

Índice

Lista de abreviaturas.....	4
Resumo.....	11
Abstract	12
Introdução.....	13
Materiais e Métodos	15
Capítulo I - Enquadramento da LMA: da fisiopatologia à estratificação do risco dos doentes	16
Fisiopatologia da LMA.....	16
Classificação.....	18
Diagnóstico.....	20
Morfologia celular	20
Imunofenotipagem	22
Citogenética	22
Genética Molecular.....	22
Outros estudos complementares/procedimentos.....	23
Prognóstico	23
Capítulo II - Anomalias moleculares na LMA: impacto no prognóstico.....	25
Mutações nos sinalizadores celulares	25
<i>FLT3</i>	25
Mutações ITD do gene <i>FLT3</i>	29
Mutações TKD do gene <i>FLT3</i>	37
Mutações nos fatores de transcrição mielóides	38
<i>CEBPA</i>	38
<i>RUNX 1</i>	47
Mutações no gene que codifica a nucleofosmina	56
<i>NPM1</i>	56
Mutações em genes associados à metilação do DNA.....	64

<i>TET 2</i>	64
<i>IDH1 E IDH2</i>	70
<i>DNMT3A</i>	77
Mutações em genes modificadores da cromatina.....	86
<i>ASXL1</i>	86
<i>MLL-PTD</i>	95
Discussão e Conclusão.....	102
Agradecimentos.....	111
Referências Bibliográficas.....	112

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação da LMA segundo a OMS.....	18
Tabela 2. Grupos de risco da LMA.....	24
Tabela 3. Impacto do <i>ratio alélico</i> na mutação ITD do gene <i>FLT3</i> no prognóstico dos doentes com LMA.....	31
Tabela 4. Impacto das mutações <i>CEBPAsm</i> e <i>CEBPA^{dm}</i> no prognóstico dos doentes com LMA.....	43
Tabela 5. Impacto das mutações somáticas <i>RUNX1</i> no prognóstico dos doentes com LMA..	52
Tabela 6. Impacto das mutações <i>ASXL1</i> no prognóstico dos doentes com LMA.....	90
Tabela 7. Impacto das mutações <i>MLL-PTD</i> no prognóstico dos doentes com LMA.....	98
Tabela 8. Resumo sobre o impacto no prognóstico das principais anomalias moleculares na LMA.....	108
Tabela 9. Impacto de outros marcadores moleculares no prognóstico dos doentes com LMA.....	110

Índice de Ilustrações

Ilustração 1. Análise histoquímica da morfologia celular na LMA.....	21
--	----

Ilustração 2. O recetor FLT3.....	26
Ilustração 3. Vias de sinalização ativadas pelo recetor FLT3.....	28
Ilustração 4. Estrutura das isoformas da proteína CEBPA.....	39
Ilustração 5. Mecanismos envolvidos na regulação da expressão da proteína CEBPA.....	41
Ilustração 6. Estrutura da proteína RUNX1.....	48
Ilustração 7. Estrutura da nucleofosmina.....	57
Ilustração 8. Estrutura da proteína TET2.....	64
Ilustração 9. Interação entre a IDH, o TET2 e o DNMT3A na regulação da expressão génica	72
Ilustração 10. Estrutura da família de proteínas DNMT.....	78
Ilustração 11. O complexo tetramérico DNMT3L–DNMT3A–DNMT3A–DNMT3L.....	81
Ilustração 12. Estrutura da proteína ASXL1 e tipos de proteínas mutantes.....	86
Ilustração 13. Estrutura da proteína MLL <i>wild-type</i> e MLL-PTD.....	96

Lista de abreviaturas

5mc - 5-metilcitosina

5hmc - 5-hidroximetilcitosina

ABC - *adenosine triphosphate-binding cassette*

ASXL1 - gene *additional sex combs like-1*

ASXL1 - proteína *additional sex combs like-1*

BAALC - gene *Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic*

BAP1 - *BRCA1 associated protein-1*

BCL-2 - proteína *B-cell lymphoma 2*

BCRP - *breast cancer resistance protein*

BO - biópsia medular óssea

bZIP - *Basic Leucine Zipper*

CBF β - *Core-Binding Factor subunit beta*

CBP - *CREB binding protein*

CEBPA - gene *CCAAT/enhancer binding protein- α*

CEBPA - proteína *CCAAT/enhancer binding protein- α*

Crm1 - *chromosome region maintenance 1*

CSF-1R - *colony stimulating factor 1 receptor*

DSBH - *double-stranded β -helix*

DFS - sobrevivência livre de doença

D^m - double mutation

DNA - Deoxyribonucleic Acid

DNMT 1- DNA Methyltransferase 1

DNMT3A - gene DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Alpha

DNMT3A - proteína DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Alpha

DNMT3B - proteína DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Beta

DRM - doença residual mínima

EFS - sobrevivência livre de eventos

e.g. - exempli gratia

ELN - European LeukemiaNet

ERG - gene ETS related gene 1

ETO - gene Eight-twenty-one

EVI 1 - gene Ecotropic Virus Integration Site 1 Protein Homolog

EZH2 - proteína Enhancer of zeste homolog 2 methyltransferase

EZH2 - gene Enhancer of zeste homolog 2 methyltransferase

FAB - French-American-British AML Classification

Fbw7 γ - F-box and WD-40 domain-containing protein 7 gamma

FISH - fluorescence in situ hybridization

FLT3 - gene fms-related tyrosine kinase 3

FLT3 - proteína fms-related tyrosine kinase 3

FLT3L - ligando do FLT3

GATA 1 - gene *GATA Binding Protein 1*

GATA 2 – gene *GATA Binding Protein 2*

G-CSFR - *granulocyte colony-stimulating factor receptor*

Gr-1 - *granulocyte antigen-1*

HEXIM1 - *hexamethylene bis-Acetamide inducible protein 1*

HOXA- gene *Homeobox A*

HOXB - gene *Homeobox B*

HP1 α /CBX5 - *Heterochromatin Protein 1 Alpha*

HR - *Hazard Ratio*

ID1 - gene *Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein*

IDH 1 - gene *Isocitrate dehydrogenase 1*

IDH 1 - enzima isocitrato desidrogenase 1

IDH 2 - gene *Isocitrate dehydrogenase 2*

IDH 2 - enzima isocitrato desidrogenase 2

IDH1^{R132}- mutação por substituição no codão 132 do gene *IDH1*

IDH1^{105GGT} - SNP rs11554137 do gene *IDH1*

IDH2^{R140} - mutação por substituição no codão 140 do gene *IDH2*

IDH2^{R172}- mutação por substituição no codão 172 do gene *IDH2*

IL-6R - *Interleukin-6 receptor*

IRF1 - *interferon regulatory factor 1*

ITD - *Internal tandem duplication*

KIT - gene *KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase*

JAK/STATs - *Janus kinase surfasse receptor/Signal Transducer and Activator of Transcription protein pathway*

LDH - desidrogenase do lactato

LLA - Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA - Leucemia Mieloblástica Aguda

LMA CN - *Cytogenetically normal acute myeloid leukemia (cariótipo normal)*

^m – mutante

Mac-1 - Macrophage-1 antigen

miRNAs - microRNA

MLL/ KMT2A - gene mixed lineage leukemia/ lysine (K)-specific methyltransferase 2A

MLL - proteína *mixed lineage leukemia*

MLL-PTD - mixed lineage leukemia gene partial tandem duplication

MLL-PTD - proteína *mixed lineage leukemia gene partial tandem duplication*

MMP-9 - metaloproteinase de matriz 9

MNI - gene meningioma (disrupted in balanced translocation) 1

MPO - mieloperoxidase

MYH11 - gene Myosin, Heavy Chain 11, Smooth Muscle

MYST3 - *histone acetyltransferase 3*

mRNA - RNA mensageiro

NADP⁺ - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NCOA1 - *Nuclear receptor coactivator 1*

NEK2A - *NIMA-Related Kinase 2A*

NES - *nuclear export signal*

NF- κ B - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NLS - *nuclear localization signal*

NoLS - *nucleolar localization signal*

NPM1 - gene *nucleophosmin*

NPM1 - proteína nucleofosmina

NSE - esterase não específica

MO - medula óssea

OMS - Organização Mundial de Saúde

OR - *Odds Ratio*

OS - Sobrevivência global

p15 - *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*

p21 - *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*

p53 - *tumor protein p53*

PAS - ácido periódico-Schiff

PDGFR - *Platelet-derived growth factor receptor*

PHD - *plant homeodomain*

PHF6 - *gene PHD Finger Protein 6*

PI3K/AKT - *phosphatidylinositide 3-kinase/ Protein kinase B pathway*

PLC γ - *phospholipase C gamma*

PML - *gene promyelocytic leukemia*

PPAR- γ - *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PRC1 - *Polycomb Repressive complex 1*

PRC2 - *Polycomb Repressive complex 2*

PTD - *partial tandem duplication~*

PTPN11 - *gene protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*

PWWP - *domínio prolina-triptofano-triptofano-prolina*

RA - *Ratio alélico*

RAR - *retinoic acid receptor*

RAS/MAPK - *RAS/mitogen-activated protein kinases pathway*

RC - *Remissão completa*

RHD - *Runt homology domain*

RNA - *Ribonucleic acid*

RUNX1 - *gene Runt-related transcription factor 1*

RUNX1 - *proteína Runt-related transcription factor 1*

SBB -negro do Sudão B

SCFR - *Mast/stem cell growth factor receptor* ou *tyrosine-protein kinase Kit*

sm - *single mutation*

SMD - síndrome mielodisplásica

snoRNPs - *nucleolar ribonucleoprotein particles*

SP - sangue periférico

SPI-1 - gene *Spi-1 proto-oncogene*

SUZ12 - *polycomb repressive complex 2 subunit*

TACEH - transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas

TAD - *transcriptional activation domain*

TCF/LEF1 - gene *Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1*

TET - *ten eleven translocation*

TET2 - gene *Tet methylcytosine dioxygenase 2*

TET2 - proteína *Tet methylcytosine dioxygenase 2*

TKD - *tyrosine-kinase domain*

TP 53 - gene *tumor protein p53*

TRX - *trithorax*

WT1 - gene *Wilms Tumor 1*

WT - *wild-type*

Resumo

A Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) é uma neoplasia maligna caracterizada pela infiltração da medula óssea (MO), sangue e outros tecidos por células clonais e imaturas do sistema hematopoiético. Trata-se de uma neoplasia associada a um prognóstico geralmente adverso, dependente de múltiplos fatores, em particular das características citogenéticas e moleculares das células neoplásicas. Nas últimas décadas, foram descobertas dezenas de novas mutações em genes essenciais em várias etapas da carcinogénese na LMA, bem como alterações da expressão de proteínas-chave e mecanismos epigenéticos anómalos. Estas alterações podem afetar o prognóstico dos doentes, sendo que o seu impacto é, na maioria dos casos, ainda desconhecido. O objetivo deste artigo de revisão consistiu em clarificar o impacto das principais alterações moleculares no prognóstico dos doentes com LMA, de forma a perceber se a sua identificação permite estratificar melhor o risco dos doentes e, desta forma, pode ajudar a delinear a estratégia terapêutica mais adequada. O *ratio* alélico elevado nas mutações ITD do gene *FLT3* e as mutações dos genes *RUNX1* e *DNMT3A* contribuem, de forma independente, para um pior prognóstico nos doentes com LMA. As mutações dos genes *NPM1* e *CEBPA^{dm}* contribuem, de forma independente, para um prognóstico mais favorável nos doentes com LMA. As mutações MLL do gene *PTD*, as mutações TKD do gene *FLT3* e as mutações dos genes *TET2* e *ASXL1* parecem estar associadas a pior prognóstico na LMA, apesar de o seu valor como variáveis independentes de risco não estar ainda bem estabelecido. O valor prognóstico definitivo das mutações dos genes *IDH1* e *IDH2* nos doentes com LMA permanece desconhecido. Conclui-se que a avaliação do *ratio* alélico nas mutações ITD do *FLT3* e a presença das mutações *CEBPA^{dm}*, *RUNX1* e *DNMT3A* podem permitir refinar o modelo atualmente proposto para estratificação do risco dos doentes, com potenciais vantagens na previsão mais fidedigna do seu prognóstico e na selecção das estratégias terapêuticas mais adequadas a cada doente.

Palavras-chave: Leucemia Mieloblástica Aguda, mutações, genes, prognóstico, tratamento

Abstract

Acute Myeloblastic Leukemia (AML) is a malignant neoplasm characterized by infiltration of the bone marrow (BM), blood and other tissues by clonal and immature cells of the hematopoietic system. This neoplasm is generally associated with an adverse prognosis, which depends on multiple factors, in particular cytogenetic and molecular characteristics of the tumor cells. In the last decades, dozens of new mutations were discovered in genes essential in various stages of leukemogenesis, as well as abnormalities in the expression of key proteins and abnormal epigenetic regulation. These changes may affect the prognosis of patients with AML, but their prognostic impact is, in the majority of cases, still unknown. The aim of this review article was to clarify the impact of the most important molecular abnormalities in the prognosis of patients with AML, in order to understand if their identification allows for a better risk stratification of patients, thus helping the clinicians to choose the most adequate therapeutic strategy for the patient. Mutations in *RUNX1*, *DNMT3A* and a high allelic ratio in *FLT3-ITD* mutations are independent prognostic factors to a worse outcome in patients with AML. *NPM1* and *CEBPA^{dm}* mutations are independent prognostic factors to a more favorable outcome in patients with AML. *MLL-PTD*, *FLT3-TKD*, *TET2* and *ASXL1* mutations appear to be associated with a worse prognosis in AML. However, their value as independent prognostic factors has not been well established yet. The prognostic impact of mutations of *IDH1* and *IDH2* genes in patients with AML remains unknown. We conclude that the assessment of the allelic ratio in *FLT3-ITD* mutations and the presence of *CEBPA^{dm}*, *RUNX1* and *DNMT3A* mutations can be used to refine the currently proposed model for risk stratification of patients with AML, with potential benefits in more accurate prediction of prognosis, and thus in selection of the most appropriate therapeutic strategies for each patient.

Keywords: Acute Myeloblastic Leukemia, mutations, genes, prognosis, treatment

Introdução

A Leucemia Mieloblástica Aguda é uma neoplasia maligna caracterizada pela infiltração da medula óssea, sangue periférico (SP) e outros tecidos por células clonais e imaturas do sistema hematopoiético, com capacidade proliferativa autónoma e com diferenciação anómala, constituindo 20% das células nucleadas presentes na MO ou sangue periférico. ⁽¹⁾

Trata-se da forma mais frequente de leucemia aguda em adultos, afetando três a quatro indivíduos em cada cem mil, em todo o mundo. Apesar de a maioria dos doentes responder à quimioterapia, o prognóstico é adverso, com taxas médias de sobrevivência global aos 5 anos inferiores a 50%, devido sobretudo à recidiva da doença. Dada a sua incidência e taxa de mortalidade, é fundamental o conhecimento aprofundado da patogénese da doença e o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas para o seu tratamento. ⁽²⁾

Ao longo das últimas décadas constatou-se que a resposta à terapêutica nos doentes com LMA é francamente heterogénea. A identificação dos doentes que provavelmente irão responder à terapêutica convencional e dos doentes refratários é um procedimento fundamental na avaliação inicial dos mesmos. Assim, a estratificação prognóstica destes doentes pode permitir uma adaptação da terapêutica ao risco individual. ^(3,4)

A descoberta de novas mutações genéticas na LMA, em particular dos genes *fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3)*, *nucleophosmin (NPM1)* e *CCAAT/enhancer binding protein- α (CEBPA)*, e a constatação de que a sua presença em doentes com LMA se correlacionava significativamente com o seu prognóstico, levou a que a pesquisa destas mutações tivesse sido recomendada na estratificação do prognóstico de doentes pela *European LeukemiaNet (ELN)*, e, mais tarde, também pela Organização Mundial de Saúde (OMS). ⁽¹⁾ A incorporação destas mutações permitiu assim refinar a estratificação do risco dos doentes com LMA. ^(3,4)

Estudos posteriores revelaram a presença de dezenas de mutações genéticas com potencial impacto no prognóstico dos doentes com LMA. O verdadeiro significado destas mutações no prognóstico e a sua aplicabilidade na estratificação do risco na prática clínica permanecem ainda, na maioria dos casos, controversos. ^(2,4)

Com este trabalho pretende-se identificar o impacto das principais alterações moleculares no prognóstico dos doentes com LMA, nomeadamente das mutações ITD do gene *FLT3*, TKD do gene *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL-PTD*, *RUNX1*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* e *TET2*. Descrevem-se também sucintamente as suas repercussões na fisiopatologia da doença e a eficácia de algumas terapêuticas atuais/em desenvolvimento nos diferentes subgrupos de doentes portadores destas alterações moleculares.

Materiais e Métodos

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura utilizando a base de dados *Pubmed* entre maio de 2015 e outubro de 2015. Foram utilizadas várias sequências de palavras, incluindo “Acute Myeloid Leukemia” e “*CEPBA*”, “*NPM1*”, “*FLT3-ITD*”, “*FLT3-TKD*”, “*RUNX1*”, “*ASXL1*”, “*DNMT3A*”, “*MLL-PTD*”, “*IDH*” ou “*TET2*” e “*physiopathology*”, “*prognostic*”, “*treatment*” ou “*outcome*”, recorrendo aos termos *MeSH* adequados e aplicando os filtros necessários à obtenção da informação pretendida. A pesquisa foi restringida a artigos em Português e Inglês, entre os anos 2000 e 2015, tendo sido incluídos alguns artigos anteriores ao ano de 2000 quando a relevância destes assim o justificou. Foram excluídos os artigos referentes à população pediátrica com LMA. Foram selecionados para a elaboração deste trabalho os artigos considerados mais relevantes para o tema em estudo, pela análise sumária do *abstract* de cada artigo. Procedeu-se ainda à análise e inclusão nesta revisão de alguns artigos e capítulos de livros que poderiam escapar aos filtros acima descritos, que foram consultados tendo em conta as referências bibliográficas citadas nos artigos inicialmente pesquisados.

Capítulo I - Enquadramento da LMA: da fisiopatologia à estratificação do risco dos doentes

Fisiopatologia da LMA

A patogénese da LMA é um processo complexo, influenciado por múltiplos fatores e mecanismos, ainda não totalmente elucidados. Tal como noutros tipos de neoplasias, o surgimento da LMA está associada a mutações genéticas, que conferem a uma determinada população de células estaminais hematopoiéticas capacidades proliferativas anormais, associadas geralmente a perda de diferenciação, bem como resistência à apoptose, que parecem ser um evento-chave na carcinogénese.^(5,6)

A LMA é uma neoplasia geneticamente heterogénea. As mutações associadas à LMA são subdivididas em dois grandes subgrupos, compreendendo as alterações cromossómicas (ocorrem em 55% dos casos de LMA, constituindo na sua maioria translocações) e as alterações moleculares (geralmente mutações somáticas).⁽¹⁾

Anteriormente, consideravam-se dois tipos fundamentais de mutações no surgimento e promoção da carcinogénese leucémica: mutações de classe I e classe II (*Two-hit model hypothesis*). As mutações de classe I envolvem genes associados a transdução de sinal, quer através da ativação constitutiva de proteínas com função de tirosina-cinase ou desregulação de transdutores de sinal (*FLT3-ITD*, *PTPN11 - protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*, *RAS*, *KIT - proto-oncogene receptor tyrosine kinase*,...), conferindo uma vantagem proliferativa ou resistência à apoptose. As mutações de classe II envolvem genes associados a fatores de transcrição (inclui anomalias citogenéticas que originam genes de fusão - *RUNX1/ETO*, *CBFβ/MYH11* e *PML/RARα* – e anomalias moleculares - *RUNX1 - Runt-related transcription factor 1*, *CEBPA* e *MLL - mixed lineage leukemia*) que parecem contribuir para o bloqueio da diferenciação mielóide e para a autorrenovação do clone de células neoplásicas. Este modelo explica que mutações apenas num gene são insuficientes

para originar LMA, considerando-se atualmente que o desenvolvimento deste tipo de leucemia aguda está associado à incidência cumulativa de mutações em diferentes genes.^(5,6)

Contudo, a descoberta recente de mutações em genes associados a mecanismos de regulação epigenética (incluindo metilação do DNA e modificação de histonas) em doentes com LMA veio alterar este paradigma, visto que muitas destas mutações não se inserem nas classes I e II, acima descritas. Para além disto, constata-se que determinadas mutações parecem contribuir para o surgimento de LMA apenas em determinada fase do desenvolvimento neoplásico, sugerindo que o potencial carcinogénico é dependente do estado de maturação e desenvolvimento das células hematopoiéticas.⁽⁶⁾

Assim, o *Two-hit model hypothesis* parece constituir um modelo demasiado simplista da complexa fisiopatologia desta doença.⁽⁶⁾ Para além disto, parece ser atualmente evidente que determinadas mutações podem cooperar entre si, produzindo efeitos diferentes em função da presença ou ausência de outros tipos de mutações coadjuvantes. Da mesma forma, as modificações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA (*Deoxyribonucleic Acid*), modificações pós-tradução de histonas e a modulação de miRNAs - microRNAs (*RNA – ribonucleic acid*), que constituem mecanismos não mutantes envolvidos na carcinogénese, também podem contribuir para a heterogeneidade molecular da doença, e para a variação interindividual da resposta ao tratamento na LMA.⁽⁴⁾

Alterações do microambiente da MO (medula óssea) parecem ser igualmente importantes na fisiopatologia da LMA. As células mesenquimais da MO apresentam geralmente as mesmas alterações citogenéticas das células clonais neoplásicas. Alguns estudos demonstraram que as alterações no microambiente da MO estão associadas à produção aumentada de proteínas anti-apoptóticas (*BCL-2 - B-cell lymphoma 2 protein*, e.g.), contribuindo para a inibição da apoptose dos blastos de LMA. Da mesma forma, a LMA parece estar associada a um aumento da densidade microvascular, em possível associação com a sobreprodução de fatores angiogénicos. Foi também descrita nesta neoplasia a

sobreexpressão de metaloproteinases (particularmente MMP-9 – metaloproteinase de matriz 9), que parece estar associada à clivagem de ligandos de membrana como o KIT, afetando as vias de proliferação e renovação neoplásicas. O padrão de expressão de citocinas no microambiente tumoral poderá ter também impacto no processo de carcinogênese.⁽⁷⁾

Alguns fatores foram implicados na etiopatogênese da LMA, destacando-se fatores hereditários (maior propensão para LMA na síndrome de Down e outras aneuploidias, doenças da reparação deficitária do DNA – anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, entre outros, síndrome de Kostmann - neutropenia congênita e mutações germinais de genes como o *RUNX1*), exposição à radiação (acidentes nucleares e potencial efeito da irradiação terapêutica conjunta com a quimioterapia), exposição a químicos (sobretudo o benzeno) e fármacos (agentes alquilantes e inibidores da topoisomerase II, e.g.).⁽⁸⁾

Classificação

A classificação dos diferentes tipos de LMA, tal como proposto pela OMS em 2008 (em detrimento da antiga classificação FAB – *French-American-British classification*), baseia-se nas características clínicas, na caracterização morfológica das células em amostras de MO ou SP, na análise da expressão de marcadores citoplasmáticos e de superfície celular por citometria de fluxo (imunofenotipagem), na identificação de alterações citogenéticas recorrentes e, mais recentemente, de alterações moleculares.^(1,9) A classificação proposta pela OMS é apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação da LMA segundo a OMS

Categorias
LMA com alterações genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LAP com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>

LMA com t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
LMA com t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i>
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLI</i>
Entidade provisória: LMA com mutação <i>NPM1</i>
Entidade provisória: LMA com mutação <i>CEBPA</i>
LMA com alterações associadas a mielodisplasia
Neoplasias mielóides associadas à terapêutica
Leucemia Mielóide Aguda sem outra especificação (NOS)
LMA com diferenciação mínima
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia aguda monoblástica/monocítica
Leucemia eritróide aguda
Leucemia eritróide pura
Eritroleucemia, eritróide/mielóide
Leucemia aguda megacarioblástica
Leucemia basofílica aguda
Panmielose aguda com mielofibrose
Sarcoma mielóide (tumor mielóide extramedular; sarcoma granulocítico; cloroma)
Proliferações mielóides associadas a síndrome de Down
Mielopoiese anormal transitória (sin.: distúrbio mieloproliferativo transitório)
Leucemia mielóide associada a S. de Down.
Neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitóides
Leucemias agudas de linhagem ambígua
Leucemia aguda indiferenciada
Leucemia aguda de fenótipo misto com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> ¹
Leucemia aguda de fenótipo misto com t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranged
Leucemia aguda de fenótipo misto, B/mielóide, NOS
Leucemia aguda de fenótipo misto, T/mielóide, NOS
Entidade provisória: Leucemia linfoblástica/Linfoma de células <i>Natural killer</i>

Está atualmente em curso uma revisão desta classificação, que se prevê que esteja disponível ainda em 2016. Ponderam-se várias alterações, incluindo a modificação da LMA com mutação *CEBPA^{dm}/NPM1* de entidades provisórias para entidades definitivas, a inclusão da LMA com mutação do *RUNX1* como entidade provisória, entre outras.^(1,9)

Diagnóstico

O diagnóstico de LMA deve compreender uma história clínica completa do doente e a realização de exames complementares essenciais, tendo em vista a confirmação do diagnóstico da doença. Uma anamnese e um correto exame clínico constituem a base para a suspeição da doença, sendo que o hemograma completo com fórmula leucocitária, a análise citomorfológica das células neoplásicas, a imunofenotipagem e a análise citogenética (e eventual análise molecular) são os procedimentos obrigatórios para confirmar e estabelecer definitivamente o diagnóstico de LMA.⁽¹⁾

Morfologia celular

O esfregaço do aspirado medular (em alguns casos também biópsia medular óssea - BO) e do SP após coloração com *Giemsa*, permitem obter a contagem do número de blastos presentes na amostra. Recomenda-se que sejam contados pelo menos 200 leucócitos no esfregaço de SP e pelo menos 500 células nucleadas na amostra de MO. Segundo a OMS, os blastos têm de constituir pelo menos 20% das células nucleadas presentes na MO ou SP, para que o diagnóstico de LMA seja estabelecido. Existem, contudo, algumas exceções, como por exemplo a presença de alterações citogenéticas como a t(15;17), a inv(16)/t(16;16) ou a t(8;21), em que o diagnóstico de LMA pode ser estabelecido independentemente da percentagem de blastos na MO. O mesmo se aplica nos casos de diferenciação monocítica

(promonócitos são considerados para efeitos de diagnóstico como blastos), na eritroleucemia aguda e na leucemia eritróide pura.⁽¹⁾

Para identificar a linha celular envolvida na neoplasia, as técnicas histoquímicas, incluindo a MPO (mieloperoxidase), o negro do Sudão B (SBB), PAS (ácido periódico-Schiff) e NSE (esterase não específica) foram os métodos mais utilizados no passado (**Ilustração 1**), tendo sido atualmente amplamente complementados pela imunofenotipagem.⁽¹⁾

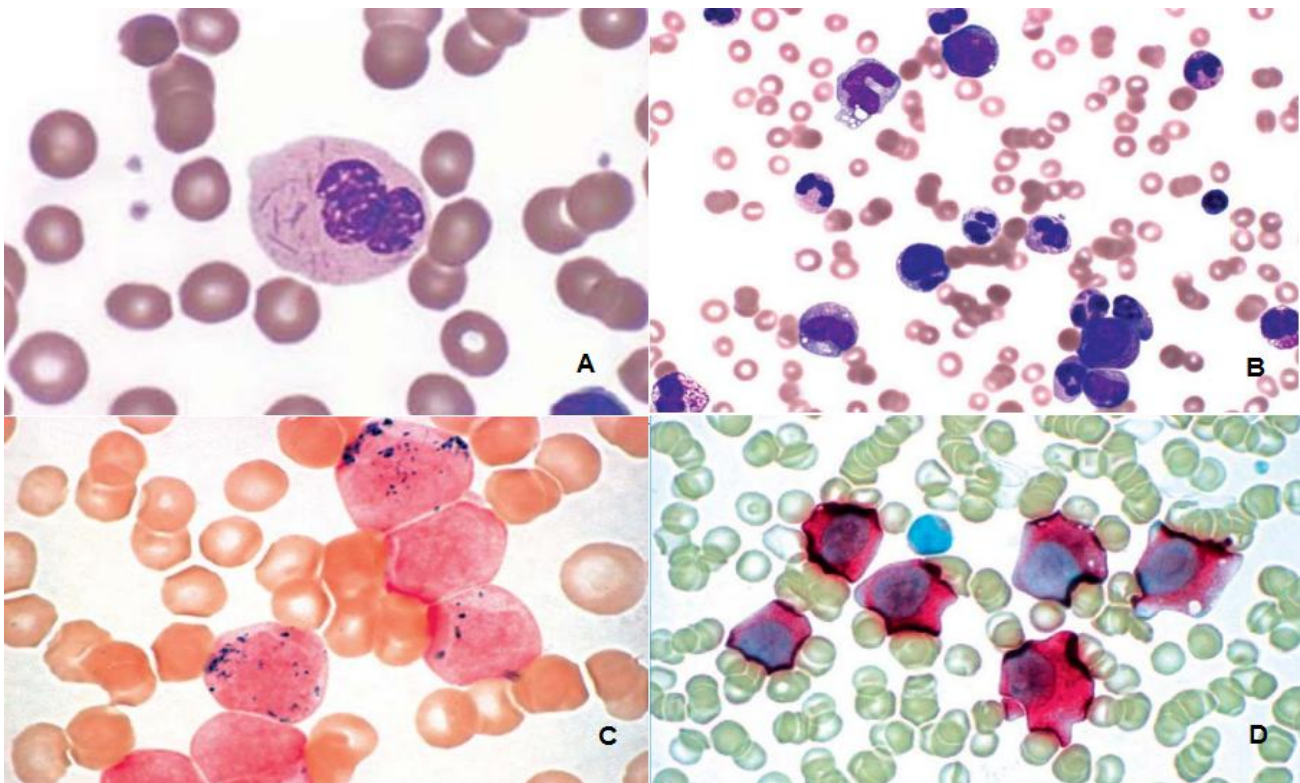


Ilustração 1. Análise histoquímica da morfologia celular na LMA

A) Neutrófilo de doente com LMA e t(8,21), contendo bastonetes de Auer no citoplasma (coloração Wright); B) Observa-se proeminente maturação mielóide e monocítica, apesar de poderem ser observados alguns blastos. Salienta-se a profunda anemia e trombocitopenia observáveis na figura (coloração Wright). C) Coloração com MPO evidenciando estádios precoces de maturação granulocítica num doente com LMA. D) Coloração com NSE em doente com LMA (Adaptado de Foucar *et al.*, 2010)⁽¹¹⁾

Imunofenotipagem

A imunofenotipagem permite determinar a linha de células mielóides envolvida na LMA. A quantificação da expressão de antígenos citoplasmáticos e de superfície é necessária para assegurar o comprometimento da linha celular, para diagnosticar leucemias de linhagem ambígua, bem como leucemias megacarioblásticas agudas e LMA de diferenciação mínima. Permite também detetar imunofenótipos aberrantes, que podem permitir a monitorização de doença residual mínima. Algumas alterações citogenéticas recorrentes associam-se a padrões de expressão imunofenotípica característicos.⁽¹⁾

Citogenética

A análise citogenética convencional é fundamental na avaliação diagnóstica da LMA. Para além disto, as alterações citogenéticas têm importantes implicações no prognóstico e tratamento dos doentes. A análise de pelo menos 20 metafases em células de MO é essencial para estabelecer uma LMA com cariótipo normal, sendo que a presença de alterações citogenéticas pode ser comprovada em amostra de MO ou SP. Se a análise citogenética convencional não for suficiente para detetar as anomalias presentes, podem ser também utilizados métodos de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) para evidenciar rearranjos génicos.⁽¹⁾

Genética Molecular

A identificação de mutações somáticas recorrentes em inúmeros genes em doentes com LMA revelou que algumas destas mutações têm implicações importantes no prognóstico e tratamento dos mesmos. Esta descoberta levou a que o *screening* de mutações ITD do gene *FTL3*, *NPM1* e *CEBPA* tenha sido recentemente recomendado pela ELN e OMS, em doentes com LMA e citogenética normal (*Cytogenetically normal acute myeloid leucemia – LMA CN*), em que se preconiza terapêutica com intuito curativo.^(1,4)

No futuro, com o crescente conhecimento das implicações de outras mutações na fisiopatologia da doença, bem como das suas implicações no prognóstico e tratamento, a pesquisa de diferentes mutações poderá tornar-se um procedimento de rotina na prática clínica.⁽⁴⁾

Outros estudos complementares/procedimentos

A realização de outros exames complementares ou procedimentos é importante para avaliar a gravidade da doença, prever o prognóstico e planejar a terapêutica. De entre estes incluem-se a verificação do *Performance Status*, análise das comorbilidades associadas, realização de testes bioquímicos, da coagulação e urinários, estudos de compatibilidade HLA (tendo em vista o transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas - TACEH), serologias virais (hepatite B e C, VIH, CMV, EBV), exames imagiológicos, informação acerca de criopreservação de gâmetas, entre outros, individualizados em relação a cada doente.^(1,8)

Prognóstico

A estratificação dos doentes com LMA segundo o seu prognóstico depende de múltiplos fatores que influenciam a resposta ao tratamento, incluindo a idade, as comorbilidades (e *performance status*), a duração das citopenias até ao momento do diagnóstico, a contagem de leucócitos no SP, a existência prévia de síndrome mielodisplásica (SMD), quimioterapia ou radioterapia prévia para tratamento de outra doença, as características citogenéticas dos blastos, as alterações genéticas moleculares e, mais recentemente, a monitorização da doença residual mínima (DRM).^(1,8) Outros fatores, como a concentração sérica de LDH (desidrogenase do lactato) e esplenomegália, têm demonstrado uma correlação inconsistente com o prognóstico dos doentes com LMA.⁽¹⁾

O cariótipo das células de LMA constitui o fator com correlação mais forte com a resposta à terapêutica de indução e com a sobrevivência global do doente. Assim, com base

no cariótipo, vários grupos propuseram diferentes sistemas de estratificação dos doentes em três classes de risco: prognóstico favorável, prognóstico intermédio e prognóstico desfavorável, consoante as alterações cariotípicas presentes. Porém, constata-se que 40-50% dos doentes com LMA apresentam cariótipo normal (LMA CN), inserindo-se na classe de prognóstico intermédio, sendo este o subgrupo de doentes onde se verifica maior heterogeneidade na resposta ao tratamento e na sobrevivência.^(1,12)

A descoberta de novas alterações moleculares e do seu potencial impacto no prognóstico dos doentes (sobretudo no subgrupo de doentes com LMA CN) revolucionou o sistema de prognóstico anteriormente proposto, levando à criação de um novo modelo de estratificação pela *European LeukemiaNet* (**Tabela 2**), mais tarde também adotado pela OMS. Este baseia-se não só nas características citogenéticas, como também nas características moleculares (mutação ITD do gene *FLT3*, mutação *NPM1* e *CEBPA*) destes doentes. Este modelo permite a estratificação dos doentes baseando-se na previsão da sua resposta ao tratamento, permitindo assim determinar a necessidade de terapêuticas mais agressivas.^(4,12)

Tabela 2. Grupos de risco da LMA

Grupo de risco (Subtipos)	Alteração genética
Favorável	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Mutação <i>NPM1</i> sem mutação <i>FLT3</i> -ITD (cariótipo normal)
	Mutação <i>CEBPA</i> (cariótipo normal)
Intermédio-I	Mutação <i>NPM1</i> e mutação <i>FLT3</i> -ITD (cariótipo normal)
	Wild-type <i>NPM1</i> e mutação <i>FLT3</i> -ITD (cariótipo normal)
	Wild-type <i>NPM1</i> sem mutação <i>FLT3</i> -ITD (cariótipo normal)
Intermédio-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i>

	Outras anomalias citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas.
Adverso	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i>
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); <i>MLL rearranged</i>
	-5 ou del(5q)
	-7
	abn(17p)
	Cariótipo complexo**

**Cariótipo complexo é definido como três ou mais anomalias cromossômicas na ausência de uma das inversões ou translocações recorrentes designadas pela OMS [t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11) (v;q23), t(6;9); inv(3) ou t(3;3)]. (Adaptado de Estey *et al.*, 2012)⁽¹³⁾

Capítulo II - Anomalias moleculares na LMA: impacto no prognóstico

Mutações nos sinalizadores celulares

FLT3

O gene *FLT3*, localizado no cromossoma 13q banda 12, codifica um recetor com função de tirosina-cinase, pertencente à classe III dos recetores tirosina-cinase (que inclui o *FLT3*, *PDGFR - Platelet-derived growth factor receptors*, *CSF-1R - colony stimulating factor 1 receptor* e *SCFR - Mast/stem cell growth factor receptor*), importante em processos de proliferação e diferenciação celular.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

Os membros desta família, incluindo o *FLT3*, são recetores membranares com atividade enzimática, caracterizados por apresentarem 5 domínios imunoglobulina-like, na sua porção extracelular, um domínio transmembranar, localizado na membrana plasmática da célula, um domínio justamembranar citoplasmático, seguido de um domínio de tirosina-cinase citoplasmático, altamente conservado, subdividido em dois – TKD I e TKD II, por uma zona

de inserção de cinases, terminando a estrutura proteica com uma cauda C-terminal. (Ilustração 2)⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

Os 3 domínios *IG-like* mais externos constituem o *ligand binding domain*, e são responsáveis pela interação entre o ligando e a enzima. Os domínios TKD são responsáveis pela atividade enzimática intrínseca, sendo que é no TKD II que se localiza o *activation loop*, onde se ligam os efetores (*downstream*) das vias de sinalização ativadas pelo FLT3.⁽¹⁴⁾

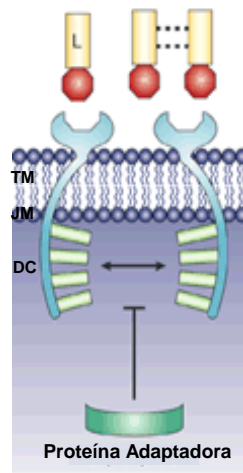


Ilustração 2. O recetor FLT3.

A ligação do ligando do FLT3 (L) promove a dimerização e ativação do recetor, o qual fica bloqueado pela ligação de uma proteína adaptadora (a verde). DC – domínio cinase. JM – domínio justamembranar. TM – domínio transmembranar. L – ligando do FLT3. (Adaptado de Stirewalt & Radich, 2003).⁽¹⁷⁾

Em condições normais de funcionamento, a via do FLT3 encontra-se frenada por um mecanismo auto-inibitório (controlado pelo domínio justamembranar), de modo a garantir que os restantes substratos efetores não ativem descontroladamente a proliferação celular. Assim, a via de sinalização do FLT3 inicia-se apenas quando ocorre interação do seu ligando, o FLT3L, com o *ligand binding domain*.^(14,18)

Desta forma, após interação entre o ligando e o domínio extracelular do recetor FLT3, ocorre dimerização das 2 subunidades contíguas, que induz a transfosforilação de resíduos de tirosina no domínio justamembranar e no domínio TKD. O processo de fosforilação no domínio justamembranar permite a alteração da conformação da tirosina-quinase para a sua forma ativa, através do deslizamento do *activation loop*, que, uma vez ativo, permite a ligação de ATP e de substratos efetores. A fosforilação destes substratos no domínio TKD conduz à ativação sequencial de múltiplos efetores numa cascata complexa, que culmina na estimulação de vias de sinalização que regulam a transcrição de múltiplos genes envolvidos nos processos de proliferação e diferenciação celular (incluindo as vias do PLC γ - *phospholipase C gamma*, JAK/STATs - *Janus kinase surfasse receptor/Signal Transducer and Activator of Transcription protein*, PI3K/AKT - *phosphatidylinositide 3-kinases/ Protein kinase B*, NF-KB - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* e RAS/MAPK – RAS/*mitogen-activated protein kinases* (**Ilustração 3**).^(14,18)

Numa célula normal, no fim da ativação do FLT3, este recetor tende a sofrer processos de internalização, migrando para a membrana celular, processo que conduz à cessação da interação entre o ligando e o recetor, permitindo assim o término da ativação da tirosina-quinase e o seu retorno à sua forma conformacional inativa.⁽¹⁴⁾

Em condições normais, o FLT3 é expresso nas membranas das células hematopoiéticas precursoras, sendo importante para a sua diferenciação, proliferação e multiplicação. Foi demonstrado que os blastos de LMA expressam FLT3, sendo que a desregulação desta via de sinalização conduz à sobreativação de vias envolvidas na proliferação celular, quer devido a estimulação aberrante por FLT3L exógeno, quer devido à presença de mutações com ganho de função, ambos processos fisiopatológicos importantes que contribuem para o surgimento da LMA.^(16,19)

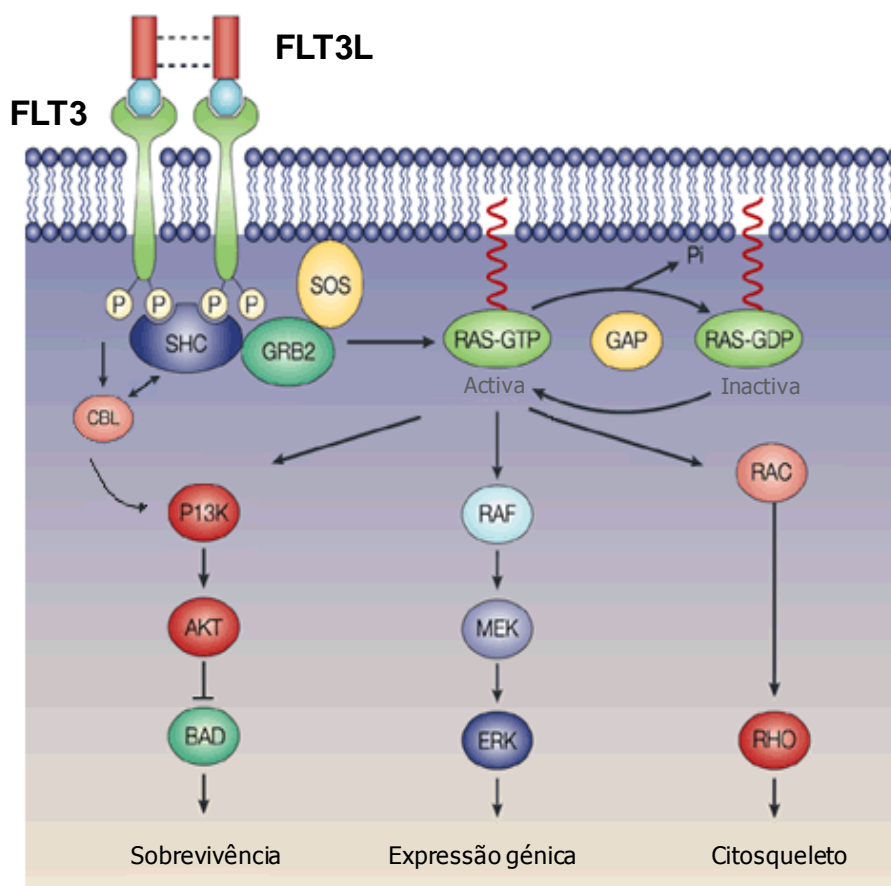


Ilustração 3. Vias de sinalização ativadas pelo recetor FLT3

A ligação do ligando FLT3L ao seu recetor, FLT3, ativa múltiplas vias de sinalização a jusante do recetor, nomeadamente a PI3K/AKT e a via RAS/MAPK. (Adaptado de Stirewalt & Radich, 2003)⁽¹⁷⁾

As mutações do gene *FLT3* são observadas em cerca de 40% dos casos de LMA CN, o que o torna num dos genes mais frequentemente afetados nestes doentes. Foram identificados três grupos principais de mutações que ocorrem no gene *FLT3* na LMA. O tipo de mutações mais frequente corresponde à duplicação interna em *tandem* (*FLT3-ITD*), que ocorre em cerca de 20% dos doentes com LMA e em 28-34% dos indivíduos com LMA CN.^(18,19) As mutações pontuais no *activating loop* (TKD II) no domínio da TKD (*FLT3-TKD*) ocorrem em cerca de 7-10% dos indivíduos com LMA CN. Finalmente, presentes numa frequência muito baixa (apenas cerca de 2% dos indivíduos com LMA CN), destacam-se as mutações pontuais no domínio justamembranar ou extracelular (IG-like) do *FLT3*.⁽¹⁸⁾

As mutações deste gene compreendem assim tipos diferentes de mecanismos mutacionais, variando desde simples deleções, inserções ou mutações pontuais às duplicações mais características.⁽¹⁴⁾

Independentemente do domínio da proteína afetado pela mutação, os mecanismos moleculares resultantes que contribuem para a carcinogénese parecem conduzir inexoravelmente à ativação constitutiva do FLT3, e da cascata de sinalização que depende desta tirosina-cinase. Assim, pensa-se que mutações pontuais no domínio extracelular conduzam à ativação constitutiva do FLT3 independente do seu ligando, através da indução de dimerização e ativação conformacional. Da mesma forma, existem evidências de que as mutações na região justamembranar interferem com o mecanismo auto-inibitório, conduzindo a uma modificação conformacional da enzima, com ativação constitutiva da mesma. De forma semelhante, as mutações da TKD resultam na fosforilação autónoma do seu domínio catalítico e na sua ativação constitutiva.^(14,18)

Mutações ITD do gene *FLT3*

As mutações ITD do gene *FLT3* mais frequentes ocorrem nos exões 14 e 15, e consistem em duplicações *inframe* com inserção de 3 a centenas de bases nucleotídicas, originando uma proteína anómala, de maiores dimensões, habitualmente com ganho de função.⁽²⁰⁾ Este tipo de mutações é caracterizado por alta heterogeneidade, dado o facto de poderem variar em tamanho, no local de inserção da duplicação, no número de mutações presente e no *ratio alélico* (*RA*) com que são expressas (relação entre os alelos *FLT3* mutantes e os alelos *FLT3 wild-type* - *WT*).^(16,18)

As mutações *FLT3-ITD* não são exclusivas de doentes com LMA CN, tendo sido descritas em casos de LMA com outras alterações citogenéticas, como a t(15,17) e t(6,9).⁽¹⁵⁾

Salienta-se que as mutações ITD do *FLT3* estão associadas *per si* a um prognóstico desfavorável em doentes jovens com LMA CN, associando-se a maior risco de recidiva e sobrevivência reduzida. Esta asserção foi constatada em dezenas de estudos ao longo dos últimos anos e sintetizada na revisão da literatura e meta-análise de Port *et al.*, que analisaram os principais estudos realizados até 2012 sobre o impacto prognóstico das mutações *FLT3-ITD*, *NPM1* e *CEBPA* nos doentes jovens com LMA CN.⁽¹⁹⁾

Na metanálise realizada por estes autores, as mutações *FLT3-ITD* associaram-se a um *HR* (*hazard ratio*) para a sobrevivência global de 1.86 ($p < 0.00001$) e um *HR* para a sobrevivência livre de doença de 1.75 ($p < 0.00001$), concluindo-se assim que este se trata, sem dúvida, de um fator independente de mau prognóstico neste subgrupo de doentes, efeito este que tem significativamente maior impacto em comparação com os efeitos benéficos das mutações dos genes *NPM1* e *CEBPA* nos mesmos doentes.⁽¹⁹⁾

Os doentes com este tipo de mutações apresentam também um risco de recidiva bastante elevado.⁽²¹⁾ Os doentes com LMA e mutações ITD do gene *FLT3* associam-se também à presença de maior percentagem de blastos na MO e a leucocitose mais exuberante.⁽²⁰⁾

Além do potencial negativo que as mutações *FLT3-ITD* têm nos doentes com LMA CN, bem patente pela sua inclusão como fator de estratificação de risco na classificação ELN, estudos recentes têm evidenciado que os efeitos nefastos deste tipo de mutações podem não resultar somente da presença da mutação, mas também do local onde esta ocorre, do tamanho da sequência duplicada, do número de mutações presentes, da presença de mutações de outros genes e do *RA*.^(18,20,21)

Diversos estudos parecem apoiar a hipótese de que um *RA* elevado nas mutações ITD do *FLT3* se associa a pior prognóstico nos doentes com LMA.^(16,20-23) A tabela seguinte resume os resultados de alguns dos principais estudos acerca desta problemática (**Tabela 3**).

Tabela 3. Impacto do *ratio alélico* na mutação ITD do gene *FLT3* no prognóstico dos doentes com LMA.

Autor(es)	Amostra em estudo	Resultados/Conclusões	Fator Prognóstico Independente
Whitman <i>et al.</i> ⁽¹⁶⁾	82 doentes jovens com LMA CN <i>de novo</i>	OS a 1 ano: 74% <i>FLT3 WT/WT</i> vs 65% <i>FLT3-ITD/WT</i> vs 13% <i>FLT3-ITD/-</i> ($p=0,0014$) DFS a 1 ano: 71% <i>FLT3 WT/WT</i> vs 51% <i>FLT3 ITD/WT</i> vs 17% <i>FLT3ITD/-</i> ($p=0,0017$)	Não estudado
Thiede <i>et al.</i> ⁽²²⁾	979 doentes com LMA (818 com LMA <i>de novo</i>)	Doentes com <i>RA</i> elevado ($>0,78$) associado a menor OS (0% vs $\approx 87\%$ aos 14 meses, $p=0,006$, respetivamente) e pior DFS ($\approx 30\%$ vs $\approx 82\%$ aos 13 meses, $p=0,004$), em comparação com doentes com <i>RA</i> baixo.** Elevado risco de recidiva se <i>RA</i> elevado (HR: 1.60, $p=0,001$), em comparação com <i>RA</i> baixo** Quanto maior o <i>RA</i> , pior o prognóstico.	Sim Menor OS: (HR=1.8, $p=0,002$) se $RA > 0,78$ Menor DFS: (HR=3.2, $p < 0,001$) se $RA > 0,78$
Gale <i>et al.</i> ⁽²⁰⁾	1425 doentes com LMA, dos quais 1307 com LMA <i>de novo</i> .	Taxa de remissão completa não alterada pelo <i>RA</i> . OS aos 5 anos: 42% ($RA=0\%$), 31% ($RA < 25\%$), 28% ($RA 25-50$), 15% ($RA > 50\%$), $p < 0,001$. DFS aos 5 anos: 41%, 26%, 27%, 16%, respetivamente, $p < 0,001$	Sim Risco Recidiva (OR=1.55, $p < 0,001$) OS (OR=1.34, $p < 0,001$),

		Risco Recidiva aos 5 anos 49%, 69%, 64%, 82%, respetivamente, $p < 0,001$.	
How <i>et al.</i> ⁽²⁴⁾	206 doentes com LMA e risco citogenético intermédio.	<p>Taxa de remissão completa não alterada pelo RA;</p> <p>OS e DFS aos 3 anos semelhantes em doentes com RA baixo (5-25%) e intermédio (25-50%);</p> <p>OS aos 3 anos semelhante em doentes com RA elevado (>50%), em comparação com RA baixo e intermédio;</p> <p>DFS aos 3 anos inferior em doentes com RA elevado, em comparação com RA baixo e intermédio ($OR: 2.05, p=0,02$).</p>	Não
Pratcorona <i>et al.</i> ⁽²³⁾	303 doentes jovens com LMA de risco citogenético intermédio	<p>Quanto mais elevado o RA nos doentes, menor a OS, maior o risco de recidiva e menor a DFS;</p> <p>Em doentes $NPM1^m$, o RA baixo (<0,5) confere prognóstico semelhante ao genótipo $FLT3^{wt}$;</p> <p>Em doentes $NPM1^m$, o RA elevado (>0,5) confere maior risco de recidiva aos 5 anos em comparação com doentes com RA baixo e $FLT3^{wt}$ (79% vs 20% vs 38%, respetivamente, $p=0.000054$), menor OS aos 5 anos (29% vs 47% vs 56%, respetivamente, $p=0.017$) e menor DFS aos 5 anos (32% vs 53% vs 56%, $p=0.025$);</p>	<p>Sim</p> <p>OS ($HR: 1,274, p < 0,001$)</p> <p>Risco recidiva ($HR: 1,604, p=2 \times 10^{-15}$)</p> <p>DFS ($HR: 1,363, p < 0,001$)</p>

		Doentes <i>NPM1^m</i> com <i>RA</i> elevado (ou <i>NPM1^{wt}</i>) beneficiam de tratamento com TACEH após primeira remissão completa, ao contrário de doentes <i>NPM1^m</i> com <i>RA</i> baixo ou <i>FLT3^{wt}</i> .	
Schlenk <i>et al.</i> ⁽²¹⁾	323 doentes com LMA de risco citogenético intermédio e portadores de mutação ITD do gene <i>FLT3</i>	<p>Taxa de remissão completa inversamente correlacionada com o <i>RA</i> ($P < 0,001$). Taxa de remissão completa: 81,5% - $RA < 0,2$ vs 57,5% - $RA > 0,8$, $p = 0,003$.</p> <p><i>RA</i> associado a maior incidência cumulativa de recidiva aos 3 anos ($p = 0,04$), exceto nos doentes submetidos a TACEH.</p> <p>Doentes com <i>RA</i> elevado ($\geq 0,51$) apresentaram OS e DFS superiores quando submetidos a TACEH após primeira remissão completa ($\approx 50\%$ vs $\approx 20\%$ aos 8 anos, $p = 0,03$ e $\approx 40\%$ vs $\approx 15\%$, $p = 0,02$, respetivamente) vs outras terapêuticas.</p> <p>TACEH não é mais eficaz que outros tratamentos em doentes com <i>RA</i> baixo ($< 0,51$).</p>	<p>Sim</p> <p>Taxa remissão completa (OR: 0.59; $p = 0.02$)</p> <p>TACEH em doentes com <i>RA</i> elevado ($\geq 0,51$)</p> <p>DFS (HR: 0.39, $p = NS$) e OS (HR: 0.47, $p = NS$).***</p>

** Em doentes com < 60 anos, LMA *de novo* e de risco citogenético intermédio; *** NS – não especificado

Nos estudos de Pretz *et al*, verificou-se que nos doentes com LMA e mutações *FLT3-ITD* em que se usavam agentes inibidores da tirosina-cinase, a resposta terapêutica era consideravelmente superior nos doentes com maior *ratio alélico*.⁽²⁵⁾

Existe controvérsia acerca do impacto de outro tipo de mutações concomitantes com a mutação ITD do *FLT3* em doentes com LMA, sendo que os estudos mais recentes parecem indicar que este tipo de mutações retém o seu efeito nefasto sobre o prognóstico dos doentes com LMA de risco intermédio, mesmo na presença de outros tipos de mutações, como dos genes *DNMT3A* (*DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Alpha*) e *TET2* (*Tet methylcytosine dioxygenase 2*). Alguns estudos defendem ainda que a presença de mutações *FLT3-ITD* com *RA* elevado pode inclusive reverter os efeitos benéficos de outros tipos de mutações, como a do gene *NPM1*.⁽²¹⁾

Recentemente, no seguimento dos estudos de Breitenbuecher *et al.*, Kayser *et al.*, que estudaram 241 doentes com LMA e mutações *FLT3-ITD*, confirmaram que cerca de 30% dos doentes com LMA e este tipo de mutação apresentavam a duplicação fora do domínio justamembranar. Na maioria dos casos estas mutações ocorriam na folha *beta1* da TKD1 ($\approx 26\%$), e, em casos mais raros, na folha *beta2* da TKD1 e no *nucleotide binding loop*. Breitenbuecher *et al.*, relataram que a mutação inserida na folha *beta2* da TKD 1 está associada à fosforilação constitutiva do FLT3 e do STAT 5 (efetor *downstream*). Apesar dos mecanismos fisiopatológicos desta fosforilação constitutiva serem ainda desconhecidos, algumas implicações clínicas já foram descritas, destacando-se a menor eficácia das terapêuticas inibidoras das cinases em doentes com um tipo específico de mutação externa ao domínio justamembranar, *FLT3-ITD627E* (mutação na folha *beta2* da TKD1), em comparação com os doentes com mutações *FLT3-ITD* em que o local de inserção da mutação é o domínio justamembranar. Apesar de as causas para a menor resposta à terapêutica nestes doentes ainda não serem conhecidas, especula-se que a alteração da conformação da TKD interfira com os mecanismos que medeiam a destruição tumoral pelos fármacos convencionais, quer agentes quimioterápicos quer inibidores de cinases, culminando num prognóstico consideravelmente pior nestes doentes.⁽¹⁸⁾

Neste estudo constatou-se ainda que a presença de mutações *FLT3-ITD* localizadas na folha *beta 1* da TKD1 estava associada a uma menor taxa de remissão completa, tanto no grupo de doentes com LMA estudado, como no subgrupo formado pelos doentes com LMA CN. Para além disto, observou-se ainda que os doentes com mutações localizadas a esta região apresentavam menor sobrevivência livre de doença (DFS aos 10 anos $\approx 9\%$ vs $\approx 30\%$, respetivamente, $p=0,001$) e menor sobrevivência global (OS aos 10 anos $\approx 12\%$ vs $\approx 31\%$, respetivamente, $p=0,002$), em comparação com doentes com LMA e mutação *FLT3-ITD* inserida noutra local. O mesmo se verificou no subgrupo de doentes com LMA CN.⁽¹⁸⁾

Estudos com múltiplas variáveis evidenciaram o impacto nefasto e independente da localização da mutação na folha *beta 1* da TKD1 sobre a taxa de remissão completa (*OR*: 0,22, $p<0,01$), sobrevivência livre de doença (*HR*: 1.86, $p<0,001$) e sobrevivência global (*HR*: 1.59, $p=0,008$) dos doentes com LMA, efeito este que foi ainda mais acentuado nos doentes com LMA CN.⁽¹⁸⁾

Estes resultados foram confirmados num estudo posterior por Shclenk *et al.*, onde se verificou que o impacto negativo da localização das mutações na TKD1 no prognóstico dos doentes era evidente mesmo após realização de TACEH.⁽²¹⁾ O mesmo não se verificou, contudo, no estudo de *Schnittger et al.*, em que o prognóstico não foi significativamente alterado pela localização da mutação.⁽²⁶⁾

O tratamento dos doentes com mutações *FLT3-ITD* é problemático, dado que estes respondem geralmente mal à quimioterapia convencional. A quimioresistência nos doentes com mutações *FLT3*, ainda que não inteiramente esclarecida, pode estar associada à estimulação de mecanismos de reparação do DNA e outros mecanismos de reparação em células danificadas.⁽²⁰⁾ Assim, terapêuticas alternativas, como o TACEH e a utilização de inibidores da tirosina-cinase, podem ser benéficos nestes doentes.^(15,20,27)

O impacto negativo das mutações *FLT3-ITD* no prognóstico dos doentes após a realização de TACEH permanece atualmente controverso. De facto, nos estudos de

Sengsayadeth *et al.*, em que 79 doentes com LMA submetidos a TACEH atingiram a primeira remissão completa (RC), constatou-se que os doentes com mutações *FLT3-ITD* apresentaram um risco cumulativo de recidiva aos 100 dias de 45% ($p=0.01$).⁽²⁸⁾

Em comparação com doentes sem mutações do gene *FLT3*, sujeitos também a TACEH, os doentes com a referida mutação apresentaram maior risco de recidiva após 1 ano (59% vs 19%, $p=0.01$, respetivamente), menor sobrevivência livre de doença (DFS aos 2 anos 19% vs 64%, respetivamente, $p=0.0027$) e tendência para uma menor sobrevivência global.⁽²⁸⁾ Pelo contrário, nos estudos de Chou *et al.*, as mutações *FLT3-ITD* perderam o seu efeito sobre o prognóstico dos doentes após realização de TACEH.⁽²⁹⁾ A aplicação do TACEH em doentes com mutações *FLT3-ITD* pode ser particularmente proveitoso em doentes com *RA* elevado.^(21,23)

A identificação da tirosina-cinase *FLT3* como alvo terapêutico permitiu o desenvolvimento de terapêutica dirigida especificamente a este alvo molecular. Foram desenvolvidos inicialmente inibidores de tirosina-cinase de 1ª geração (midostaurin, lestaurtinib, sunitinib, sorafenib), tendo surgido mais recentemente um de 2ª geração (quizartinib). Os resultados obtidos na monoterapia com os fármacos de 1ª geração foram, no entanto, decepcionantes, registando-se apenas uma diminuição transitória da contagem de blastos periféricos.⁽¹⁵⁾ O quizartinib, um composto mais seletivo e potente, apresenta-se como uma inovação promissora. Porém, o principal problema relacionado com estes fármacos parece assentar na celeridade com que surgem resistências.⁽³⁰⁾ O *RA* elevado também pode interferir com a resposta a estes fármacos.^(15,25)

Nos últimos anos registou-se uma melhoria do prognóstico dos doentes com LMA portadores deste tipo de mutações, que se deve provavelmente à inclusão progressiva do TACEH e dos inibidores da tirosina-cinase, entre outros tipos de tratamentos, nos esquemas terapêuticos destes indivíduos.⁽³¹⁾

Mutações TKD do gene *FLT3*

As mutações TKD do *FLT3*, tal como as mutações ITD, parecem resultar também na ativação constitutiva do recetor FLT3, contribuindo para proliferação celular desorganizada. Porém, os seus efeitos moleculares sobre os intermediários ativados (*downstream*) pelo FLT3 parecem diferir em relação aos efeitos das mutações ITD, existindo diferenças na ativação das vias de sinalização celular, que poderão ser responsáveis pelas diferenças fenotípicas (prognóstico) observadas entre estes dois subgrupos de doentes. O tipo mais frequente de mutações *FLT3-TKD* corresponde a mutações pontuais (inserções e deleções) nos codões 835 e 836, ocorrendo sobretudo em doentes com LMA CN ou com inv(16).⁽¹⁵⁾

O impacto deste tipo de mutações no prognóstico dos doentes permanece ainda muito controverso. Tendo isto em conta, Wei Li *et al.*, realizaram uma metanálise onde incluíram os principais estudos acerca do impacto deste tipo de mutações no prognóstico dos doentes com LMA não-promielocítica.⁽³²⁾

Assim, puderam constatar que as mutações TKD do *FLT3* contribuem para um prognóstico mais desfavorável nos doentes com LMA, com menor sobrevivência global (*HR*: 1.18, *p*= 0.003) e menor sobrevivência livre de doença (*HR*: 1.20, *p*= 0.01), em comparação com doentes com genótipo *FLT3^{wt}*. Este facto não se verificou, no entanto, nos doentes que apresentavam alterações citogenéticas de risco intermédio.⁽³²⁾

Da mesma forma, observaram também que os doentes com mutações *FLT3-TKD* pareciam apresentar maior sobrevivência global (*HR*: 0.87, *p*= 0.006) e tendência para maior sobrevivência livre de doença, em comparação com doentes com mutações ITD do *FLT3*. Estes efeitos foram ainda mais notórios nos doentes com LMA e risco citogenético intermédio.⁽³²⁾

Recentemente, Alvarado *et al.*, descreveram que a resistência evidenciada por doentes com mutações *FLT3-ITD* ao tratamento com inibidores da tirosina-cinase estava associada,

em parte, ao surgimento de mutações *de novo* *FLT3-TKD*. Este tipo de mutações parece ocorrer em pelo menos 20% dos doentes tratados com estes fármacos.⁽³⁰⁾

Mutações nos fatores de transcrição mielóides

CEBPA

A proteína CEBPA (*CCAAT/enhancer binding protein- α*), que atua como um importante fator de transcrição em células da linhagem mielomonocítica, é codificada por um gene (*CEBPA*) localizado no cromossoma 19, banda q13.1. Para além da sua importante ação como fator de transcrição, o CEBPA apresenta também funções de supressor tumoral, sendo importante no bloqueio da proliferação celular.^(33,34)

Duas proteínas podem ser traduzidas a partir dos transcritos de CEBPA, uma com um tamanho de 42 kDa (p42, que possui dois domínios reguladores, TAD1 e TAD2 – *transcriptional activation domain* – na região N-terminal, fundamentais na regulação da transcrição), e uma mais pequena, com um tamanho de 30 KDa (p30, apenas com um domínio TAD2). Ambas as isoformas contêm ainda uma região C-terminal, onde se localiza um domínio responsável pela ligação ao DNA (*DNA-binding domain*) e um bZIP (*leucine zipper*), que são também importantes para a dimerização proteica (**Ilustração 4**). Estas proteínas têm uma ação fundamental nos progenitores mielóides, sendo importantes para potenciar a diferenciação granulocítica, em especial dos neutrófilos.⁽³⁵⁾

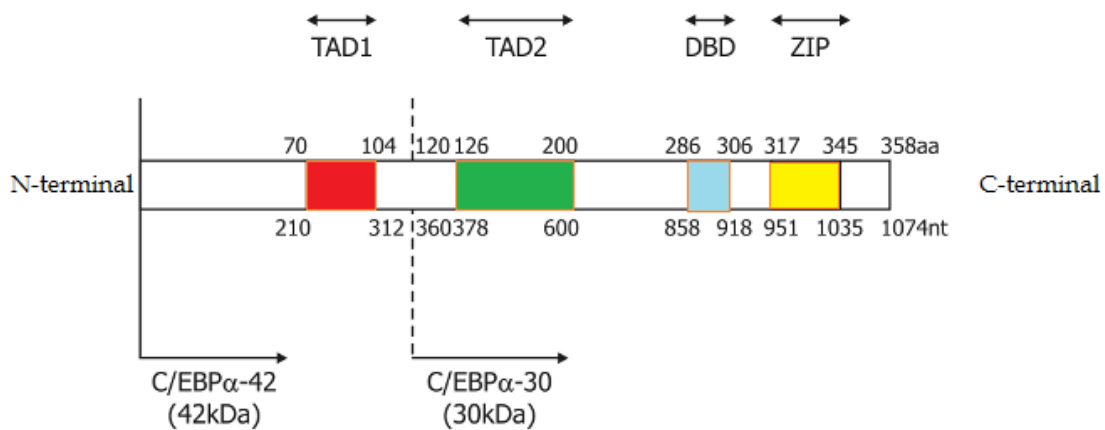


Ilustração 4. Estrutura das isoformas da proteína CEBPA

A figura mostra a constituição das duas isoformas do CEPBA, p30 e p42, e a localização dos domínios da proteína; o TAD 1 (a vermelho), o TAD2 (a verde), o *DNA binding domain* (DBD, a azul) e o bZIP (ZIP, a amarelo). Note-se que a isoforma p30, obtida por *splicing* alternativo, não possui o domínio TAD1. (Adaptado de Ota Fuchs, 2011)⁽³⁶⁾

Mutações do gene *CEBPA* são detetadas em cerca de 5-14% dos doentes com LMA e em aproximadamente 10-18% dos indivíduos com LMA CN.^(19,37) Distinguem-se dois tipos principais de mutações *CEBPA*. As mutações da região N-terminal, geralmente do tipo *frameshift*, conduzem à tradução de proteínas truncadas, resultando na expressão exclusiva da isoforma p30 pelo alelo mutante. As proteínas p30 exercem um efeito de dominância negativa sobre as proteínas p42 produzidas pelo alelo *WT*, que desregula a razão p30/p42. As mutações da região C-terminal, geralmente mutações *inframe* (deleções ou inserções), dificultam a ligação do DNA com o *DNA binding domain* e bZIP, impossibilitando também a homo ou heterodimerização com outras proteínas. Como consequência, estas mutações originam um desequilíbrio entre a proliferação e a diferenciação dos progenitores granulocíticos.^(33-35,38) De facto, em estudos efetuados em ratos em que foi efetuado o *knock-*

out do gene *CEBPA*, observa-se um bloqueio seletivo da diferenciação, com ausência de granulócitos maduros, enquanto as restantes linhagens hematopoiéticas não apresentam alterações na sua diferenciação.⁽³⁴⁾

Os mecanismos moleculares que conduzem à carcinogénese são ainda mal conhecidos. Os mecanismos que interferem com a normal expressão do gene *CEBPA* são heterogéneos, envolvendo translocações cromossómicas, mutações, ou alterações epigenéticas/pós-tradução.^(38,39)

A deficiência de *CEBPA*^{wt} na hematopoiese conduz à hiperproliferação dos progenitores hematopoiéticos, devido à incapacidade de induzir o comprometimento das linhagens granulocíticas com um processo de diferenciação seletivo. Pensa-se que a expressão da isoforma p30 em elevadas quantidades seja suficiente para garantir uma função basal da proteína *CEBPA*, necessária à diferenciação dos progenitores hematopoiéticos, mas insuficiente para induzir a diferenciação terminal da linhagem granulocítica.⁽³⁹⁾

Assim, quando ocorrem mutações que diminuem a expressão (dominância negativa, e.g.) ou a função (menor ligação do DNA, e.g.) da isoforma p42, a principal responsável pelos efeitos de supressão tumoral do *CEBPA*, aumentando a preponderância da isoforma p30, as células precursoras, que deveriam passar de um estado de progenitor mielóide comum para um estado de progenitor monocítico-granulocítico, pelo efeito regulador mediado pelo *CEBPA* sobre moléculas alvo (*IL-6R* – *interleukin 6 receptor*, *G-CSFR* - *granulocyte colony-stimulating factor receptor*, *Mac-1* - *Macrophage-1 antigen*, *Gr-1* - *granulocyte antigen-1*,...), deixam de sofrer esta ação. Este processo abre portas a um “escape” no comprometimento destas com a sua diferenciação, permitindo assim a sua proliferação desregulada (**Ilustração 5**).^(38,39)

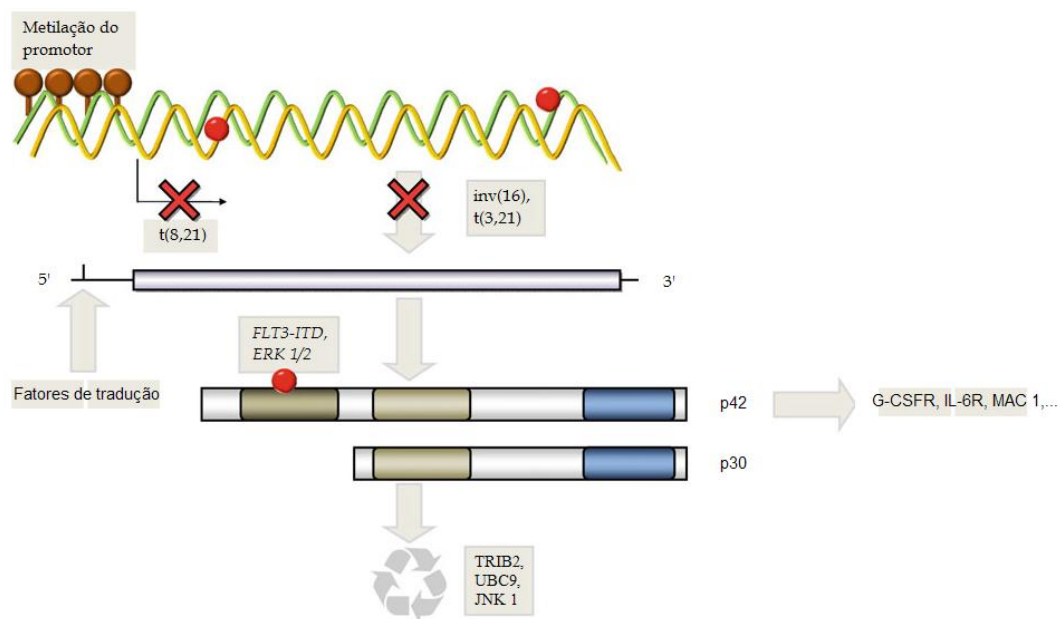


Ilustração 5. Mecanismos envolvidos na regulação da expressão da proteína CEBPA

A regulação da expressão de CEBPA depende de um conjunto complexo de mecanismos. A metilação do promotor do gene causa silenciamento epigenético e reduz a sua transcrição. A proteína de fusão AML1-ETO suprime a transcrição do *CEBPA*. A ativação de *RNA-binding proteins* na *inv(16)* e *t(3,21)* suprime a tradução do mRNA (RNA mensageiro) do CEBPA. Fatores iniciadores da tradução regulam o *ratio* de expressão das isoformas p30 e p42. A ativação das vias de sinalização *FLT3* e *ERK1/2* conduzem à fosforilação da proteína CEBPA, bloqueando a diferenciação mielóide. Proteínas como TRIB2 e UBC9 degradam o CEBPA, enquanto a JNK1 impede a sua degradação. (Adaptado de Reckzeh *et al.*, 2010)⁽³⁹⁾

Curiosamente, não só os genes envolvidos na diferenciação mielóide (*RUNX1*, *SPI-1* - *Spi-1 proto-oncogene* e *ID1* - *Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein*), como também genes da família *HOX* (*HOXA1-10* - *Homeobox A*, *HOXB2-6* - *Homeobox B*) e de algumas vias de sinalização (*FLT3*, *RAS*, ...) estão subexpressos em alguns doentes com mutações do gene *CEBPA*, ainda que a causa seja desconhecida.⁽³⁸⁾

Na revisão da literatura e meta-análise de Port *et al.*, que analisaram os principais estudos acerca do impacto das mutações *CEBPA* no prognóstico de doentes jovens com LMA

CN, os autores constataram que os portadores destas mutações apresentavam melhor sobrevivência global ($HR: 0.37, p<0.00001$) e melhor sobrevivência livre de doença ($HR: 0.42, p<0.00001$), concluindo assim que as mutações *CEBPA* conferiam uma vantagem no prognóstico dos doentes com LMA CN.⁽¹⁹⁾

Os doentes com LMA CN que apresentam mutações *CEBPA* podem ser subdivididos em dois subgrupos principais; doentes com uma única mutação do gene (*CEBPA*sm), e doentes com mutação dupla (*CEBPA*^{dm}). Na maioria dos casos de *CEBPA*^{dm}, existe mutação de ambos os alelos, ocorrendo geralmente uma mutação da região N-terminal em um dos alelos e uma mutação do bZIP na região C-terminal, no restante alelo. As mutações *CEBPA*sm, monoalélicas, podem ocorrer na região C-terminal ou N-terminal do gene.^(34,35) Existe alguma evidência de que as mutações *CEBPA*^{dm} conduzem a perda total da função da proteína *WT* na maioria dos casos, ao contrário das mutações únicas, em que os efeitos são mais heterogêneos, sendo compatíveis apenas com uma função reduzida da proteína normal.⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ Pensa-se que as mutações *CEBPA*^{dm} possam representar um estágio mais avançado na carcinogênese, evoluindo a partir de mutações únicas, dado o facto de as mutações N-terminal e C-terminal demonstrarem efeitos sinérgicos, nomeadamente na inibição da transativação do promotor G-CSFR.⁽⁴⁰⁾

Nos estudos mais antigos em que o efeito das mutações *CEBPA* no prognóstico dos doentes com LMA foi investigado, sem que se subdividissem os doentes nos 2 subgrupos supramencionados, obtiveram-se resultados que pareciam indicar que todos os doentes com LMA CN portadores deste tipo de mutações tivessem um prognóstico relativamente favorável. Porém, em estudos mais recentes, constatou-se que os doentes que beneficiavam de um prognóstico mais favorável correspondiam maioritariamente aos doentes com genótipo *CEBPA*^{dm}, em detrimento dos doentes com mutações *CEBPA*sm. Efetivamente, as mutações *CEBPA*sm parecem estar associadas a prognóstico intermédio ou a prognóstico semelhante ao dos doentes *CEBPA*^{wt}. Para além disto, existe também evidência de que a maioria das

restantes mutações recorrentes na LMA que surgem em doentes com gene *CEBPA* mutante, ocorrem habitualmente associadas aos doentes com *CEBPA*sm, sendo menos frequentes nos doentes com *CEBPA*^{dm} (nomeadamente as mutações *FLT3-ITD* e *NPM1*).^(35,41-43)

A tabela seguinte (**Tabela 4**) resume alguns dos principais estudos acerca do impacto das mutações *CEBPA*sm e *CEBPA*^{dm} no prognóstico destes doentes.

Tabela 4. Impacto das mutações *CEBPA*sm e *CEBPA*^{dm} no prognóstico dos doentes com LMA

Autor(es)	Amostra em estudo	Resultados/Conclusões	Fator Prognóstico Independente
Pabst <i>et al.</i> ⁽⁴⁰⁾	224 doentes com LMA	Doentes <i>CEBPA</i> sm têm menor OS média (15 meses vs <i>not reached</i> , respetivamente, $p=0.006$) e DFS (12 meses vs <i>not reached</i> , respetivamente, $p=0.013$) em comparação com doentes <i>CEBPA</i> ^{dm} ; Prognóstico semelhante em doentes <i>CEBPA</i> sm e doentes <i>CEBPA</i> ^{wt} ;	Sim (<i>CEBPA</i> ^{dm}) OS (<i>HR</i> : 0.28, $p<0.001$) DFS (<i>HR</i> : 0.28, $p<0.001$)
Dufour <i>et al.</i> ⁽⁴³⁾	467 doentes com LMA CN	Doentes <i>CEBPA</i> ^{dm} têm OS média superior (<i>not reached</i> vs 20.4 meses, respetivamente, $p=0.018$) em comparação com doentes <i>CEBPA</i> ^{wt} ; Doentes <i>CEBPA</i> sm têm OS semelhante aos doentes <i>CEBPA</i> ^{wt} ; Doentes <i>CEBPA</i> ^{dm} têm tendência para maior taxa de RC (85% vs 66%, $p=0.071$), EFS (16.2 vs 8.5 meses, $p=0.064$) e menor taxa de recidiva (41% vs 63%, $p=0.074$) em comparação com doentes <i>CEBPA</i> ^{wt} .	Sim (<i>CEBPA</i> ^{dm}) OS (<i>HR</i> : 0.285, $p=0.003$) EFS (<i>HR</i> : 0.392, $p=0.008$)
Green <i>et al.</i>	1427	Taxa de RC semelhante entre doentes	Sim

<i>al.</i> ⁽⁴¹⁾	doentes jovens com LMA (não – promielocítica)	<p><i>CEBPA^{dm}</i>, <i>CEBPAsm</i> e <i>CEBPA^{wt}</i>;</p> <p>OS aos 8 anos superior em doentes com mutações <i>CEBPA^{dm}</i> e semelhante entre doentes <i>CEBPAsm</i> e <i>CEBPA^{wt}</i> (54% vs 31% vs 34%, respetivamente, $p=0.004$);</p> <p>DFS aos 8 anos superior nos doentes <i>CEBPA^{dm}</i> e semelhante entre doentes <i>CEBPAsm</i> e <i>CEBPA^{wt}</i> (45% vs 35% vs 34%, respetivamente, $p=0.04$).</p>	<p>(<i>CEBPA^{dm}</i>)</p> <p>OS ($HR: 0.53, p=0.004$)</p> <p>DFS ($HR: 0.6, p=0.02$)</p>
Taskesen <i>et al.</i> ⁽³⁵⁾	1182 doentes jovens com LMA CN	<p>Doentes <i>CEBPA^{dm}</i> têm maiores taxas de RC em comparação com doentes <i>CEBPAsm</i> (92% vs 78%, $p= 0.02$). Taxa de RC semelhante entre doentes <i>CEBPAsm</i> e <i>CEBPA^{wt}</i>;</p> <p>Doentes <i>CEBPA^{dm}</i> têm maior OS aos 5 anos (63% vs 39%, $p<0 .0001$), melhor EFS (45% vs 28%, $p<0.0001$) e DFS (DFS: 44% vs 32%, $p= 0.05$) em comparação com doentes <i>CEBPA^{wt}</i>;</p> <p>Doentes <i>CEBPAsm</i> apresentaram OS aos 5 anos e DFS ligeiramente superiores em relação aos doentes <i>CEBPA^{wt}</i>;</p> <p>Prognóstico de doentes com mutações <i>CEBPAsm</i> e <i>CEBPA^{dm}</i> é semelhante;</p> <p><i>Status</i> mutante <i>NPM1/FLT3</i> é responsável pela resposta à terapêutica em doentes com mutação <i>CEBPA</i>.</p>	<p>Sim</p> <p>(<i>CEBPA^{dm}</i>)</p> <p>OS ($HR:0.36, p<0.0001$)</p> <p>EFS ($HR:0.41, p<0.0001$)</p> <p>DFS ($HR:0.55, p=0.001$)</p>
Wen <i>et</i>	233	Doentes <i>CEBPA^{dm}</i> têm taxa RC superior	Sim

<p><i>al.</i>⁽³⁷⁾</p>	<p>doentes chineses com LMA não-promielocítica</p>	<p>em comparação com doentes <i>CEBPA</i>^{wt} (88% vs 51%, $p=0.037$). Taxa de RC semelhante em doentes <i>CEBPA</i>sm e <i>CEBPA</i>^{wt};</p> <p>Doentes <i>CEBPA</i>^{dm} têm maior OS em comparação com doentes <i>CEBPA</i>^{wt} (25 vs 8 meses, $p = 0.033$). OS entre doentes <i>CEBPA</i>sm e <i>CEBPA</i>^{wt} é semelhante.</p> <p>Tendência para uma maior sobrevivência global em doentes <i>CEBPA</i>^{dm} em comparação com doentes <i>CEBPA</i>sm ($P = 0.115$);</p>	<p>(<i>CEBPA</i>^{dm})</p> <p>OS ($HR: 0.596, p=0.047$)</p> <p>OS em doentes <i>NPM1</i>^{wt}<i>FLT3</i>^{wt} c/ mutação <i>CEBPA</i>^{dm} ($HR: 0.65, p= 0.04$)</p>
<p>Pastore <i>et al.</i>⁽³⁴⁾</p>	<p>88 doentes com LMA CN portadores de mutações <i>CEBPA</i>^{dm} (45 e 43 <i>CEBPA</i>sm)</p>	<p>Doentes <i>CEBPA</i>^{dm} têm OS superior (9.6 anos vs 1.7 anos, $p=0.008$) em comparação com doentes <i>CEBPA</i>sm;</p> <p>Doentes com >60 anos - OS aos 5 anos: 37% <i>CEBPA</i>^{dm} vs. 11% <i>CEBPA</i>sm, $p=0.045$.</p> <p>Doentes com <60 anos – OS aos 5 anos: 81% <i>CEBPA</i>^{dm} vs. 59% <i>CEBPA</i>sm, $p=0.076$);</p> <p>A taxa de RC é semelhante entre <i>CEBPA</i>^{dm} e <i>CEBPA</i>sm (82% vs. 70%, $p=0.17$);</p> <p>Doentes <i>CEBPA</i>^{dm} têm maior DFS do que doentes <i>CEBPA</i>sm (DFS: 9.4 anos vs. 1.5 anos, $p=0.021$);</p> <p>A incidência cumulativa de recidiva é</p>	<p>Sim</p> <p>(<i>CEBPA</i>^{dm})</p> <p>OS ($HR: 0.596, p=0.047$)</p>

		inferior nos doentes $CEBPA^{dm}$ em comparação com os $CEBPA^{sm}$ (40% vs. 60% aos 5 anos; 45 vs. 65% aos 10 anos, $p=0.036$);	
Fasan <i>et al.</i> ⁽⁴²⁾	2296 doentes com LMA	Doentes $CEBPA^{dm}$ têm OS média superior em comparação com doentes $CEBPA^{sm}$ (<i>not reached</i> vs 26.2 meses, respetivamente, $p<0.001$) e $CEBPA^{wt}$ (<i>not reached</i> vs 45.6 meses, respetivamente, $p=0.002$); Doentes $CEBPA^{dm}$ têm EFS média superior em comparação com doentes $CEBPA^{sm}$ (45.9 meses vs 10.6 meses, $p=0.008$) e $CEBPA^{wt}$ (45.9 meses vs 15.9 meses, $p=0.012$); Mutações $TET2$ em doentes $CEBPA^{dm}$ associaram-se a pior OS aos 2 anos (23.8% vs 59.6%, $p=0.043$);	Sim ($CEBPA^{dm}$) OS ($HR: 0.438, p=0.02$).

O impacto das mutações coexistentes com a mutação $CEBPA$ nos doentes com LMA, quer em doentes $CEBPA^{sm}$, quer em doentes $CEBPA^{dm}$, é ainda muito controverso.^(35,42) Da mesma forma, os resultados acerca do impacto da localização das mutações (região N-terminal vs C-terminal) no prognóstico dos doentes com LMA são também controversos.^(41,42)

Alguns autores descreveram o uso potencial do $CEBPA$ para monitorização de DRM, depois de terem constatado que a expressão de $CEBPA$ cessava após a remissão completa da LMA, retornando aos níveis precedentes quando ocorria recidiva da doença.⁽⁴⁴⁾

No plano terapêutico, ressalva-se o estudo de Schlenk *et al.*, que estudaram 124 doentes jovens com LMA e cariótipo normal ou de risco intermédio, com mutações $CEBPA^{dm}$, e que tinham atingido a primeira RC. Neste estudo, constataram que os doentes

submetidos a TACEH ou autotransplante, em comparação com quimioterapia intensiva de consolidação, apresentavam taxas de sobrevivência sem recidiva aos 5 anos superiores (73% nos doentes sujeitos a TACEH, 60% nos doentes sujeitos a autotransplante e apenas 32% nos doentes submetidos a quimioterapia intensiva, $p < 0,001$). Não se observaram diferenças na sobrevivência global dos doentes dos dois grupos. Estes resultados parecem apoiar a hipótese de que os doentes com este genótipo podem beneficiar da opção terapêutica com transplante de células estaminais hematopoiéticas. Porém, constatou-se também que, à semelhança da LMA com inv(16), os doentes com mutações *CEBPA*^{dm} apresentam taxas de remissão completa após a recidiva bastante elevadas (>80%), com sobrevivência após segunda RC bastante boa, facto que explica a semelhança entre a sobrevivência global dos doentes submetidos a transplante e quimioterapia.⁽⁴⁵⁾

Assim, a opção de reservar o TACEH/autotransplante para os casos em que após quimioterapia de consolidação se obtém uma recidiva, parece ser também uma estratégia terapêutica lícita.⁽⁴⁵⁾ Estes resultados foram confirmados posteriormente por Pastore *et al.*⁽³⁴⁾

Estão atualmente em estudo fármacos que inibem a fosforilação do CEBPA, como os inibidores da tirosina-cinase e os inibidores da MAPK/ERK, que permitem um reforço dos estímulos de maturação dos granulócitos pelas proteínas não mutantes do CEBPA. A utilização de peptídeos de fusão e vetores que permitam o aumento da concentração de CEBPA intranuclear podem ser também estratégias promissoras.⁽³⁸⁾

RUNX 1

O gene *RUNX1*, pertencente à família dos genes *RUNX*, localizado no cromossoma 21q, banda 22, é constituído por dez exões e exerce funções fundamentais no controlo da hematopoiese. É um gene fulcral para a diferenciação das células hematopoiéticas, codificando um fator de transcrição, e desempenhando um papel central numa vasta rede de

intermediários da transcrição de genes alvo (sobretudo miRNAs), que contribuem também para a sua regulação.^(46,47)

Estudos em ratos demonstraram que a expressão de RUNX1 é fulcral para a diferenciação das células hematopoiéticas estaminais a partir das células endoteliais primordiais, nos tecidos hematopoiéticos, em estádios embrionários. Mais tarde, durante a fase pós-embriónica, a expressão de RUNX1 passa a ser importante para bloquear a auto-renovação das células estaminais, induzindo a sua diferenciação até ao estágio de maturação final, sendo assim crucial na diferenciação das linhagens mielóide, linfóide e megacariocítica.⁽⁴⁶⁾

O gene *RUNX1* codifica um fator de transcrição constituído por 3 domínios fundamentais. O domínio designado RHD (*Runt homology domain* – região altamente conservada com 128 aminoácidos), com estrutura *IG-like*, localizado na região N-terminal, consiste no local de ligação complementar entre a proteína e as sequências homólogas de DNA, permitindo ainda as interações com outros fatores de transcrição e a heterodimerização com o cofator CBF *beta* (CBF β - *Core-binding factor subunit beta*) (**Ilustração 6**).^(46–48)

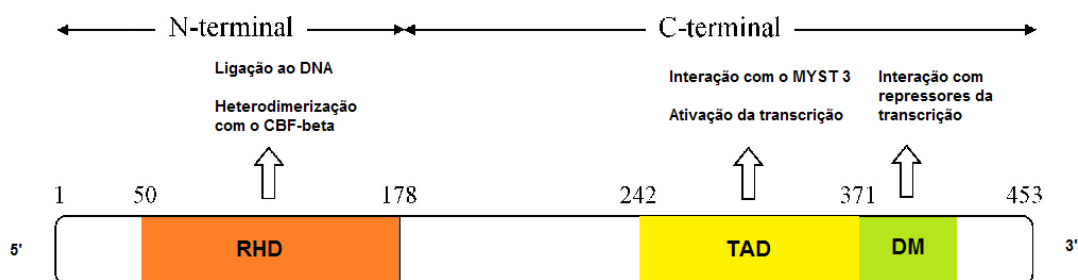


Ilustração 6. Estrutura da proteína RUNX1

Estão representados os 3 domínios do regulador de transcrição RUNX1. O domínio RHD (a laranja) é fundamental na ligação ao DNA e na heterodimerização com o CBF β . O domínio TAD (a amarelo) permite a ativação da transcrição mediante a interação com mediadores, como o MYST3. O domínio repressor (a verde) interage com outras moléculas para reprimir a transcrição de genes-alvo.

RHD – *Runt homology domain*, TAD - *transcription activation domain*, DM – domínio repressor. MYST 3 – *histone acetyltransferase 3*. (Adaptado de Amélie Giguère *et al.*, 2012).⁽⁴⁹⁾

A ligação do cofator CBF β (em condições normais localizado ao citosol, ligado à Filamina-A) nesta região conduz ao reforço significativo da afinidade do RUNX1 pela sequência homóloga de DNA, estabilizando o complexo DNA-RUNX1, e evitando também a sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteossoma, sendo, portanto, indispensável à sua função. O heterodímero formado pelo RUNX1 e pelo CBF β designa-se comumente de *core binding factor* (CBF).⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ Estudos em ratos com *knock-out* do gene que codifica o CBF β demonstraram o mesmo tipo de alterações que os ratos com *knock-out* RUNX1, o que demonstra a grande interdependência entre estas duas moléculas.⁽⁴⁸⁾

A região C-terminal contém regiões reguladoras que medeiam a interação com repressores ou ativadores da transcrição, permitindo que o RUNX1 atue como um regulador da transcrição de múltiplos genes-alvo. Localizam-se aqui os dois domínios restantes da proteína RUNX1, o TAD (*transcription activation domain*), responsável pela interação com um coativador da transcrição, o MYST3 - *histone acetyltransferase 3*, e o domínio repressor **(Ilustração 6)**.^(46,47)

O RUNX1 tem assim capacidade de modificar localmente a cromatina, através do recrutamento de enzimas (como acetilases, desacetilases de histonas e PRC1 - *Polycomb Repressive complex*) capazes de alterar a expressão epigenética de determinadas sequências de DNA, facilitando ou bloqueando a sua transcrição. A regulação da atividade do RUNX1 depende de múltiplos fatores, incluindo o microambiente celular, características do promotor, interação com outros fatores de transcrição e modificações pós-transcrição (miRNAs e moléculas reguladoras). O RUNX1 parece interagir diretamente com múltiplos genes alvo (*CEBPA*, *TCF/LEF-1* - *Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1*, *SPI-1*, *GATA-1* - *GATA*

Binding Protein 1,...), que atuam como fatores de transcrição, com miRNAs e com fatores de crescimento, potenciando ou inibindo a sua atividade.^(46,48)

Estão descritas atualmente mais de cinquenta translocações envolvendo o *RUNX1*.^(46,50) Para além destas translocações relativamente comuns, foram também descritas mutações pontuais envolvendo este gene em indivíduos com LMA. Inicialmente foram descritas mutações germinais *RUNX1* (associadas a doenças familiares de plaquetas com predisposição para LMA), tendo sido posteriormente identificadas também mutações somáticas.⁽⁴⁷⁾

Inicialmente, as mutações pontuais *RUNX1* foram descritas em doentes com LMA secundária a SMD, à terapêutica e à exposição a radiação ionizante, tendo sido também descritas, posteriormente, em doentes com LMA *de novo*, sobretudo do subtipo FAB M0.^(47,51) Estas mutações somáticas ocorrem em 6-33% dos doentes com LMA, consoante a idade, o grupo citogenético, entre outros, e em 6-20% dos doentes com LMA CN.^(50,51) As mutações na LMA subtipo FAB M0 são quase sempre bialélicas (levando a uma perda quase total da função da proteína), enquanto noutros subtipos, as mutações mais frequentes são monoalélicas (perda parcial de função), acompanhadas de anomalias citogenéticas características (sobretudo trissomia 21).⁽⁵²⁾

As mutações pontuais *RUNX1* podem ser divididas em 4 subgrupos principais: 1) mutações *nonsense/frameshift* na região N-terminal que conduzem à formação de uma proteína truncada, 2) mutações *inframe* (deleções ou inserções) no domínio RHD da região N-terminal, 3) mutações *frameshift* na região C-terminal que conduzem à formação de uma proteína truncada e 4) mutações do tipo *frameshift* na região C-terminal, que conduzem à formação de uma proteína anormalmente grande (*chimera-like mutations*).⁽⁵³⁾ As mutações da região N-terminal são as mais frequentes na LMA, sendo que as mutações da região C-terminal são quase exclusivas de LMA secundária a SMD.⁽⁵²⁾

As mutações *nonsense* e *frameshift* na região N-terminal resultam na deleção parcial do domínio RHD e na perda total da região C-terminal. A perda de função do domínio RHD interfere com a capacidade de ligação ao DNA e com o potencial de transativação de complexos RUNX1-promotor (impedindo que estes iniciem corretamente o processo de transcrição).⁽⁵³⁾ As mutações *inframe* no domínio RHD da região N-terminal envolvem geralmente resíduos de arginina fundamentais para a capacidade de ligação do DNA ao fator de transcrição, resultando numa perda ou diminuição da capacidade de ligação do DNA ao RUNX1, com capacidade de ligação ao CBF β mantida.⁽⁵³⁾

As mutações *frameshift* no domínio C-terminal são particularmente heterogêneas, conduzindo à formação de proteínas de variados tamanhos. O domínio RHD encontra-se preservado (e, portanto, a ligação ao DNA e CBF β pode não ser totalmente afetada), mas os domínios de coativador e repressor, na região C-terminal, são afetados de formas distintas, consoante a mutação. As mutações da região C-terminal que conduzem à formação de proteínas truncadas apresentam afinidade aumentada de ligação ao DNA, mas nenhum potencial de transativação. As mutações *chimera-like* conduzem à formação de proteínas anormalmente grandes com capacidade de ligação ao DNA diminuída e sem potencial de transativação.⁽⁵³⁾

Constata-se que as mutações que conduzem a haploinsuficiência raramente se associam a LMA, sendo pelo contrário as mutações com efeitos de dominância negativa, em que a expressão do alelo *WT* é praticamente abolida, aquelas que mais se associam à LMA. A causa para estes efeitos de dominância negativa não é ainda conhecida (silenciamento epigenético, deleção do alelo *WT* com duplicação do alelo mutante e mutação somática do alelo *WT* são explicações possíveis). De facto, quanto menor a expressão do alelo *WT*, maiores parecem ser os efeitos proliferativos conferidos pelas mutações *RUNX1*.^(48,54)

Os mecanismos moleculares que contribuem para a carcinogénese são ainda desconhecidos, mas alguns estudos sugerem que níveis muito baixos deste fator de transcrição (resultantes da diminuição da expressão dos alelos *WT* por dominância negativa) parecem conduzir a um estado pré-leucémico, caracterizado por instabilidade genómica (associado à diminuição da transcrição de genes *p53* – *tumor protein p53* dependentes) e maior potencial proliferativo dos progenitores granulocíticos-monocíticos. As mutações *RUNX1* parecem também conduzir à atenuação dos processos de reparação celular nas células hematopoiéticas.^(48,54) Assim, estas mutações parecem constituir um mecanismo importante de bloqueio da diferenciação celular, requerendo, geralmente, a acumulação de outras mutações adjuvantes em genes que controlam a apoptose e proliferação celular para originar LMA. De facto, mutações *inframe* da região N-terminal parecem requerer mutações de outros genes parceiros, enquanto mutações da região C-terminal, que formam proteínas truncadas, podem ser suficientes, *per si*, para induzir a proliferação das células neoplásicas.⁽⁵³⁾

Os estudos publicados acerca do impacto das mutações *RUNX1* no prognóstico dos doentes com LMA parecem evidenciar um efeito deletério destas mutações.^(47,51,55–57)

A seguinte tabela (**Tabela 5**) resume alguns dos principais estudos acerca do impacto das mutações somáticas do gene *RUNX1* no prognóstico dos doentes com LMA.

Tabela 5. Impacto das mutações somáticas *RUNX1* no prognóstico dos doentes com LMA

Autor(es)	Amostra em estudo	Resultados/Conclusões	Fator Prognóstico Independente
Tang <i>et al.</i> ⁽⁴⁷⁾	470 doentes com LMA <i>de novo</i>	Doentes <i>RUNX1^m</i> apresentam pior taxa de RC em comparação com doentes <i>RUNX1^{wt}</i> (56.8% vs 77.5%, <i>p</i> =0.009). Doentes <i>RUNX1^m</i> apresentam menor OS	Sim Taxa RC (<i>HR</i> = 0.443, <i>p</i> =0.05).

	(não-promiELO crítica)	<p>média em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i> (10.5 meses vs 30.5 meses, $p<0.001$).</p> <p>No subgrupo de doentes com LMA CN, a OS também foi inferior nos doentes <i>RUNXI^m</i> ($\approx 20\%$ aos 50 meses vs $\approx 60\%$, $p<0.01$);</p> <p>Tendência para menor DFS em doentes <i>RUNXI^m</i> em comparação com <i>RUNXI^{wt}</i> ($HR=1.426$, $p=0.111$).</p>	<p>OS ($HR: 1.878$, $p=0.019$).</p>
Gaidzik <i>et al.</i> ⁽⁵⁶⁾	945 doentes com LMA	<p>Doentes <i>RUNXI^m</i> têm tendência para taxas RC inferiores em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i> (60.4% vs 73.4%, $p=0.055$);</p> <p>A taxa de doença refratária é superior em doentes <i>RUNXI^m</i> (30% vs 19%, respectivamente, $p=0.047$);</p> <p>Mutações <i>RUNXI</i> associaram-se a menor DFS aos 4 anos (26% vs 44%, $p=0.022$), menor EFS aos 4 anos (8% vs 30%, $p<0.0001$) e a tendência para menor OS aos 4 anos (32% vs 45%, $p=0.051$), em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i>;</p> <p>Doentes <i>RUNXI^m/FLT3-ITD</i> têm tendência para pior OS em comparação com doentes <i>RUNXI^m/FLT3-ITD^{wt}</i> (18% vs 37%, $p=0.07$).</p>	<p>Sim (mas apenas EFS)</p> <p>EFS ($HR: 1.494$, $p=0.011$)</p> <p>Subgrupo LMA CN - <i>RUNXI^m</i> não é fator de prognóstico independente.</p>
Schnittger <i>et al.</i> ⁽⁵⁵⁾	449 doentes com	Doentes <i>RUNXI^m</i> têm pior OS média (378 dias vs <i>not reached</i> , $p=0.003$, respectivamente) e pior EFS (285 dias vs 450	<p>Sim OS ($p=0.029$)</p>

	LMA <i>de novo</i> e cariótipo não-complexo.	dias, $p=0.003$) em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i> ; Doentes do subgrupo LMA CN com <i>RUNXI^m</i> têm pior OS média (361 dias vs <i>not reached</i> , respetivamente, $p=0.05$) e pior EFS (285 vs 504 dias, $p=0.038$) em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i> .	
Mendler <i>et al.</i> ⁽⁵⁷⁾	400 doentes jovens com LMA CN <i>de novo</i> (175 doentes jovens e 225 doentes idosos).	Doentes <i>RUNXI^m</i> têm menor taxa de RC (47% vs 77%, $p<0.001$), menor DFS aos 5 anos (0% vs 28%, $p<0.001$), OS aos 5 anos (2% vs 30%, $p<0.001$) e menor EFS aos 5 anos (0% vs 22%, $p<0.001$), em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i> ; Em doentes jovens e idosos <i>NPM1^{wt}</i> , constata-se pior prognóstico nos doentes <i>RUNXI^m</i> , em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i> ; Em doentes com <i>ASXLI^{wt}</i> , constata-se pior prognóstico nos doentes <i>RUNXI^m</i> , em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i> . Em doentes <i>RUNXI^{wt}</i> , os doentes <i>ASXLI^m</i> têm pior prognóstico em comparação com doentes <i>ASXLI^{wt}</i> .	Sim Taxa de RC (<i>HR</i> : 0.25, $p<0.001$) OS (<i>HR</i> : 1.65, $p<0.001$) DFS (<i>HR</i> : 2.34, $p<0.001$) EFS (<i>HR</i> : 2.27, $p<0.001$)
Greif <i>et al.</i> ⁽⁵¹⁾	93 doentes com LMA CN.	Menor taxa de RC em doentes <i>RUNXI^m</i> (30% vs 73%, $p=0.01$) em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i> ; Taxa de doença refratária superior em doentes <i>RUNXI^m</i> (40% vs 11.5%, $p=0.04$) em comparação com doentes <i>RUNXI^{wt}</i> ;	Sim OS (<i>HR</i> : 2.51, $p=0.03$)

	<p>Doentes <i>RUNX1^m</i> apresentam menor DFS aos 3 anos (0% vs 30.4%, $p=0.002$) e menor OS aos 3 anos (0% vs 34.4%, $p<0.001$) em comparação com doentes <i>RUNX1^{wt}</i>;</p> <p>A sobrevivência cumulativa é inferior no subgrupo de doentes de risco intermédio-I (média de 75 dias vs 293 dias, $p=0,02$) e no subgrupo de doentes idosos (média de 86 dias vs 432 dias, $p=0,02$) com <i>RUNX1^m</i>, em comparação a doentes <i>RUNX1^{wt}</i>.</p>	
--	--	--

Os doentes com mutações *RUNX1* apresentam mais frequentemente LMA subtipo FAB M0, mutações *MLL-PTD* (a associação com mutações dos genes *ASXL1* - *additional sex combs like-1*, *FLT3-ITD* e *IDH1/2* é controversa) e cariótipo normal ou não complexo. As mutações do gene *NPM1*, por outro lado, são muito raras nos doentes com mutações *RUNX1*. Estas mutações são mais frequentes em doentes mais idosos, sobretudo nos doentes com idade superior a 60 anos, portadores de LMA CN.^(47,51,55-57)

Existe ainda alguma evidência de que o *RUNX1* possa ter aplicação na monitorização da doença residual mínima.⁽⁵⁰⁾

No plano terapêutico, parece existir alguma evidência de que os doentes com mutações do gene *RUNX1* respondem mal à quimioterapia, com baixas taxas de remissão completa e fraca sobrevivência livre de doença, pelo que podem beneficiar de estratégias de tratamento alternativas, em detrimento da quimioterapia convencional, como por exemplo o TACEH.^(47,51,56,57) De facto, no estudo de *Gaidzik et al.*, o TACEH de células estaminais hematopoiéticas, aplicado após a primeira remissão completa, associou-se a maior sobrevivência livre de doença nestes doentes, em comparação com os que foram tratados com quimioterapia convencional/autotransplante.⁽⁵⁶⁾ Estes resultados também haviam sido

sugeridos pelos estudos de Tang *et al.*⁽⁴⁷⁾ Num estudo de Chou *et al.*, constatou-se que a mutação *RUNX1* nos doentes submetidos a TACEH constituía, notavelmente, um fator independente de bom prognóstico.⁽²⁹⁾

Mutações no gene que codifica a nucleofosmina

NPM1

A nucleofosmina (NPM1) é uma proteína ubiquitária, codificada pelo gene *NPM1*, localizado no cromossoma 5q, banda 35, e que pode ser encontrada no citoplasma e no nucléolo das células. Tem como função essencial efetuar o transporte de outras proteínas entre o núcleo e o citoplasma, dada a sua peculiar capacidade de transitar entre estas duas estruturas.^(58,59)

Ao longo dos anos, o conhecimento molecular crescente acerca desta proteína polivalente e multifuncional levou a que lhe tivessem sido reconhecidas inúmeras funções, conhecendo-se atualmente a sua importância na embriogénese, nos processos de *remodeling* da cromatina, duplicação do centróssoma, replicação, reparação, recombinação e transcrição do DNA, bem como no controlo do ciclo celular e na manutenção da sobrevivência celular.⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾

A nucleofosmina apresenta uma estrutura característica, constituída por um domínio hidrofóbico, responsável pela atividade de *chaperon* e pela capacidade de oligomerização (homo ou heterodimerização com outras proteínas), dois locais ácidos importantes na ligação a histonas, um domínio central com atividade de ribonuclease, e domínios envolvidos na ligação ao DNA e RNA, na região C-terminal. Existem ainda dois NLS (*nuclear localization signal*), um NES (*nuclear export signal*) e um NoLS (*nucleolar localization signal*) dispersos pela proteína, e que são importantes nos processos de transporte citoplasma-núcleo, executados pela nucleofosmina (**Ilustração 7**).^(58,59)



Ilustração 7. Estrutura da nucleofosmina

Está representada a estrutura da isoforma B23.1 da nucleofosmina, com os respectivos domínios e suas funções. NES (*nuclear export signal*), NLS (*nuclear localization signal*), NuLS/NoLS (*nucleolar localization signal*) (Adaptado de Silvia Grisendi *et al.*, 2006)⁽⁵⁹⁾

Existem três isoformas de nucleofosmina obtidas por *splicing* alterantivo, sendo a isoforma B23.1 a mais prevalente em todos os tecidos do organismo.^(59,60)

O domínio hidrofóbico da região N-terminal funciona, como anteriormente referido, como um *chaperon* de histonas (responsável pela maior parte das funções da nucleofosmina), apresentando a capacidade de montar estruturas octaméricas de histonas, de transferir nucleossomas para outras sequência de DNA, descondensar cromatina e reparar as proteínas desnaturadas, estimulando ainda a transcrição através de mecanismos acetilase-dependentes. Para além disto, estudos demonstraram que a região N-terminal é também responsável pela interação da nucleofosmina com uma plétora de proteínas (p53, p14arf - *ARF tumor suppressor*, Fbw7 γ - *F-box and WD-40 domain-containing protein 7 gamma*, proteínas ribossômicas, entre outras), sendo que esta parece representar um papel fulcral na sinalização, tráfego e ativação de proteínas entre o núcleo e o citoplasma das células.⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾

Para lá da sua importante atividade de *chaperon*, os restantes domínios permitem ainda que a nucleofosmina interaja com outras proteínas, destacando-se fatores nucleares (nucleolina, fibrilarina, snoRNPs - *nucleolar ribonucleoprotein particles*), fatores de

transcrição (IRF1 - *interferon regulatory factor 1*, NF-kB...), histonas (H3, H4, H2B...), proteínas envolvidas na proliferação celular (NEK2A - *NIMA-Related Kinase 2A*, DNA polymerase- α), entre outras, reforçando o papel polivalente da nucleofosmina na homeostasia das células.⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾

A função do gene *NPM1* pode ser desregulada por múltiplos mecanismos, desde translocações com formação de proteínas de fusão a mutações pontuais, muito comuns em doentes com LMA. A desregulação do gene *NPM1* foi associada não só a neoplasias hematológicas como também a tumores sólidos, verificando-se a sobreexpressão de *NPM1* em neoplasias do cólon, do ovário, do estômago e da próstata.⁽⁵⁹⁾

O gene *NPM1* tem sido reportado como o alvo mais frequente de mutações nos doentes com LMA, estando estas presentes em cerca de 30-35% dos doentes com LMA e em 45-64% dos doentes com LMA CN.^(19,58,61) As mutações pontuais *NPM1* são sempre heterozigóticas, e mutuamente exclusivas com anomalias citogenéticas recorrentes, daí que tivessem sido propostas como um subtipo de LMA específico na nova classificação da OMS (2008).⁽⁵⁸⁾ Este gene pode atuar simultaneamente como supressor tumoral ou como oncogene, dependendo da sua expressão génica, da quantidade de proteína traduzida, das proteínas intermediárias que interagem com a nucleofosmina e da compartimentalização da mesma.⁽⁵⁰⁾

Atualmente encontram-se descritas mais de 50 mutações diferentes do gene *NPM1*, sendo as consequências fenotípicas, porém, semelhantes em todos os tipos de mutações, com desregulação do domínio C-terminal. As mais frequentes envolvem o exão 12 do gene *NPM1*, correspondendo a mais de 50% dos casos em doentes com LMA CN, consistindo em duplicações ou inserções de nucleótidos, que resultam em mutações do tipo *frameshift*.^(58,60,61)

As mutações do gene *NPM1* conduzem assim, habitualmente, à tradução de uma proteína aberrante, em que a região C-terminal é afetada, com interrupção do NoLS, fundamental para a manutenção da nucleofosmina no nucleoplasma. Causam ainda a perda de 1 ou 2 resíduos de triptofano na região C-terminal, provocando uma alteração conformacional

da estrutura tridimensional da proteína aberrante, modificando-a para a sua forma *unfolded*. A esta alteração estrutural, acresce ainda a inserção de um novo domínio NES (resultante da mutação), que reforça o efeito da ação de exportinas (Crm1 - *chromosome region maintenance 1, e.g.*) que medeiam o transporte da nucleofosmina aberrante do nucleoplasma para o citoplasma. Como o domínio NLS é mantido, a proteína aberrante mantém a capacidade de se mover do citoplasma para o nucleoplasma, mas a sua capacidade de ligação ao nucléolo é parcial (perda de um só resíduo de triptofano) ou totalmente (perda dos 2 resíduos) inibida, privando o nucléolo desta proteína fundamental para a sua homeostasia, e alterando as suas funções transportadoras.^(50,60) Este mecanismo explica as observações efetuadas em doentes com LMA e mutações *NPM1*, em que se constatou que a maioria das proteínas *NPM1* mutantes estava circunscrita ao citoplasma, sendo que apenas uma minoria estaria localizada no núcleo da célula.⁽⁵⁸⁾

Os eventos moleculares que potenciam a carcinogénese nas mutações *NPM1* permanecem ainda desconhecidos.⁽⁵⁰⁾ Contudo, dado que a nucleofosmina mutante se liga a inúmeras proteínas, deslocando-as assim do núcleo para o citoplasma, presume-se que algumas das proteínas deslocadas possam ter um impacto importante na proliferação celular ou na supressão da apoptose, favorecendo desta forma a carcinogénese. De facto, as mutações deste gene parecem desempenhar um papel crítico no surgimento da LMA, ao interferir com múltiplos reguladores do ciclo celular (incluindo o NF-KB, HEXIM1 - *hexamethylene bis-Acetamide inducible protein 1*, p15 - *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*, p21 - *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*, entre outros).⁽⁶⁰⁾

Curiosamente, as mutações do gene *NPM1* foram associadas a algumas características clínicas singulares, como baixa expressão de CD34, sobreexpressão de CD33 e leucocitose exuberante, bem como a um padrão de expressão génica típico, caracterizado por sobreexpressão de genes da família *HOX* e alguns miRNAs específicos.⁽⁵⁰⁾

O impacto positivo das mutações *NPM1*, na ausência de mutações ITD do gene *FLT3*, no prognóstico dos doentes com LMA (geralmente com cariótipo normal) foi constatado em vários estudos. Assim, estas mutações constituem atualmente parte integrante da classificação da ELN para estratificação do risco dos doentes com LMA (subgrupo com LMA CN).^(50,60,62)

Numa metanálise publicada recentemente por Port *et al.*, que analisaram os principais estudos realizados até 2012 sobre o impacto prognóstico das mutações *FLT3-ITD*, *NPM1* e *CEBPA* nos doentes com LMA CN, pôde constatar-se o impacto independente positivo das mutações *NPM1* no prognóstico destes doentes, que se associaram a melhor sobrevivência livre de doença (*HR*: 0.56, $p < 0.00001$) e a melhor sobrevivência global (*HR*: 0.56, $p < 0.00001$).⁽¹⁹⁾

As taxas de remissão completa em doentes jovens com LMA CN e genótipo *NPM1^m/FLT3-ITD^{wt}* são geralmente superiores a 90% com esquemas de quimioterapia convencional, obtendo-se também boas taxas de remissão em doentes mais idosos submetidos a quimioterapia intensiva.⁽⁵⁰⁾

Para além disto, na minoria dos doentes com LMA e mutação *NPM1* que também apresentam alterações citogenéticas (cerca de 15%), constatou-se que o impacto das mutações do gene *NPM1* no prognóstico destes doentes parece ser independente das alterações cromossómicas presentes, tendo-se constatado uma evolução semelhante entre os doentes *NPM1^m* com cariótipo normal e os doentes com alterações cromossómicas aberrantes.⁽⁶⁰⁾ Estes achados parecem suportar a hipótese de que a mutação do gene *NPM1* é, de facto, um evento precoce e iniciador da carcinogénese, sendo que o surgimento de alterações cromossómicas aberrantes pode ser um evento secundário na história natural da doença, neste subgrupo de doentes.^(58,60)

Contudo, apesar de as mutações do gene *NPM1* conferirem intrinsecamente melhor prognóstico aos doentes com LMA, constatou-se em alguns estudos que a presença

concomitante de mutações ITD do gene *FLT3* parece suplantar os efeitos positivos das mutações do gene da nucleofosmina.⁽⁵⁰⁾

De facto, nos estudos de Gale *et al.*, observou-se que em 1217 doentes em que foram estudadas mutações *FLT3-ITD* e *NPM1*, a sobrevivência global aos 5 anos para doentes com LMA e genótipo *NPM1^m/FLT3-ITD^{wt}* era de 59%, enquanto que para doentes com genótipo *NPM1^m/FLT3-ITD* era de apenas 35% ($p<0.001$). Observou-se também uma menor sobrevivência livre de doença e maior risco de recidiva em doentes *NPM1^m/FLT3-ITD*, em comparação com doentes *NPM1^m/FLT3^{wt}*.⁽²⁰⁾

Nos estudos de Jain *et al.*, os autores estudaram também o impacto sobre o prognóstico dos genótipos *NPM1^m/FLT3-ITD*, *NPM1^m/FLT3^{wt}*, *NPM1^{wt}/FLT3-ITD*, e *NPM1^{wt}/FLT3^{wt}*. Constatou-se que os doentes com genótipo *NPM1^{wt}/FLT3-ITD* apresentavam, de entre todos os subgrupos, as piores taxas de sobrevivência global (OS: $\approx 20\%$ às 156 semanas, $p=0.012$) e de sobrevivência livre de eventos (OS: $\approx 20\%$ às 156 semanas, $p=0.003$), não se tendo verificando, contudo, diferenças significativas entre o prognóstico dos doentes com genótipo *NPM1^m/FLT3-ITD* e os doentes com genótipo *NPM1^m/FLT3^{wt}*, mesmo no subgrupo de doentes com LMA CN (ao contrário do estudo de Gale *et al.*).⁽⁶¹⁾

Recentemente, Cheng *et al.*, divulgaram estudos que parecem indicar que a presença de polimorfismos intrónicos na região 3' do gene *NPM1*, que resultam da deleção de um nucleótido de Timidina na posição 1146, pode estar também associada a implicações prognósticas relevantes. Dos cerca de 60-70% de doentes com LMA que são portadores desta alteração, constatou-se que os indivíduos portadores deste polimorfismo em homozigotia apresentavam um prognóstico significativamente inferior (DFS – média 5 meses *vs* 12 meses, $p=0.007$ e OS – média 9 meses *vs* 12 meses, respetivamente, $p=0.016$) e maior taxa de recidiva (59% *vs* 31%, respetivamente, $p=0.051$), em comparação com indivíduos não-homozigóticos. Neste estudo, este polimorfismo demonstrou ser inclusive um fator de

prognóstico independente para menor sobrevivência global em doentes com LMA. Esta alteração genética parece estar associada à criação de um local de ligação anómalo entre o gene *NPM1* e o *miRNA-337-5p*, que parece exercer um efeito repressor sobre este, diminuindo a expressão génica, quando o polimorfismo está presente em homozigotia. Este efeito causa uma diminuição da expressão de nucleofosmina na célula, que provavelmente potencia efeitos pró-carcinogénicos através de mecanismos que envolvem a amplificação do centróssoma e a instabilidade genómica.⁽⁶³⁾

Para além do valor indiscutível do gene *NPM1* na estratificação do risco dos doentes com LMA, constatou-se também nos estudos de Jain *et al.*, que as mutações deste gene pareciam ser estáveis no tempo, ao contrário das mutações ITD do gene *FLT3*. De facto, todos os doentes com a mutação que atingiram a remissão completa apresentaram uma ausência completa dos clones *NPM1+*, sendo que no caso de recidiva, a maioria dos doentes com mutação prévia deste gene voltou a expressar clones de LMA com *NPM1+*. Esta estabilidade, aliada ao facto de que um número elevado de doentes com LMA apresentam mutações *NPM1*, tornam este gene num candidato potencial para monitorização da DRM, sendo necessários estudos posteriores para clarificar a sua verdadeira importância neste contexto.⁽⁶¹⁾

No plano terapêutico, os estudos de Schlenk *et al.*, parecem indicar que os doentes com mutações *NPM1* (sem mutação *FLT3*) não parecem beneficiar de TACEH de células estaminais hematopoiéticas após primeira RC, uma vez que não se constatam diferenças importantes na sobrevivência livre de recidiva entre os doentes submetidos a quimioterapia de consolidação/autotransplante *vs* TACEH.⁽⁶⁴⁾ Estes resultados foram confirmados posteriormente por Chou *et al.*⁽²⁹⁾

De facto, como foi anteriormente referido, a quimioterapia convencional parece ser bastante eficaz nos doentes com este tipo de mutações, facto que foi associado à inativação do NF-KB, deslocado do núcleo para o citoplasma, pela nucleofosmina mutante.^(50,60) Assim, parece existir evidência de que os doentes jovens com LMA e mutações *NPM1* (*FLT3-ITD^{wt}*)

devem ser tratados com esquemas de quimioterapia convencional, com ou sem autotransplante.^(50,60)

Quanto aos doentes mais idosos, em que as mutações *NPM1* parecem ter um menor impacto favorável no prognóstico, bem como em relação a doentes com mutações *NPM1* e *FLT3-ITD* concomitantes, o tratamento permanece ainda controverso, sendo ainda desconhecido o verdadeiro valor do TACEH e de outras terapêuticas alternativas nestas circunstâncias.^(50,60)

O futuro da terapêutica molecular visando a nucleofosmina parece passar por duas alternativas fundamentais. A primeira consiste na criação de fármacos que permitam a diminuição do *pool* residual de nucleofosmina *WT* que permanece no nucléolo, uma vez que este parece ser essencial para a sobrevivência dos blastos de LMA. A abolição destas proteínas normais residuais poderia conduzir a uma maior suscetibilidade das células tumorais à terapêutica.^(58,60)

Da mesma forma, a criação de moléculas que bloqueiem especificamente as proteínas intermediárias que são deslocadas pela nucleofosmina mutante, como o NF-KB, HEXIM 1, entre outras, pode permitir também o controlo dos mecanismos que conduzem à carcinogénese.⁽⁶⁰⁾

A segunda alternativa envolve o desenvolvimento de moléculas que atuem como *chaperons* farmacológicos, apresentando capacidade de modificar a nucleofosmina mutante, que se encontra na sua forma *unfolded*, para a forma *folded*. Assim, esta alteração poderia permitir que esta proteína fosse reintegrada no nucléolo dos blastos, de modo a impedir a interação com os intermediários que intervêm nos processos fisiopatológicos da carcinogénese, através da supressão da apoptose e da proliferação celular desorganizada.⁽⁵⁸⁾

Mutações em genes associados à metilação do DNA

TET 2

O *TET2* é um oncogene pertencente à família dos genes *TET* (*ten eleven translocation*), localizado ao cromossoma 4q, banda 24, contendo onze exões.⁽⁶⁵⁾ Este gene codifica uma proteína que catalisa a hidrólise de 5-metilcitosina (5mc) em 5-hidroximetilcitosina (5hmc) nas cadeias de DNA, processo que parece ser importante na desmetilação do DNA, contribuindo para a regulação epigenética e para o *remodeling* da cromatina.^(66,67)

A proteína codificada pelo *TET2* existe em 3 isoformas distintas, resultantes de *splicing* alternativo, expressas variavelmente nos diferentes tecidos do nosso organismo. A sua estrutura é constituída por dois domínios fundamentais; um domínio N-terminal rico em cisteína e um domínio dioxigenase 2-oxoglutarato-Fe(II) dependente, com dupla cadeia em β -*helix* (DSBH), responsável pela atividade catalítica da proteína. O domínio DSBH comporta três locais de ligação metálica, onde são acoplados iões de Fe^{2+} , e um local de ligação ao 2-oxoglutarato (ou α -cetoglutarato, que atua como cofator), fundamentais para que ocorra a ativação catalítica (**Ilustração 8**).⁽⁶⁵⁾

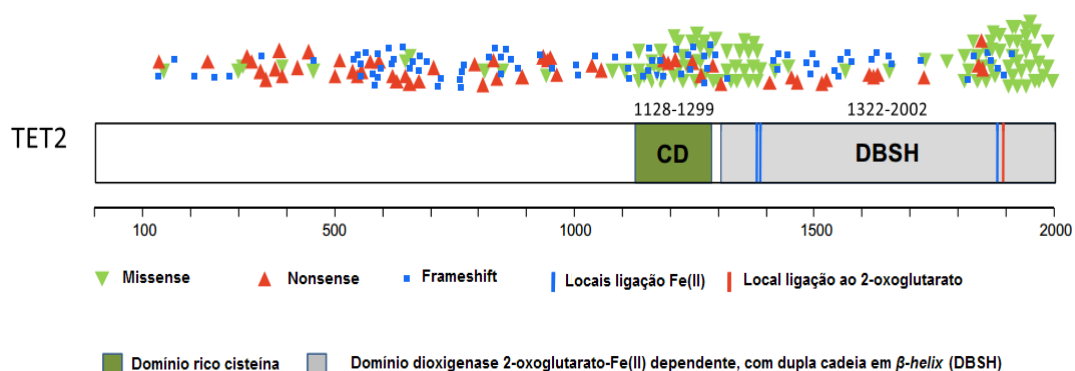


Ilustração 8. Estrutura da proteína TET2

É possível observar os dois domínios principais da proteína; o domínio rico em cisteína (CD, quadrado verde) e o domínio dioxigenase 2-oxoglutarato-Fe(II) dependente (DSBH, quadrado cinzento). Os

traços azuis correspondem aos 3 locais de ligação de iões Fe^{2+} , enquanto o traço vermelho representa o local de ligação do 2-oxoglutarato. Podem observar-se os locais da proteína correspondentes ao local e tipo de mutação que ocorrem no gene *TET2*. Note-se que as mutações *missense* (triângulo verde) estão agregadas junto dos dois domínios da proteína, enquanto as mutações *Nonsense* e *Frameshift* (triângulo vermelho e quadrado azul) estão dispersas por toda a sua estrutura. (Adaptado de Mohr *et al.*, 2010)⁽⁶⁵⁾

A conversão de 5mc em 5hmc pelas proteínas TET2 constitui aparentemente um processo intermédio nos mecanismos de desmetilação. A DNMT1 não reconhece os resíduos 5hmc (previamente convertidos a partir do 5mc pela proteína TET2) das sequências de DNA, levando assim a uma suspensão da reprodução dos padrões de metilação quando o DNA é replicado.⁽⁶⁸⁾ Estudos mais recentes demonstraram que a proteína TET2 também pode contribuir para processos de desmetilação ativa, através da remoção catalítica de grupos *metil* das bases de citosina.⁽⁶⁶⁾

O papel do *TET2* na hematopoiese não foi ainda completamente elucidado, mas parece existir evidência de que este gene é importante na mielopoiese. De facto, estudos em ratos com *knock-out* de gene *TET2* demonstraram uma expansão do compartimento de células hematopoiéticas, com aumento da sua autorrenovação, associado a uma distorção na diferenciação mielóide, com favorecimento da diferenciação granulocítica-monocítica em detrimento de outras linhagens mielóides.^(68,69)

As mutações *TET2* estão presentes em cerca de 7.7 a 27.4% dos doentes com LMA e em cerca de 8.8 a 36.2% dos doentes com LMA CN.⁽⁶⁶⁾ Estas mutações eram anteriormente consideradas como eventos precoces e iniciadores na carcinogénese da LMA, mas estudos recentes vieram demonstrar que representam provavelmente um evento mais tardio no processo neoplásico.⁽⁷⁰⁾ Provavelmente, o que ocorre nos estádios pré-carcinogénicos é uma

proliferação de clones pré-neoplásicos de células estaminais, com mutação deste gene, antes da transformação neoplásica, sendo necessárias mutações adicionais em outros genes para além do *TET2*, para o surgimento da LMA.^(66,68)

Os processos moleculares específicos na base da indução carcinogénica pelo *TET2* permanecem por desvendar. Pensa-se que as mutações do gene *TET2*, que conduzem geralmente a haploinsuficiência, ao impedirem a hidroxilação do 5mc a 5hmc, interfiram com a desmetilação do DNA, conduzindo potencialmente à subregulação de genes que controlam a diferenciação celular e de genes que regulam negativamente a renovação do *pool* de células estaminais.^(66,68)

As mutações *TET2* podem ser do tipo *frameshift*, *nonsense* ou *missense*. A esmagadora maioria dos casos correspondem a mutações heterozigóticas, conduzindo a perda de função. Contudo, em casos mais raros, foram identificadas mutações associadas a dissomia uniparental, perda de heterozigotia ou deleção de um alelo, em possível associação com efeitos de dominância negativa da proteína mutante sobre a proteína *WT*.^(65,66)

As mutações somáticas no *TET2* do tipo *missense* afetam com maior frequência o domínio catalítico DSBH, conduzindo provavelmente a alterações da conformação da proteína (*folding*) ou dos locais de ligação aos cofatores, interferindo com a atividade catalítica da proteína mutante. As mutações do tipo *nonsense*, que conduzem à síntese de um codão *stop* prematuro, e as mutações do tipo *frameshift*, que se associam à perda de função ou à síntese de um codão *stop* prematuro, conduzem geralmente à tradução de proteínas truncadas, provavelmente sem atividade catalítica. Estas hipóteses parecem estar de acordo com o facto de se constatarem níveis diminuídos de 5hmc em indivíduos com mutações *TET2*, sugerindo a diminuição ou abolição da atividade catalítica da proteína mutante.⁽⁶⁵⁾

Mutações que ocorrem em regiões não críticas para o funcionamento catalítico desta proteína parecem não afetar significativamente a função da mesma.⁽⁶⁵⁾

Não é raro que os doentes com LMA sejam portadores de mais do que uma mutação do gene *TET2*, bem como mutações de outros genes, como o *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *RUNX1*, entre outras.⁽⁶⁶⁾ As mutações *TET2* são mutuamente exclusivas com as mutações *IDH1* e *IDH2*.^(66,67)

O impacto das mutações *TET2* no prognóstico dos doentes com LMA permanece ainda controverso, inclusive no subgrupo com LMA CN.^(66,67)

Inicialmente, Abdel-Wahab *et al.*, relataram nos seus estudos que os doentes com LMA e mutações *TET2* apresentavam prognóstico mais desfavorável, com menor sobrevivência global. Contudo, estes resultados não foram confirmados nos estudos posteriores de Nibourel *et al.*, onde não se constatou nenhuma associação significativa entre as mutações *TET2* e a sobrevivência global dos doentes estudados, que haviam atingido a remissão completa.⁽⁶⁶⁾

Chou *et al.*, estudaram 486 doentes com LMA *de novo*, em que 13,2% eram portadores de mutações *TET2*, tendo constatado que os doentes classificados com risco citogenético intermédio e que eram portadores da referida mutação, apresentavam um prognóstico mais desfavorável. Os efeitos deletérios da mutação *TET2* no prognóstico dos doentes foram ainda mais notórios nos que apresentavam genótipos desfavoráveis, incluindo os que eram portadores de mutações *TET2* e *FLT3-ITD* concomitantes ou *NPM1^{wt}* com mutação *TET2*, apresentando estes pior sobrevivência global comparativamente aos doentes sem mutação do *TET2*.⁽⁷¹⁾

Posteriormente, alguns estudos focaram-se sobretudo na relação entre as mutações deste gene e o prognóstico dos doentes com LMA CN.⁽⁶⁶⁾

Neste contexto, Weissmann *et al.*, e Metzeler *et al.*, constataram que as mutações *TET2* representavam um fator de mau prognóstico apenas nos doentes com LMA CN, pertencentes ao grupo de risco favorável (classificação ELN), não se verificando este efeito no subgrupo de doentes com risco intermédio-I.⁽⁶⁶⁾

Estes resultados não foram, porém, confirmados por Gaidzik *et al.*, que estudaram 783 doentes jovens com LMA, dos quais 60 (7.6%) apresentavam mutações do gene *TET2*, tendo constatado que as mutações deste gene não apresentavam impacto significativo no prognóstico dos doentes (sobrevivência global, sobrevivência livre de doença, sobrevivência livre de eventos), nem mesmo no subgrupo de doentes com LMA CN.⁽⁶⁷⁾

Perante os resultados discrepantes obtidos pelos diversos grupos de estudo, Liu *et al.*, publicaram uma metanálise onde foram considerados os 8 principais estudos publicados entre 2010 e 2012, acerca do impacto da mutação *TET2* no prognóstico dos doentes com LMA, obtendo assim uma amostra total de 2552 doentes.⁽⁶⁶⁾

Em termos clínicos, constatou-se nesta metanálise que estes doentes eram em média mais idosos do que os doentes sem mutação deste gene, e que as mutações *TET2* se associavam mais frequentemente a mutações do gene *NPM1* ($p < 0.05$), não parecendo existir associação estatística com mutações dos genes *FLT3* ou *CEBPA*.⁽⁶⁶⁾

Quanto ao prognóstico, o *HR* obtido para a sobrevivência global nos doentes com LMA e mutação *TET2* foi de 1.53 ($p = 0.000$), enquanto para a sobrevivência livre de eventos foi obtido um *HR* de 1.64 ($p = 0.000$), em comparação com os doentes sem mutação *TET2*. Estes resultados traduzem claramente uma associação independente das mutações *TET2* com um prognóstico desfavorável nos doentes com LMA. Quando se analisaram os subgrupos de doentes com LMA CN, obteve-se um *HR* nos indivíduos com mutações *TET2* de 1.43 para a sobrevivência global ($p = 0.001$), e de 1.76 para a sobrevivência livre de eventos ($p = 0.000$), parecendo as mutações *TET2* nestes doentes constituir também um fator independente de mau prognóstico. Foi também constatado um pior prognóstico em termos de sobrevivência livre de eventos nos subgrupos de doentes com LMA CN, quer de risco favorável (classificação ELN) quer de risco intermédio-I.⁽⁶⁶⁾

Damm *et al.*, publicaram posteriormente um estudo sobre 215 doentes jovens com LMA CN, dos quais 6% eram portadores de mutações *TET2*, não tendo constatado também nenhuma associação relevante entre estas mutações e o prognóstico dos doentes. Contudo, verificaram que os portadores de mutações concomitantes *TET2* e *FLT3-ITD* apresentavam prognóstico particularmente desfavorável.⁽⁷⁰⁾

Não existem estudos sólidos que permitam determinar o impacto da cooperação entre as mutações do gene *TET2* e outras anomalias genéticas recorrentes (*FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*,...), suspeitando alguns autores que o verdadeiro impacto das mutações *TET2* no prognóstico dos doentes pode mesmo ser dependente das mutações concomitantes associadas.^(66,70)

Chou *et al.*, constataram que as mutações *TET2* estavam frequentemente ausentes em casos de recidiva de LMA, em que os doentes apresentavam mutações do referido gene antes de atingirem a remissão completa. Para além disto, em casos raros, constatou-se também o surgimento *de novo* de mutações do gene *TET2*, aquando da recidiva da doença, em doentes *TET2^{wt}* à data do diagnóstico. Uma vez que estes dados sugerem uma instabilidade relativa destas mutações, o valor do *TET2* na monitorização de DRM na LMA parece ser limitado.⁽⁷¹⁾

As mutações *TET2* parecem estar associadas a resistência à quimioterapia convencional, apesar de este dado ser ainda controverso.^(67,72) Neste contexto, o papel das terapêuticas alternativas como o TACEH permanece ainda por elucidar nestes doentes. O papel dos agentes hipometilantes no tratamento dos doentes com LMA e mutações *TET2* tem gerado controvérsia ao longo dos últimos anos, com resultados discrepantes quanto à sua eficácia (um estudo apurou resposta de 82% dos doentes à azacitidina, enquanto outros apuraram uma menor resposta a fármacos hipometilantes), provavelmente associados à escassa caracterização genómica dos doentes nestes estudos, para lá das mutações do referido gene.^(66,73) A ausência de resposta pode estar relacionada com o desconhecimento dos padrões de metilação global dos doentes com mutações deste gene – a expressão génica em doentes

com mutação *TET2* demonstra um padrão típico de hipermetilação, em comparação com doentes *WT*. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel destas mutações nos padrões de metilação dos doentes com LMA, de modo a apurar potenciais alvos terapêuticos.^(69,73)

IDH1 E IDH2

O gene *IDH 1* (*Isocitrate dehydrogenase 1*), localizado ao cromossoma 2q, banda 33.3, codifica a enzima isocitrato desidrogenase 1, presente no citoplasma/peroxissoma, enquanto o gene *IDH2* (*Isocitrate dehydrogenase 2*), localizado no cromossoma 15q, banda 26.1, codifica a enzima isocitrato desidrogenase 2, presente nas mitocôndrias. Ambas são enzimas homodiméricas, pertencentes à família das β -descarboxilase desidrogenases, NADP⁺ dependentes, fundamentais no ciclo de Krebs, que catalisam a descarboxilação oxidativa do isocitrato a α -cetoglutarato, com redução do NADP⁺ a NADPH. Estes genes estão envolvidos no metabolismo celular aeróbio, na defesa das células contra o stresse oxidativo e na transdução dos sinais oxigénio-dependentes, em células normais.^(50,74)

A presença de mutações somáticas dos genes *IDH* foi descrita inicialmente em neoplasias colo-retais, tendo sido seguidamente identificada em gliomas, SMD e outras neoplasias mieloproliferativas, bem como nos linfomas angioimunoblásticos de células T.⁽⁵⁰⁾

As mutações do gene *IDH1* ocorrem em cerca 6 a 16% dos doentes com LMA, enquanto as mutações do gene *IDH2* ocorrem em cerca de 8 a 19% destes indivíduos.⁽⁷⁵⁾ Estas alterações genéticas parecem ser mais frequentes em doentes com LMA CN do que nos restantes subgrupos (11% vs 3.5% nas mutações *IDH1* e 16% vs 3.8% nas mutações *IDH2*), sendo das mutações mais frequentes nestes indivíduos (cerca de 27%). Este tipo de anomalias é muito mais frequente em doentes adultos do que em crianças.⁽⁷⁴⁾

Todas as mutações conhecidas dos genes *IDH* na LMA envolvem a substituição de um resíduo de arginina por outro aminoácido. Quando envolvem o gene *IDH1*, a substituição ocorre no codão 132 - *IDH1*^{R132}, enquanto as mutações do gene *IDH2* afetam geralmente os codões 140 - *IDH2*^{R140} (mais comum, ocorre em cerca de 81% dos casos) ou 172 - *IDH2*^{R172}. Não foram identificadas até hoje mutações que inativem o *IDH* (tipo *frameshift* ou *nonsense*). Do ponto de vista bioquímico, a substituição da arginina conduz provavelmente a uma diminuição da afeição da enzima mutante pelo isocitrato, seu substrato.⁽⁷⁴⁾

As mutações destes dois genes são, na maioria dos casos, mutuamente exclusivas, ocorrendo simultaneamente mutações concomitantes *IDH1* e *IDH2* apenas numa minoria dos casos, facto que parece corroborar a hipótese de que pelo menos alguns dos efeitos deletérios e oncogénicos da mutação *IDH1* são semelhantes aos da mutação *IDH2*.⁽⁷⁴⁾

Notavelmente, ao contrário do que é habitual, mutações nestes genes conduzem não só a uma perda da função normal da proteína mutante, como também à aquisição de novas funções, diferentes da isoenzima *WT* (atividade neomórfica). Dado que todas as mutações *IDH1* e *IDH2* até hoje identificadas são heterozigóticas, pensa-se que as proteínas *IDH*^{wt} (que atuam geralmente como homodímeros) formem complexos heterodiméricos com as proteínas mutantes, associando-se a uma alteração da especificidade e direccionalidade da ligação entre a enzima e o substrato padrão (isocitrato). Assim, na impossibilidade de sintetizar α -cetogluturato a partir do isocitrato, a enzima aberrante passa a reduzir o α -cetogluturato (a mutação dos genes *IDH* aumenta a afinidade por este substrato) a 2-hidroxi-glutarato, um metabolito potencialmente oncogénico, e com capacidade para interferir na desmetilação do DNA, promovida por outras proteínas intermediárias (*TET2*, por exemplo – **Ilustração 9**).⁽⁷⁴⁾

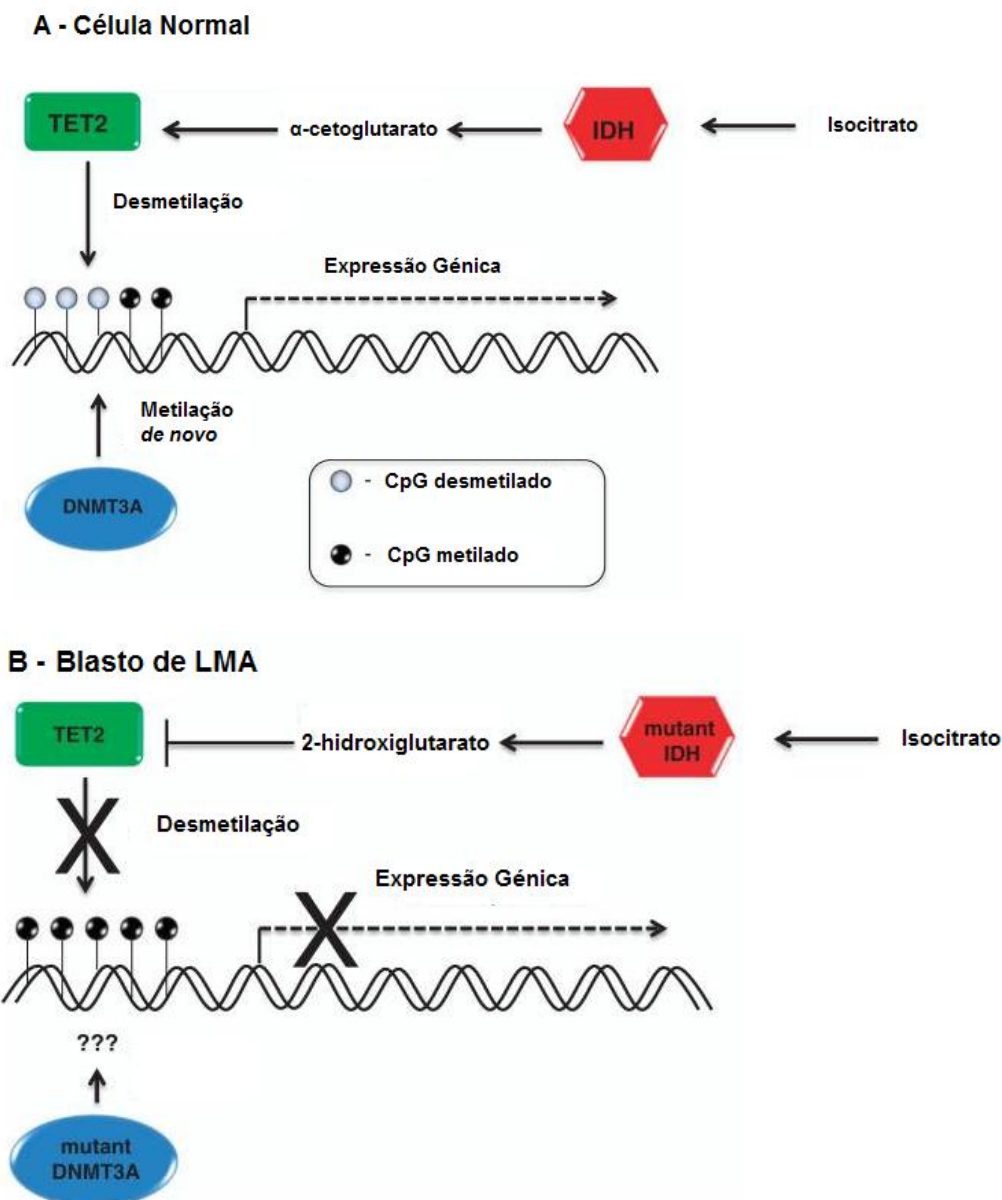


Ilustração 9. Interação entre a IDH, o TET2 e o DNMT3A na regulação da expressão gênica

A) A proteína Isocitrato desidrogenase (IDH, a vermelho) catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato a α -cetoglutarato, numa célula normal. O α -cetoglutarato é um cofator importante para a ativação do TET2 (a verde), que permite a desmetilação de sequências CpG, através da hidrólise de 5mc em 5hmc, conduzindo à expressão de genes-alvo. O DNMT3A (a azul) permite a metilação *de novo* das sequências desmetiladas, impedindo a sobreexpressão de genes envolvidos na proliferação celular. B) Na presença de mutações *IDH*, as proteínas mutantes não conseguem transformar o isocitrato em α -cetoglutarato, convertendo-o, ao invés, em 2-hidroxiglutarato. O défice de α -cetoglutarato perturba a função das proteínas TET2, que não conseguem promover a desmetilação das

sequências de DNA, conduzindo à repressão génica. O papel do DNMT3A mutante neste contexto permanece controverso. (Adaptado de Im *et al.*, 2014)⁽⁷⁵⁾

Os mecanismos moleculares que conduzem à carcinogénese na LMA na presença de mutações destes genes não são ainda totalmente conhecidos. Observa-se em doentes com LMA que a síntese anormal de 2-hidroxioglutarato leva a uma subida detetável da concentração intracelular deste metabolito, pensando-se que esta concentração elevada pode ser suficiente para induzir a produção de espécies reativas de oxigénio (devido a alterações da função da cadeia respiratória), que danificam as células hematopoiéticas. Dada a similaridade entre o α -cetoglutarato e o 2-hidroxioglutarato, pensa-se que este metabolito possa exercer também uma atividade oncogénica através de um mecanismo de inibição competitiva entre enzimas α -cetoglutarato-dependentes (*TET2*, *PHD* – *plant homeodomain* e outras dioxigenases).⁽⁷⁴⁾

As mutações dos genes *IDH* podem assim contribuir para a hipermetilação aberrante do DNA e das histonas, através da produção de 2-hidroxioglutarato e da inibição da desmetilação promovida pelo *TET2*, modelando assim a regulação epigenética, com desregulação da expressão génica e bloqueio da diferenciação de células estaminais (**Ilustração 9**).^(74,75)

Considerando que as mutações *TET2* são mutuamente exclusivas com as mutações *IDH*, estes dados sugerem uma função redundante de ambas na carcinogénese, uma vez que ambas parecem conduzir a estados de hipermetilação do DNA. Apesar de o mecanismo carcinogénico poder ser semelhante, o impacto das mutações *TET2* no prognóstico dos doentes é diferente do registado nas mutações *IDH1* e *IDH2* (possivelmente devido aos efeitos do 2-hidroxioglutarato e das diferentes mutações associadas em cada subgrupo de doentes).⁽⁷⁴⁾

As mutações *IDH* foram associadas a hipermetilação de genes importantes na diferenciação celular e na carcinogênese, como o *EVII* (*Ecotropic Virus Integration Site 1 Protein Homolog*) e os genes *GATA1* e *GATA2* (*GATA Binding Protein 2*), bem como a subregulação do *c-KIT*. Existe evidência de que o 2-hidroxiglutarato tem também um efeito inibitório sobre desmetilases de histonas (fundamentais para os processos de diferenciação terminal de progenitores hematopoiéticos), o que pode contribuir para uma potenciação da hipermetilação tanto das histonas como do DNA, com importantes efeitos na regulação epigenética. Estudos em ratos demonstraram que as mutações *IDH1* cooperavam com o gene *HOXA9* para fomentar a carcinogênese.^(74,75)

Pensa-se que as mutações dos genes *IDH* constituem um evento iniciador da carcinogênese nos doentes com LMA.^(50,74)

Globalmente, as mutações destes genes na LMA estão associadas com maior frequência a indivíduos mais idosos, a contagens mais altas de plaquetas e a LMA CN. Em contraste, estas mutações associam-se com menor frequência a mutações concomitantes ITD ou TKD do gene *FLT3* e *CEBPA*, sendo muito incomuns nos doentes com anomalias cromossômicas recorrentes [inv(16), t(15;17), t(8;21),...], em comparação com doentes sem mutações *IDH1/2*.^(74,75)

As mutações *IDH1*^{R132} e *IDH2*^{R140} associam-se frequentemente a mutações *NPM1*, enquanto a mutação *IDH2*^{R172} surge frequentemente sem qualquer outra anomalia genética associada.⁽⁷⁴⁾

O impacto das mutações *IDH1* e *IDH2* no prognóstico dos doentes permanece controverso. Ao longo dos últimos anos foram publicados dezenas de estudos acerca do impacto das mutações *IDH* no prognóstico dos doentes com LMA, tendo-se constatado uma heterogeneidade importante. Enquanto alguns estudos parecem indicar um efeito positivo destas mutações na sobrevivência global dos doentes, outros parecem indicar um impacto

negativo destas no prognóstico dos mesmos. Outros ainda relatam a inexistência de uma associação significativa entre estas mutações e o prognóstico dos doentes.^(74,75)

A título de exemplo, nos estudos de Paschka *et al.*, em que foram estudados 805 doentes com LMA, constatou-se a presença de mutações *IDH1* e *IDH2* em 8% e 8.7% dos doentes, respetivamente, sendo que não se observaram diferenças significativas na sobrevivência global e sobrevivência livre de doença entre os indivíduos com estas alterações e os indivíduos sem as referidas mutações. No entanto, quando se consideravam os indivíduos com LMA CN e genótipo *NPM1^m/FLT3^{wt}/IDH1/2^m*, em relação aos indivíduos *NPM1^m/FLT3^{wt}/IDH1/2^{wt}*, a sobrevivência global aos 5 anos era francamente inferior no primeiro subgrupo (41% vs 65%, respetivamente), tal como a sobrevivência livre de doença (37% vs 67%, respetivamente).⁽⁷⁶⁾ Ravandi *et al.* e Abbas *et al.*, obtiveram resultados semelhantes aos de Paschka *et al.*^(74,75)

Wagner *et al.*, Mardis *et al.*, Chotirat *et al.* e Chou *et al.*, por sua vez, não encontraram nenhuma associação significativa entre as mutações *IDH1/2* e o prognóstico dos doentes.^(74,75) Koszarska *et al.* também não observaram nos seus estudos nenhum impacto conjunto das mutações *IDH1* e *IDH2* no prognóstico destes doentes, mas observaram um impacto negativo das mutações *IDH1*^{R132} na sobrevivência global dos doentes com LMA.⁽⁷⁵⁾ DiNardo *et al.* estudaram 826 doentes com LMA entre 2010 e 2014, não tendo constatado diferenças na taxa de remissão e na sobrevivência global entre os 167 doentes com mutações *IDH1/2* ($\approx 20\%$) e os restantes doentes *IDH^{wt}*.⁽⁷⁷⁾

Nos estudos de Patel *et al.*, que estudaram 398 doentes jovens com LMA, tratados aleatoriamente com esquemas baseados em dose *standard* ou alta dose de daunorrubicina, constatou-se que os doentes com LMA de risco intermédio que apresentavam mutações *NPM1* e *IDH1/IDH2* concomitantes, apresentavam uma sobrevivência global aos 3 anos de 89%, bastante superior quando comparada à dos doentes *NPM1^m/IDH1/2^{wt}*, cuja sobrevivência no mesmo período foi de 31% ($p < 0.001$)⁽⁷⁸⁾. O mesmo estudo revelou ainda

que as mutações *IDH2R*¹⁴⁰ parecem estar associadas a um prognóstico favorável nos doentes com LMA de risco intermédio, com taxas de sobrevivência global aos 3 anos de 66% ($p=0.01$).⁽⁷⁸⁾

As diferenças observadas entre a evolução dos doentes com mutações *IDH1* em relação às mutações *IDH2*, bem como a heterogeneidade entre o prognóstico dos doentes com diferentes mutações concomitantes, levam a que alguns autores considerem que a presença de mutações adicionais e o tipo de mutação do gene *IDH* possam modelar o risco dos doentes com LMA.^(74,75)

No artigo de revisão publicado por Rakheja *et al.*, em que foram analisados os principais estudos acerca do impacto das mutações *IDH1/2* no prognóstico dos doentes com LMA, os autores referem que parece existir alguma evidência de que a presença concomitante de mutações *IDH1* em doentes com LMA CN e mutações do gene *NPM1* (e *FLT3-ITD*^{wt}), parece associar-se a um risco aumentado de recidiva e a menor sobrevivência. Da mesma forma, as mutações *IDH2R*¹⁴⁰ parecem conferir ou melhor prognóstico ou não ter impacto sobre o prognóstico destes doentes, enquanto as mutações *IDH2R*¹⁷² parecem estar associadas a um pior prognóstico.⁽⁷⁴⁾

Recentemente, foi ainda descoberto um SNP no gene *IDH1*, denominado SNP rs11554137 (*IDH1*^{105GGT}), localizado no mesmo exão da mutação *IDH1R*¹³², presente em cerca de 12% dos doentes com LMA CN. Constatou-se que a presença deste SNP parecia contribuir como fator independente para menor sobrevivência global em doentes de risco molecular elevado (*NPM1*^{wt} ou *FLT3-ITD*). Esta descoberta sugere que existam ainda outras mutações e polimorfismos de significado desconhecido nos genes *IDH* que possam também afetar o prognóstico dos doentes.⁽⁷⁹⁾

Tal como ocorre em mutações de outros genes, as mutações *IDH1/2* também apresentam estabilidade ao longo do tempo, pelo que são também possíveis alvos para

aplicação na monitorização da DRM.⁽⁷⁴⁾ Da mesma forma, foi descrita em alguns estudos uma associação entre níveis plasmáticos elevados de 2-hidroxioglutarato e uma menor sobrevivência global, bem como uma pior resposta ao tratamento, em doentes com LMA e mutações *IDH*. Este achado parece correlacionar-se como uma potencial utilidade deste marcador na monitorização ou mesmo na estratificação do prognóstico destes doentes, podendo tornar-se particularmente relevante com o surgimento de novos fármacos inibidores do IDH.⁽⁷⁵⁾

No plano terapêutico, especula-se que a criação de agentes farmacológicos que bloqueiem a atividade neomórfica da isoenzima mutante, impedindo a sua ação de catalisação na conversão do 2-hidroxioglutarato, possa constituir um novo alvo terapêutico nos doentes com LMA e mutação destes genes. Existem já alguns fármacos em estudo, como o AGI-5198, um inibidor seletivo da isoenzima IDH1^{R132} (que impede o crescimento das células mutantes e reverte o padrão de hipermetilação, promovendo a diferenciação celular), o HMS-101, outro inibidor IDH1 (induz apoptose e diminui a formação de colónias de mutantes *IDH1* na MO) e o AG-221, um inibidor IDH2.^(74,75)

Da mesma forma, os agentes hipometilantes eram encarados como estratégias muito promissoras em doentes com mutações destes genes, mas estudos preliminares recentes não demonstraram vantagens do tratamento com estes fármacos neste subgrupo de doentes.⁽⁷⁵⁾ São necessários mais estudos para compreender os benefícios do TACEH nos doentes com mutações dos genes *IDH*, em comparação com estratégias de quimioterapia convencional.

DNMT3A

A metilação do DNA é um processo epigenético hereditário e reversível, regulado por genes da família *DNMT* (metiltransferases do DNA), que englobam os genes *DNMT1*, *DNMT3A* (*DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Alpha*) e *DNMT3B*. Todos codificam

enzimas responsáveis por catalisar a transferência de um grupo *metil* para a posição 5' do nucleótido de citosina, na cadeia de DNA, em dinucleótidos CpG, permitindo assim a sua metilação. As DNMT3A e DNMT3B estão envolvidas em processos de metilação *de novo*, enquanto a DNMT1 está predominantemente envolvida em processos de manutenção do padrão de metilação.^(50,80,81)

A alteração dos padrões de metilação ao nível dos dinucleótidos CpG consiste num processo fundamental de regulação epigenética que, a par de outros, influencia a expressão génica, a diferenciação celular, o *imprinting*, o silenciamento e a inativação de genes.^(75,80,81)

As DNMT3A apresentam uma estrutura subdividida em dois segmentos; uma região N-terminal, de tamanho variável, com funções reguladoras, com dois domínios fundamentais, e uma região C-terminal, com função catalítica. Na região N-terminal salientam-se os domínios PHD (rico em cisteína, que liga iões de zinco, sendo importante na localização nuclear da proteína e estando envolvido na interação entre a proteína e fatores de transcrição, desacetilases e metiltransferases de histonas) e PWWP (domínio prolina-triptofano-triptofano-prolina, fundamental para a ligação da proteína à cromatina). O domínio catalítico é responsável pela função de metiltransferase da DNMT3A (**Ilustração 10**).⁽⁸⁰⁾

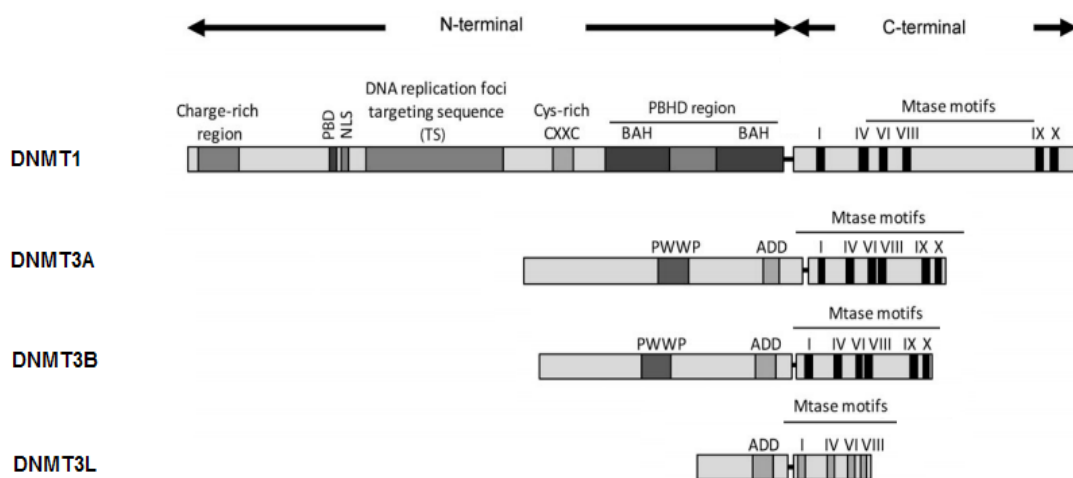


Ilustração 10. Estrutura da família de proteínas DNMT

Observa-se na figura a estrutura da proteína DNMT3A, com o domínio prolina-triptofano-triptofano-prolina (PWWP) e ADD/PHD (*plant homeodomain*) na região N-terminal. Na região C-terminal localiza-se o domínio catalítico de metiltransferase (Mtase). (Adaptado de Jurkowska *et al.*, 2011)⁽⁸⁰⁾

As mutações do gene *DNMT3A*, localizado no cromossoma 2p, banda 32, detetadas pela primeira vez em 2010 por três estudos independentes, ocorrem em múltiplas neoplasias hematológicas, destacando-se os casos da LMA, leucemia linfoblástica aguda (LLA) e SMD. Estima-se que as mutações deste gene na LMA ocorram em até 20-25% dos casos de LMA, sendo mais frequentes em doentes com cariótipo normal, o que torna o *DNMT3A* num dos genes com maior frequência de mutações em doentes com esta neoplasia.^(15,50,69,82)

Parece existir uma menor preponderância de indivíduos asiáticos portadores de mutações *DNMT3A* em relação a outras etnias, o que pode evidenciar a existência de fatores étnicos de predisposição.^(15,82)

Aproximadamente 95% das mutações *DNMT3A* ocorrem na segunda metade do gene, onde estão localizadas as regiões que codificam os domínios PDH e metiltransferase. A mutação mais prevalente consiste numa mutação do tipo *missense*, que ocorre no codão *R882H*, localizado no domínio da metiltransferase, e que resulta na substituição de um aminoácido arginina por um de histidina, representado até cerca de 80% das mutações do *DNMT3A*. Estas mutações são sempre heterozigóticas, e conduzem a uma diminuição da atividade catalítica de metiltransferase, provavelmente através de um efeito de dominância negativa.^(50,69,81) A causa da preponderância deste tipo de mutações é desconhecida, não tendo sido ainda descritas diferenças clínicas nem no prognóstico entre doentes portadores de mutações *R882H* e não - *R882H*.⁽⁷⁵⁾

São conhecidas até hoje mais de 30 tipos de mutações do gene *DNMT3A*, podendo corresponder a mutações do tipo *frameshift*, *inframe* ou *nonsense*. Pensa-se que as mutações não -*R882H* conduzem à codificação de uma proteína aberrante, truncada, com deleção total

ou parcial do domínio metiltransferase (haploinsuficiência), abolindo assim a sua normal atividade enzimática.^(50,75,81) No entanto, não existe consenso quanto a esta hipótese, havendo até algumas teorias que defendem que as mutações heterozigóticas do *DNMT3A* podem resultar em ganho de função.⁽⁷³⁾

Os mecanismos exatos pelos quais a mutação *DNMT3A* contribui para a carcinogênese permanecem ainda desconhecidos.⁽¹⁵⁾

Yan *et al.*, propuseram que as mutações deste gene pudessem estar relacionadas com a perda de função das metiltransferases, conduzindo a hipometilação dos genes *HOX*, com sobreexpressão desregulada dos mesmos. Esta hipótese não foi, contudo, corroborada em estudos posteriores.⁽¹⁵⁾ Assim, os efeitos destas mutações nos padrões de metilação e de expressão gênica permanecem atualmente controversos.⁽⁷⁵⁾

Recentemente, num estudo publicado por Challen *et al.*, onde se estudaram ratos em que tinha sido efetuado o *knock-out* de gene *DNMT3A*, descobriu-se que esta metiltransferase desempenha um papel essencial no silenciamento de genes que promovem a renovação do *pool* de células estaminais hematopoiéticas, parecendo interferir na correta diferenciação de células na hematopoiese. Foi assim sugerido que as mutações do *DNMT3A* poderiam conduzir a uma diferenciação deficitária dos progenitores hematopoiéticos, contribuindo desta forma para a carcinogênese.⁽¹⁵⁾ Apesar disto, parece existir evidência de que as mutações isoladas deste gene são insuficientes para causar LMA *per si*.⁽⁷⁵⁾

As proteínas DNMT3A, em condições normais, ligam-se ao DNMT3L, um homólogo inativo que regula a formação de oligómeros, formando com estes complexos tetraméricos (**Ilustração 11**). Schietinger *et al.*, descreveram recentemente que na presença de mutações do tipo *R882H* e de outras mutações *missense* na interface homodimérica, a tetramerização das metiltransferases (que aumenta a atividade de metiltransferase em 80%) é bloqueada pelas proteínas mutantes, processo que parece diminuir a atividade enzimática de metiltransferase nos dinucleótidos CpG (efeito de dominância negativa). Tendo em conta estes resultados,

verificou-se que a presença de dímeros de DNMT3A mutantes se associava a uma maior rapidez de dissociação das proteínas mutantes aos locais de ligação CpG. Este mecanismo pode resultar na incapacidade de metilação consecutiva de múltiplos locais de ligação CpG e na diminuição do processamento enzimático por outras enzimas modificadoras do DNA, com alterações da ligação aos promotores e da regulação da transcrição. Pensa-se assim que os mecanismos que desregulam o padrão de metilação nas mutações do gene *DNMT3A* são multifatoriais, envolvendo não só alterações da atividade catalítica da DNMT3A, como também do seu processamento por outras enzimas e da ligação a proteínas envolvidas na localização nuclear, bem como na regulação do DNMT3A.^(69,81) Para além disto, podem existir ainda diferenças fisiopatológicas entre o efeito das mutações *R882H* e as mutações não- *R882H*.⁽⁸³⁾

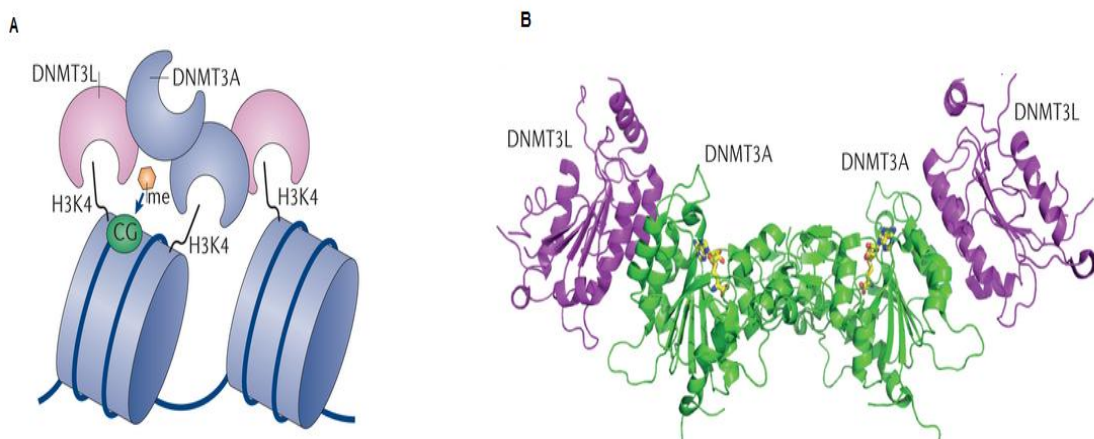


Ilustração 11. O complexo tetramérico DNMT3L–DNMT3A–DNMT3A–DNMT3L

A) Observa-se o complexo tetramérico esquematizado. O complexo tetramérico liga-se à histona H3K4, catalisando de seguida a metilação das sequências CpG. B) A ligação de duas proteínas DNMT3L a duas proteínas DNMT3A permite a formação de um complexo tetramérico, com atividade de metiltransferase aumentada. As proteínas DNMT3A mutantes podem inibir a formação dos complexos tetraméricos e impedir a metilação de regiões consecutivas da cadeia de DNA. (Adaptado de Jiamu Du *et al.*, 2015)⁽⁸⁴⁾

Constatou-se em vários estudos que as mutações *DNMT3A* estão intrincadamente relacionadas com outras anomalias genéticas recorrentes, como as mutações *NPM1*, *FLT3-ITD* e *IDH1/2*. São também mais frequentes nos indivíduos com LMA CN, associando-se a idade mais avançada e a contagens mais elevadas de leucócitos e plaquetas, em comparação com indivíduos *DNMT3A*^{wt}.^(50,75) Notavelmente, cerca de 60-80% dos doentes com mutações do *DNMT3A* apresentam mutações *NPM1*.^(69,83) Alguns autores relatam também uma associação inversa com as mutações *CEBPA*.⁽⁸²⁾ As mutações deste gene quase nunca ocorrem em doentes com alterações citogenéticas favoráveis [t(8;21), t(15;17) e inv (16)].⁽⁶⁹⁾ Esta associação estreita entre as mutações *DNMT3A* e outras anomalias genéticas recorrentes parece indicar uma cooperação fisiopatológica das diferentes mutações na carcinogénese da LMA.⁽¹⁵⁾

Im *et al.*, e Li *et al.*, publicaram duas revisões da literatura acerca do impacto das mutações *DNMT3A* no prognóstico dos doentes com LMA. Em ambas as revisões, constatou-se que a maioria dos estudos demonstrava um efeito negativo destas alterações no prognóstico dos doentes, contribuindo para uma menor sobrevivência global em comparação com doentes *DNMT3A*^{wt}.^(75,85) O efeito sobre os restantes *outcomes*, sobretudo sobre a taxa de remissão completa, parece ser menos evidente. Estas mutações parecem correlacionar-se também com uma resistência relativa à quimioterapia convencional.⁽⁶⁹⁾ Os efeitos nefastos destas mutações são particularmente evidentes em certos subgrupos de doentes, como no caso dos mais idosos e nos indivíduos com cariótipo normal.⁽⁷⁵⁾

De facto, vários estudos demonstraram que as mutações *DNMT3A* contribuem para um pior prognóstico em termos de sobrevivência global nos doentes com LMA CN de alto risco molecular (genótipo *FLT3-ITD* ou *NPM1*^{wt}/*FLT3*^{wt}), em comparação com doentes *DNMT3A*^{wt}. Não se constata diferenças significativas entre o prognóstico dos doentes com mutações *DNMT3A* e genótipo *NPM1*^m/*FLT3*^{wt} e os doentes com *DNMT3A*^{wt} com o mesmo

genótipo. Estes resultados sugerem que, nos doentes com LMA CN e mutações *DNMT3A*, apenas aqueles que são portadores de um genótipo de risco molecular elevado apresentam pior prognóstico.^(15,50,75)

Apesar disto, nem todos os estudos conseguiram demonstrar o impacto das mutações *DNMT3A* no prognóstico dos doentes, destacando-se o estudo de Gaidzik *et al.*, em que foram estudados 1770 doentes (dos quais 370 eram portadores de pelo menos uma mutação deste gene), que não demonstrou nenhum impacto significativo destas mutações no prognóstico dos doentes com LMA. Foi equacionado que esta discrepância nos resultados se pudesse dever a uma má seleção da amostra de doentes e a diferenças no seu tratamento.^(75,86)

Tie *et al.*, publicaram uma metanálise, onde incluíram doze estudos acerca do impacto das mutações *DNMT3A* no prognóstico dos doentes com LMA de novo (total de 6377 doentes), tendo constatado que os doentes portadores destas mutações apresentavam menor sobrevivência global, em comparação com doentes *DNMT3A*^{wt}. Este efeito foi evidente tanto em doentes idosos, como em doentes jovens, tanto no subgrupo de doentes com LMA CN (*HR*: 1.6, *p*=0.001), como nos subgrupos com LMA de risco citogenético intermédio e desfavorável. Os resultados na sobrevivência livre de doença e sobrevivência livre de eventos foram semelhantes aos obtidos para a sobrevivência global. Observaram ainda que estas mutações não tinham impacto negativo no subgrupo de doentes com risco favorável nem no subgrupo de doentes com mutações não-*R882H*.⁽⁸⁷⁾ Shivarov *et al.*, haviam publicado anteriormente uma metanálise de cerca de 4500 doentes, avaliando o impacto destas mutações no seu prognóstico, tendo constatado também que a presença da mutação *DNMT3A* constituía um fator independente para menor sobrevivência global (*OR*: 1.27, *p*=0.0004) e menor sobrevivência livre de doença (*OR*: 1.24, *p*=0.002) nos doentes com LMA. No subgrupo de doentes com LMA CN, o impacto negativo na sobrevivência global era apenas evidente nos doentes com genótipo de risco elevado – classificação ELN (*OR*: 1.38, *p*=0.002).⁽⁸⁸⁾

Recentemente, Gale *et al.*, descreveram que os resultados discrepantes que denotavam em vários estudos uma ausência do impacto das mutações *DNMT3A* nos doentes com mutações *NPM1* podiam ser explicados pelo paradoxo de Simpson (as mutações *DNMT3A* e *NPM1* coexistem em até 80% dos doentes, sendo que as mutações *DNMT3A* conferem pior prognóstico, enquanto, pelo contrário, as mutações *NPM1* conferem melhor prognóstico; são escassos os casos de doentes sem mutações *NPM1* e com mutação do gene *DNMT3A*, e dado que o prognóstico global parece depender das contribuições relativas de cada tipo de mutação, o efeito que se constata em separado para cada subgrupo é mascarado quando são considerados doentes com mutação de ambos os genes). Assim, estes autores demonstraram que as mutações *DNMT3A* conferem pior prognóstico aos doentes com LMA, independentemente do *status* mutante do gene *NPM1*. Os mesmos autores descreveram ainda que o local da mutação não parece ter impacto no prognóstico destes doentes, e que as mutações que conduzem à síntese de proteínas truncadas não parecem afetar o prognóstico dos doentes, assemelhando-se portanto ao genótipo *DNMT3A^{wt}*.⁽⁸³⁾

Por outro lado, nos estudos de Loghavi *et al.*, em que foram estudados 178 doentes com LMA e mutações *DNMT3A*, *NPM1* e/ou *FLT3-ITD*, constatou-se que o subgrupo de doentes com LMA CN e genótipo *NPM1^m/DNMT3A^m* apresentava menor sobrevivência global e menor sobrevivência livre de eventos, quando comparado com o subgrupo *NPM1^m/FLT3-ITD*. Este dado sugere que as mutações *DNMT3A* são ainda mais desfavoráveis do que as mutações ITD do gene *FLT3*, nos doentes com mutações *NPM1*.⁽⁸⁹⁾

Os estudos iniciais de Hou *et al.*, pareciam sugerir que as mutações *DNMT3A* eram estáveis no tempo, o que parecia apoiar uma eventual aplicação destes marcadores na monitorização da DRM.⁽⁸²⁾ Estas conclusões, porém, não foram confirmadas nos estudos mais recentes de Pløen *et al.*, onde se observou que era frequente a persistência das mutações deste gene, mesmo após a remissão completa.⁽⁹⁰⁾

Relativamente à terapêutica, nos estudos de Gaidzik *et al.*, não se registaram diferenças significativas em relação à sobrevivência livre de doença nos doentes com mutações *DNMT3A* submetidos a TACEH, em comparação com os doentes tratados com quimioterapia intensiva.⁽⁸⁶⁾ Porém, mais estudos prospetivos serão necessários para confirmar estas conclusões.⁽⁷⁵⁾

Permanece ainda controverso se as mutações *DNMT3A* podem prever uma resposta favorável aos fármacos hipometilantes. Os estudos mais recentes sugerem um forte valor preditivo da resposta a estes fármacos nos doentes com LMA portadores desta mutação. Metzeler *et al.*, avaliaram a resposta de 46 doentes idosos com LMA à decitabina, associada ou não ao inibidor da desacetilase das histonas Vorinostat, tendo observado que os doentes com mutação *DNMT3A* apresentavam taxas de remissão completa significativamente superiores, quando tratados com este agente (75% vs 34%, respetivamente, $p=0.05$). DiNardo *et al.*, constataram também uma taxa de remissão completa superior em doentes com esta mutação tratados com agentes hipometilantes, quando comparados com doentes *DNMT3A*^{wt} (40% vs 22%). A utilização de agentes hipometilantes como segunda linha de tratamento em doentes idosos, não aptos para realização de quimioterapia convencional, é hoje uma alternativa aplicável, mas estudos futuros poderão vir a comprovar o benefício da associação entre estes fármacos e outros usados em quimioterapia convencional, nos doentes jovens com LMA e mutação *DNMT3A*.⁽⁷⁵⁾

Patel *et al.*, estudaram a resposta de dois subgrupos de doentes, com mutação *DNMT3A*, à terapêutica de indução com daunorrubicina (associada à citarabina), sendo que um dos subgrupos recebia a dose *standard* (45 mg/m²) e outro recebia uma dose superior (90 mg/m²). Surpreendentemente, constataram que o subgrupo que havia recebido a dose superior de daunorrubicina apresentava uma sobrevivência global aos 60 meses consideravelmente superior ($\approx 40\%$ vs $\approx 10\%$, respetivamente, $p=0.04$).⁽⁷⁸⁾

Mutações em genes modificadores da cromatina

ASXL1

O gene *ASXL1*, um promotor da família de genes *trithorax* e *polycomb*, localizado no cromossoma 20 banda 11, com 12 exões, é o homólogo humano do gene *additional sex combs*, inicialmente descrito em *Drosophila*. Este gene codifica uma proteína com 5 domínios - ASXN, ASXH, ASXM1, ASXM2 e o homeodomínio PHD. O domínio ASXN, localizado na região N-terminal, em conjunto com os domínios ASXH e ASXM1, possuem capacidade para interagir com a BAP1 - *BRCA1 associated protein-1* (enzima com função de deubiquitinase) e com a EZH2 - *Enhancer of zeste homolog 2 methyltransferase* (metiltransferase de histonas), bem como com a NCOA1 (*Nuclear receptor coactivator 1*). Os domínios PHD e ASXM2, localizados na região C-terminal, participam nos processos de marcação de histonas previamente metiladas (PHD), permitindo ainda a interação com recetores nucleares, incluindo recetores de estrogénios, androgénios, glucocorticoides, entre outros (ASXM2) - **Ilustração 12.** ^(50,91)

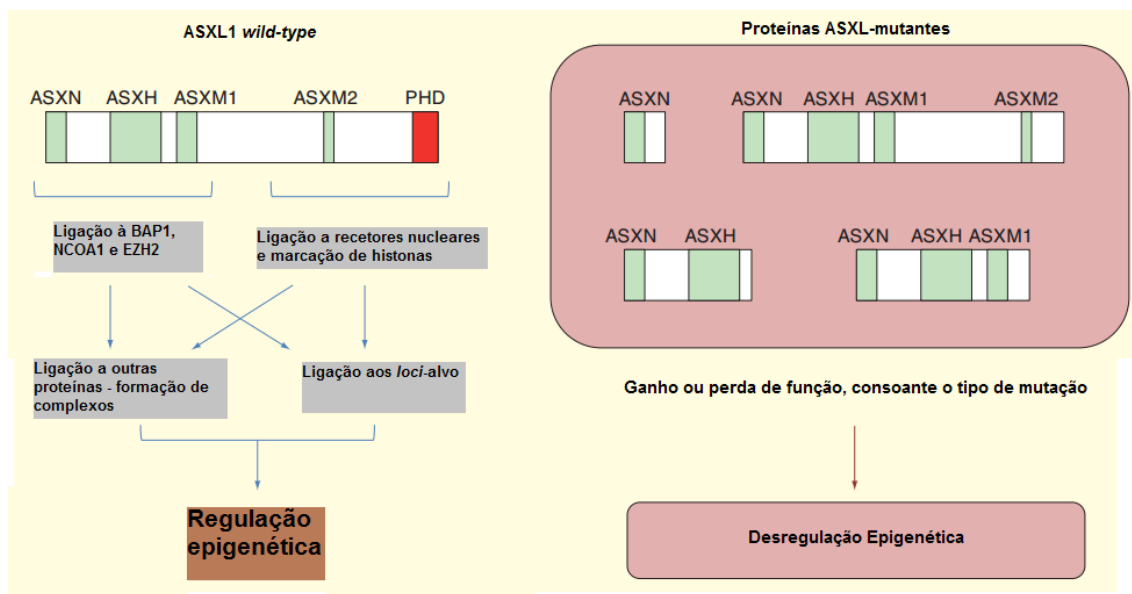


Ilustração 12. Estrutura da proteína ASXL1 e tipos de proteínas mutantes

Na imagem observam-se os domínios principais da proteína ASXL1 (ASXN, ASXH, ASXM1, ASXM2 e PHD), estando representadas também as funções que lhes foram atribuídas. As mutações *ASXL1* conduzem geralmente à tradução de proteínas truncadas, com ganho ou perda de função, que contribuem para a desregulação dos processos epigenéticos de expressão génica. (Adaptado de Katoh, 2015)⁽⁹¹⁾

A ASXL1 é uma proteína integradora (“*scaffold*”, que medeia a interação entre substrato e enzima para a formação de complexos) que apresenta dupla atividade epigenética, com capacidade para ativar ou reprimir a transcrição de genes-alvo, através da interação entre proteínas do complexo *polycomb*, ativadores e repressores da transcrição.^(50,92) Estudos em *Drosophila* revelaram que a proteína ASX (homóloga da ASXL1) forma complexos com uma deubiquitinase da cromatina designada de *calypso*, dando origem a um complexo deubiquitinase *Polycomb*-repressivo, que remove a monoubiquitina da histona H2A. A proteína *calypso* é homóloga da deubiquitinase BAP1 na espécie humana, sendo que a formação de um complexo semelhante ao que ocorre na *Drosophila* (BAP1-ASXL1), parece desempenhar um papel semelhante de deubiquitinação das histonas H2A no homem, conduzindo à repressão génica.^(92,93)

Estudos recentes demonstraram que a proteína ASXL1 interage também com componentes do complexo PRC2 (*Polycomb Repressive complex 2*), nomeadamente as proteínas EZH2 e SUZ12 (*polycomb repressive complex 2 subunit*), que estão envolvidas na repressão epigenética através da marcação de histonas (H3K27me3 – trimetilação das histonas H3K27 pela EZH2, *e.g.*).^(92,93) A integridade do gene *ASXL1* parece ser fundamental para garantir o recrutamento e/ou estabilização do complexo PRC2.⁽⁹⁴⁾ Foi ainda descrita uma associação entre a ASXL1 e o complexo repressivo da cromatina, através da ligação desta proteína ao HP1 α /CBX5 (*Heterochromatin Protein 1 Alpha*), um dos componentes deste complexo.⁽⁹²⁾

Foi descrito que a ASXL1 pode intervir na regulação de vias de proliferação celular e diferenciação de células hematopoiéticas através, em parte, da metilação de histonas, estando envolvida na modulação da expressão gênica, interagindo com o PPAR gama (*peroxysome proliferator-activated receptor gamma*) e RAR (*retinoic acid receptor*). Contudo, o papel exato da ASXL1 na hematopoiese permanece ainda desconhecido.⁽⁹⁵⁾

As mutações somáticas *ASXL1* ocorrem na maioria dos casos no exão 12, sendo virtualmente todas heterozigóticas, podendo ser identificadas em doentes com neoplasias hematológicas variadas (LMA, LLA, SMD).⁽⁵⁰⁾ São habitualmente do tipo *frameshift* ou *nonsense*, e resultam geralmente na codificação de uma proteína truncada no domínio C-terminal, com ausência do domínio PHD.^(92,96) As mutações mais frequentes ocorrem junto do domínio rico em glicina compreendido entre os aminoácidos 642-685, destacando-se uma mutação que resulta na duplicação de um nucleótido de guanina na posição 1934, resultando numa mutação *frameshift* (p.Gly646TrpfsX12), que está presente em mais de 50% dos casos de mutações deste gene.^(92,95,97,98)

O mecanismo exato pelo qual as mutações *ASXL1* contribuem para a carcinogénese na LMA permanece ainda desconhecido.⁽⁹³⁾

Estudos em ratos em que foi efetuado o *knock-out* do gene *ASXL1* demonstraram uma associação com elevada mortalidade perinatal, sugerindo a importância deste na embriogénese, mas não demonstraram alterações relevantes nas células estaminais da linhagem hematopoiética dos ratos sobreviventes.⁽⁹³⁾ Outros estudos, também em ratos com *knock-out* do gene *ASXL1*, revelaram apenas defeitos nas linhagens de células B e T, insuficientes para originar síndromes mielodisplásicas ou LMA.⁽⁹⁵⁾ Um estudo mais recente evidenciou, pelo contrário, que a ausência de expressão do gene *ASXL1* podia causar o surgimento de um fenótipo semelhante à SMD.⁽⁹²⁾

Inicialmente, pensou-se que os efeitos fisiopatológicos da mutação resultavam apenas de um ganho de função (devido à sobreexpressão de uma proteína truncada com função

anómala).^(93,95) Estudos em blastos de LMA *in vitro* demonstraram, no entanto, que algumas mutações *ASXL1* podiam conduzir à expressão reduzida da proteína *ASXL1*^{wt}, através de um provável efeito de perda de função, sugerindo um potencial papel de gene supressor tumoral do *ASXL1*.^(92,93) Alguns estudos parecem indicar que as mutações *ASXL1* constituem um evento precoce na carcinogénese, apesar de este dado ser ainda controverso.^(69,92)

O principal efeito biomolecular das mutações *ASXL1* parece consistir no défice de trimetilação da histona H3K27 (H3K27me3), mediada pelo complexo PRC2, devido à perda de expressão da proteína *ASXL*^{wt} nas células hematopoiéticas. A ausência de *ASXL*^{wt} parece conduzir a um anormal funcionamento do complexo PRC2, que impede o seu recrutamento para determinados *loci* oncogénicos, impossibilitando a sua repressão durante a transcrição, por mecanismos de modificação da cromatina (trimetilação de histonas). As interações e a cooperatividade entre outras proteínas deste complexo (*EZH2*, *SUZ12*, ...) e as mutações *ASXL1* podem contribuir para a promoção da carcinogénese, ainda que estes mecanismos sejam desconhecidos. As modificações na cromatina induzidas pela perda de *ASXL1*^{wt} parecem ser independentes da interação com a BAP1 (complexo *ASXL1*-BAP1 tem função de deubiquitinase da histona H2AK119), sendo que a perda de função do complexo *ASXL1*-BAP1 e a sua relação com a carcinogénese na LMA é atualmente desconhecida.⁽⁹³⁾

Estudos de expressão génica demonstraram uma associação entre a perda de expressão de proteína *ASXL1* e uma desregulação da expressão dos genes da família *HOXA*, que são fundamentais na diferenciação das células hematopoiéticas.⁽⁹³⁾

Foi também descrita uma possível relação de cooperação entre as mutações *ASXL1* e mutações de genes envolvidos na sinalização celular e nos processos de *splicing*, em múltiplas neoplasias hematológicas.⁽⁹²⁾

As mutações *ASXL1* podem ser identificadas em cerca de 6-30% dos doentes com LMA, sendo mais frequentes em LMA secundária do que em LMA *de novo*.^(50,94) Esta mutação é também significativamente mais frequente em doentes mais idosos (16.2% a 25%

dos casos ocorrem em doentes com LMA com idade superior a 60 anos, enquanto apenas 3.6% a 8% ocorrem em doentes jovens com LMA).⁽⁹⁴⁾ Parece existir uma associação com as mutações *RUNX1*, e uma relação inversa com a prevalência da mutação *ASXL1* em doentes com LMA CN.⁽⁶⁹⁾

A maioria dos estudos publicados até à atualidade demonstrou um efeito negativo das mutações do gene *ASXL1* no prognóstico dos doentes com LMA, mas os resultados obtidos são muitos heterogéneos.^(95,96,99-102) A tabela seguinte resume os resultados de alguns dos principais estudos acerca do impacto destas mutações no prognóstico dos doentes.

Tabela 6. Impacto das mutações *ASXL1* no prognóstico dos doentes com LMA

Autor(es)	Amostra em estudo	Resultados/Conclusões	Fator Prognóstico Independente
Chou <i>et al.</i> ⁽⁹⁹⁾	501 doentes com LMA <i>de novo</i>	Doentes <i>ASXL1</i> ^m têm menor taxa RC (57.7%, vs 79.9%, $p=0.013$) em comparação com doentes <i>ASXL1</i> ^{wf} ; Doentes <i>ASXL1</i> ^m têm OS média inferior (14 meses vs 58 meses, $p=0.009$) em comparação com doentes <i>ASXL1</i> ^{wf} . DFS é semelhante entre <i>ASXL1</i> ^m e <i>ASXL1</i> ^{wf} ; No subgrupo de doentes com risco citogenético intermédio os resultados são semelhantes.	Não
Shen <i>et al.</i> ⁽¹⁰⁰⁾	1185 doentes com LMA <i>de novo</i>	EFS e OS são semelhantes entre doentes <i>ASXL1</i> ^m e <i>ASXL1</i> ^{wf} .	Não
Metzeler <i>et al.</i> ⁽⁹⁵⁾	423 doentes com LMA	Em doentes idosos, os <i>ASXL1</i> ^m têm menor OS aos 3 anos (5% vs 23%,	Sim (Doentes <i>ASXL1</i> ^m com

	<p>CN <i>de novo</i> (234 tinham idade superior a 60 anos).</p>	<p>$p=0.006$) menor DFS aos 3 anos (10% vs 19%, $p=0.03$) EFS aos 3 anos (5% vs 14%, $p=0.002$) e menor taxa de RC (53% vs 71%, $p=0,04$), quando comparados com doentes <i>ASXL^{wt}</i>;</p> <p>Doentes idosos <i>ASXL^m</i> de grupos de risco favorável (classificação ELN) têm menor OS (<i>HR</i>: 1.64, $p=0.006$), menor DFS (<i>HR</i>: 1.71, $p=0.03$), menor EFS (<i>HR</i>: 1.74, $p=0.002$) e menor probabilidade de atingir RC (<i>OR</i>: 0.46, $p=0,04$), em comparação com doentes <i>ASXL^{wt}</i>;</p> <p>As mutações <i>ASXL1</i> não apresentaram impacto prognóstico nos doentes com LMA CN de risco intermédio-I.</p>	<p>LMA risco favorável)</p> <p>OS (<i>HR</i>: 4.43, $p<0.001$)</p> <p>DFS (<i>HR</i>: 4.38, $p<0.001$),</p> <p>EFS (<i>HR</i>: 3.61, $p<0.001$)</p> <p>Taxa de RC (<i>OR</i>: 0.24, $p=0.03$)</p>
<p>Pratcorona <i>et al.</i>⁽¹⁰¹⁾</p>	<p>882 doentes com LMA</p>	<p>Doentes <i>ASXL1^m</i> têm menor OS média (15.9 meses vs 22.3 meses, $p=0.019$) e menor taxa de RC (61% vs 79,6%, $p=0.004$), em comparação com doentes <i>ASXL1^{wt}</i>;</p> <p>Não existe associação entre as mutações <i>ASXL1</i> e o prognóstico de doentes com LMA CN.</p> <p>Doentes <i>ASXL1^m</i> com risco citogenético intermédio e ausência de mutações <i>FLT3-ITD</i> e <i>NPM1</i> têm menor OS média do que doentes</p>	<p>Sim</p> <p>OS (<i>HR</i>: 1.52, $p=0.032$)</p>

		<i>ASXLI</i> ^{wt} (14.9 vs 32.3 meses, $p=0.037$).	
Schnittger <i>et al.</i> ⁽¹⁰²⁾	740 doentes com LMA e risco citogenético intermédio	Doentes <i>ASXLI</i> ^m apresentam menor OS média (11.0 vs 62.2 meses, $p<0.001$) e menor EFS (9.1 vs 16.3 meses, $p=0.012$) em comparação com doentes <i>ASXLI</i> ^m . O mesmo se verifica para doentes com cariótipo normal, independentemente da idade.	Sim OS (<i>HR</i> : 1,70, $p=0,032$)
El-Sharkawi <i>et al.</i> ⁽⁹⁶⁾	367 doentes com LMA	Doentes <i>ASXLI</i> ^m apresentam maior taxa de recidiva aos 5 anos (83% vs 56%, $p=0.01$) e menor OS (6% vs 22%, $p=0.02$) em comparação com doentes <i>ASXLI</i> ^{wt} ; Não se verificaram diferenças significativas na taxa de RC entre doentes <i>ASXLI</i> ^m e <i>ASXLI</i> ^{wt} .	Não Diferenças verificadas no prognóstico de doentes <i>ASXLI</i> ^m dependem sobretudo da idade.
Paschka <i>et al.</i> ⁽⁹⁸⁾	1696 doentes com LMA	Doentes <i>ASXLI</i> ^m têm menor OS aos 5 anos (30.3% vs 45.7%, $p=0.0004$) e menor EFS aos 5 anos (15.9% vs 29.0%, $p=0.02$), bem como menor taxa de RC (56.3% vs 74.2%; $p=0.0002$), em comparação com os doentes <i>ASXLI</i> ^{wt} ; Doentes com mutações concomitantes <i>RUNX1</i> e <i>ASXLI</i> ($\approx 30\%$ dos doentes <i>ASXLI</i> ^m) apresentam prognóstico desfavorável, com OS cerca de duas	Não O genótipo <i>ASXLI</i> ^m / <i>RUNX1</i> ^m constitui um fator de prognóstico independente para a OS (<i>HR</i> : 1.8, $p=0.04$).

		vezes inferior aos indivíduos com genótipo <i>RUNX1^{wt}/ASXL1^{wt}</i> .	
--	--	---	--

Paschka *et al.*, publicaram um estudo recente onde constataram que, em doentes jovens, o prognóstico parece ser particularmente desfavorável em doentes com mutações concomitantes *RUNX1* e *ASXL1*, sugerindo uma possível interação entre mutações em diferentes genes, no prognóstico dos doentes.⁽⁹⁸⁾

Perante estes resultados discrepantes, Shivarov *et al.*, publicaram em 2015 uma metanálise onde analisaram 6 estudos individuais acerca do impacto das mutações *ASXL1* nos doentes com LMA (não-promielocítica). Nesta metanálise foram estudados um total de 3311 doentes com LMA, dos quais 385 apresentavam mutações do referido gene. Constataram que a frequência de mutações variava, consoante o estudo, de 5,2 a 22,1%, afetando mais doentes do sexo masculino e sendo mais comum em indivíduos com idade superior a 60 anos. A presença destas mutações foi menos frequente em casos de LMA *de novo*, em comparação com LMA secundária (*OR*: 0.39, *p*= 0.0003).⁽¹⁰³⁾

Não se obteve uma associação significativa entre a presença da mutação *ASXL1* e LMA CN, sugerindo que a presença de mutações neste subgrupo de doentes não é particularmente frequente.⁽¹⁰³⁾

Foi também observada uma associação positiva entre mutações *ASXL1* e mutações *IDH2*, e uma associação inversa com mutações ITD e TKD do *FLT3*, *DNMT3A* e *NPM1*. Não se encontrou uma associação significativa com mutações dos genes *TET2* e *CEBPA*.⁽¹⁰³⁾

Nesta metanálise, concluiu-se que a presença de mutações *ASXL1* confere prognóstico significativamente inferior aos doentes com LMA, quando comparados a indivíduos *ASXL1^{wt}*, em termos de sobrevivência global (*HR*: 1.86, *p*<0.00001) e em termos de sobrevivência livre de eventos (*HR*: 1.62, *p*<0.002). O mesmo foi constatado no subgrupo de doentes com idade superior a 60 anos, obtendo-se uma sobrevivência global francamente inferior nos doentes

com mutações *ASXL1* (*HR*: 1.65, $p=0.01$), concluindo-se que a utilização deste gene na estratificação do prognóstico dos doentes permite um refinamento do seu prognóstico, independentemente da idade.⁽¹⁰³⁾

A utilização das mutações *ASXL1* para monitorização da DRM parece ser atualmente pouco praticável, dado que as mutações *ASXL1* não aparentam ser estáveis ao longo do tempo.⁽⁹⁹⁾

No plano terapêutico, salienta-se que a menor taxa de remissão completa e a maior probabilidade de recidiva verificada em vários estudos nos doentes com mutações *ASXL1*, em relação a doentes sem esta mutação, quando submetidos a esquemas de quimioterapia intensiva. Estes dados parecem indicar uma associação desta mutação com resistência à quimioterapia.^(98,99,101)

Paschka *et al.*, estudaram 58 doentes com mutações *ASXL1* que atingiram a primeira remissão completa, dos quais 24 realizaram TACEH, não tendo constatado diferenças significativas na sobrevivência global e sobrevivência livre de doença, em comparação com os doentes que foram tratados com quimioterapia de consolidação. No entanto, a taxa de remissão completa particularmente baixa e a curta sobrevivência dos doentes com genótipo *RUNX1^m/ASXL1^m* tratados com quimioterapia convencional, parecem sugerir que este subgrupo pode beneficiar de TACEH. Estudos de maior escala são necessários para compreender o papel do TACEH no prognóstico, a longo prazo, deste subgrupo de doentes.⁽⁹⁸⁾

No que concerne a novas terapêuticas, dado que as mutações *ASXL1* conduzem à perda da capacidade da proteína ASXL1 interagir com o PRC2 e promover a marcação de histonas (H3K27me3), levando à ativação anormal de genes, pensa-se que a criação de fármacos que estabilizem a atividade deste complexo possa ser uma estratégia promissora no tratamento destes doentes. Da mesma forma, a utilização de novas terapêuticas que modulam a interação entre reguladores epigenéticos e histonas, como os inibidores de proteínas com

bromodomínio, inibidores do EZH2, entre outros, podem ser estratégias alternativas nestes doentes, sendo necessários mais estudos para perceber a sua aplicabilidade e eficácia.^(94,98)

MLL-PTD

O gene *MLL* ou *KMT2A* (*lysine (K)-specific methyltransferase 2A*), localizado ao cromossoma 11q, banda 23, contendo 34 exões, foi inicialmente descrito como um dos locus mais envolvidos em translocações cromossómicas recorrentes na LMA e LLA. Ao longo dos últimos anos, este gene foi associado a dezenas de tipos de translocações com genes distintos.^(104,105)

O gene *MLL*, que apresenta homologia com o gene *trithorax*, descrito inicialmente em *Drosophilas*, codifica uma proteína que atua como regulador epigenético, estando envolvida na metilação de histonas. Esta proteína apresenta uma estrutura complexa, possuindo na sua região N-terminal três domínios *AT-hook*, que estão envolvidos na ligação ao DNA, seguidos de dois sinais de localização nuclear (NLS) e um domínio metiltransferase-homólogo (MT), envolvido na ligação não específica ao DNA. Possui ainda um homeodomínio PHD, envolvido na regulação da transcrição, através de interações com a cromatina, um domínio TAD (transativação), que se liga à CBP (*CREB binding protein*), que está aparentemente envolvido na acetilação das histonas H3 e H4 nas região *homeobox* de DNA, e um domínio SET, na região C-terminal, com atividade de metiltransferase, importante na metilação da lisina 4 em histonas H3, sobretudo nas regiões promotoras dos genes HOX (*HOXA5*, *HOXA7* e *HOXA9*) – **Ilustração 13.**^(69,104,106) Este padrão de metilação está caracteristicamente associado a zonas de transcrição génica ativa, o que reforça o papel do MLL como regulador positivo de transcrição.^(69,105)

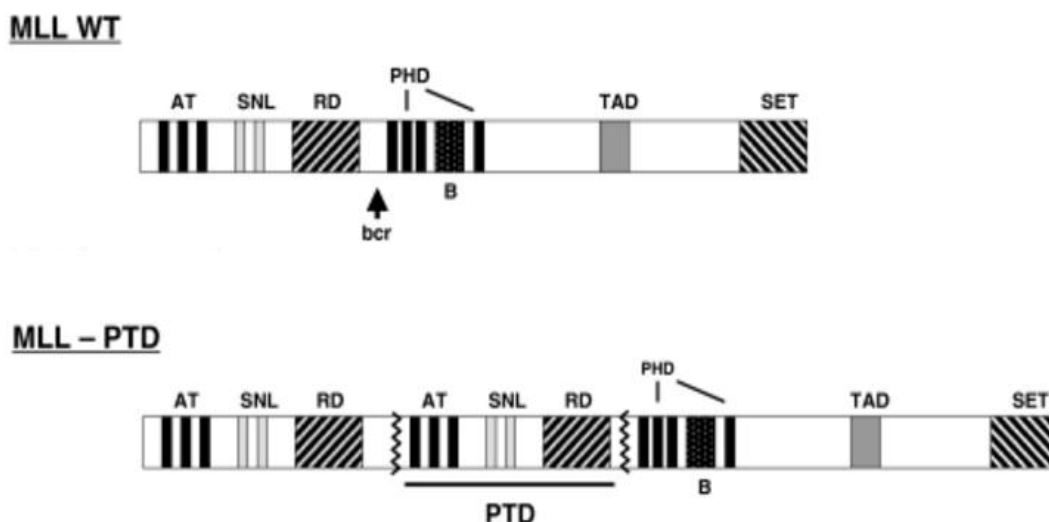


Ilustração 13. Estrutura da proteína MLL *wild-type* e MLL-PTD

Na figura pode observar-se a estrutura básica da proteína MLL normal, com os seus domínios característicos; três domínios *AT-hook* (AT), dois sinais de localização nuclear (SNL), o domínio metiltransferase-homólogo (RD), o *plant homeodomain* (PHD), o domínio de transativação (TAD) e o domínio com função de metiltransferase (SET). Está também representado um dos exemplos mais frequentes de duplicação parcial em *tandem* (PTD) da proteína MLL, compreendendo a duplicação dos exões 3 a 9 - (e9e3). (Adaptado de Basecke *et al.*, 2006).⁽¹⁰⁴⁾

As mutações *MLL-PTD* (*Partial tandem duplication* - duplicação em *tandem*) foram identificadas pela primeira vez por Caligiuri *et al.*, em doentes com LMA CN *de novo* e em portadores de trissomia do cromossoma 11. Este tipo de mutações resulta de uma duplicação parcial, originando uma repetição *inframe*, na região 5' do gene *MLL*, que pode envolver diferentes exões.⁽¹⁰⁴⁾ As duplicações mais frequentes ocorrem entre o exão 3 e 9 - (e9e3), e entre o exão 3 e 11 (e11e3), originando uma proteína anormalmente grande.⁽¹⁰⁵⁾ Ao contrário das proteínas de fusão resultantes das translocações do *MLL*, neste tipo de mutações a proteína resultante conserva o domínio SET na região C-terminal, mantendo a sua atividade de metiltransferase. Apresenta, contudo, alterações da região N-terminal, que podem associar-

se ao recrutamento aberrante de coativadores ou à inibição de repressores da transcrição, o que parece resultar num ganho de função da proteína aberrante.^(104,107)

Estudos em ratos demonstraram que as mutações envolvendo o gene *MLL* estão associadas a modificações na expressão génica dos genes *HOX*, com perturbação da embriogénese e da diferenciação hematopoiética. Assim, teoriza-se atualmente que o *MLL* será importante na regulação/manutenção da transcrição (iniciada por outros fatores de transcrição) de genes como o *HOX*.^(104,105) De facto, pensa-se atualmente que as mutações *MLL-PTD* conduzem provavelmente à desregulação da normal expressão génica do *HOX* e ao silenciamento epigenético de supressores tumorais, através de hipermetilação, como por exemplo o *SLC5A8*.^(104,107) Porém, os mecanismos exatos que contribuem para a carcinogénese são ainda desconhecidos.^(104,105)

Existem evidências de que as mutações *MLL-PTD* parecem ser insuficientes para originar LMA *per si*, e de que a presença concomitante de outras anomalias moleculares, sobretudo de genes envolvidos em vias de sinalização e na modulação epigenética, constitui um fator importante no surgimento e na gravidade da doença. De facto, estudos em ratos demonstraram que a heterozigotia para mutações *FLT3-ITD* e *MLL-PTD* concomitantes desencadeiam o surgimento de LMA.⁽¹⁰⁵⁾ A elevada correlação entre as mutações *MLL-PTD* e outros genes envolvidos na regulação epigenética podem indicar uma potencial cooperação entre estes genes no surgimento da LMA. Para além disto, foi ainda comprovada a existência de uma interação direta entre o gene *RUNX1* e a mutação *MLL-PTD*.⁽¹⁰⁵⁾

A mutação *MLL-PTD* está presente em 3,4% a 11% dos doentes com LMA, em 25% a 54% dos doentes com LMA e trissomia do cromossoma 11 e em 5,7% a 27,7% dos doentes com cariótipo normal, sendo muito mais frequente em doente idosos.⁽¹⁰⁴⁾ Mais de 90% dos doentes com LMA e mutações *MLL-PTD* apresentam outras mutações concomitantes, o que parece reforçar uma possível cooperação entre as diferentes alterações moleculares que influenciam o prognóstico destes indivíduos.⁽¹⁰⁵⁾

Mutações *MLL-PTD* foram também descritas em indivíduos saudáveis, tendo sido ainda encontradas em recém-nascidos, com uma incidência de aproximadamente 100%, e em amostras de sangue do cordão umbilical, ainda que a sua origem e significado sejam desconhecidos. Perante este achado, permanece a dúvida acerca do potencial carcinogénico deste tipo de mutações. Verifica-se que, nos doentes com LMA, apenas alguns tipos de cópias de proteína *MLL-PTD* são altamente expressas, enquanto outros tipos de duplicações são observados em proporções semelhantes aos de indivíduos normais. Pensa-se, portanto, que a expressão génica variável nas diferentes duplicações possíveis do *MLL-PTD*, nos doentes com LMA, possa dever-se a alterações estruturais ainda desconhecidas, com efeitos nefastos variáveis, e que podem explicar o facto de este tipo de mutação coexistir tanto em indivíduos saudáveis como em doentes com LMA.⁽¹⁰⁴⁾

Apesar de a maioria dos estudos evidenciar um efeito negativo das mutações *MLL-PTD* no prognóstico dos doentes com LMA, constata-se que o impacto deste gene no prognóstico permanece ainda controverso.^(78,108–113) A tabela seguinte resume os principais estudos publicados acerca do impacto destas mutações no prognóstico dos doentes com LMA.

Tabela 7. Impacto das mutações *MLL-PTD* no prognóstico dos doentes com LMA.

Autor(es)	Amostra em estudo	Resultados/Conclusões	Fator Prognóstico Independente
Schnittger <i>et al.</i> ⁽¹⁰⁸⁾	387 doentes com LMA	Doentes <i>MLL-PTD</i> apresentam menor OS média (5 vs 12 meses, $p=0.006$) e menor DFS (4 meses vs <i>not reached</i> , $p=0.00015$), em comparação com doentes <i>MLL^{wt}</i> .	Não
Dohner <i>et al.</i> ⁽¹⁰⁹⁾	683 doentes jovens com LMA, dos quais apenas 247 doentes com LMA CN	Doentes <i>MLL-PTD</i> com LMA CN apresentam período de remissão médio consideravelmente inferior (7.75 meses vs 19 meses, $p<0.001$) em comparação com doentes <i>MLL^{wt}</i> ;	Sim Período de remissão de doença ($HR: 3.595$, $p<0.001$)

	foram estudados.		
Steudel <i>et al.</i> ⁽¹¹⁰⁾	956 doentes com LMA	Não existem diferenças significativas entre o prognóstico de doentes <i>MLL-PTD</i> e <i>MLL^{wt}</i> , em termos de OS e taxa de RC; Doentes <i>MLL-PTD</i> têm tendência para menor DFS (11.4 meses vs 15 meses, <i>p</i> : não significativo) em comparação com doentes <i>MLL^{wt}</i> ;	Não
Whitman <i>et al.</i> ⁽¹¹¹⁾	238 doentes jovens com LMA CN <i>de novo</i>	Doentes <i>MLL-PTD</i> têm tendência para taxas de RC superiores (92% vs 83%, <i>p</i> =0.39), em comparação com doentes <i>MLL^{wt}</i> . Não se verificaram diferenças significativas na OS e DFS entre os doentes <i>MLL-PTD</i> e <i>MLL^{wt}</i> .	Não
Patel <i>et al.</i> ⁽⁷⁸⁾	398 doentes com LMA e idade inferior a 60 anos	Doentes <i>MLL-PTD</i> apresentam uma OS média inferior em relação aos doentes <i>MLL^{wt}</i> (12.6 meses vs 18 meses, <i>p</i> <0.009). As mutações do <i>MLL-PTD</i> não constituem um fator de prognóstico independente nos doentes com LMA;	Sim (apenas em doentes com LMA de risco citogenético intermédio, <i>FLT3-ITD^{wt}</i>) OS aos 3 anos (6.3%, no subgrupo de doentes com mutações <i>TET2</i> , <i>ASXL1</i> , <i>PHF6</i> , ou <i>MLL-PTD</i> , <i>p</i> <0,001)
Whitman <i>et al.</i> ⁽¹¹²⁾	226 doentes com idade	Não foram observadas diferenças significativas na taxa de RC, OS e	Não

	superior a 60 anos e LMA CN <i>de novo</i>	DFS aos 3 anos entre doentes <i>MLL-PTD</i> e <i>MLL^{wt}</i> .	Ausência de impacto no prognóstico associado à idade, maior incidência de alterações genéticas e menor tolerância a tratamentos mais intensivos nos idosos.
Kihara <i>et al.</i> ⁽¹¹³⁾	197 doentes com LMA <i>de novo</i> (não-promielocítica)	Doentes <i>MLL-PTD</i> apresentam pior OS em comparação com doentes <i>MLL^{wt}</i> (HR: 3.782, $p < 0.001$).	Sim OS (HR: 2.853, $p = 0.0039$).

Como foi anteriormente referido, dada a elevada incidência de outras alterações moleculares concomitantes em doentes com LMA e mutação *MLL-PTD*, Kao *et al.*, publicaram um estudo em 2015 onde foram analisados 98 doentes com LMA portadores desta mutação, de modo a estudar o efeito de outras 19 mutações recorrentes neste subgrupo de indivíduos. Concluíram que cerca de 91% dos doentes com mutação *MLL-PTD* apresentavam mutações de pelo menos um dos restantes genes estudados, destacando-se as mutações dos genes envolvidos em vias de sinalização (63,3%) - *FLT3-ITD* (44.9%) e *FLT3-TKD* (13.3%), genes envolvidos na regulação epigenética - *DNMT3A* (32.7%), *IDH2* (18.4%), *TET2* (18.4%) e *IDH1* (10.2%) e genes envolvidos na transcrição - *RUNX1* (23.5%) e supressão tumoral (10.2%). Não foi encontrada nenhuma mutação *CEBPA^{dm}* ou *NPM1* nestes doentes.⁽¹⁰⁵⁾

Os autores não encontraram nenhuma associação entre o prognóstico dos 55 doentes com mutações *MLL-PTD* submetidos a quimioterapia convencional com as mutações *FLT3-ITD*, *RUNX1*, *IDH1/IDH2*, *TET2* e *ASXL1*. Contudo, constataram que os doentes com mutações *DNMT3A* e *MLL-PTD* apresentavam prognóstico significativamente inferior em relação aos doentes *MLL-PTD* sem a referida mutação (EFS - 0 vs 6.8 meses, $p = 0.026$ e OS -

6.0 vs 11.5 meses, $p= 0.032$, respetivamente), concluindo que mutações do gene *DNMT3A* conferem pior prognóstico nos doentes com LMA e mutação *MLL-PTD*, sugerindo que este possa ser um grupo de risco particularmente desfavorável.⁽¹⁰⁵⁾

Weisser *et al.*, estudaram a aplicação da monitorização dos transcritos de *MLL-PTD* para deteção de DRM em 145 doentes com LMA CN, portadores da mutação. Em 44 doentes seguidos durante a terapêutica, procedeu-se à pesquisa por RT-PCR dos níveis de *MLL-PTD* expressos, tendo-se constatado que a redução igual ou superior a 2 log na expressão de *MLL-PTD*, em comparação com níveis inferiores a 2 log, estava associada a uma sobrevivência global média significativamente superior ($p=0.003$). Constataram ainda que todos os doentes previamente analisados que recidivaram, apresentavam a mesma mutação do *MLL-PTD* que haviam apresentado à data do diagnóstico, sugerindo que estas são estáveis ao longo do tempo. Estes dados colocam em aberto a possibilidade de utilizar este marcador na monitorização da DRM.⁽¹¹⁴⁾

Relativamente ao tratamento destes doentes, constata-se que as mutações *MLL-PTD* parecem estar associadas a uma resistência relativa à quimioterapia. Estes dados parecem estar, pelo menos em parte, associados à expressão elevada de BCRPmRNA (*breast cancer resistance protein*), um membro da família ABC (*adenosine triphosphate-binding cassette*), que funciona como transportador membranar e permite o efluxo celular de fármacos usados em quimioterapia convencional. De facto, Nasilowska-Adamska *et al.*, observaram que a expressão elevada desta proteína era particularmente evidente em doentes com LMA e mutações *MLL-PTD*, em comparação com doentes sem a referida mutação (0.61 vs 0.38, $p=0.03$). A expressão elevada de BCRPmRNA (≥ 1.1487 cópias) parece constituir, notavelmente, um fator de prognóstico independente para maior risco de recidiva e menor sobrevivência livre de doença ($p=0.01$ e $p=0,002$, respetivamente) nestes doentes.⁽¹¹⁵⁾

Perante estes dados, conclui-se que estes doentes podem beneficiar de estratégias alternativas de tratamento, como o TACEH, autotransplante e fármacos hipometilantes, particularmente no subgrupo de doentes mais idosos.⁽¹¹²⁾ Whitman *et al.*, demonstraram uma maior sobrevivência livre de doença em doentes com LMA e mutações deste gene tratados com autotransplante, em comparação com doentes tratados com quimioterapia convencional.⁽¹⁰⁷⁾ Outro grupo sugeriu que em doentes com LMA CN e mutações *MLL-PTD*, a elevada taxa de doentes tratados com TACEH podia contribuir para períodos de remissão de longa duração, melhorando o seu prognóstico.⁽¹¹¹⁾

Patel *et al.*, estudaram a eficácia de esquemas de dose intensificada de daunorrubicina *versus* esquemas de dose *standard* em doentes com LMA, tendo constatado que não existia benefício significativo na administração de doses aumentadas destes agentes no subgrupo de doentes com mutações *MLL-PTD*.⁽⁷⁸⁾ A eficácia dos fármacos hipometilantes e de outras terapêuticas nestes doentes permanece, assim, ainda por esclarecer, apesar de serem estratégias muito promissoras.⁽¹⁰⁵⁾ Outros fármacos como o Bortezomib demonstraram também efeitos promissores em estudos com ratos.⁽¹⁰⁵⁾

Discussão e Conclusão

Em relação às mutações ITD do gene *FLT3*, conclui-se que a maioria dos estudos publicados demonstra que o *ratio* alélico elevado tem impacto negativo no prognóstico nos doentes com LMA (sobretudo nos de risco citogenético intermédio), sendo o efeito negativo deste *ratio* inclusive independente de outras variáveis, em alguns estudos. O *cut-off* a partir do qual se considera o *RA* significativamente elevado não se encontra ainda bem estabelecido.^(16,20–23)

Como tal, para além da classificação dos doentes em função do *status* mutante *FLT3-ITD*, a avaliação do prognóstico tendo em conta o *RA FLT3-ITD* pode resultar numa melhor estratificação do risco na LMA, se adicionado à atual classificação proposta pela ELN. Esta seriação pode ser particularmente proveitosa no subgrupo de doentes com LMA CN, onde as mutações ITD do *FLT3* são mais frequentes. Parece existir evidência de que os doentes com LMA de risco citogenético intermédio com *RA* elevado constituem um grupo de risco desfavorável, que pode beneficiar de TACEH precoce e de terapêuticas inibidoras da tirosina-cinase.^(15,21,23,25)

Apesar de alguns estudos indicarem que a localização da mutação ITD do *FLT3* à TKD1 se associa a pior prognóstico, esta relação é também controversa, e necessita de posterior clarificação.^(18,21,26)

As mutações TKD do gene *FLT3* parecem estar associadas a um prognóstico desfavorável em doentes com LMA (contudo, mais favorável do que em doentes com mutações *FLT3-ITD*), excetuando o subgrupo de doentes com risco citogenético intermédio. Dada a escassez e heterogeneidade entre os estudos publicados, serão necessárias mais investigações para comprovar o impacto destas mutações no prognóstico dos doentes.⁽³²⁾

Em relação às mutações *CEBPA*, conclui-se pelos resultados apresentados que apenas as mutações *CEBPA^{dm}* constituem um fator independente de bom prognóstico em doentes com LMA (inclusive no subgrupo com LMA CN). Assim, a atual classificação da ELN deve ser reformulada, de forma a contemplar apenas este tipo de mutações (e não as mutações *CEBPAsm*) como fator importante de estratificação na LMA.^(34,35,37,40–43)

A resposta ao tratamento em doentes *CEBPA^{dm}* parece ser afetada pelo *status* mutante *FLT3/NPM1*, pelo que mais estudos serão necessários para perceber a cooperação entre as mutações do gene *CEBPA* e de outros genes frequentemente afetados na LMA.^(35,42) O impacto do local da mutação *CEBPA* no prognóstico dos doentes permanece controverso, e mais estudos são necessários para a sua clarificação.^(41,42)

No que concerne ao gene *RUNX1*, verifica-se que as mutações deste gene constituem um fator independente de mau prognóstico na LMA, tanto em doentes jovens como em doentes mais idosos, sendo este efeito provavelmente independente (exceto no estudo de Gaidzik *et al.*) de outras variáveis também nos doentes com LMA CN. Dada a sua maior frequência em doentes com idade superior a 60 anos, alguns autores advogam a sua utilização para melhor estratificação do risco destes doentes na LMA CN, sendo que a sua utilização noutros subgrupos será também provavelmente proveitosa.^(47,51,55-57) Assim, deve ser equacionada a sua introdução no atual modelo de estratificação de risco da ELN. Mais estudos são necessários para avaliar pormenorizadamente o valor destas mutações na estratificação do prognóstico dos diferentes subgrupos de doentes com LMA.

Apesar do impacto favorável e independente das mutações do gene *NPM1* nos doentes com LMA CN estar bem estabelecido, os efeitos da cooperação entre as mutações *FLT3-ITD* e *NPM1* no prognóstico dos doentes com LMA CN permanecem controversos. São assim necessários mais estudos para demonstrar como interagem estas mutações, e se de facto a presença de mutações *FLT3-ITD* elimina ou não o contributo positivo das mutações *NPM1* para o prognóstico destes doentes.^(20,50,61) A associação entre as mutações do gene *NPM1* e outras anomalias moleculares recorrentes, tal como a sua interação no prognóstico, permanecem também controversas, carecendo de clarificação posterior.⁽⁵⁰⁾

Da mesma forma, os achados recentes que demonstraram a correlação entre polimorfismos intrónicos do gene *NPM1* e uma menor sobrevivência global dos doentes carecem de estudos posteriores, que permitam confirmar estes dados.⁽⁶³⁾

Em relação às mutações *TET2*, pode concluir-se que o seu impacto no prognóstico dos doentes permanece controverso. Apesar de uma metanálise recente evidenciar o seu valor como fator independente de prognóstico nos doentes com LMA, a alta heterogeneidade entre os estudos anteriormente publicados evidencia a necessidade de mais estudos posteriores, sobretudo no subgrupo de doentes com LMA CN, onde o prognóstico pode diferir entre

doentes de grupos de risco favorável e intermédio (classificação ELN).^(66,67,70,71) Foi sugerido por alguns autores que o verdadeiro impacto das mutações *TET2* no prognóstico dos doentes pode ser dependente das mutações concomitantes associadas, pelo que mais estudos sobre a cooperação entre estas mutações e as de outros genes na LMA são altamente desejáveis.^(66,70) Relativamente às mutações dos genes *IDH* na LMA, o seu impacto no prognóstico permanece ainda controverso. Alguns estudos indicam que existe evidência de que as mutações do gene *IDH1* parecem contribuir para pior prognóstico nos doentes com LMA CN e *NPM1^m/FLT3-ITD^{wt}*, e de que as mutações *IDH2^{R140}* parecem conferir melhor prognóstico ou não ter impacto sobre o prognóstico destes doentes. Por outro lado, as mutações *IDH2^{R172}* parecem estar associadas a um pior prognóstico. Contudo, constata-se que vários autores obtiveram resultados contrários a estes.^(74,75) É provável que o impacto das mutações destes genes no prognóstico esteja dependente das características da população afetada.⁽⁷⁵⁾ Assim, dada a disparidade entre os resultados obtidos, torna-se fundamental a realização de mais estudos, sobretudo em subgrupos de doentes bem definidos (por exemplo, estudar o impacto em populações representativas das mutações *IDH1* nos doentes com LMA CN e *NPM1^m/FLT3-ITD^{wt}*, verificando se no subgrupo de doentes com *NPM1^{wt}* as mutações *IDH1* não interferem com o prognóstico), e acerca do verdadeiro impacto das diferentes mutações *IDH2* no prognóstico dos doentes. O esclarecimento do impacto de outras alterações moleculares concomitantes com as mutações dos genes *IDH*, dos novos SNPs descobertos no gene *IDH1* e dos níveis de 2-hidroxiglutarato no prognóstico dos doentes com LMA são outros temas que requerem também investigação futura.^(74,79)

No que concerne às mutações do gene *DNMT3A*, parece existir evidência de que estas se associam a menor sobrevivência global nos doentes com LMA, efeito que parece ser independente de outras variáveis. No subgrupo de doentes com LMA CN, apenas os que apresentam risco molecular elevado (ou seja, LMA de risco intermédio-I) parecem ser

afetados pelo efeito nefasto das mutações do *DNMT3A* (na LMA de risco favorável as mutações do *DNMT3A* não parecem ter influência no prognóstico dos doentes).^(75,83,85,87,88)

Tendo isto em conta, pode considerar-se que as mutações *DNMT3A* podem permitir refinar a estratificação do risco dos doentes com LMA, sobretudo nos doentes com LMA CN de alto risco (doentes com mutações *FLT3-ITD* ou *NPM1^{wt}*). Estudos posteriores serão necessários para compreender o impacto da cooperação entre outras mutações concomitantes com a do gene *DNMT3A* nestes doentes, e para comprovar se, de facto, nos doentes *NPM1^m*, as mutações *DNMT3A* retêm ou não o seu efeito nefasto (paradoxo de Simpson). Permanece ainda duvidoso se as mutações *DNMT3A* contribuem para uma menor taxa de remissão completa na LMA. Mais estudos serão necessários para apurar também se o tipo de mutação *DNMT3A* pode estar associado a diferentes efeitos no prognóstico dos doentes.^(75,83,85,87-89)

Em relação às mutações *ASXLI*, a maioria dos estudos demonstram um efeito negativo destas mutações no prognóstico dos doentes com LMA, em comparação com doentes sem a referida mutação.^(95,96,99,101,102) Contudo, os resultados obtidos são significativamente heterogéneos, sendo que alguns autores não encontraram nenhum efeito independente desta mutação no prognóstico dos doentes com LMA (a idade foi identificada em alguns estudos como um fator de enviesamento).^(96,99,100) Alguns autores advogam um impacto independente destas mutações apenas em certos subgrupos de doentes (doentes com risco citogenético intermédio, doentes com LMA CN de risco favorável -classificação ELN- ou doentes com genótipo *RUNX1^m/ASXLI^m*).^(95,98,102)

Apesar de uma metanálise recente ter demonstrado um impacto negativo independente das mutações *ASXLI* no prognóstico dos doentes com LMA (inclusive em doentes idosos), estes resultados devem ser considerados cautelosamente. Mais estudos acerca do impacto destas mutações em subgrupos específicos de doentes (LMA CN, doentes com mutações concomitantes *RUNX1*,...) são necessários, antes que se possa concluir acerca do verdadeiro

significado desta mutação na LMA, e antes que a sua utilização possa ser recomendada na prática clínica para refinar o prognóstico dos doentes.⁽¹⁰³⁾

Relativamente às mutações *MLL-PTD*, a maioria dos estudos evidencia algum efeito negativo destas alterações no prognóstico dos doentes, apesar de este impacto ter sido verificado em diferentes *endpoints*, consoante o estudo.^(78,108,109,113) Três estudos não demonstraram qualquer impacto significativo destas mutações no prognóstico dos doentes, sendo que dois foram realizados no subgrupo de doentes com LMA CN (um dos estudos foi realizado exclusivamente em doentes idosos, suspeitando-se que esta possa ser uma variável de enviesamento, e o outro estudo foi associado a melhores resultados na sobrevivência dos doentes devido à alta taxa de tratamento com TACEH, aplicada no protocolo terapêutico).⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾ Apenas três estudos conseguiram demonstrar um efeito negativo independente das mutações *MLL-PTD* sobre o prognóstico dos doentes com LMA (um dos estudos apenas sobre o período de remissão da doença), ressalvando-se que os subgrupos de doentes onde este efeito foi verificado se caracterizam por alta heterogeneidade genética entre estudos.^(78,109,113)

Assim, conclui-se que apesar de existir evidência de que as mutações *MLL-PTD* possam contribuir para um prognóstico nefasto nos doentes com LMA, em comparação com doentes sem a referida mutação (efeito este que é altamente controverso nos doentes com LMA CN), os benefícios da aplicação desta mutação para estratificação do risco de doentes com LMA permanecem ainda desconhecidos. São necessários mais estudos para comprovar se esta mutação tem efeito independente sobre o prognóstico dos doentes, e para compreender o impacto de outras mutações concomitantes (*DNMT3A*, *e.g.*) no prognóstico de doentes com este tipo de alterações moleculares.⁽¹⁰⁵⁾

Patel *et al.*, publicaram inicialmente um estudo analisando o impacto da deteção conjunta de múltiplas anomalias moleculares sobre o prognóstico dos doentes com LMA, tendo concluído que a seleção de doentes em função de vários grupos de risco molecular

permitia uma estratificação mais adequada do seu risco.⁽⁷⁸⁾ Na sequência deste trabalho, Grossmann *et al.*, num estudo semelhante, analisaram também o impacto da deteção de múltiplas mutações em genes frequentemente afetados na LMA, tendo constatado que o modelo proposto (exclusivamente baseado em dados moleculares) permitia inclusive estratificar melhor os doentes em função do prognóstico, em comparação com o modelo atual, proposto pela ELN.⁽¹¹⁶⁾ Alpermann *et al.*, e, posteriormente, Kihara *et al.*, propuseram também os seus próprios modelos de estratificação de doentes com LMA *de novo*, baseados na análise simultânea de múltiplos marcadores moleculares e nas características citogenéticas, tendo constatado que permitiam uma melhor definição do risco nos doentes com LMA, em comparação com a classificação da ELN atualmente em vigor.^(113,117)

Estes resultados parecem indicar que a criação de modelos de estratificação baseados na análise de múltiplas alterações moleculares, de forma simultânea, em conjunção com a análise citogenética, permitem estratificar melhor os doentes com LMA (sobretudo doentes pertencentes ao grupo heterogéneo com LMA CN), o que poderá trazer, indubitavelmente, vantagens na seleção e orientação terapêutica dos doentes (**Tabela 8**).

Tabela 8. Resumo sobre o impacto no prognóstico das principais anomalias moleculares na LMA.

Alteração Molecular	Impacto no prognóstico	Variável de risco independente	Conclusão
Ratio alélico elevado na mutação <i>FLT3-ITD</i>	Adverso	Sim	Considerar inclusão na prática clínica
<i>FLT3-TKD</i>	Adverso	Não comprovado	Necessários mais estudos
<i>CEBPA^{dm}</i>	Favorável	Sim	Considerar inclusão na prática clínica
<i>RUNX1</i>	Adverso	Sim	Considerar inclusão na prática clínica

<i>NPM1</i>	Favorável	Sim	Atualmente já em utilização
<i>TET2</i>	Adverso	Não comprovado	Necessários mais estudos
<i>IDH1</i>	Incerto	Não	Necessários mais estudos
<i>IDH2</i>	Incerto	Não	Necessários mais estudos
<i>DNMT3A</i>	Adverso	Sim	Considerar inclusão na prática clínica
<i>ASXL1</i>	Adverso	Não comprovado	Necessários mais estudos
<i>MLL-PTD</i>	Adverso	Não comprovado	Necessários mais estudos

Dentro de alguns anos poderemos aproximar-nos de um paradigma de tratamento individualizado e ajustado a cada doente, baseado na compreensão da globalidade das alterações citogenéticas e moleculares que determinam a história natural e o prognóstico na LMA, e na seleção das terapêuticas que melhor se ajustam ao fenótipo e genótipo de cada doente.

Para além das alterações moleculares focadas no presente trabalho, existem muitas outras mutações (*EZH2*, *KIT*, *WT1* – *Wilms Tumor 1*, *PHF6* - *PHD Finger Protein 6* , *TP 53*, entre outras) cujo impacto sobre o prognóstico dos doentes com LMA ainda não se encontra bem estabelecido. Além das novas mutações, as recentes descobertas envolvendo alterações da expressão génica de múltiplos genes (*ERG* - *ETS related gene 1*, *EVII*, *BAALC* - *Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic*, *MNI* - *meningioma (disrupted in balanced translocation) 1*, entre outros), o papel da modulação pós-transcrição do mRNA por miRNAs e a influência dos mecanismos de regulação epigenética sobre o prognóstico dos doentes constituem áreas

de investigação promissoras, que prometem alterar profundamente o paradigma da avaliação do prognóstico na LMA (Tabela 9).^(8,62,79)

Tabela 9. Impacto de outros marcadores moleculares no prognóstico dos doentes com LMA

Tipo de Anomalia Molecular	Localização cromossómica	Efeito no Prognóstico
Mutações		
<i>KIT</i>	4q12	Adverso
<i>TP 53</i>	17p13.1	Adverso
<i>EZH2</i>	7q35-q36	Controverso
<i>WT1</i>	11p13	Adverso
Desregulação da expressão génica		
Sobreexpressão de <i>BAALC</i>	8q22.3	Adverso
Sobreexpressão de <i>ERG</i>	21q22.3	Adverso
Sobreexpressão de <i>MNI</i>	22q12.1	Adverso
Sobreexpressão de <i>EVI 1</i>	3q26.2	Adverso
Desregulação de miRNAs		
Sobreexpressão de miRNA-155	21q21.3	Adverso
Sobreexpressão de miRNA-3151	8q22.3	Adverso
Sobreexpressão de miRNA-181a	1q32.1 e 9q33.3	Favorável

Adaptado de Fauci *et al*, 2015.⁽⁸⁾

Agradecimentos

É inegável que para a elaboração desta tese de mestrado contribuíram dezenas de pessoas, direta ou indiretamente, através do papel que representaram na minha formação pessoal e académica, ao longo dos seis anos em que tive o privilégio de estudar na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A todos os que de alguma forma contribuíram para que pudesse aprender algo de novo em cada dia, deixo o meu sincero agradecimento.

Gostaria de agradecer também a algumas pessoas em particular.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro, e co-orientadora, Doutora Emília Nobre Barata Roxo Cortesão, agradeço pelo profissionalismo e pelo apoio incansável prestado durante a realização deste artigo de revisão.

Aos meus pais, Paula Leal e Joaquim Roxo, por tudo o que me ensinaram, agradeço o apoio incondicional ao longo destes anos.

A Margarida Santos, agradeço toda a paciência e auxílio que sempre me disponibilizou.

Referências Bibliográficas

1. 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* [Internet]. American Society of Hematology; 2010 Jan 21 [cited 2015 Jul 21];115(3):453–74. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/115/3/453.abstract>
2. Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2015 Sep 8];15(9):e382–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25079101>
3. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Dec 20 [cited 2015 Sep 8];30(36):4515–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3518729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2015 Sep 10];88(4):318–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23526416>
5. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Dec 19];4:36. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3180439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol* [Internet]. 2014 Jan 23 [cited 2015 Dec 19];2014(8):103175. Available from: https://www.researchgate.net/publication/261957289_The_Epigenetic_Landscape_of_Acute_Myeloid_Leukemia
7. Bernasconi P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions-a review. *Br J Haematol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2015 Dec 19];142(5):695–708. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18540941>
8. Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J., Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. McGraw-Hill Professional; 2015. 678-687 p.
9. Döhner H, Weisdorf DJ., Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 [cited 2015 Dec 19];373:1136–52. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1406184>
10. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid

- neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2009 Jul 30 [cited 2015 Feb 5];114(5):937–51. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/114/5/937.abstract>
11. Foucar K, Reichard K, Czuchlewski D. *Bone Marrow Pathology* [Internet]. 3rd edition. American Society for Clinical Pathology; 2010. 393 p. Available from: <http://www.ascp.org/PDF/Books/Chapter-18.pdf>
 12. Union for International Cancer Control. *ACUTE MYELOGENOUS LEUKEMIA AND ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA* [Internet]. 2014 Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines. 2014. Available from: http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/20/applications/AML_AP L.pdf
 13. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Feb 16];87(1):89–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180162>
 14. Berenstein R. Class III Receptor Tyrosine Kinases in Acute Leukemia - Biological Functions and Modern Laboratory Analysis. *Biomark Insights* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Oct 8];10(Suppl 3):1–14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4527365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 15. Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. *Blood Rev* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Sep 17];27(1):13–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261068>
 16. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Cancer Res* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2015 Sep 7];61(19):7233–9. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/19/7233.full>
 17. Stirewalt D, Radich J. Role of FLT3 in Haematopoietic Malignancies. *Cancer*. 2003;3:650–65.
 18. 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* [Internet]. 2009 Sep 17 [cited 2015 May 16];114(12):2386–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602710>
 19. Port M, Böttcher M, Thol F, Ganser A, Schlenk R, Wasem J, et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2015 May 12];93(8):1279–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24801015>

20. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2008 Mar 1 [cited 2015 Sep 14];111(5):2776–84. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/111/5/2776.abstract>
21. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood* [Internet]. 2014 Sep 30 [cited 2015 Mar 3];124(23):3441–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25270908>
22. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* [Internet]. 2002 Jun 15 [cited 2015 Sep 14];99(12):4326–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036858>
23. Pratz M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2013 Apr 4 [cited 2015 Dec 26];121(14):2734–8. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/121/14/2734.abstract>
24. How J, Sykes J, Gupta V, Yee KWL, Schimmer AD, Schuh AC, et al. Influence of FLT3-internal tandem duplication allele burden and white blood cell count on the outcome in patients with intermediate-risk karyotype acute myeloid leukemia. *Cancer* [Internet]. 2012 Dec 15 [cited 2015 Oct 12];118(24):6110–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22736495>
25. Pratz KW, Sato T, Murphy KM, Stine A, Rajkhowa T, Levis M. FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood* [Internet]. 2010 Feb 18 [cited 2015 Sep 15];115(7):1425–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2826764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
26. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13-15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2012 Oct [cited 2015 Sep 19];51(10):910–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674490>
27. DeZern AE, Sung A, Kim S, Smith BD, Karp JE, Gore SD, et al. Role of allogeneic transplantation for FLT3/ITD acute myeloid leukemia: outcomes from 133 consecutive newly diagnosed patients from a single institution. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2011 Sep [cited 2015 Sep 19];17(9):1404–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3110512&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

28. Sengsayadeth SM, Jagasia M, Engelhardt BG, Kassim A, Strickland SA, Goodman S, et al. Allo-SCT for high-risk AML-CR1 in the molecular era: impact of FLT3/ITD outweighs the conventional markers. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2012 Dec [cited 2015 Sep 19];47(12):1535–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22659680>
29. Chou S-C, Tang J-L, Hou H-A, Chou W-C, Hu F-C, Chen C-Y, et al. Prognostic implication of gene mutations on overall survival in the adult acute myeloid leukemia patients receiving or not receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Leuk Res* [Internet]. 2014 Nov [cited 2015 Sep 29];38(11):1278–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260824>
30. Alvarado Y, Kantarjian HM, Luthra R, Ravandi F, Borthakur G, Garcia-Manero G, et al. Treatment with FLT3 inhibitor in patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia is associated with development of secondary FLT3-tyrosine kinase domain mutations. *Cancer* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2015 Sep 8];120(14):2142–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4124083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
31. Badar T, Kantarjian HM, Nogueras-Gonzalez GM, Borthakur G, Garcia Manero G, Andreeff M, et al. Improvement in clinical outcome of FLT3 ITD mutated acute myeloid leukemia patients over the last one and a half decade. *Am J Hematol* [Internet]. 2015 Aug 24 [cited 2015 Oct 13]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299958>
32. Li W, Zhang L, Huang L, Mi Y, Wang J. Meta-analysis for the potential application of FLT3-TKD mutations as prognostic indicator in non-promyelocytic AML. *Leuk Res* [Internet]. 2012 Feb [cited 2015 Sep 4];36(2):186–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145212611004140>
33. Volpe G, Walton DS, Del Pozzo W, Garcia P, Dassé E, O’Neill LP, et al. C/EBP α and MYB regulate FLT3 expression in AML. *Leukemia* [Internet]. 2013 Jul [cited 2015 Sep 8];27(7):1487–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4214120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
34. Pastore F, Kling D, Hoster E, Dufour A, Konstandin NP, Schneider S, et al. Long-term follow-up of cytogenetically normal CEBPA-mutated AML. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Sep 8];7:55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4172831&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CAJ, Wouters BJ, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood* [Internet]. 2011 Feb 24 [cited 2015 May 16];117(8):2469–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177436>

36. Fuchs O. Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge [Internet]. Antica M, editor. InTech; 2011 [cited 2016 Feb 16]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/acute-leukemia-the-scientist-s-perspective-and-challenge/molecular-markers-for-risk-stratification-in-adult-acute-myeloid-leukemia-with-normal-cytogenetics>
37. Wen X-M, Lin J, Yang J, Yao D-M, Deng Z-Q, Tang C-Y, et al. Double CEBPA mutations are prognostically favorable in non-M3 acute myeloid leukemia patients with wild-type NPM1 and FLT3-ITD. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Sep 8];7(10):6832–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4230151&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
38. Pabst T, Mueller BU. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2015 Oct 15];15(17):5303–7. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/17/5303.long>
39. Reckzeh K, Cammenga J. Molecular mechanisms underlying deregulation of C/EBPalpha in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* [Internet]. 2010 May [cited 2015 Oct 15];91(4):557–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20422469>
40. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer* [Internet]. 2009 Mar 10 [cited 2015 Oct 15];100(8):1343–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2676545&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
41. 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* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2015 Oct 15];28(16):2739–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439648>
42. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, Jeromin S, Grossmann V, Eder C, et al. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia* [Internet]. Macmillan Publishers Limited; 2014 Apr [cited 2015 Oct 15];28(4):794–803. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2013.273>
43. 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* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2015 Oct 15];28(4):570–7. Available from: <http://jco.ascopubs.org/content/28/4/570.long#T3>
44. Han C, Lin D, Ai X, Wang F, Sun H, Wang M, et al. [CEBPA gene mutation analysis in acute myeloid leukemia]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* [Internet]. 2013 Jul [cited 2015 Oct 15];34(7):566–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906447>

45. Schlenk RF, Taskesen E, van Norden Y, Krauter J, Ganser A, Bullinger L, et al. The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA. *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2013 Aug 29 [cited 2015 Sep 9];122(9):1576–82. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/122/9/1576.abstract>
46. Rossetti S, Sacchi N. RUNX1: A microRNA hub in normal and malignant hematopoiesis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Sep 17];14(1):1566–88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3565335&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
47. Tang J-L, Hou H-A, Chen C-Y, Liu C-Y, Chou W-C, Tseng M-H, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2009 Dec 17 [cited 2015 Aug 29];114(26):5352–61. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/114/26/5352.abstract>
48. Engel ME, Hiebert SW. Proleukemic RUNX1 and CBFbeta mutations in the pathogenesis of acute leukemia. *Cancer Treat Res* [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Sep 17];145:127–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20306249>
49. A. Giguçre HJ. t(1;21)(p22;q22) RUNX1/CLCA2 [Internet]. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2012 [cited 2016 Feb 16]. Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0121p22q22ID1608.html>
50. Cagnetta A, Adamia S, Acharya C, Patrone F, Miglino M, Nencioni A, et al. Role of genotype-based approach in the clinical management of adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Leuk Res* [Internet]. 2014 Jun [cited 2015 Sep 14];38(6):649–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726781>
51. Greif PA, Konstandin NP, Metzeler KH, Herold T, Pasalic Z, Ksienzyk B, et al. RUNX1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are associated with a poor prognosis and up-regulation of lymphoid genes. *Haematologica* [Internet]. 2012 Dec [cited 2015 Aug 29];97(12):1909–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3590097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
52. Al-Kzayer LFY, Sakashita K, Al-Jadiry MF, Al-Hadad SA, Uyen LTN, Liu T, et al. Frequent coexistence of RAS mutations in RUNX1-mutated acute myeloid leukemia in Arab Asian children. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2014 Nov [cited 2015 Dec 21];61(11):1980–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25066867>
53. Harada Y, Harada H. Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *J Cell Physiol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2015 Sep 17];220(1):16–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19334039>
54. Antony-Debré I, Manchev VT, Balayn N, Bluteau D, Tomowiak C, Legrand C, et al. Level of RUNX1 activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood* [Internet]. 2015 Feb 5 [cited 2015 Oct 16];125(6):930–40.

Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4347283&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

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* [Internet]. 2011 Feb 24 [cited 2015 Aug 21];117(8):2348–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148331>
56. 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* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2015 May 12];29(10):1364–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343560>
57. Mender JH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek 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* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2015 Sep 17];30(25):3109–18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3732007&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
58. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci* [Internet]. 2013 May [cited 2015 May 16];22(5):545–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3649256&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
59. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2006 Jul [cited 2015 Jul 23];6(7):493–505. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1885>
60. Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* [Internet]. Macmillan Publishers Limited; 2009 Jun 11 [cited 2015 Sep 10];23(10):1731–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.124>
61. Jain P, Kantarjian H, Patel K, Faderl S, Garcia-Manero G, Benjamini O, et al. Mutated NPM1 in patients with acute myeloid leukemia in remission and relapse. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2014 Jun [cited 2015 Sep 4];55(6):1337–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4143910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
62. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2015 Mar 10];89(11):1063–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25318680>
63. Cheng CK, Kwan TK, Cheung CY, Ng K, Liang P, Cheng SH, et al. A polymorphism in the 3'-untranslated region of the NPM1 gene causes illegitimate regulation by

- microRNA-337-5p and correlates with adverse outcome in acute myeloid leukemia. *Haematologica* [Internet]. 2013 Jun [cited 2015 Sep 10];98(6):913–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3669448&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
64. 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* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2015 Sep 11];358(18):1909–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450602>
 65. Mohr F, Döhner K, Buske C, Rawat VPS. TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. *Exp Hematol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2015 Sep 15];39(3):272–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21168469>
 66. Liu W-J, Tan X-H, Luo X-P, Guo B-P, Wei Z-J, Ke Q, et al. Prognostic significance of Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2) gene mutations in adult patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2014 Dec [cited 2015 Sep 15];55(12):2691–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24524305>
 67. Gaidzik VI, Paschka P, Spath D, Habdank M, Kohne C-H, Germing U, et al. TET2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia (AML): Results From a Comprehensive Genetic and Clinical Analysis of the AML Study Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Mar 19 [cited 2015 Apr 4];30(12):1350–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430270>
 68. Chan SM, Majeti R. Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2015 Oct 24];98(6):648–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23949914>
 69. Eriksson A, Lennartsson A, Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: early key events during leukemogenesis. *Exp Hematol* [Internet]. 2015 Jun 25 [cited 2015 Jul 16];43(8):609–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26118500>
 70. Damm F, Markus B, Thol F, Morgan M, Göhring G, Schlegelberger B, et al. TET2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: clinical implications and evolutionary patterns. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2014 Oct [cited 2015 Oct 27];53(10):824–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24898826>
 71. Chou W-C, Chou S-C, Liu C-Y, Chen C-Y, Hou H-A, Kuo Y-Y, et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood* [Internet]. 2011 Oct 6 [cited 2015 Sep 17];118(14):3803–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21828143>
 72. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* [Internet].

- 2011 Apr [cited 2015 Sep 17];29(10):1373–81. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3084003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
73. Abdel-Wahab O, Patel J, Levine RL. Clinical implications of novel mutations in epigenetic modifiers in AML. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2011 [cited 2015 Sep 15];25(6):1119–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093580>
 74. Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2015 Sep 13];43(10):1541–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22917530>
 75. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* [Internet]. 2014 Apr 4 [cited 2015 Mar 11];28(9):1774–83. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4234093&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 76. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2015 May 11];28(22):3636–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567020>
 77. DiNardo CD, Ravandi F, Agresta S, Konopleva M, Takahashi K, Kadia T, et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am J Hematol* [Internet]. 2015 Aug [cited 2015 Oct 31];90(8):732–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26016821>
 78. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Mar 22 [cited 2014 Dec 3];366(12):1079–89. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3545649&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 79. Walker A, Marcucci G. Molecular prognostic factors in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2015 May 16];5(5):547–58. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3582378&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 80. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem* [Internet]. 2011 Jan 24 [cited 2015 Aug 13];12(2):206–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243710>
 81. Holz-Schietinger C, Matje DM, Reich NO. Mutations in DNA Methyltransferase (DNMT3A) Observed in Acute Myeloid Leukemia Patients Disrupt Processive Methylation. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Jun 21 [cited 2015 Sep 22];287(37):30941–

51. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3438927&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
82. Hou H-A, Kuo Y-Y, Liu C-Y, Chou W-C, Lee MC, Chen C-Y, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood* [Internet]. 2012 Jan 12 [cited 2015 May 16];119(2):559–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22077061>
83. Gale RE, Lamb K, Allen C, El-Sharkawi D, Stowe C, Jenkinson S, et al. Simpson's Paradox and the Impact of Different DNMT3A Mutations on Outcome in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Jun 20 [cited 2015 Nov 7];33(18):2072–83. Available from: <http://jco.ascopubs.org/content/33/18/2072.long>
84. Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015 Aug 21 [cited 2015 Aug 21];16(9):519–32. Available from: http://www.nature.com/nrm/journal/v16/n9/fig_tab/nrm4043_F4.html
85. Li Y, Zhu B. Acute myeloid leukemia with DNMT3A mutations. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2014 Sep [cited 2015 Nov 7];55(9):2002–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283755>
86. Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, Stolzle A, Spath D, Kuendgen A, et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2013 Apr 30 [cited 2015 Sep 22];121(23):4769–77. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/121/23/4769.abstract>
87. Tie R, Zhang T, Fu H, Wang L, Wang Y, He Y, et al. Association between DNMT3A mutations and prognosis of adults with de novo acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Nov 7];9(6):e93353. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4061003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
88. Shivarov V, Gueorguieva R, Stoimenov A, Tiu R. DNMT3A mutation is a poor prognosis biomarker in AML: results of a meta-analysis of 4500 AML patients. *Leuk Res* [Internet]. 2013 Nov [cited 2015 Dec 22];37(11):1445–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962568>
89. Loghavi S, Zuo Z, Ravandi F, Kantarjian HM, Bueso-Ramos C, Zhang L, et al. Clinical features of de novo acute myeloid leukemia with concurrent DNMT3A, FLT3 and NPM1 mutations. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Sep 4];7:74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4197326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
90. Pløen GG, Nederby L, Guldborg P, Hansen M, Ebbesen LH, Jensen UB, et al. Persistence of DNMT3A mutations at long-term remission in adult patients with AML.

- Br J Haematol [Internet]. 2014 Nov [cited 2015 May 16];167(4):478–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25371149>
91. Katoh M. Functional proteomics of the epigenetic regulators ASXL1, ASXL2 and ASXL3: a convergence of proteomics and epigenetics for translational medicine. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2015 Jun [cited 2015 Sep 25];12(3):317–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25835095>
 92. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci M-J, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Sep 9];5:12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3355025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 93. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* [Internet]. 2012 Aug 14 [cited 2015 Sep 24];22(2):180–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3422511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 94. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 2013 May 2 [cited 2015 Sep 25];121(18):3563–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3643757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 95. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood* [Internet]. 2011 Dec 22 [cited 2015 Sep 24];118(26):6920–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3245212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 96. El-Sharkawi D, Ali A, Evans CM, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, et al. ASXL1 mutations are infrequent in young patients with primary acute myeloid leukemia and their detection has a limited role in therapeutic risk stratification. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2014 Jun [cited 2015 Sep 24];55(6):1326–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23952244>
 97. Boulwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. Macmillan Publishers Limited; 2010 May [cited 2015 Sep 24];24(5):1062–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2010.20>
 98. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, et al. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica* [Internet]. 2015 Jan 16 [cited 2015 Sep 24];100(3):324–30. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4349270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

99. Chou W-C, Huang H-H, Hou H-A, Chen C-Y, Tang J-L, Yao M, et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2010 Aug 6 [cited 2015 Sep 24];116(20):4086–94. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/116/20/4086.abstract>
100. Shen Y, Zhu Y-M, Fan X, Shi J-Y, Wang Q-R, Yan X-J, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2011 Nov 17 [cited 2015 Sep 24];118(20):5593–603. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/118/20/5593.abstract>
101. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, Koenders JE, Kavelaars FG, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica* [Internet]. 2012 Mar [cited 2015 Sep 24];97(3):388–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3291593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
102. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Sep 24];27(1):82–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23018865>
103. Shivarov V, Gueorguieva R, Ivanova M, Tiu R V. ASXL1 mutations define a subgroup of patients with acute myeloid leukemia with distinct gene expression profile and poor prognosis: a meta-analysis of 3311 adult patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2015 Jun [cited 2015 Sep 25];56(6):1881–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25308295>
104. Basecke J, Whelan JT, Griesinger F, Bertrand FE. The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2015 Sep 26];135(4):438–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16965385>
105. Kao H-W, Liang D-C, Kuo M-C, Wu J-H, Dunn P, Wang P-N, et al. High frequency of additional gene mutations in acute myeloid leukemia with MLL partial tandem duplication: DNMT3A mutation is associated with poor prognosis. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Sep 8 [cited 2015 Sep 28]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26375248>
106. Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher JK, Ernst P. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2007 Sep 13 [cited 2015 Aug 19];1(3):324–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2234224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

107. Whitman SP, Hackanson B, Liyanarachchi S, Liu S, Rush LJ, Maharry K, et al. DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication. *Blood* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2015 Aug 21];112(5):2013–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2518901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
108. Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, et al. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* [Internet]. 2000 May [cited 2015 Sep 26];14(5):796–804. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803509>
109. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, et al. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2015 Sep 28];20(15):3254–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149299>
110. Steudel C, Wermke M, Schaich M, Schäkel U, Illmer T, Ehninger G, et al. Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2003 Jul [cited 2015 Sep 26];37(3):237–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759922>
111. Whitman SP, Ruppert AS, Marcucci G, Mrózek K, Paschka P, Langer C, et al. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* [Internet]. 2007 Jun 15 [cited 2015 Sep 29];109(12):5164–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1890839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
112. Whitman SP, Caligiuri MA, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Becker H, et al. The MLL partial tandem duplication in adults aged 60 years and older with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2012 Jul [cited 2015 Sep 29];26(7):1713–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3565839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
113. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* [Internet]. 2014 Aug [cited 2015 Sep 29];28(8):1586–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487413>
114. Weisser M, Kern W, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukemia during therapy. *Haematologica* [Internet]. 2005 Jul [cited 2015 Sep 28];90(7):881–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996925>

115. Nasilowska-Adamska B, Solarska I, Paluszewska M, Malinowska I, Jedrzejczak WW, Warzocha K. FLT3-ITD and MLL-PTD influence the expression of MDR-1, MRP-1, and BCRP mRNA but not LRP mRNA assessed with RQ-PCR method in adult acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2015 Sep 28];93(4):577–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24030729>
116. Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood* [Internet]. American Society of Hematology; 2012 Oct 11 [cited 2015 Sep 14];120(15):2963–72. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/120/15/2963.abstract>
117. Alpermann T, Kern W, Schnittger S, Schmid C, Kreuzer K-A, Serve H, et al. Evaluation of the proposed reporting system of the European LeukemiaNet and recommendations for prognosis of acute myeloid leukemia. *Leuk Res* [Internet]. 2013 Mar [cited 2015 Sep 29];37(2):197–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237559>