fonte: Nickels et al. [4]

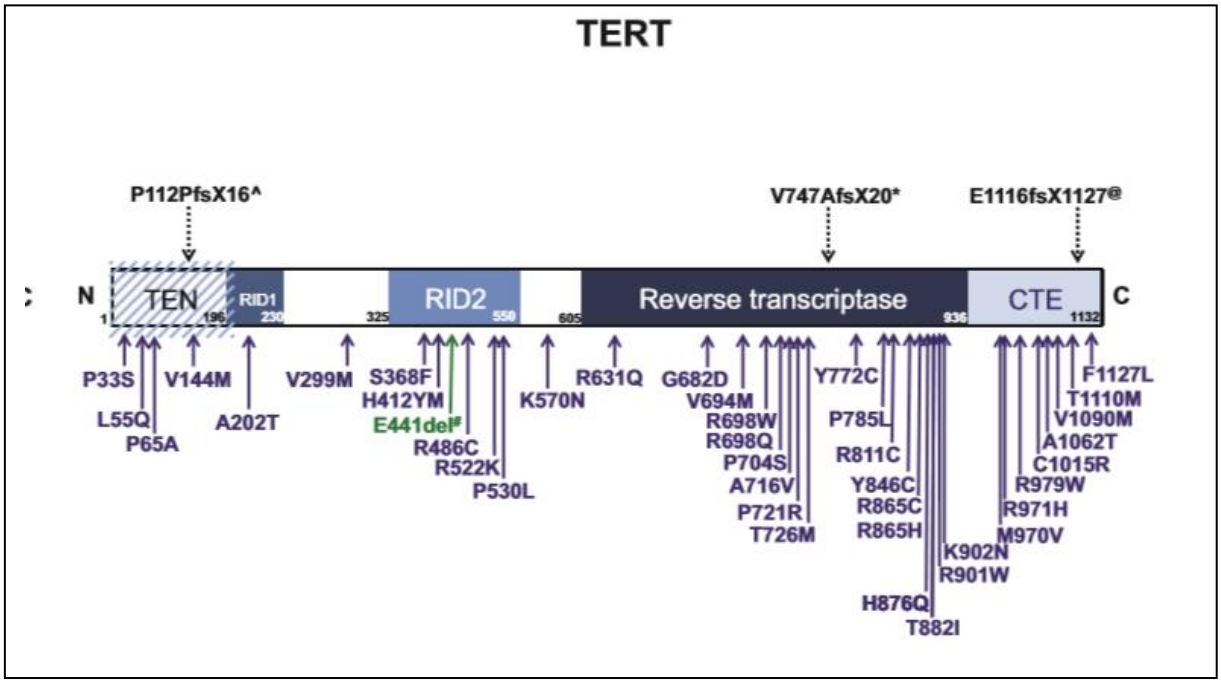
1.2.7 Neoplasias mieloides associadas a distúrbios da biologia dos telômeros

As malignidades associadas aos distúrbios da biologia dos telômeros resultam de mutações em nove diferentes genes que induzem uma manutenção anormal dos telômeros levando a instabilidade cromossômica e apoptose.[159] A disceratose congênita (DC), uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, é caracterizada por distrofia ungueal, pele reticular com pigmentação normal e leucoplasia oral.[160,161] A apresentação clínica pode variar, resultando em pacientes com defeitos constitucionais, enquanto o câncer e a predisposição a SMD são distintos.

O aumento excessivo do telômero no cromossomo Xq28, onde o gene DKC1 (Dyskerin) é localizado, leva à instabilidade genética e alto risco de câncer.[162,163] Uma alta frequência de neoplasias hematológicas é observada na DC. Existe um aumento no risco de desenvolvimento de LMA em relação à população normal em torno de 200 vezes, e para SMD em torno de 2500 vezes, motivo pelo qual os pacientes afetados devem ser devidamente identificados.[164] As mutações deletérias que afetam *TERT* (Telomerase 250 transcriptase reversa), um gene em 5p15.33, ou *TERC* (componente de ARN de Telomerase), um gene em 3q26.2, são transmitidos como traços autossômicos dominantes com fenótipos heterogêneos e penetração incompleta (Figuras 6, 7 e 8, a seguir).[165] Os fenótipos variam de normal a graves neoplasias hematológicas, com idade variável no início e fenômeno de antecipação.[166] Esse fato não deve ser ignorado uma vez que as crianças que herdam mutações *TERT* / *TERC* podem apresentar anteriormente manifestações clínicas, embora os pais que carregam as mesmas mutações não.

A apresentação clínica pode incluir fibrose pulmonar idiopática isolada, cirrose hepática, câncer anogenital precoce ou câncer de cabeça e pescoço, e combinações destas características. A frequência dessas manifestações associadas ainda é desconhecida.

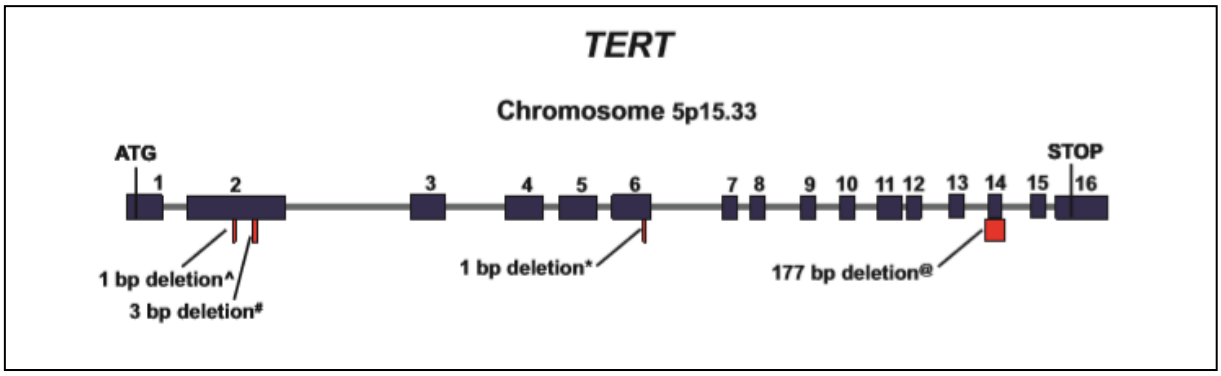
Figura 6 - Proteína esquemática de *TERT* (NP_937983.2)



Nota: Mutações do tipo *missense, nonsense, frameshift*, duplicações e deleções que conferem uma predisposição familiar às leucemias hereditárias. As mutações tipo *missense* estão em azul, mutações *nonsense* estão em vermelho, mutações *frameshit* em preto, duplicações em laranja e deleções em verde.[4]

Fonte: Nickels et al. [4]

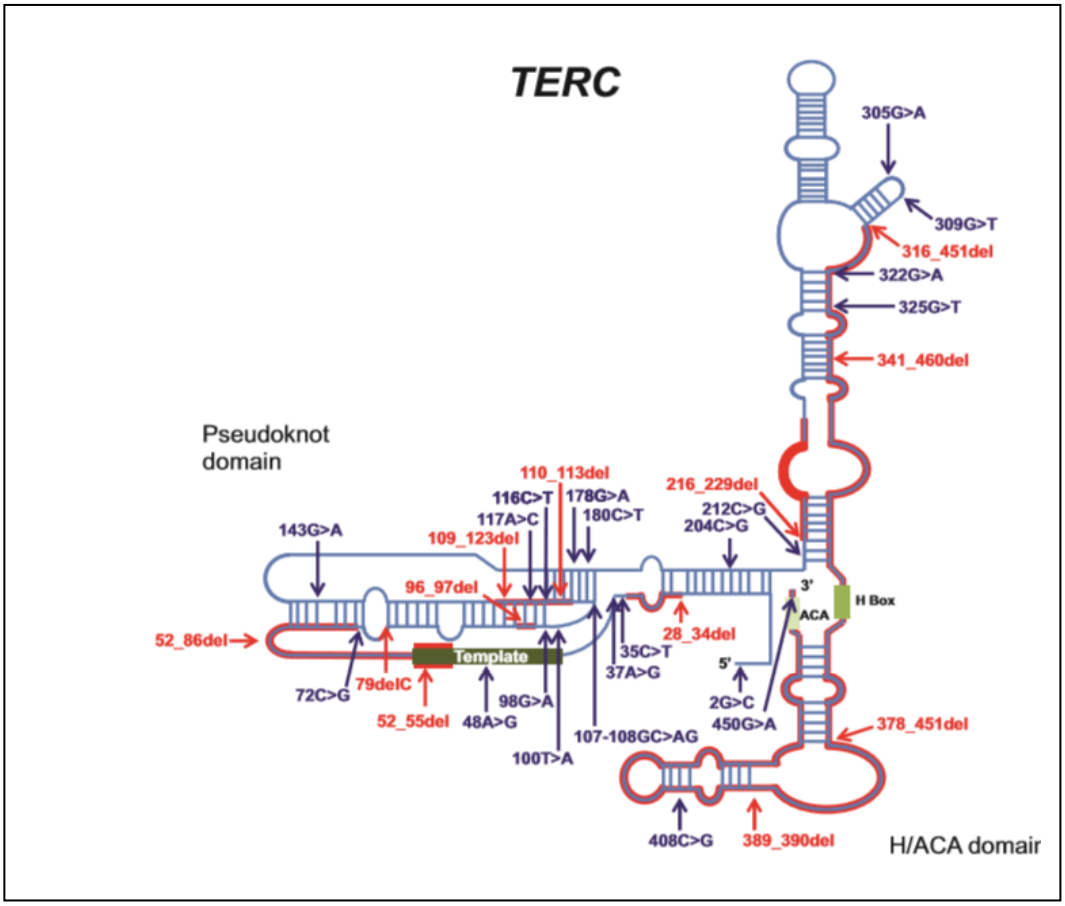
Figura 7 - Estrutura genômica de *TERT* demonstrando locais de deleção



Nota: Mutações do tipo *missense, nonsense, frameshift*, duplicações e deleções que conferem uma predisposição familiar às leucemias hereditárias. As mutações tipo *missense* estão em azul, mutações *nonsense* estão em vermelho, mutações *frameshit* em preto, duplicações em laranja e deleções em verde.[4]

Fonte: Nickels et al. [4]

Figura 8 - Estrutura preditiva do RNA secundário de *TERC* RNA (NR_001566.1)



Nota: Mutações do tipo *missense*, *nonsense*, *frameshift*, duplicações e deleções que conferem uma predisposição familiar às leucemias hereditárias. As mutações tipo *missense* estão em azul, mutações *nonsense* estão em vermelho, mutações *frameshit* em preto, duplicações em laranja e deleções em verde.[4]

Fonte: Nickels et al. [4]

1.2.8 Leucemia mielomonocítica crônica juvenil (LMMCJ) associada à neurofibromatose, Síndrome de Noonan ou transtornos semelhantes a Síndrome de Noonan

A maioria dos casos de LMMCJ está associada a mutações somáticas nos componentes do caminho de transdução de sinal RAS / MAPK.[167] A minoria dos casos surge em crianças pequenas com síndrome de Noonan, uma doença genética com aumento da sinalização RAS / MAPK. Cinquenta por cento dos pacientes com síndrome de Noonan e 35% dos casos de LMMCJ carregam mutações de ganho de função em PTPN11 (Proteína-tirosina fosfatase, tipo não-receptor, 11), alterando SHP-2, uma tirosina fosfatase envolvida na regulação da via RAS / MAPK.[168]

Na síndrome de Noonan, a LMMCJ pode ocorrer devido a mutações germinativas no gene *PTPN1*. Nesses casos, a apresentação clínica é semelhante aos casos que apresentam mutação somática, embora o prognóstico seja melhor. As mutações nos genes *PTPN11*, *RAS*, *NF1* e *CBL* são exclusivas da LMMCJ indicando que um evento no caminho RAS / MAPK é suficiente para leucemogênese.[169]

Aproximadamente 10 a 15% dos casos de LMMCJ ocorrem em associação com neurofibromatose tipo I, doença resultante de mutações no gene neurofibromatose tipo I (NF1), que codifica a neurofibromina. A neurofibromina é uma molécula que regula vários processos intracelulares, como a via RAS-MAPK.[170] A neurofibromatose tipo I é um distúrbio autossômico dominante com uma apresentação clínica que inclui manchas café com leite, nódulos oculares de Lisch e tumores fibróticos na pele. O desenvolvimento de tumores benignos e malignos é alto nesses indivíduos.

As mutações germinativas que afetam o gene *CBL* (Protocogênio do Linfoma Casita-B-Lineage), localizado no cromossomo 11q23.3, podem resultar em fenômenos variáveis semelhantes à síndrome de Noonan (OMIM # 613563). Nesses pacientes, a presença de características neurológicas é relativamente alta, baixa prevalência de anormalidades cardíacas, crescimento reduzido e criptorquidismo, além da predisposição à LMMCJ.[171] Finalmente, as mutações germinativas que afetam *SHOC2* (supressor de clara homólogo), um gene localizado no cromossomo 10q25.2, geralmente resultam na síndrome de Noonan - com fenótipo clássíco (OMIM # 607721) e LMMCJ em uma pequena proporção dos pacientes. Uma mutação SHOC2 recorrente de falhas (4A> G) foi identificada em um subgrupo com deficiência de hormônio do crescimento, comportamento hiperativo, anomalias do cabelo, pele pigmentada escuro com eczema ou ictiose, fala hipernasal e displasia valvar mitral.

1.2.9 Neoplasias mieloides associadas à síndrome de Down

A Síndrome de Down está associada a com mielopoiese anormal transitória (MAT-SD) e com a leucemia mieloide aguda (LMA-SD). O gene GATA de proteína 1 de ligação (*GATA1*), localizado no cromossomo Xp11.23, codifica um fator de transcrição de ligação ao DNA que é crítico para o desenvolvimento normal de células hematopoiéticas. As mutações em *GATA1* são uma característica da MAT-SD e da LMA-SD.[172] Todas as mutações *GATA1* estão no exon 2 (ou raramente exon 3).[173] A MAT-SD e LMA-SD estão associadas a

trissomia constitucional do cromossomo 21, embora alguns pacientes tenham mostrado mosaicismo para a trissomia do 21. A falta de um fenótipo típico de Síndrome de Down não pode, portanto, excluir o diagnóstico de MAT-SD.

A MAT-SD é clinicamente e morfologicamente indistinguível da LMA, com morfologia e características imunológicas da LMA megacariocítica. Cerca de 10% dos recém-nascidos com Síndrome de Down apresentam MAT-SD, sendo essa entidade menos comum na trisomia do cromossomo 21 fenotipicamente normal.[174] A MAT-SD apresenta uma apresentação clínica heterogênea e a maioria dos pacientes é assintomática. Esta é a razão pela qual é incidentalmente diagnosticada através de um hemograma que evidencia trombocitopenia ou trombocitose, leucositose, e eritroblastos. A hepatomegalia é uma manifestação comum, enquanto que as manifestações severas como hidropsia fetal, insuficiência hepática, icterícia, defeitos de coagulação, diátese hemorrágica, insuficiência cardíaca, derrames pleurais, ascite, e / ou insuficiência respiratória são mais raras. Os sintomas podem aparecer no início das primeiras três semanas de vida, apresentando remissão espontânea nos primeiros três meses de vida na maioria dos casos.[175] A MAT-SD é frequentemente precedida por uma fase semelhante a SMD que pode durar meses, caracterizada por trombocitopenia, eritropoiese ineficaz com anemia subsequente e alterações displásicas na medula óssea. Embora as mutações em *GATA1* e a trissomia do 21 possam ser responsáveis pelo desenvolvimento da MAT-SD, alterações genéticas adicionais parecem ser necessárias para o seu desenvolvimento. Essas alterações incluem trissomia do cromossomo 8, deleções parciais ou completas do cromossomo 5 e 7, dup (1q), del (16q)[176] e mutações somáticas em *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*[81], *TP53*[82], *FLT3* e *MPL* em alguns poucos casos.

Os indivíduos com SD apresentam um aumento de 50 vezes na incidência de leucemia aguda durante os primeiros cinco anos de vida em comparação com indivíduos que não apresentam SD. A grande maioria das crianças com LMA-SD têm menos de cinco anos de idade[83] e cerca de 20 a 30% delas tiveram o diagnóstico prévio de MAT-SD 1 a 3 anos antes. A LMA se apresenta como uma leucemia megacariótica aguda em 50% dos casos.

A apresentação inicial pode ser indolente com um período anterior com trombocitopenia. O prognóstico da LMA para lactentes com SD é mais favorável do que para lactentes sem a síndrome. O tratamento com os protocolos de quimioterapia atuais é associado a taxas de sobrevida livre de doença de cerca de 80%. Apesar da excelente resposta à terapia, a mortalidade resultante da toxicidade continua a ser um problema, ocorrendo em aproximadamente 7% dos casos. Existem diferentes assinaturas de expressão de genes entre a LMA-SD e a LMA não associada à SD.[177] Essas diferenças não podem ser atribuídas apenas

a presença da trissomia do cromossomo 21 e à expressão de c-Kit, c-MYC e *GATA2* parecem estar encolvidas, indicando que esses malignidades são entidades diferentes.[77]

Devido à recente descoberta dessas síndromes familiares, as suas reais incidências não são conhecidas. Algumas observações sugerem que elas devam ser subapreciadas. Uma delas é que uma história familiar detalhada muitas vezes não é colhida pelo médico, a outra é que mesmo em pequenos relatos de casos usando a definição de SMD familiar como mais de um caso em parentes de primeiro grau, a incidência dessas síndromes tem sido alta. Por exemplo, Owen et al.[2] examinaram 10 casos de SMD/LA familiar e acharam mutações germinativas em *RUNX1* em 50% dos casos.

O reconhecimento de um indivíduo com SMD/LA familiar deve ser iniciado com uma história pessoal e familiar bem detalhada e determinados achados clínicos devem ser considerados alertas para uma avaliação especializada, conforme Quadro 6.

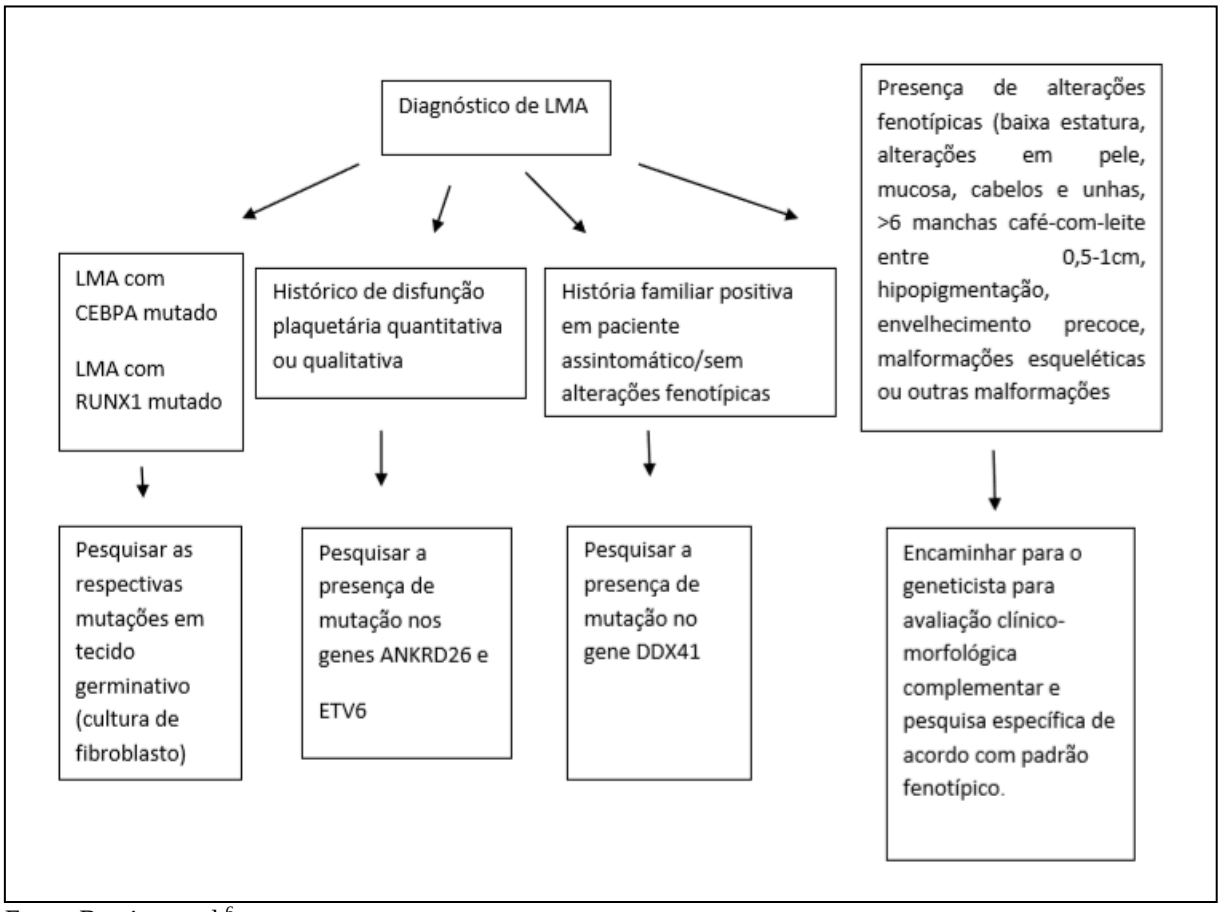
Quadro 6 - Recomendações para a detecção clínica da Leucemia mieloide aguda (LMA) familiar

1) Qualquer paciente com LMA que tenha familiares de primeiro ou segundo grau com qualquer uma das patologias a seguir: diagnóstico de SMD, LMA ou LLA, trombocitopenia, história clínica de sangramento, alterações de pele e unhas, leucoplasia oral, fibrose pulmonar idiopática, doença hepática inexplicada, linfedema, infecção atípica, imunodeficiência ou anomalias congênitas de membros.
2) Qualquer paciente com uma neoplasia hematológico diagnosticada em idade jovem (<45 anos) com: um parente de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (< 45 anos) ou múltiplos parentes de primeiro ou segundo grau com câncer (especialmente sarcoma, câncer de mama com menos de 50 anos, e tumor cerebral).
3) Qualquer doador de medula óssea aparentado que apresenta trombocitopenia, tendência a sangramento, macrocitose, alterações de pigmentação de pele e fâneros, leucoplasia oral ou falha de mobilização de células tronco com protocolos usuais.

Legenda: Síndrome mielodisplásica (SDM); Leuemia linfoblástica aguda (LLA).
Fonte: Owen et al.[2]

Como a LMA familiar é uma entidade nova, só introduzida na classificação das neoplasias mieloide da OMS em 2016, os *guidelines* estão sendo montados. Em 2017, o nosso grupo publicou um artigo de revisão aonde sugere um organograma para facilitar o hematologista clínico que está à beira do leito para diagnosticar os casos de LMA familiar (Figura 9).

Figura 9 - Guideline para a detecção clínica das síndromes de predisposição a Leucemia mieloide aguda (LMA) familiar



Fonte: Baptista et al.[6]

A LMA familiar provavelmente é uma entidade subdiagnosticada por se tratar de uma entidade nova e pela complexidade inicial do tema que dificulta o raciocínio do clínico hematologista que está à frente do manejo do paciente. Esse trabalho é uma tentativa também de se detectar retrospectivamente esses casos.

2 **OBJETIVO**

2.1 **Objetivos primários:**

a) identificar casos de LMA familiar, estabelecendo o *status* mutacional dos genes *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* em pacientes com LMA submetidos à TCTH alo no CEMO-INCA. Diante do cenário de tentativa de identificação de casos de LMA familiar, surgiu um modelo raro e ideal para o estudo da patogênese da LMA, que foi um par de gêmeos idênticos discordantes para o diagnóstico de LMA. Nesse momento, então, nós definimos um segundo objetivo;

b) identificar novas mutações que possam estar envolvidas na patogênese da LMA em um par de gêmeos idênticos divergentes para o diagnóstico de LMA.

2.2 **Objetivo secundário**

Desenvolver uma plataforma genética diagnóstica para casos de LMA familiar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População

Pacientes com diagnóstico de LMA que tenham sido submetidos ao TCTH alogênico aparentado de medula óssea no CEMO-INCA entre 2003 e 2015.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão são idade maior ou igual a 18 anos na data da análise, diagnóstico de LMA submetidos ao TCTH alogênico aparentado no INCA-CEMO. O critério de exclusão é ausência de DNA provindo de amostra sangue periférico disponível para análise molecular.

3.3 Coleta de dados e material

Setenta e oito amostras de pacientes com diagnóstico de LMA submetidos à TCTH alogênico aparentado foram identificadas, mas apenas 58 dessas amostras estavam em condições adequadas para serem utilizadas (ocorreu amplificação do DNA). Todos esses pacientes tinham menos de 50 anos. As informações sobre as características clínicas e a estratificação prognóstica da LMA ao diagnóstico, assim como as informações citogenéticas e moleculares da doença desses pacientes não estavam disponíveis. A pesquisa de casos de LMA familiar foi então realizada em uma coorte de 58 pacientes. O DNA utilizado para a realização da investigação foi colhido de sangue periférico no momento em que os pacientes internaram para serem submetidos ao TCTH, não sendo sabido o status de remissão da LMA dessa população.

O paciente com LMA com um irmão gêmeo discordante para o diagnóstico de LMA se trata de paciente masculino, 17 anos com diagnóstico de LMA em 2014. No diagnóstico, a

doença foi classificada como de alto risco para recaída uma vez que apresentava cariótipo complexo. A pesquisa completar por biologia molecular para estratificação prognóstica não foi realizada. O paciente foi submetido à quimioterapia de indução com esquema 7+3 apresentando falha de indução. Paciente foi reinduzido com esquema FLAG-Ida sem resposta, apresentando 30% de blastos na medula óssea após quimioterapia. Nesse momento foram colhidos exames pre-TCTH, inclusive as amostras nas quais trabalhamos. O paciente foi então considerado com tendo uma LMA refratária e foi submetido TCTH alogênico com esquema de condicionamento BUCy, apresentando no D+30 doença residual mínima positiva (DRM). Paciente foi então submetido a tratamento quimioterápico com Azacitidina apresentando negativação da DRM após dois ciclos de tratamento, mas evoluindo com recaída de doença após sexto ciclo e óbito.

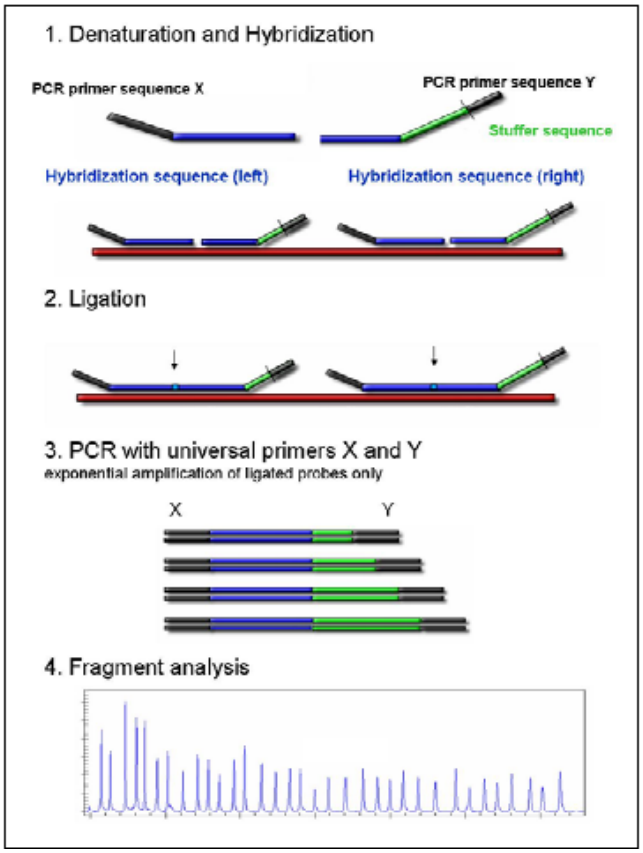
3.4 **Metodologia**

3.4.1 Metodologia para determinação do *status* dos genes *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *TERT*, *TERC*

A detecção de mutações nos genes *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, *TERT* e *TERC* foi realizada com a implementação da técnica Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).

O MLPA é um método que basicamente faz com que uma amostra de ácido nucléico seja submetida a uma reação de PCR, na qual mais de 50 sequências são amplificadas simultaneamente utilizando um único par de *primers* e uma mistura de 50 sondas específicas às regiões de interesse. Existe um par de sondas adjacentes especificas para cada região, sendo as mesmas hibridizadas às suas sequências complementares. Após a hibridização, as sondas são ligadas mediante a enzima ligase-65, como ilustrado na Figura 10 (a seguir). Note-se que a reação de hibridização é tão específica que é capaz de distinguir sequências que diferem em um único nucleotídeo. Os produtos de ligação resultantes irão ser amplificados exponencialmente durante a reação de PCR. Cada par de sondas ligado possui um tamanho específico, conhecido no quite. Como o primer *forward* é marcado com uma molécula fluorescente, os produtos gerados são fluorescentes e foram separados por eletroforese capilar.

Figura 10 - Esquema da técnica de MLPA



Legenda: Amplificação de *primer* por ligação dependente multiplex (MLPA).

Nota: Depois da hibridização das sondas nas sequências de DNA alvo, as sondas são ligadas enzimaticamente. Os produtos da ligação podem ser amplificados por PCR, utilizando sequências dos *primers* de "X" e "Y". Os produtos de amplificação são separados por eletroforese capilar. Quantidade relativa dos produtos de amplificação, em comparação com uma amostra referência, reflete o número relativo de cópias da sequência alvo no material avaliado.

Fonte: kit salsa MLPA P437[178].

O DNA extraído foi analisado usando o kit SALSA MLPA P437-A1 (MRC Holanda, Amsterdam, Países Baixos) (Quadro 7, a seguir) que contém 57 sondas MLPA com produtos de amplificação entre 124 e 503 nt.

Quadro 7 - Sondas para os genes *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* do *kit* SALSA P437 (continua)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene /Exon	Ligation site	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe	MV location (HG18)
GATA2 gene, at 3q21.3. Ligation sites are indicated, unless otherwise noted, according to NM_001145661.1 (NG_029334.1), which is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.						
244 «	19060-L24947	GATA2, ex 8	2816-2817	TGTACGTAGCCA-CAGGAGCCCTGC	1.2 kb	03-129.681570
		stop codon	*1878-1880 (ex 8)*			
168 §	19052-SP0847-L24939	GATA2, ex 8, **1192C>T**	1627-1626 and 1591-1590 reverse	GGACATCTTCC**A**-36nt spanning oligonucleotide-TGGCCTGTTAAC	0.6 kb	03-129.682771
278	19063-L25518	GATA2, ex 7a	1578-1579	AAGCTGCACAAT-GTGAGTGCGCCC	0.1 kb	03-129.683326
190 §	19053-SP0738-L25512	GATA2, ex 7a, **1061C>T**	1496-1495 and 1470-1469 reverse	TGGTGGTTGTC**A**-26nt spanning oligonucleotide-GCTCTTCTGGCG	1.4 kb	03-129.683405
447 Ø «	19298-L25506	GATA2, int 6	540 nt after ex 6	ACATCTGCAGCC-TGAAGATAAGGA	0.6 kb	03-129.684812
142 «	19050-L24937	GATA2, ex 6	1428-1429	CAGAACCGACCA-CTCATCAAGCCC	2.5 kb	03-129.685376
409 «	19071-L24958	GATA2, ex 5	684-685	ACCGGAGGCCAG-ATGTGCCGCCCA	0.7 kb	03-129.687851
		start codon	*436-438 (ex 4)*			
289 «	19064-SP0740-L25940	GATA2, ex 4	8 nt before ex 4 and 412-413	ACTCCCCCTTCC-30nt spanning oligonucleotide-ACCCTGAGCCGC	0.7 kb	03-129.688559
219 «	19058-L25516	GATA2, ex 3	355-356	CCTTCACTCTCA-GAGGCCGAGTCC	0.6 kb	03-129.689244
346 «	19588-L26183	GATA2, ex 2	166-167	CGAGCTAGGGGA-GGGAACGGTCTG	4.8 kb	03-129.689861
318 «	19067-L26432	GATA2, ex 1	NM_032638.4: 62-63	CAAGTCTGTCTA-TTGCCTGCCGCC	41.3 Mb to TERC gene	03-129.694631
TERC gene, at 3q26.2. Ligation sites are indicated according to NR_001566.1, which is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.						
270	19299-L24943	TERC, ex 1	100 nt after ex 1 reverse	TGCAGCACACTG-GCCCAGTCAGTC	0.2 kb	03-170.964960
130	08640-L08656	TERC, ex 1	314-315	GAGTTGGGCTCT-GTCAGCCGCGGG	0.4 kb	03-170.965201
372	19070-L24957	TERC, ex 1	68 nt before ex 1 reverse	GGCCAAGCTGAC-TCTCGCGGCTCT	0.3 kb	03-170.965581
489	19295-L25478	TERC, ex 1	421 nt before ex 1	GAGCCGAGACAA-GATTCTGCTGTA	-	03-170.965919
TERT gene, at 5p15.33. Ligation sites are indicated according to NM_198253.2 (NG_009265.1), which is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.						
		stop codon	*3457-3459 (ex 16)*			
395	08656-L25442	TERT, ex 16	13 nt before ex 16	ACGGAGTCTGAT-TTTGGCCCCGCA	0.6 kb	05-001.306926
149	03078-L25347	TERT, ex 15	3294-3295	CCAAGCATTCCT-GCTCAAGCTGAC	0.9 kb	05-001.307500
468	19073-L25677	TERT, ex 14	3207-3208	CCTGAAAGCCAA-GAACGCAGGTAT	3.3 kb	05-001.308379
364	08653-L23271	TERT, ex 13	3062-3063	GCACCAACATCT-ACAAGATCCTCC	1.9 kb	05-001.311706
229	08652-L25343	TERT, ex 12	2979-2980	GCGTCGCAAACT-CTTTGGGGTCTT	4.0 kb	05-001.313600
331	08651-L26433	TERT, ex 11	2788-2789	TTCCCTGTAGAA-GACGAGGCCCTG	1.9 kb	05-001.317598
418	19072-L24959	TERT, ex 10	1 nt after ex 10	ACCTTCCTCAGG-TGAGGCCCGTGC	2.0 kb	05-001.319544
224	19059-L25517	TERT, ex 9	99 nt after ex 9	ACCATGACTGCT-CTGTCTTGAGGA	2.8 kb	05-001.321495
472	19074-L25703	TERT, ex 8	3 nt before exon 8	CGTCTGCTTTCG-CAGAGCTCCTCC	1.0 kb	05-001.324291
195	08647-L25704	TERT, ex 7	2384-2385	ACATGCGACAGT-TCGTGGCTCACC	6.4 kb	05-001.325325
206	19055-L25515	TERT, ex 6	2324-2323 reverse	GAAGGCCTTGCG-GACGTGCCCATG	0.7 kb	05-001.331745
454	08645-L25504	TERT, ex 5	2113-2114	GGCCTGGACGAT-ATCCACAGGGCC	1.0 kb	05-001.332446
251	19061-L24948	TERT, ex 4	70 nt before ex 4	GTGGGGGCTTGT-GGCTTCCCGTGA	2.2 kb	05-001.333487

Quadro 7 – Sondas para os genes *RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2*, *TERT*, *TERC* do *kit* SALSA P437 (conclusão)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene /Exon	Ligation site	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe	MV location (HG18)
296	19065-L26112	TERT, ex 3	1679-1680	GTGAGGAGATCC-TGGCCAAGTTCC	12.1 kb	05-001.335658
160	10346-L25509	TERT, ex 2	300-301	GAAGGAGCTGGT-GGCCCGAGTGCT	0.3 kb	05-001.347727
180	15272-L18513	TERT, ex 1	131-132	TGCTGCCGCTGG-CCACGTTCGTGC	-	05-001.348001
		start codon	*59-61 (ex 1)*			
CEBPA gene, at 19q13.11. Ligation sites are indicated according to NM_004364.4 (NG_012022.1), which is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.						
		stop codon	*1277-1279 (ex 1)*			
265 «	19062-L24949	CEBPA, ex 1	773-774	GCACCTGCAGTT-CCAGATCGCGCA	0.4 kb	19-038.484506
136 «	19049-L24936	CEBPA, ex 1	389-390	GTTCCTGGCCGA-CCTGTTCCAGCA	0.2 kb	19-038.484884
		start codon	*151-153 (ex 1)*			
309 «	19066-L26430	CEBPA, ex 1	144-145	GAGAACTCTAAC-TCCCCCATGGAG	-	19-038.485133
RUNX1 gene, at 21q22.13. Ligation sites are indicated, unless otherwise noted, according to NM_001754.4 (NG_011402.2), which is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.						
		stop codon	*1633-1635 (ex 10)*			
324 «	19017-L25523	RUNX1, ex 10	1405-1406	TCCTACCACCTG-TACTACGGCGCC	7.1 kb	21-035.086493
301 «	02840-L25520	RUNX1, ex 9	1036-1037	TGGTCCTACGAT-CAGTCCTACCAA	22.3 kb	21-035.093547
156	19051-L25507	RUNX1, ex 8	NM_001122607.1; 2312-2313	AGAGGAAGACAC-AGCACCCTGGAG	12.8 kb	21-035.115810
388	19019-L26111	RUNX1, ex 7	978-977 reverse	TCTGACTCTGAG-GCTGAGGGTTAA	25.1 kb	21-035.128567
440	02838-L25676	RUNX1, ex 6	739-740	TTCACAAACCCA-CCGCAAGTCGCC	21.1 kb	21-035.153664
425	19237-L25317	RUNX1, ex 5	623-624	CGGCTGAGCTGA-GAAATGCTACCG	6.5 kb	21-035.174758
239	19014-L26113	RUNX1, ex 4b	290-291	TCCCCGTAGATG-CCAGCACGAGCC	5.8 kb	21-035.181223
355	19069-L24956	RUNX1, ex 3	280-281	CCTTCTAGAGAC-GTCCACGGTATG	156.0 kb	21-035.187052
		start codon	*191-193 (ex 2)*			
172	02835-L25510	RUNX1, ex 2	186-187	TTTTCAGGAGGA-AGCGATGGCTTC	0.3 kb	21-035.343029
213	19057-L25344	RUNX1, ex 1	71-70 reverse	CTGACCACTATG-CTGGGTTCAGAC	-	21-035.343369

Fonte: kit salsa MLPA P437[178]

Esse *kit* contém sondas para a detecção das aberrações do número de cópia nos seguintes genes: *GATA2* (3q21.3), *TERC* (em 3q26.2), *TERT* (às 5p15.33), *CEBPA* (às 19q13.11) e *RUNX1* (às 21q22.12), além de duas mutações pontuais em *GATA2* (1061C> T e 1192C> T), que são considerados de relevância diagnóstica na SMD/LMA familiar. As primeiras 9 sondas são sondas controle que contemplam quatro fragmentos que avaliam a quantidade de DNA (Qfragments), três fragmentos que avaliam a desnaturação do DNA (fragmentos D), um fragmento X e um fragmento Y. Existem 13 sondas de referência que detectam 13 locais cromossômicos diferentes, que são relativamente estáveis em amostras de pacientes com SMD e LMA. Alguns sinais de sonda são mais sensíveis à pureza da amostra e pequenas mudanças nas condições experimentais podem produzir alteração na altura do pico. Portanto, as exclusões e duplicações detectadas pela MLPA devem ser confirmadas por outros métodos. Nem todas as deleções e duplicações detectadas pela MLPA serão patogênicas; os usuários devem sempre verificar a literatura científica mais recente ao interpretar suas descobertas.

O DNA genômico, pertencente a amostras de sangue periférico de 58 pacientes com diagnóstico de LMA, foi extraído por meio de um método automatizado pelo Kit Maxwell 16

Blood DNA (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Amostras de DNA de cinco indivíduos saudáveis também foram extraídas por este mesmo método e foram utilizadas neste estudo como controle negativo.

Cerca de 100 ng de DNA de cada amostra analisada foram aquecidos a 98° C durante 5 min. A mistura de sondas contidas no kit P437 foi adicionada ao DNA desnaturado e incubados a 60°C durante 16-20h para permitir o anelamento das sondas. As sondas aneladas foram ligadas por adição de Ligase-65 a 54°C, durante 15 min. Os produtos de ligação foram amplificados por um PCR universal (35 ciclos, 30 segundos 95°C; 30 segundos a 60°C, 60 segundos a 72°C) utilizando primers de PCR SALSA, comuns para todas as sondas, sendo o primer forward marcado com a molécula fluorescente Cy5.0. Os fragmentos de PCR foram denaturados e então, separados por eletroforese capilar em ABI Sequencer 3130 (XL). A análise dos eletroferogramas foi realizada utilizando o software Peak Scanner v.1.0 (Applied Biosystems) - Coffalyser e como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador Gene Scan LIZ-500 (Applied Biosystems).

3.4.2 Metodologia para determinação do exoma dos irmãos gêmeos discordantes para o diagnóstico de LMA

3.4.2.1 Amostra

As amostras de sangue periférico do gêmeo com diagnóstico de LMA e do irmão saudável foram encaminhadas para diagnóstico molecular antes do transplante de células-tronco. O DNA de cada amostra foi extraído pelo método automatizado Maxwell (Promega) com o Kit Maxwell 16 Blood DNA, como já descrito anteriormente.

3.4.2.2 Exoma por sequenciamento na plataforma Ilummina

3.4.2.2.1 Construção da biblioteca genômica

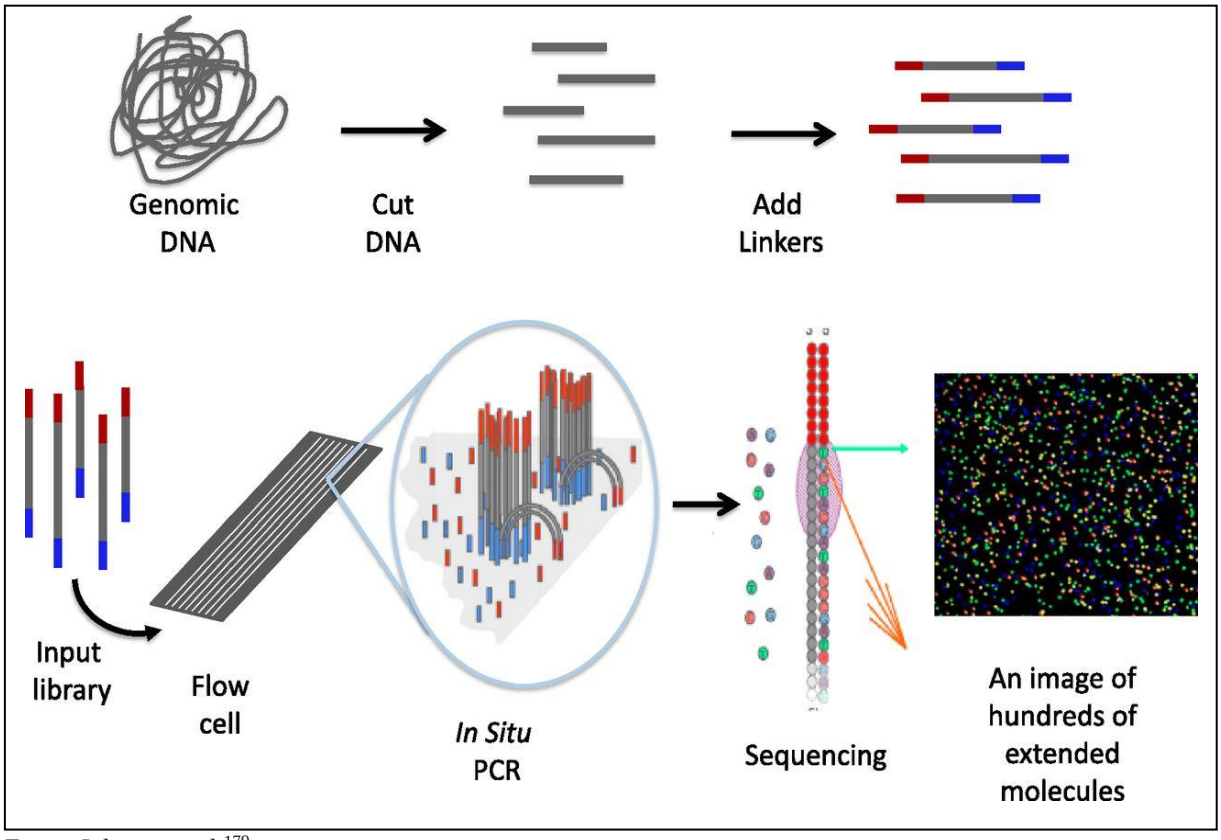
As duas bibliotecas foram realizadas seguindo o protocolo do fabricante *Nextera Rapid Capture Enrichment Guide* (Revisão G, maio de 2014). 50 ng de DNA foram fragmentados por digestão enzimática e os adaptadores foram ligados (tagmentação) simultaneamente. Após a tagmentação, uma primeira amplificação foi realizada utilizando primers contendo uma sequencia específica para cada DNA. Duas hibridizações consecutivas foram realizadas, a primeira durante 2h e uma segunda durante a noite. A biblioteca foi capturada usando esferas magnéticas conjugadas com estreptavidina e uma segunda amplificação por PCR foi realizada.

3.4.2.2.2 Sequenciamento

As plataformas da Illumina utilizam sequenciamento por síntese e são capazes de gerar > 40Gb de sequências por corrida de sequenciamento. A metodologia de sequenciamento por síntese envolve a fragmentação enzimática do DNA, com posterior ligação de adaptadores nas extremidades 5’ (P5) e 3’ (P7) da sequência e desnaturação do DNA. As extremidades 5’ das moléculas de DNA são aderidas à superfície sólida de clonagem (flow cells) por complementariedade. Durante a etapa de pareamento, o adaptador presente na extremidade livre 3’ da molécula encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte sólido, formando pontes e permitindo à amplificação das sequências de DNA. Posteriormente, há a separação e linearização das fitas, formando clusters de moléculas idênticas ligadas ao suporte. Com a incorporação de nucleotídeos marcados com fluorocromos e excitação a laser é gerado um sinal que é capturado pelo dispositivo de leitura. A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cluster. O processo de amplificação por pontes é ilustrado pela Figura 11. Para que seja possível sequenciar amostras distintas dentro de uma mesma reação, sequências específicas de nucleotídeos (indexes) são adicionadas nas extremidades 5’ e 3’ da molécula de DNA (junto com os adaptadores P5 e P7). A adição dos

indexes permite que até 96 amostras sejam corridas simultaneamente em uma mesma linha (lane), uma vez que existem 12 e 8 opções de indexes ligados a P7 e P5, respectivamente (Figura 11).

Figura 11 - Sequenciamento pela plataforma Illumina



Fonte: Johnsen et al.[179].

3.4.2.2.3 Bioinformática

A análise de bioinformática foi realizada pela Dra Maria Boroni, pesquisadora do laboratório de bio-informática e biologia computacional, situado no Centro de Pesquisa (CPQ) do INCA. Em resumo, a detecção de variantes foi realizada de acordo com o guia de análise entitulado *Best Practices* disponível no *Genome Analysis Toolkit* (GATK, Broad Institute) para SNP e INDEL. O *pipeline* BWA foi usado para a chamada de variantes e alinhamento das sequências ao genoma humano de referência GRCh37 de acordo com os parâmetros padrão. As leituras duplicadas foram removidas pelo programa Picard (http://broadinstitute.github.io/picard/). Os genótipos foram gerados utilizando configurações

padrões do GATK Unified Genotyper. As variantes com menos de 6 e 32 leituras para SNVs e INDELs, respectivamente, e as mutações com frequencia alélica ⩽ 0,02 foram removidas. A anotação de variantes foi realizada usando a Ferramenta de Predição de Efeito Variante (VEP). Scripts *in house* Perl/R foram utilizados para o processamento de arquivos VCF. As mutações não sinonimas foram selecionadas como mutações "deletérias" se: a) fossem mutações classificadas pelo VEP (predição de efeito de variantes) como de impacto alto ou moderado incluindo; b) fossem mutações de ganho ou perda de códon de parada, mutações em sítios de splicing; c) fossem mutações descritas com frequência alélica ⩽ 0,01 (www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/as) no genoma de referência. Para encontrar diferenças genômicas nos gêmeos discordantes para LMA, SNVs e INDELs foram selecionados com base nos seguintes critérios: a) regiões exclusivamente genotipadas em um indivíduo foram removidas; b) mutação homozigota em relação a genoma referência.

3.5 **Comitê de Ética em Pesquisa**

Todo estudo foi desenvolvido conforme a última versão da Declaração de Helsinque (outubro de 2000) e a legislação brasileira (outubro de 1996) sobre ética em pesquisa envolvendo seres humanos.

Esse estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE) foram submetidos e aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) (ANEXO A) e do INCA (ANEXO B).

4 RESULTADOS

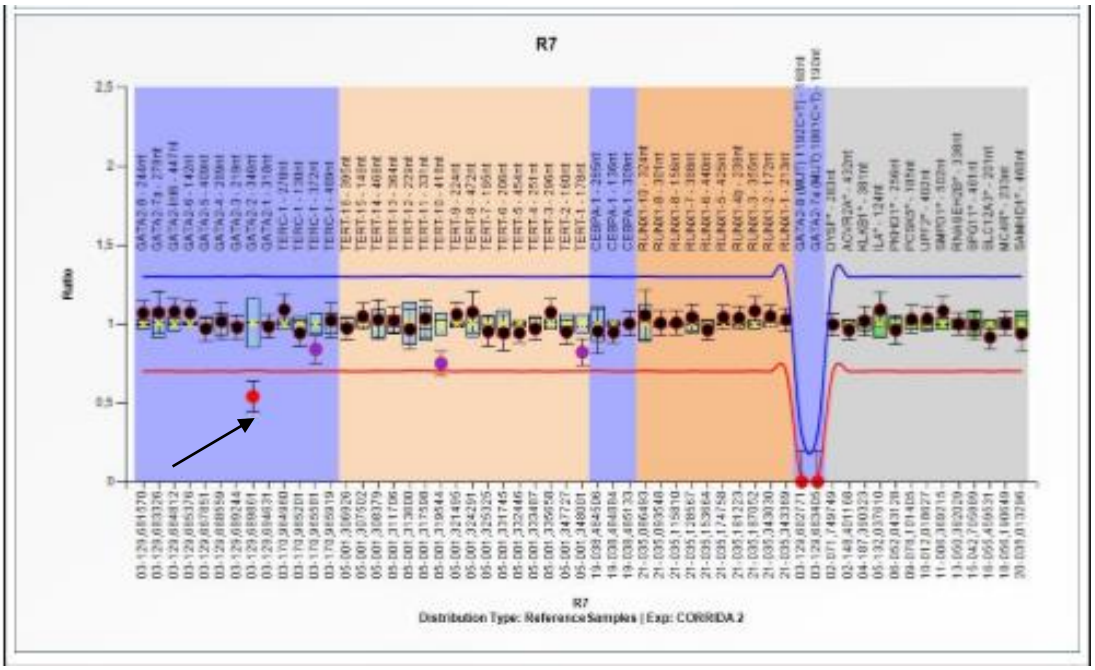
4.1 Detecção de mutações nos genes *CEBPA, RUNX1, GATA2, TERT, TERC* pela técnica de MLPA

O MLPA foi projetado para detectar deleções / duplicações de uma ou mais sequências nos genes *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, *TERT* e *TERC* e para detectar a presença das mutações pontuais em *GATA2* (1061C>T and 1192C>T) em uma amostra de DNA. As deleções heterozigotas geram uma redução da altura do pico de 35-50% do produto de amplificação dessa sonda. A presença de uma mutação ou polimorfismo na sequência detectada por uma sonda também pode causar uma redução na altura relativa do pico, mesmo quando não está localizado exatamente no local de ligação.

Foram estudadas 58 amostras de DNA genômico de pacientes com diagnóstico de LMA e cinco amostras de doadores saudáveis, para os testes após a implementação da técnica MLPA. Durante a análise, duas amostras apresentaram redução de 35-50% da altura do pico do produto de amplificação sugerindo a presença de possíveis casos com mutação heterozigota ou polimorfismo em *GATA2* E2 (at 3q21.3) e *TERT* E6 (at 5p15.33) (Figuras 12 e 13, a seguir).

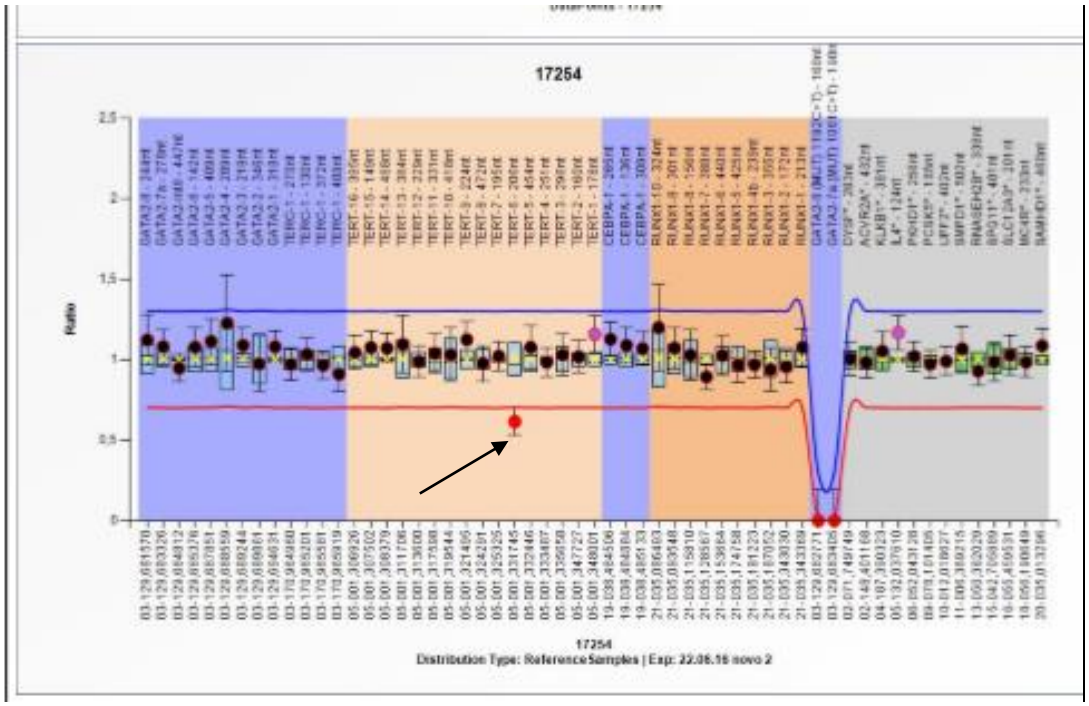
Os dados gerados foram normalizados, já que os sítios alvo das sondas de referência podem ganhar ou perder. A normalização intra-amostra foi realizada dividindo o sinal de cada sonda específica do alvo pelo sinal de cada sonda de referência única nessa amostra, criando assim muitas proporções por sonda específica do alvo. Posteriormente, a mediana de todas essas proporções produzidas pelas sondas foi medida; esta é a Constante de Normalização da sonda. Em segundo lugar, a comparação entre amostras foi realizada dividindo a Constante de Normalização de cada sonda em uma determinada amostra pela Constante de Normalização média dessa sonda em todas as amostras de referência. A normalização dos dados foi realizada dentro da mesma experiência e com amostras e DNA de referência extraídos com o mesmo método e derivado da mesma fonte de tecido, conforme orientações descritas em bula.

Figura 12 - Paciente com possível deleção em *GATA2* E2



Fonte: A autora, 2018.

Figura 13 - Paciente com possível deleção em *TERT* E6



Fonte: A autora, 2018.

Para confirmação da presença das variações nas amostras e pesquisada das referidas variações nos irmãos doadores de medula dos pacientes, foi feita a seguinte estratégia. Para a pesquisa da mutação em *GATA2* E2 foi realizado sequenciamento direto nas amostras do

paciente e irmão saudável. Já para a pesquisa da mutação em *TERT*6 E6, como a tecnologia de sequenciamento direto para esse gene não estava disponível, já que é um gene localizado em uma região promotora, foi usada a técnica de MLPA no irmão saudável.

O sequenciamento direto por Sanger confirmou a variação no gene GATA E2 do paciente com LMA e detectou a mesma variação no irmão saudável, tendo sido classificadas como um polimorfismo e não uma mutação após pesquisa em duas bases de dados diferentes (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/; e https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/).

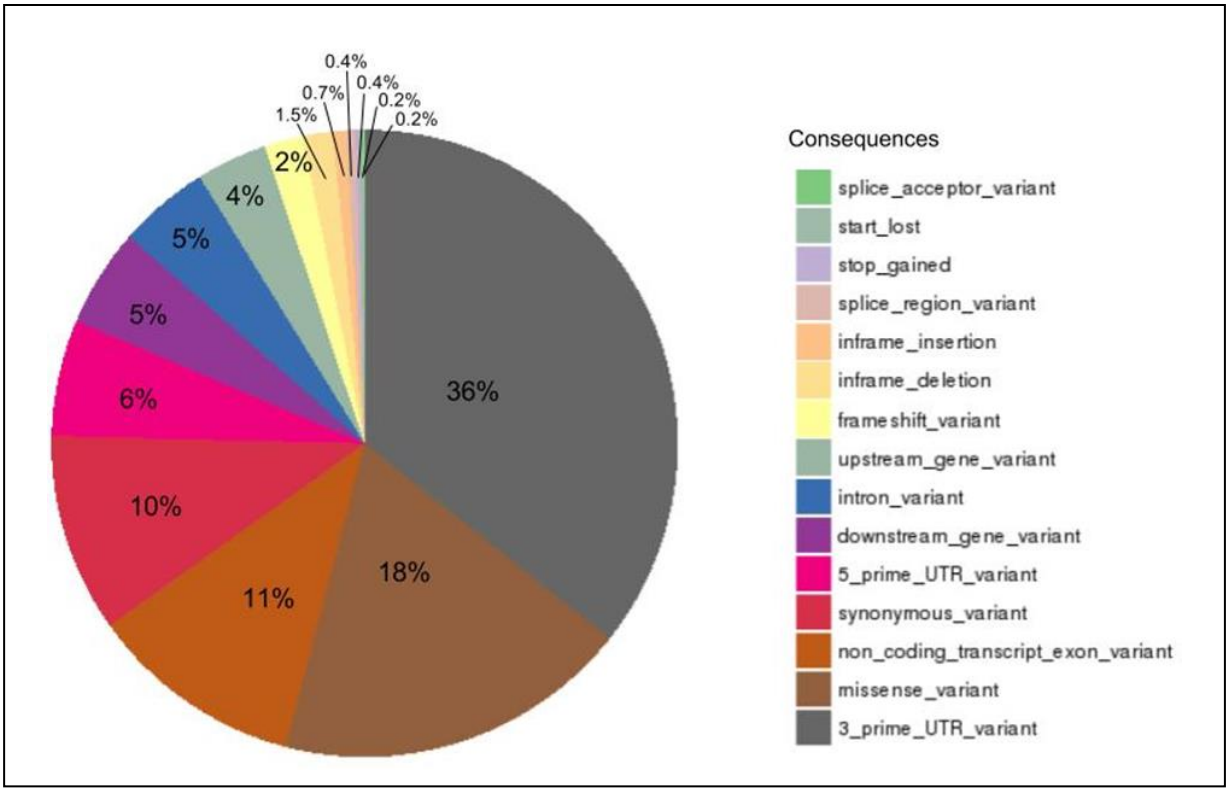
A alteração de um único nucleotídeo (SNV) no gene *TERT* E6 não foi observada no irmão doador e foi também classificada como polimorfismo.

4.2 **Exoma de irmãos gêmeos discordantes para LMA**

4.2.1 Análise do sequenciamento do exoma

No total, mais de 89 bilhões de sequências (99% do total) foram mapeadas para cada biblioteca exômica, resultando em uma boa cobertura de sequenciamento para ambas as amostras. Mais de 93% das regiões visadas (*on target*) foram cobertas com uma cobertura média superior a 50 × e 37 × e cerca de 76% e 71% das bases foram cobertas por um mínimo de dez leituras para os pacientes_40259 e paciente_40166, respectivamente. Para identificar variáveis de alta confiança, foi realizada a análise de parâmetros padrão baseado no *workflow* GATK *Best Practices*. As variantes chamadas para SNVs e INDELs com menos de 6 e 32 leituras, respectivamente, foram descartadas. Além disso, as variantes com frequência alélica inferior a 0,02 também foram removidas. A análise de exoma produziu 46.693 variantes para o paciente e 45.866 para o irmão saudável. Após a remoção de polimorfismos (GMAF> 0,01), foram identificadas 6.578 e 6.448 variantes para o paciente (amostra 40259) e seu irmão (amostra 40166), respectivamente, sendo 87,7% correspondentes a SNVs, 6,9% a deleções e 5,2% a inserções. Em seguida, os genótipos de todas as variantes entre os gêmeos foi comparado, excluindo as variantes que foram exclusivamente genotipadas em um único indivíduo, resultando em 849 variantes discordantes classificadas de acordo com seu impacto, sendo as consequências das variantes mostradas na Figura 14.

Figura 14 - Porcentagem de variantes discordantes entre os gêmeos de acordo com as consequências relacionadas ao gene



Fonte: A autora, 2018.

A anotação de variantes foi realizada com VEP. Para tentar identificar variáveis deletérias, apenas as variantes que não foram homozigotas para o paciente afetado foram consideradas e classificadas como alto ou moderado impacto pela VEP, totalizando 116 candidatos (12 variantes de *frameshift*, 6 deleções *in frame*, 3 inserções *in frame*, 92 variantes missense, 1 variante num sítio aceptor de splice, 1 perda do início de tradução e 1 códon de parada prematuro). Estes candidatos foram então inspecionados manualmente e alguns deles mostraram uma clara frequência predominantemente no paciente.

O sequenciamento completo do exoma identificou 9 genes mutados no paciente e 2 genes mutados no gêmeo saudável de possível relevância (Quadros 8 e 9, a seguir). Os genes *HJURP*[180], *ABCE1*[181], *PCDHA11*[182], *AJM1*, *TAS2R19*[183], *AMER2*[184], *FNDC3A*[185], *SIN3A*[186] e L1CAM[187,188] são mutados no paciente. Os genes RBM5[189] e ATXN3[190] são mutados no gêmeo saudável (Quadro 10, a seguir). De todos os SNV identificados, apenas duas mutações foram consideradas preditivas de serem deletérias por programas de EIPD e Polyphen, e poderiam estar associadas à patogênese.

Quadro 8 - Genes mutados no gêmeo com diagnóstico de leucemia mielóide aguda (LMA)

Gene	Localização	Exon	Ação	Efeito clínico
HJURP	2q 37.1		Ptn com papel central na incorporação e manutenção de histona	Ca hepatobiliar, mama luminal
ABCE1	4q 31.21	18	Ptn transportadora de ATP, bloqueia ação da ribonuclease	Ca de pulmão, tireoide e esôfago
PCDHA11	5q 31.3	4	Conexão de células no SNC	Alteração neurológica
AJM1	9q 34.3	1		
TAS2R19	12p 13.2	1	Receptores de degustação	
AMER2	13q 12.3	3	Ptn que recruta a membrana APC	
FNDC3A	13q 14.2	34		Autismo
SIN3A	15q 24.2	26	Ptn reguladora da transcrição	Déficit intelectual, azospermia, ca pulmão, glioma
L1CAM	Xq 28	29	Ptn de adesão celular com papel no desenvolvimento do SNC	Ca mama, testículo, colon, pâncreas, osteossarcoma, ovário

Fonte: A autora, 2018.

Quadro 9 - Genes mutados no gêmeo saudável

	Localização	Exon	Ação	Efeito clínico
RBM5	3p 21.31	25	Candidato a supressor tumoral	Ca pulmão, estômago, colon, próstata, gástrico, glioma
ATXN3	14q 32.12	13	Ptn que repete regiões GAG na região codificadora	Ataxia cerebelar

Fonte: A autora, 2018.

Quadro 10 - Genotipos dos gêmeos discordantes

Cr.	Início	Alt.	Ref.	missense_variant	Genotipo do gêmeo saudável	Genotipo do paciente com LMA	Nome do gene	Vep	SIFT	Polyphen
2	234749694	T	C	missense_variant	0/0	0/1	*HJURP*	MODERATE	Tolerated (0.14)	Benign (0.411)
4	146033407	G	C	missense_variant	0/0	0/1	*ABCE1*	MODERATE	Deleterious (0.01)	probably_damaging (0.998)
5	140250856	T	C	missense_variant	0/0	0/1	*PCDHA11*	MODERATE	deleterious_ low_confidence (0.02)	Benign (0.11)
9	139739489	A	G	missense_variant	0/0	0/1	C9orf172	MODERATE	Tolerated (1)	Benign (0.055)
12	11175029	C	G	missense_variant	0/0	0/1	*TAS2R19*	MODERATE	Deleterious (0.05)	possibly_damaging (0.764)
12	11175036	G	C	missense_variant	0/0	0/1	*TAS2R19*	MODERATE	tolerated (1)	Benign (0)
12	11175041	T	C	missense_variant	0/0	0/1	*TAS2R19*	MODERATE	Tolerated (0.11)	possibly_damaging (0.777)
12	11175055	T	C	missense_variant	0/0	0/1	*TAS2R19*	MODERATE	Tolerated (1)	Benign (0.006)
12	11175060	C	G	missense_variant	0/0	0/1	*TAS2R19*	MODERATE	Tolerated (1)	Benign (0)
12	11175073	T	A	inframe_insertion	0/0	0/1	*TAS2R19*	MODERATE	Tolerated (0.07)	Benign (0.314)
13	25744836	GCT CGG GGG GT GCC CGG GGC TT	G	missense_variant	0/0	0/1	*AMER2*	MODERATE	*	*
13	49705319	A	C	missense_variant	0/0	0/1	*FNDC3A*	MODERATE	Deleterious (0)	Benign (0.034)
15	75664462	T	G		0/0	0/1	*SIN3A*	MODERATE	Tolerated (0.77)	Benign (0.009)
X	153129810	A	G		0/0	0/1	L1CAM	MODERATE	Tolerated (0.19)	Tolerated (0.19)
3	50155887	T	TG A		0/1	0/0	RBM5	HIGH	*	*

Fonte: A autora, 2018.

Nove do total de 11 genes mutados são fosfoproteínas, três deles apresentaram envolvimento relatado no desenvolvimento do sistema nervoso (*L1CAM*, *ATXN3*, *PCDHA11*). Dois desses 11 genes codificam proteínas chaperonas (*ABCE1* e *HJURP*) que são extensivamente relatadas em vários tumores sólidos. Apesar da associação conhecida entre o gene *ABCE1* e a infecção viral, deve-se também considerar seu papel no aumento da viabilidade celular do câncer no adenocarcinoma pulmonar,[191] carcinoma de tireoide[192] e câncer de esôfago.[193] O gene *HJURP* codifica uma proteína centromérica que desempenha um papel central na incorporação e manutenção de uma variante de histona H3 em centrímeros, atuando como uma chaperona específica para ela. A proteína centrírica *HJURP* é significativamente sobreexpressa no câncer de pulmão quando comparada com amostras pulmonares normais. Em contraste, o gene *HJURP* parece ter um perfil de expressão mais baixo na medula óssea normal quando comparado com outros níveis normais de expressão dos tecidos. O gene *HJURP* foi associado à susceptibilidade ao carcinoma hepatocelular[194] entre os chineses e parece ser um marcador prognóstico independente para o carcinoma luminal de mama.[195]

A *L1CAM* é conhecida como uma molécula de adesão celular com um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso e já foi relacionada a muitos tipos de câncer na literatura - como tumor de células germinativas testiculares,[196] câncer de mama,[197] câncer colorretal, adenocarcinoma pancreático,[198] osteossarcoma, carcinoma de ovário[199] e outros. Embora os genes *ABCE1*, *HJURP* e *L1CAM* possam contribuir para o fenótipo do câncer discordante, é improvável que sejam a principal causa. Não há dados que associem esses genes a doenças malignas hematológicas.

Ambos os genes encontrados mutados no gêmeo saudável apresentam funções celulares peculiares. O gene *RBM5* é um componente do complexo Spliceosome A e regula o splicing alternativo de vários mRNAs. Pode tanto regular positivamente quanto negativamente a apoptose, regulando o *splicing* alternativo de vários genes envolvidos neste processo, incluindo FAS e CASP2 / caspase-2. O *RBM5* é amplamente expresso em tecidos normais e é expresso em níveis aumentados nas linhas celulares T-leucémicas. Os dados recentes classificam o *RBM5* como um gene supressor de tumor em vários tipos de câncer como pulmão,[200] próstata,[201] estômago, cólon, glioma e outros.[202] Aqui, é descrita uma supressão importante que levaria a uma proteína frameshift, que deverá ter um alto impacto na sua estrutura. Isso parece contrariar a ideia de que o gene *RBM5* possa ser um gene supressor tumoral, sendo necessários mais estudos para investigar a função in vivo da proteína *RBM5* em células leucêmicas. O outro gene mutado em gêmeos saudáveis é o *ATXN3*, que

geralmente está ligado à doença de Machado-Joseph. No entanto, a mutação descrita neste WES não corresponde à alteração usual encontrada na doença de Machado-Joseph (repetições curtas em tandem). Em vez disso, encontramos uma inserção de base que levaria a um deslocamento de quadros de alto impacto na estrutura protéica, de acordo com a predição. O *ATXN3* atua como uma proteína de ligação a histonas que regula a transcrição, interage com reguladores chave (CBP, p300 e PCAF) de transcrição e reprime-a, como também atua como uma enzima desubicitante e, curiosamente, interage com proteínas de reparo de DNA RAD23A e RAD23B.[203]

5 **DISCUSSÃO**

A LMA familiar é uma entidade recente, incluída na classificação da OMS apenas em 2016. Esse trabalho ressaltou a importância de uma nova entidade clínica, cujo manejo exige o aconselhamento genético e medidas específicas.[5] Os pacientes com LMA familiar e/ou disfunção plaquetária devem ter manejo diferenciado, incluindo acompanhamento regular nos casos de familiares com a presença da mutação. Da mesma forma que pacientes com indicação de TCTH alogênico deve ter a mutação excluída do irmão doador para que não seja transplantada uma medula com a mutação que predispôe ao desenvolvimento da LMA.[9]

Na grande maioria das vezes, o clínico que está à frente do paciente não se atenta a questão familiar e as condições que podem estar associadas a essa entidade. Dessa forma, em 2017, nós propuzemos, num artigo de revisão, um algorítimo que orienta o hematologista clínico na investigação clínica da LMA familiar.[6]

A partir desse trabalho foram identicados mais cinco casos de pares de gemêos idênticos em que um deles foi referido para TCTH alo no CEMO-INCA, o que abre a prespectiva para que esse estudo seja extendido para novos casos.

A não identificação de casos de LMA familiar na coorte estudada não foi uma surpresa uma vez que a descrição desses casos na literatura é raro. Em algumas séries, são descritas 30 famílias no mundo.

As mutações em *CEBPA* e *RUNX1* são as mais frequentes e por serem genes de mais fácil avaliação, talvez mesmo na ausência de tecnologias de sequênciamento de nova geração, elas possam ser avaliadas.

Esse trabalho é o início de uma abordagem que visa melhorar a descriminação de casos familiares, o que só se concretiza com o trabalho cooperativo multicêntrico.

A análise de exoma revelou mutações discordantes em nove genes no gêmeo com LMA e em dois genes no irmão saudável. Na busca em bases de dados (Clinvar, Cosmic, My cancer genome) não foi observada uma associação entre esses genes e neoplasias mieloides. Em contraste, mutações nesses alvos foram observadas nos tumores sólidos (pulmão, próstata, etômago, pâncreas, ovário).

Nenhum desses genes identificados está nas recomendações de American College of Genetics and Genomics (ACMG) dos genes que devem ser relatados se mutados no sequenciamento de exomas.

Não foram identificadas mutações nos 23 genes mais recorrentemente mutados no genoma da LMA (Tumor Cancer Genomic Analysis), mas essa informaçõa não foi uma susrpresa já que esses genes são descritos na sua grande maioria em casos de LMA com cariótipo normal e esse paciente tinha um cariótipo complexo.

CONCLUSÃO

A pesquisa de mutações pela técnica de MLPA não identifcou alterações no número de cópias ou variantes patogênicas na coorte estudada.

A aplicação dessa plataforma pode ser utilizada como modelo para a avaliação de casos suspeitos de LMA familiar.

Com relação à análise de exoma, nossos resultados de sequenciamento de exoma em par de gêmeos discordantes em LMA, revelaram diferenças em alguns genes de possível interesse.

As mutações encontradas podem ser o resultado da instabilidade genética subjacente associada ao processo de transformação. Para a determinação do impacto funcional das mutações identificadas, ensaios clínicos *in vitro* devem ser realizados para caracterização da relação genótipo-fenótipo.

REFERÊNCIAS

1. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer. 2006;107(9):2099-107.

2. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia– a review. Br J Haematol. 2008;140(2):123-32.

3. Hahn C, Chong C, Carmichael C, Wilkins E, Brautigan P, Li X, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Nat Genet. 2011;43(10):1012-17.

4. Nickels EM, Soodalter J, Churpek JE, Godley LA. Recognizing familial myeloid leukemia in adults. Ther Adv in Hematol. 2013;4(4):254-69.

5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.

6. Baptista RLR, dos Santos ACE, Gutiyama L, Solza C, Renault IZ. Familial Myelodysplastic Syndrome/Acute Leukemia Syndromes - Myeloid Neoplasms with Germline Predisposition. Front Oncol. 2017;7:206.

7. West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. Ann NY Acad Sci. 2014;1310(10):111-8.

8. Godley LA. Inherited predisposition to acute myeloid leukemia. Semin Hematol. 2014; 51(4):306-21.

9. Churpek JE, Lorenz R, Nedumgottil S, Onel K, Olopade OI, Sorrell A, et al. Proposal for the clinical detection and management of patients and their family members with familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia predisposition syndromes. Leuk Lymphoma. 2013;54(1):28-35.

10. Bennett JH. Two cases of hypertrophy of the spleen and liver, in wich death took place from suppuration of blood. Edinburgh Med Surg J. 1845;64:413.

11. Virchow R. Die Leukamie. In: Virchow R. Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin. Frankfurt: Meidinger; 1856. p. 2-190.

12. Naegeli O. Uber rothes Knochenmark und Myeloblasten. Deutsch Med Wochenschr. 1900;26(18):287-90.

13. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2006;56(2):106-30.

14. Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L. The incidence of secondary leukemias. Haematologica. 1999;84(10):937-45.

15. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. Lancet. 1997;349(9048):344-9.

16. Taylor GM, Birch JM. The hereditary basis of human leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, editores. Leukemia. Philadelphia: WB Saunders;1996. p. 210-45.

17. Horwitz M, Goode EL, Jarvik GP. Anticipation in familial leukemia. Am J Hum Genet. 1996;59:990-8.

18. Crittenden LB. An interpretation of familial aggregation based on multiple genetic and environmental factors. Ann N Y Acad Sci. 1961;91:769-80.

19. Gao Q, Horwitz M, Roulston D, Hagos F, Zhao N, Freireich EJ, et al. Susceptibility gene for familial acute myeloid leukemia associated with loss of 5q and/or 7q is not localized on the commonly deleted portion of 5q. Genes Chromosomes Cancer. 2000;28(2):164-72.

20. Horwitz M. The genetics of familial leukemia. Leukemia. 1997; 11(8):1347-59.

21. Creutzig U, Ritter J, Vormoor J, Ludwig WD, Niemeyer C, Reinisch I, et al. Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia in Down's syndrome. A report of 40 children of the AML-BFM Study Group. Leukemia. 1996;10(11):1677-86.

22. Hasle H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. Lancet Oncol. 2001;2(7):429-36.

23. Auerbach AD. Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. Leukemia. 1992; 6(Suppl 1):1-4.

24. Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Andersen MK, Skovby F. Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. Leukemia. 2002;16(11):2177-84.

25. Finch SC. Leukemia: lessons from the Japanese experience. Stem Cells. 1997; 15(Supl 2):135-9.

26. Ichimaru M, Ishimaru T, Belsky JL. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950–71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. J Radiat Res (Tokyo). 1978; 19(3):262-82.

27. Ishimaru T, Otake M, Ischimaru M. Dose-response relationship of neutrons and gamma rays to leukemia incidence among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki by type of leukemia, 1950–1971. Radiat Res. 1979;77(2):377-94.

28. Hempelmann LH, Hall WJ, Phillips M, Cooper RA, Ames WR. Neoplasms in persons treated with x-rays in infancy: fourth survey in 20 years. J Natl Cancer Inst. 1975; 55(3):519-30.

29. Cronkite EP. Chemical leukemogenesis: benzene as a model. Semin Hematol. 1987; 24(1):2-11.

30. Aksoy M, Erdem S. Followup study on the mortality and the development of leukemia in 44 pancytopenic patients with chronic exposure to benzene. Blood. 1978;52(2):285-92.

31. Snyder R. Benzene and leukemia. Crit Rev Toxicol. 2002;32(3):155-210.

32. Pogoda JM, Preston-Martin S, Nichols PW, Ross RK. Smoking and risk of acute myeloid leukemia: Results from a Los Angeles County case-control study. Am J Epidemiol. 2002; 155(6):546-53.

33. Chelghoum Y, Danaila C, Belhabri A, Charrin C, Le QH, Michallet M, et al. Influence of cigarette smoking on the presentation and course of acute myeloid leukemia. Ann Oncol. 2002;13(10):1621-7.

34. Karp JE, Smith MA. The molecular pathogenesis of treatment-induced (secondary) leukemias: foundations for treatment and prevention. Semin Oncol. 1997;24(1):103-13.

35. Kalaycio M, Rybicki L, Pohlman B, Sobecks R, Andresen S, Kuczkowski E, et al. Risk factors before autologous stem-cell transplantation for lymphoma predict for secondary myelodysplasia and acute myelogenous leukemia. J Clin Oncol. 2006;24(22):3604-10.

36. Ratain MJ, Rowley JD. Therapy-related acute myeloid leukemia secondary to inhibitors of topoisomerase II: from the bedside to the target genes. Ann Oncol. 1992;3(2):107-11.

37. Sandoval C, Pui CH, Bowman LC, Heaton D, Hurwitz CA, Raimondi SC, et al. Secondary acute myeloid leukemia in children previously treated with alkylating agents, in TERC alating topoisomerase II inhibitors, and irradiation. J Clin Oncol. 1993; 11(6):1039-45.

38. Bloomfield CD, Archer KJ, Mrozek K, Lillingto DM, Kaneko Y, Head DR, et al. 11q23 balanced chromosome aberrations in treatment-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. Genes Chromosomes Cancer. 2002;33(4):362-78.

39. Smith LJ, Curtis JE, Messner HA, Senn JS, Furthmayr H, McCulloch EA. Lineage infidelity in acute leukemia. Blood. 1983;61(6):1138-45.

40. Nand S, Stock W, Godwin J, Fisher SG. Leukemogenic risk of hydroxyurea therapy in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Am J Hematol. 1996;5(1)2:42-6.

41. Ohara A, Kojima S, Hamajima N, Tsuchida M, Imashuku S, Ohta S, et al. Myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia as a late clonal complication in children with acquired aplastic anemia. Blood. 1997;90(3):1009-13.

42. Gonzalez F, Trujillo JM, Alexanian R. Acute leukemia in multiple myeloma. Ann Intern Med. 1977;86(4):440-3.

43. Tursz T, Flandrin G, Brouet JC, Briere J, Seligmann M. Simultaneous occurrence of acute myeloblastic leukaemia and multiple myeloma without previous chemotherapy. Br Med J. 1974;2(5920):642-3.

44. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976; 33(4):451-8.

45. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med. 1985; 103(4):620-5.

46. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. J Clin Oncol. 1999; 17(12):3835-49.

47. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood. 2002; 100(7):2292-302.

48. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietical and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2008.

49. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the WHO Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114(5):937-51.

50. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2002;3:179-98.

51. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, de Wit E, Bouwman BAM, Erpelinck C, et al. A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia. Cell. 2014;157(2):369-81.

52. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD, et al. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. Cancer Cell. 2014;25(4): 415-27.

53. Soupir CP, Vergilio JA, Dal Cin P, Muzikansky A, Kantarjian H, Jones D, et al. Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: a rare aggressive leukemia with clinicopathologic features distinct from chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. Am J Clin Pathol. 2007;127(4):642-50.

54. Konoplev S, Yin CC, Kornblau SM, Kantarjian HM, Konopleva M, Andreeff M, et al. Molecular characterization of de novo Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma. 2013;54(1):138-44.

55. Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, et al. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. Blood. 2011;117(8): 2348-57.

56. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, Mrözek K, Becker H, Metzeler KH, et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. J Clin Oncol. 2012;30(25):3109-18.

57. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Röck J, Paschka P, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. J Clin Oncol. 2011;29(10):1364-72.

58. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood. 2008;111(8):3941-67.

59. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia. 1995;9(10):1783-6.

60. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). Br J Haematol. 1991;78(3):325-29.

61. Kita K, Nakase K, Miwa H, Masuya M, Nishii K, Morita N, et al. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. Blood. 1992;80(2):470-7.

62. Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Byrd JC, Davey FR, et al. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22; q22). Blood. 1997;90(4):1643-8.

63. Adriaansen HJ, te Boekhorst PAW, Hagemeijer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJM. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. Blood. 1993;81(11):3043-51.

64. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med. 2005;352(3):254-66.

65. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. Blood Rev. 2004;18(2):115-36.

66. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2001;14(3):497-529.

67. Frohling S, Skelin S, Liebisch P, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, et al. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2002;20(10): 2480-5.

68. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CA, Valk PJ, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. Blood. 2008;111(8):4329-37.

69. Mrozek K, Prior TW, Edwards C, Marcucci G, Carroll AJ, Snyder PJ, et al. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 2001;19(9):2482-92.

70. Grimwade D. Screening for core binding factor gene rearrangements in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2002;16(5):964-9.

71. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Honike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia. 1996; 10(12):1911-8.

72. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suziki R, Kodera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood. 2001;97(8):2434-9.

73. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/ enhancer binding protein-(C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. Nat Genet. 2001;27(3):263-70.

74. Caligiuri MA, Schichman SA, Strout MP, Mrözek K, Baer MR, Frankel SR, et al. Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. Cancer Res. 1994;54(2): 370-3.

75. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. Blood. 2006;107(9):3481-5.

76. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgard L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. Blood. 2009;113(18):4179-87.

77. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and post-remission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. Blood. 2000;96(13):4075-4083.

78. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood. 2002;100(13):4325-36.

79. Grimwade D, Hills R, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in AML: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities amongst 5635 younger adults treated in the UK MRC trials. Haematologica. 2009;94(Supl 2):217.Abstract 0533.

80. Mrozek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. Semin Oncol. 2008;358(4):365-77.

81. Schoch C, Haferlach T, Bursch S, Gerstner D, Schnittger S, Dugas M, et al. Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. Genes Chromosomes Cancer. 2002;35(1):20-9.

82. Rücker FG, Bullinger L, Schwaenen C, Lipka DB, Wessendorf S, Fröhling S, et al. Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarraybased molecular characterization. J Clin Oncol. 2006;24(24):3887-94.

83. Breems DA, van Putten WLJ, De Greef GE, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. J Clin Oncol. 2008;26(29):4791-7.

84. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2012; 115(3):453-74.

85. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424-47.

86. Döhner K, Dohner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. Haematologica. 2008;93(7):976-82.

87. Mrozek K, Dohner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. Curr Opin Hematol. 2007;14(2):106-14.

88. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2008;358(18):1909-18.

89. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2012;366:1079-89.

90. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. Blood. 2005;106(12):3733-9.

91. Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, Backer H, Mrózek K, Margeson D, et al. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene-and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary citogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. Blood. 2010;116(18):3622-6.

92. Santos FP, Jones D, Qiao W, Cortes JE, Ravandi F, Estey EE, et al. Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia. Cancer. 2011;117(10):2145-55.

93. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood. 2001;98(6):1752-9.

94. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. Clin Cancer Res. 2005;11(4):1416-24.

95. Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, MarkovaB, Carius B, Brencht A, et al. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. Blood. 2009;113(17):4074-7.

96. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. Blood. 2009;114(12):2386-92.

97. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. Blood. 1999;93(9):3074-80.

98. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger Set al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (*CEBPA*alpha), in acute myeloid leukemia. Nat genet. 2001;27(3):263-70.

99. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, 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. 2010;28(14):2348-55.

100. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. J Clin Oncol. 2004; 22(4):624-33.

101. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ, et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. Hematol J. 2003;4(1):31-40.

102. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, et al. Acquired mutations in the genes encoding IHD1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Blood. 2010; 116(12): 2122-6.

103. Chotirat S, Thongnoppakhun W, Promsuwicha O, Boonthimat C, Auewarakul CU. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. J Hematol Oncol. 2012;5:5.

104. Chou WC, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, et al. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation. Blood. 2010;115(14): 2749-54.

105. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2010;363(25):2424-33.

106. Thol F, Damm F, Ludeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2011;29(21):2889-96.

107. Markova J, Michkova P, Burckova K, Brezinová J, Michalová K, Dohnalová A, et al. Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. Eur J Haematol. 2012;88(2):128-35.

108. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrózek K, et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary citogenetically normal acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2012;30(7):742-50.

109. Renneville A, Boissel N, Nibourel O, Berthon C, Helevaut N, Gardin C, et al. Prgnsotic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in citogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute leukemia French Association. Leukemia. 2012; 26(6):1247-54.

110. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. J Clin Oncol. 2010;28(16):2739-47.

111. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters-an analysis of 3082 patients. Blood. 2008;111(5):2517-37.

112. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K,et al. KITD816 mutations in AML1-ETO–positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. Blood. 2006; 107(5):1791-9.

113. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 2006;24(24):3904-11.

114. Virappane P, Gale R, Hills R, et al. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. J Clin Oncol. 2008;26(33):5429-35.

115. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K, et al. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia:a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 2008;26(28):4595-602.

116. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. Blood. 2009;113(19):4505-11.

117. Renneville A, Boissel N, Zurawski V, Llopis L, Biggio V, Nibourel O, et al. Wilms tumor 1 gene mutations are associated with a higher risk of recurrence in young adults with acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association. Cancer. 2009; 115(16):3719-727.

118. Preudhomme C, Warot-Loze D, Roumier C, Grardel-Duflos N, Garand R, Lai JL, et al. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2_B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. Blood. 2000; 96(8):2862-9.

119. Dicker F, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Trisomy 13 is strongly associated with AML1/RUNX1 mutations and increased *FLT3* expression in acute myeloid leukemia. Blood. 2007;110(4):1308-16.

120. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N EnglJ Med. 2009;360(22):2289-301.

121. Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. Nat Genet. 2009;41(7):838-42.

122. Bullinger L, Dohner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of geneexpression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2004; 350(16):1605-16.

123. Valk PJM, Verhaak RGW, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2004;350(16):1617-28.

124. Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Whitman SP, et al. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 2005;23(36):9234-42.

125. Heuser M, Beutel G, Krauter J, Döhner K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, et al. High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. Blood. 2006;108(12):3898-905.

126. Langer C, Marcucci G, Holland KB, Radmacher MD, Maharry K, Paschka P, et al. Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 2009; 27(19):3198-204.

127. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B study. Blood. 2003; 102(5):1613-8.

128. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, MuellerB. Somatic CEBPA mutations are a frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2008;26(31):5088-93.

129. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. J Clin Oncol. 2010; 28(4):570-7.

130. Stelljes M, Corbacioglu A, Schlenk R, Dohner K, Fruhwald M, Rossig C, et al. Allogeneic stem cell transplant to eliminate germline mutations in the gene for CCAAT-enhancer-binding protein alpha from hematopoietic cells in a family with AML. Leukemia. 2011;25(7):1209-10.

131. Tawana K, Wang J, Renneville A, Bödör C, Hills R, Loveday C, et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. Blood. 2015; 126(10): 1214-23.

132. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, et al. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. Cancer. 2015; 27(5):658-70.

133. Lewinsohn M, Brown AL, Weinel LM, Phung C, Rafidi G, Lee MK, et al. Novel germline DDX41 mutations define families with a longer age of MDS/AML onset and lymphoid malignances. Blood. 2016;127(8):1017-23.

134. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima M, Przychodzen B, Hosono N, et al. Inherited and somatic defects in DDX41 in myeloid neoplasms. Cancer Cell. 2015; 27(5):658-70.

135. Jerez A,Gondek LP, Jankowska AM, Makishima H, Przychodzen B, Tiu RV, et al. Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. J Clin Oncol. 2012;30(12):1343-9.

136. Liew E, Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. Haematologica. 2011;96(10):1536-42.

137. Michaud J, Wu F, Osato M, Cottles GM, Yanagida M, Asou N, et al. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. Blood. 2002;99(4):1364-72.

138. Churpek JE, Garcia JS, Madzo J, Jackson SA, Onel K, Godley LA. Identification and molecular characterization of a novel 3'; mutation in RUNX1 in a family with familial platelet disorder. Leuk Lymphoma. 2010;51(10):1931-5.

139. Holme H, Hossain U, Kirwan M, Walne A, Vulliamy T, Dokal I. Marked genetic heterogeneity in familial myelodysplasia/acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2012;158(2):242-8.

140. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Becker H, Metzeler KA, et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. J Clin Oncol. 2012;30(25):3109-18.

141. Hahn Y, Bera TK, Pastan IH, Lee B. Duplication and extensive remodeling shaped POTE family genes encoding proteins containing ankyrin repeat and coiled coil domains. Gene. 2006;366(2):238-45.

142. Pippucci T, Savoia A, Perrotta S, Pujol-Moix N, Noris P, Castegnaro, et al. Mutations in the 5-UTR of ANKRD26, the ankirin (sic) repeat domain 26 gene, cause an autosomal-dominant form of inherited thrombocytopenia, THC2. Am J Hum Genet. 2011;88(1):115-20.

143. Noris P, Perrotta S, Seri M, Pecci A, Gnan C, Loffredo G, et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. Blood. 2011;117(24):6673-80.

144. Marquez R, Hantel A, Lorenz R, Neistadt B, Wong J, Churpek JE, et al. A new family with a germline ANKRD26 mutation and predisposition to myeloid malignances. Leuk Lymphoma. 2014;55(12):2945-6.

145. Hock H, Meade E, Medeiros S, Schindler JW, Valk PJ, Fujiwara Y, et al. Tel/ETV6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. Genes Dev. 2004;18(19):2336-41.

146. Bohlander SK. ETV6: a versatile player in leukemogenesis. Semin Cancer Biol. 2005; 15(3):162-74.

147. Wall M, Rayeroux KC, MacKinnon RN, Zordan A, Campbell LJ. ETV6 deletion is a common additional abnormality in patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and monosomy 7. Haematologica. 2012;97(12):1933-6.

148. Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, Walsh T, Lee MK, Loeb KR, et al. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. Nat Genet. 2015; 47(2):180-5.

149. Noetzli L, Lo RW, Lee-Sherick AB, Callaghan M, Noris P, Savoia A, et al. Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia. Nat genet. 2015;47(5):535-8.

150. Poggi M, Canault M, Favier M, Turro E, Saultier P, Ghalloussi D, et al. Germline variants in ETV6 underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34+ progenitors. Haematologica. 2017;102(2):282-94.

151. Babushok DV, Bessler M and Alson TS. Genetic Predisposition to myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults. Leuk Lymphoma. 2016;57(3):520-36.

152. Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R, Dombkowski DM, Boyd AS, Orkin SH, et al. Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. Blood. 2005;106(2):477-84.

153. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, Rosenfeld JA, Wildin RS, Cuellar-Rodriguez J, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for *GATA2* in the lymphatic vasculature. Blood. 2012;119(5):1283-91.

154. Pasquet M, Bellanné-Chantelot C, Tavitian S, Prade N, Beaupain B, Larochelle O, et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. Blood. 2013; 121(5):8229-9.

155. Mir MA, Kochuparambil ST, Abraham RS, Rodriguez V, Howard M, Hsu AP, et al. Spectrum of myeloid neoplasms and immune deficiency associated with germline GATA2 mutations. Cancer Medicine. 2015;4(4):490-9.

156. Ostergaard P, Simpson M, Connell F, Steward C, Brice G, Woollard W, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). Nat Genet. 2011;43(10):929-31.

157. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. Blood. 2011;118(10):2653-5.

158. Bodor C, Renneville A, Smith M, Charazac A, Iqbal S, Etancelin P, et al. Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monossomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. Haematologica. 2012;97(6):890-4.

159. Ballew BJ, Yeager M, Jacobs K, Giri N, Boland J, Burdett L, et al. Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. Hum Genet. 2013;132(4):473-80.

160. Ballew BJ, Savage SA. Updates on the biology and management of dyskeratosis congenita and related telomere biology disorders. Expert Rev Hematol. 2013; 6(3): 327-37.

161. Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. Nat Genet. 1998;19(1):32-8.

162. Streffer C. Strong association between cancer and genomic instability. Radiat Environ Biophys. 2010;49(2):125-31.

163. Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, Olaussen KA, Soria JC. Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. Crit Rev Oncol Hematol. 2008;66(2):99-117.

164. Gramatges MM, Alison AB. Short Telomeres: from dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy. Transl Res. 2013;162(6):353-63.

165. Young NS. Bone marrow failure and the new telomere diseases: practice and research. Hematology. 2012;17(Supl 1):S18-21.

166. Armanios M. Syndromes of telomere shortening. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009; 10:45.

167. Yoshida N, Doisaki S, Kojima S. Current management of juvenile myelomonocytic leukemia and the impact of RAS mutations. Paediatr Drugs. 2012;14(3):157-63.

168. Mulero-Navarro S, Sevilla A, Roman AC, Lee DF, D'Souza SL, Pardo S, et al. Myeloid dysregulation in a human induced pluripotent stem cell model of PTPN11-associated juvenile myelomonocytic leukemia. Cell Rep. 2015;13(3):504-15.

169. Perez B, Mechinaud F, Galambrun C, Ben Romdhane N, Isidor B, Philip N, et al. Germline mutations of the CBL gene define a new genetic syndrome with predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia. J Med Genet. 2010;47(10):686-91.

170. Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). J Med Genet. 1996;33(1):2-17.

171. Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. Am J Hum Genet. 2010;87(2):250-7.

172. Roberts I, Alford K, Hall G, Juban G, Richmond H, Norton A, et al. GATA1-mutant clones are frequent and often unsuspected in babies with Down syndrome: identification of a population at risk of leukemia. Blood. 2013;122(24):3908-17.

173. Alford KA, Reinhardt K, Garnett C, Norton A, Bohmer K, von Neuhoff C, et al. Analysis of GATA1 mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia. Blood. 2011;118(8):2222-38.

174. Klusmann JH, Creutzig U, Zimmermann M, Dworzak M, Jorch N, Langebrake C, et al. Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. Blood. 2008;111(6):2991-8.

175. Gamis AS, Alonzo TA, Gerbing RB, Hilden JM, Sorrell AD, Sharma M, et al. Natural history of transient myeloproliferative disorder clinically diagnosed in Down syndrome neonates: a report from the Children's Oncology Group Study A2971. Blood. 2011; 118(26):6752-9.

176. Blink M, Zimmermann M, von Neuhoff C, Reinhardt D, de Haas V, Hasle H, et al. Normal karyotype is a poor prognostic factor in myeloid leukemia of Down syndrome: a retrospective, international study. Haematologica. 2014;99(2):299-307.

177. Bourquin JP, Subramanian A, Langebrake C, Reinhardt D, Bernard O, Ballerini P, et al. Identification of distinct molecular phenotypes in acute megakaryoblastic leukemia by gene expression profiling. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(9):3339-44.

178. Kit salsa MLPA P437. Amsterdan (NL): MRC; 2014 Sept. Package insert. Lot A1-1013.

179. Johnsen JM, Nickerson DA, Reiner AP. Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. Blood. 2013;122(19):3268-75.

180. Filipescu D, Naughtin M, Podsypanina K, Lejour V, Wilson L, Gurard-Levin ZA, et al. Essential role for centromeric factors following p53 loss and oncogenic transformation. Genes Dev. 2017;31(5):463-80.

181. Toompuu M, Kärblane K, Pata P, Truve E, Sarmiento C. ABCE1 is essential for S phase progression in human cells. Cell Cycle. 2016;15(9):1234-47.

182. Schmutz J, Martin J, Terry A, Couronne O, Grimwood J, Lowry S, et al. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. Nature. 2004; 431(7006):268-74.

183. Reed DR, Zhu G, Breslin PA, Duke FF, Henders AK, Campbell MJ. The perception of quinine taste intensity is associated with common genetic variants in a bitter receptor cluster on chromosome 12. Hum Mol Genet. 2010;19(21):4278-85.

184. Pfister AS, Tanneberger K, Schambony A, Behrens J. AMER2 protein is a novel negative regulator of Wnt/β-catenin signaling involved in neuroectodermal patterning. J Biol Chem. 2012;287(3):1734-41.

185. Ro M, Park J, Nam M, Bang HJ, Yang JW, Choi KS, et al. Associations between single-nucleotide polymorphism in the FNDC3A and autism spectrum disorder in a Korean population. Psychiatry Res. 2013;209(2):246-8.

186. Witteveen JS, Willemsen MH, Dombroski TC, van Bakel NH, Nillesen WM, van Hultein JA, et al. Haploinsufficiency of MeCP2-interacting transcriptional co-repressor SIN3A causes mild intellectual disability by affecting the development of cortical integrity. Nat Genet. 2008;48(8):877-87.

187. Yoo M, Carromeu C, Kwon O, Muotri A, Schachner M. The L1 adhesion molecule normalizes neuritogenesis in Rett syndrome-derived neural precursor cells. Biochem Biophys Res Commun. 2017;494(3-4):504-10.

188. Jo DH, Lee K, Kim JH, Jun HO, Kin Y, Cho YL, et al. L1 increases adhesion-mediated proliferation and chemoresistance of retinoblastoma. Oncotarget. 2017;8(9):15441-52.

189. Jiang Y, Sheng H, Meng L, Meng L, Yue H, Li B, et al. RBM5 inhibits tumorigenesis of gliomas through inhibition of Wnt/β-catenin signaling and induction of apoptosis. World J Surg Oncol. 2017;15(1):9.

190. Weber JJ, Golla M, Guaitoli G, Wanichawan P, Hayer SN, Hauser S, et al. A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. Brain. 2017;140(5):1280-99.

191. Tian Y, Tian X, Han X, Chen Y, Song CY, Jiang WJ, et al. ABCE1 plays an essential role in lung cancer progression and metastasis. Tumour Biol. 2016;37(6):8375-82.

192. Qu X, Zhang L. Effect of ABCE1-silencing gene, transfected by electrotransfer, on the proliferation, invasion, and migration of human thyroid carcinoma SW579 cells. Genet Mol Res. 2015;14(4):14680-9.

193. Li XR, Yang LZ, Huo XQ, Wang Y, Yang QH, Zhang QQ. Effects of silencing the ATP-binding cassette protein E1 gene by electroporation on the proliferation and migration of EC109 human esophageal cancer cells. Mol Med Rep. 2015;12(1):837-42.

194. Huang W, Zhang H, Hao Y, Xu X, Zhai Y, Wang S, et al. A Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphism in the HJURP Gene Associated with Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma among Chinese. PLoS One. 2016;11(2):e0148618.

195. Montes de Oca R, Gurard-Levin ZA, Berger F, Rehman H, Martel E, Corpet A, et al. The histone chaperone HJURP is a new independent prognostic marker for luminal a breast carcinoma. Mol Oncol. 2015; 9(3):657-74.

196. Pechriggl EJ, Concin N, Blumer MJ, Bitsche M, Zwierzina M, Dudas J, et al. L1CAM in the Early Enteric and Urogenital System. J Histochem Cytochem. 2017;65(1):21-32.

197. Zhang J, Yang F, Ding Y, Zhen L, Han X, Jiao F, et al. Overexpression of L1 cell adhesion molecule correlates with aggressive tumor progression of patients with breast cancer and promotes motility of breast cancer cells. Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8(8):9240-7.

198. Grage-Griebenow E, Jerg E, Gorys A, Wicklein D, Wesch D, Freitag-Wolf S, et al. L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression. Mol Oncol. 2014;8(5):982-97.

199. Abdel Azim S, Duggan-Peer M, Sprung S, Reimer D, Fiegl H, Soleiman A, et al. Clinical impact of L1CAM expression measured on the transcriptome level in ovarian cancer. Oncotarget. 2016;7(24):37205-14.

200. Lv XJ, Du YW, Hao YQ, Su ZZ, Zhang L, Zhao LJ, et al. RNA-binding motif protein 5 inhibits the proliferation of cigarette smoke-transformed BEAS-2B cells through cell cycle arrest and apoptosis. Oncol Rep. 2016;35(4):2315-7.

201. Zhao L, Li R, Shao C, Li P, Liu J, Wang K. 3p21.3tumor suppressor gene RBM5 inhibits growth of human prostate cancer PC-3 cells through apoptosis. World J Surg Oncol. 2012;10:247.

202. Rintala-Maki ND, Abrasonis V, Burd M, Sutherland LC. Genetic instability of RBM5/LUCA-15/H37 in MCF-7 breast carcinoma sublines may affect susceptibility to apoptosis. Cell Biochem Funct. 2004;22(5):307-13.

203. Blount JR, Tsou WL, Ristic G, Burr AA, Ouyang M, Galante H, et al. Ubiquitin-binding site 2 of ataxin-3 prevents its proteasomal degradation by interacting with Rad23. Nat Commun. 2014;5:4638-62.

APÊNDICE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Identificação de mutações do tipo 1, tipo 2 e tipo 3 em estudos genéticos de Leucemia mieloide aguda (LMA)

Esclarecimento:

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo clínico sobre a identificação de mutações genéticas em LMA em pacientes acompanhados no Hospital Federal da Lagoa, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Instituto Nacional de Câncer e Hemorio.

Antes de concordar em participar deste estudo, é importante que você leia e compreenda este documento. Ele fala da sua doença, do propósito do estudo e dos procedimentos que serão utilizados. Se você concordar em participar, você receberá uma cópia deste documento, com o nome e assinatura dos pesquisadores responsáveis.

A LMA é um câncer das células do sague, mais especificamente dos glóbulos brancos que se caracteriza pela rápida proliferação de células anormais e malignas, os blastos, que não amadurecem, não desempenham sua função de defesa no organismo e ainda se acumulam na fábrica do sangue, a medula óssea, interferindo na produção normal de outras células do sangue. A leucemia mieloide aguda é uma doença com potencial de cura quando se faz tratamento quimioterápico intenso, mas apenas uma pequena parcela dos doentes são curados só com esse tratamento. Usualmente o tratamento inicia com quimioterapia, que tem como objetivo combater a doença e acabar com as células cancerígenas, o que é chamado de remissão completa, mas grande parte dos doentes necessita ser submetidos a um transplante de medula óssea para alcançar a cura. Existem muitos estudos sobre a influência das alterações genéticas da célula cancerígena na resposta ao tratamento e na sobrevida.

Nós queremos identificar alterações específicas no gene da célula leucêmica e estudar se essas alterações na célula doente tem alguma relação com a resposta ao tratamento e sobrevida dos pacientes.

Para participar deste estudo, você terá apenas que permitir que sejam realizados exames no material da medula óssea que foi coletado no diagnóstico da sua doença. Você não será submetido a nenhum outro exame ou tratamento, além dos indicados de forma rotineira pelo seu médico para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da sua doença, assim como seu tratamento e acompanhamento sempre serão realizados no hospital em que você é atendido. O material coletado da sua medula óssea ficará armazenado no laboratório do CEMO como é feito de rotina com qualquer paciente que tem material de medula óssea enviado ao laboratório para investigação diagnóstica.

rubrica: _____ (paciente) rubrica: _____ (pesquisador)

Depois, através dos dados do seu prontuário, a pesquisadora principal e o colaborador de cada centro acompanharão o seu caso, registrando dados clínicos, do tratamento e do comportamento da doença. Os resultados de exames realizados no material da sua medula óssea serão enviados ao seu médico assistente, que poderá lhe fornecer esses resultados sempre que solicitado.

As informações médicas serão confidenciais. Em nenhum momento a sua identificação será divulgada: esta é uma informação sigilosa, restrita aos pesquisadores.

Seus registros médicos originais podem ser revisados pelos pesquisadores e/ou seus representantes e pelos Comitês de Ética de cada hospital com o objetivo de verificar os procedimentos do estudo clínico. Estes registros serão arquivados e analisados em computador. Você não precisa participar deste estudo para ser tratado da sua doença. Sua participação é voluntária e restringe-se a autorização para análise do material de medula óssea que foi coletado no diagnóstico da sua doença e para coleta de dados no seu prontuário.

Caso você não queira participar do estudo, nada será modificado no seu tratamento e no seu acompanhamento. Caso você não queira participar nesse momento, mas depois decida participar, basta informar a pesquisadora responsável sobre sua decisão, que, em qualquer ocasião, até o término do estudo, você poderá ser incluído.

Da mesma forma, se você aceitar participar, mas depois decidir que não quer mais estar incluído no estudo, há a possibilidade de solicitar à pesquisadora responsável a retirada da sua participação, e sua decisão será respeitada, a qualquer momento, até o término do estudo.

Os resultados do estudo serão divulgados por meio de artigos científicos e exposição em congressos e seminários na área médica, sempre com sigilo sobre a identificação dos pacientes. Estes resultados estarão disponíveis também aos pacientes participantes, sempre que requisitados à pesquisadora.

Em qualquer etapa do estudo, você poderá ter acesso à pesquisadora responsável, Renata Lyrio Rafael Baptista, que pode ser encontrada no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, telefone 2868-8402, Avenida 28 de Setembro, 77. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPE, situado na Avenida 28 de setembro, 77-Vila Isabel.

Consentimento

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo acima citado.

Eu discuti com o (a) Dr. (a) _____ sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias da confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso e tratamento hospitalar quando necessário.

rubrica: _____ (paciente) rubrica: _____ (pesquisador)

Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nessa instituição.

_____

Nome do paciente

_____ Data: _____

Assinatura do paciente

_____ Data: _____

Assinatura do pesquisador

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UERJ

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PEDRO ERNESTO/
UNIVERSIDADE DO ESTADO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de mutações do tipo 1, tipo 2 e tipo 3 em estudos genéticos de Leucemia mieloide aguda (LMA)

Pesquisador: Renata Lyrio Rafael Baptista

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 12624113.6.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 346.538

Data da Relatoria: 03/07/2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os esclarecimentos necessários à compreensão da pesquisa por parte deste Colegiado foram atendidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados e as solicitações do CEP atendidas.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ANEXO B – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do INCA

Memo 339/14-CEP-INCA Rio de Janeiro, 27 de junho de 2014.

A(o): Renata Lyrio Rafael Baptista

Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 137/13: (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Título do estudo: Identificação de mutações do tipo 1, tipo 2 e tipo 3 em estudos genéticos de Leucemia mieloide aguda (LMA)

CAAE: 12624113.2.3002.5274

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, na condição de CEP da Instituição Coparticipante, analisou e aprovou a Emenda 2 do estudo intitulado: "Identificação de mutações do tipo 1, tipo 2 e tipo 3 em estudos genéticos de Leucemia mieloide aguda (LMA)", em 27 de junho de 2014.

O Pesquisador atendeu às pendências listadas no Parecer Consubstanciado CEP-INCA de número 599.428, datado de 11 de abril de 2014, através de Emenda 2 - aprovada anteriormente pelo CEP da Instituição Proponente (Parecer Consubstanciado do CEP-HUPE/UERJ número 686.524, de 13 de junho de 2014).

Conforme disposto na Resolução CNS 466/2012, cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais (apresentado durante a pesquisa demonstrando fatos relevantes e resultados parciais de seu desenvolvimento) e final (apresentado após o encerramento da pesquisa).

Assim, para o acompanhamento do desenvolvimento dos projetos, solicitamos que o(a) pesquisador(a) providencie o mais breve possível os relatórios aqui solicitados.