

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Mutações no gene DNMT3A em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda no Rio
Grande do Sul, Brasil

ANNELISE MARTINS PEZZI DA SILVA

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Mutações no gene DNMT3A em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda no Rio
Grande do Sul, Brasil

ANNELISE MARTINS PEZZI DA SILVA

Orientador: Lucia Mariano da Rocha Silla. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Porto Alegre

2012

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

...À Dra Lúcia pela orientação em todos os momentos de execução deste trabalho, pelo conhecimento e experiência transmitidos, pelo incentivo e entusiasmo com que acreditou no meu trabalho;

...Aos colegas de laboratório: Gabriela Melchiades, Lauro Moraes, Vanessa Valim, Bruna Amorin, Alice Dahmer e Natália Emerim, pelo companheirismo e apoio;

... À Dra Fernanda Oliveira pelos primeiros passos na biologia molecular;

... À Dra Maria Aparecida da Silva pela coordenação e apoio ao nosso grupo;

... À Dra Ursula Matte, pelas inúmeras consultorias e boa vontade com que me auxiliou;

... À Dra Maria do Socorro Pombo que gentilmente me recebeu em seu laboratório no INCA/RJ;

... À Dra Rosane Bittencourt pelo envio de controles e dados clínicos de pacientes;

...À Raquel Vieira pelo interesse em ajudar nas pesquisas aos prontuários;

...À Patrícia Koehler pelo auxílio aos seqüenciamentos;

...Ao Laboratório de Terapia Gênica pelo espaço cedido;

...À minha família e namorado pelo mais importante incentivo e apoio que se pode ter.

*“O mal de quase todos nós é que preferimos ser arruinados pelo elogio
a ser salvos pela crítica.”*

Norman Vincent

RESUMO

Introdução: A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma neoplasia complexa e heterogênea do tecido hematopoético, causada por mutações, desregulação da expressão gênica e modificações epigenéticas. Vários marcadores moleculares têm sido descritos para LMA, auxiliando a estratificação dos pacientes em grupos de risco. Recentemente, mutações em *DNMT3A* foram identificadas em 22.1% dos pacientes com LMA, estando independentemente associadas com pior prognóstico. **Objetivos:** Determinar a frequência de mutações somáticas no gene *DNMT3A* e principais translocações cromossômicas em uma amostra de pacientes com LMA, correlacionando com dados clínicos **Métodos:** Foram pesquisadas, em 82 amostras de medula óssea de portadores de LMA atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil, para mutações somáticas no gene *DNMT3A* por seqüenciamento e principais transcritos de fusão por RT-PCR. **Resultados:** A frequência de mutações no gene *DNMT3A* foi de 8%(6) sendo 3 do tipo R882H. A frequência relativa dos transcritos de fusão oriundos das translocações t(8;21), t(15;17), t(9;11) e inv16, respectivamente foram: 6,1%(5), 14,6% (12), 0%(0) e 2,4%(2). **Conclusão:** A descoberta de mutações recorrentes no gene *DNMT3A* e sua possível implicação prognóstica pode ser um instrumento valioso para a tomada de decisões terapêuticas. Que nos conste, este é o primeiro estudo sobre a presença de mutações somáticas do gene *DNMT3A* em portadores de LMA no Brasil. Embora em uma amostra relativamente pequena, a frequência encontrada destas mutações foi inferior à relatada para pacientes caucasianos, sugerindo uma possível variação étnico-geográfica.

PALAVRAS-CHAVE

LMA, *DNMT3A*, RT-PCR.

ABSTRACT

Introduction: Acute Myeloid Leukemia (AML) is a complex and heterogeneous neoplasm hematopoietic tissue, caused by mutations, dysregulation of gene expression and epigenetic modifications. Several molecular markers have been described for AML, helping to classify patients into risk groups. Recently, mutations in *DNMT3A* were identified in 22.1% of patients with AML and these independently associated with poor prognosis. **Aims:** Determine the frequency of somatic mutations in the gene *DNMT3A* and major chromosomal translocations in a sample of patients with AML, correlating with clinical data. **Methods:** We investigated in 82 samples of bone marrow or peripheral blood of patients with AML treated at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, for somatic mutations in *DNMT3A* gene by sequencing and major fusion transcripts by RT-PCR. **Results:** The frequency of mutations in the *DNMT3A* gene was 8%(6) 3 being type R882H. The relative frequency of fusion transcripts arising from translocation t(8;21), t(15;17), t(9;11) and inv16, respectively were: 6,1%(5), 14,6% (12), 0%(0) and 2,4%(2). **Conclusion:** The discovery of recurrent mutations in the *DNMT3A* gene and its possible prognostic implications can be a valuable tool for making treatment decisions. From what we have recorded, this is the first study on the presence of somatic mutations of the *DNMT3A* gene in patients with AML in Brazil. Although in a relatively small sample, the frequency of these mutations was found lower than that reported for Caucasian patients and similar to that observed in Asian patients, suggesting a possible ethno-geographic variation.

KEYWORDS:

AML, *DNMT3A*, RT-PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da LMA e das neoplasias mielóides relacionadas segundo a OMS.....	25
Tabela 2	Colorações Citoquímicas.....	26
Tabela 3	Classificação Imunofenotípica da LMA.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativa de casos novos de Leucemia Mielóide Aguda por 100.000 habitantes nas Regiões: Sul, Sudeste, Centro-oeste, Norte e Nordeste do Brasil.....	19
Figura 2	Morfologia celular da leucemia mieloide aguda de acordo com a classificação FAB: a, LMA M0; b,LMA M1; c,LMA M2; d, LMA M3; e, LMA M4eo; f, LMA M5b; g, LMA M5a; h, LMA M6; i, LMA M7.....	23
Figura 3	Frequência dos subtipos FAB em LMA de novo.....	24
Figura 4	Frequência da alterações cromossômicas mais comuns detectadas pela análise citogenética; A: Adultos. B: Crianças.....	29
Figura 5	a) Representação esquemático dos genes AML1 e ETO e pontos de quebra. b) Gene de fusão AML1/ETO gerado como produto da translocação t(8;21).....	33
Figura 6	a) Representação esquemático dos genes PML e RAR α e pontos de quebra. b) Gene de fusão PML/RAR α gerado como produto da translocação t(15;17).....	35
Figura 7	a) Representação esquemático dos genes CBF β e MYH11 e pontos de quebra. b) Gene de fusão CBF β -MYH11 gerado como produto da translocação t(16;16).....	37
Figura 8	Representação esquemática da Metilação do DNA.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ANAE	Alfa-naftil acetato esterase
APL	Leucemia Promielocítica Aguda
ATRA	Ácido <i>all-trans</i> -retinóico
CAE	Cloroacetato esterase
CBF	<i>Core Binding Factor</i>
CEBP α	<i>Enhancer-binding protein alpha</i>
CID	Classificação Internacional das Doenças
c-KIT	<i>Tyrosine-protein Kinase</i>
CN-LMA	LMA com citogenética normal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT3A	DNA metil-transferase 3A
FAB	Franco-Americano-Britânico
FISH	Hibridização Fluorescente em Cito
FLT3	<i>FMS-like tyrosine quinase 3</i>
HD	Histona deacetilase
ITD	Duplicação interna
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MO	Medula óssea
MPO	Mieloperoxidase

mRNA	RNA mensageiro
MTase	<i>Methyltransferase</i>
MYH11	Cadeia pesada de miosina do músculo liso
NPM1	<i>Nucleophosmin 1</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PML	Gene promielocítico
PWWP	<i>Conserved proline-tryptophan-tryptophan-proline</i>
RAR α	Receptor do ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da Polimerase por transcriptase reversa
SBB	<i>Sudan black B</i>
SWOG	<i>Southwestern Oncology Group</i>
ZNF	<i>Zinc-finger</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	16
2.2 INCIDÊNCIA DA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	18
2.3 ETIOLOGIA	19
2.4 CLASSIFICAÇÕES	21
2.4.1 Classificação Morfológica e Citoquímica (FAB)	21
2.4.2 Classificação da OMS	24
2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	25
2.5.1 Citoquímica	26
2.5.2 Imunofenotipagem	27
2.5.3 Análise Citogenética e Hibridização Fluorescente <i>in Situ</i> (FISH)	28
2.5.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	29
2.6 BIOLOGIA MOLECULAR E LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	30
2.6.1 Principais translocações cromossômicas recorrentes e seus transcritos de fusão	31
2.6.1.1 <i>t(8;21)</i>	31
2.6.1.2 <i>t(15;17)</i>	33
2.6.1.3 <i>Inv16</i>	35
2.6.1.4 <i>t(9;11)</i>	37

2.6.2 Principais alterações moleculares em leucemia mielóide aguda.....	38
2.6.3 Epigenética	38
2.6.3.1 <i>Metilação do DNA.....</i>	41
2.6.3.2 <i>Mutações somáticas no gene DNA Metiltransferase 3.....</i>	43
2. OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	456
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	456
4. REFERÊNCIAS.....	46
5. ARTIGO EM INGLÊS.....	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83

1. INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença clonal do tecido hematopoético, que caracteriza-se pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide, ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais. Deste modo a infiltração da medula é freqüentemente acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia.¹ Os eventos moleculares responsáveis pela transformação leucêmica ainda não são precisamente conhecidos, porém já se sabe que esta neoplasia é causada por alterações cromossômicas, mutações, desregulação da expressão gênica e modificações epigenéticas.²

A LMA representa cerca de 90% das leucemias agudas que ocorrem na idade adulta e 10-15% dos casos de leucemia aguda na infância. Esta leucemia, ainda que com apresentação clínica semelhante, possui diferentes características morfológicas, citogenéticas e imunofenotípicas, os quais definem curso clínico e resposta terapêutica heterogêneas, sendo sua evolução clínica extremamente variável, podendo ir desde a sobrevivência de alguns dias até a cura.^{14,19}

A estratificação dos pacientes em grupos de risco hoje em dia é baseada em alterações citogenéticas e mutações comuns, porém muitas vezes estas são incapazes de oferecer informações prognósticas e terapêuticas precisas, de forma que o curso da doença varia significativamente entre pacientes pertencentes ao mesmo grupo de classificação, os quais poderiam ser amplamente enriquecidos pela identificação de alterações epigenéticas, principalmente em pacientes com citogenética normal, permitindo um manejo diferenciado e mais eficaz.^{3,4}

2. REVISÃO DA LITERATURA

A principal base de dados consultada foi o PubMed, utilizando as palavras-chave: AML, *DNMT3A* e RT-PCR. Ao cruzar as palavras-chaves AML e *DNMT3A* e AML e RT-PCR foram encontrados 27 e 1319 artigos respectivamente.

2.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

A patologia denominada “leucemia” foi caracterizada em 1845. Apenas em 1957 a Classificação Internacional das Doenças (CID) subdividiu a patologia em “linfóide” e “mielóide”, sendo até então consideradas como patologia única.⁵

A leucemia mielóide aguda é um grupo de doenças clonais do tecido hematopoético, com considerável heterogeneidade fenotípica e genotípica⁶, sendo uma desordem clonal de precursores mielóides que caracteriza-se por proliferação inadequada, auto-renovação indefinida de maneira análoga a uma célula-tronco, escape à morte celular programada, bloqueio da diferenciação, controle do ciclo celular aberrante e instabilidade do material genético⁷, podendo o processo neoplásico que dá origem ao clone leucêmico ocorrer em qualquer fase da hematopoese, ou seja, em qualquer estágio do desenvolvimento celular.⁸

Tal leucemia, ainda que com apresentação clínica semelhante, possui diferentes características morfológicas, citogenéticas e imunofenotípicas, os quais definem curso clínico e resposta terapêutica heterogêneas.

Estas células, além de perderem a sua funcionalidade, acumulam na medula óssea resultando na produção insuficiente de células sanguíneas normais⁹. Na maioria dos casos, as células leucêmicas extravasam para o sangue periférico, onde podem ser

vistas em grande número, podendo ainda, infiltrar o fígado, baço, linfonodos e outros tecidos.¹⁰ Sua etiologia ainda é desconhecida, porém algumas alterações genéticas estão implicadas em seu desenvolvimento.¹¹

A perda de função e substituição das células normais da medula óssea, conseqüentemente causará anemia, trombocitopenia e diminuição das contagens de leucócitos normais, manifestando-se de forma generalizada. As principais características clínicas utilizadas como suspeitas de diagnóstico são: palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, febre em consequência de infecções, faringite, petéquias e outras manifestações hemorrágicas, dor óssea, hipertrofia gengival, infiltrações cutâneas¹². No hemograma as contagens de plaquetas e hemoglobinas estão baixas, a contagem de leucócitos pode variar de <1.000/ul à 200.000/ul, contagem diferencial de células brancas anormais com neutropenia e presença de blastos e anemia normocromica e normocítica, trombocitopenia pode ser severa.¹³

A evolução clínica da LMA é extremamente variável, podendo ir desde a sobrevivência de alguns dias até a cura.¹⁴ O tratamento dos pacientes com LMA consiste basicamente em quimioterapia, abrangendo a fase de indução e pós-remissão (consolidação). Na fase de indução busca-se uma remissão completa, reduzindo a quantidade de células leucêmicas a um nível indetectável.¹⁵ Já o objetivo da fase de consolidação é eliminar qualquer resíduo da doença que não tenha sido detectado com a finalidade de se obter a cura.¹⁶ Apesar da agressividade da terapia, somente 20-30% dos pacientes conseguem alcançar a cura. E havendo recidiva, a única alternativa potencialmente curativa seria o transplante de medula óssea (para os pacientes que não haviam efetuado o transplante anteriormente).¹⁷

2.2 INCIDÊNCIA DA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

As leucemias constituem aproximadamente 2,9% de todos os diagnósticos de câncer no mundo.¹⁸

Embora a LMA seja uma doença relativamente rara, representando cerca de 1,2% dos óbitos causados por doenças oncológicas nos Estados Unidos, a LMA representa cerca de 90% das leucemias agudas que ocorrem na idade adulta e 10-15% dos casos de leucemia aguda na infância, com idade média ao diagnóstico de 63 anos¹⁹, sendo mais comum no sexo masculino²⁰ e acometendo aproximadamente 3,4/100.000 pessoas por ano nos Estados Unidos e cerca de 9,9 casos novos/100.000 habitantes por ano no Brasil de acordo com os dados do Inca nos últimos anos²⁴. Na Região Sul a estimativa de casos novos por 100.000 habitantes em 2006 é de 8,9 e são diagnosticados em todas as idades, a cada ano, 100 novos casos novos de LMA *de novo*, com uma incidência de 0.5-1:100.000 habitantes e idade média ao diagnóstico de 42 anos (FIGURA 1).²¹ Sua incidência aumenta conforme a idade, passando de 5/100.000 casos aos 40 anos para 15/100.000 caos após os 70 anos, e 2/3 dos casos ocorrem em indivíduos acima dos 60 anos.

Há variações na incidência da doença entre regiões geográficas diferentes. Nos adultos, as taxas mais elevadas são vistas na América do Norte, Europa, e Oceania, enquanto que na Ásia e América Latina é rara.²² Entretanto, a incidência de casos em crianças é menos comum na América do Norte e na Índia do que em outras partes do mundo.²³ Essas diferenças podem ser devidas à característica genética da população, fatores ambientais, ou uma combinação destas. No Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre são diagnosticados, em média, vinte casos novos de LMA a cada ano.

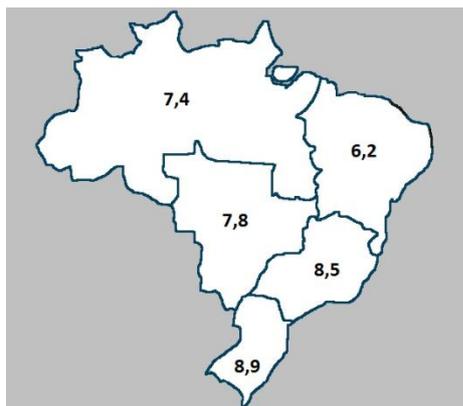


FIGURA 1: Estimativa de casos novos de Leucemia Mielóide Aguda por 100.000 habitantes nas regiões: Sul, Sudeste, Centro-oeste, Norte e Nordeste do Brasil.²⁴

2.3 ETIOLOGIA

Diferentes subtipos biológicos de leucemias podem ser originados por vários mecanismos e há muitos *links* funcionais entre anormalidades moleculares particulares e agentes causais.²⁵

A maioria dos casos de LMA, são esporádicos, caracterizados pela aquisição de mutações somáticas em progenitores hematopoiéticos que conferem uma vantagem proliferativa e/ou de sobrevivência, prejudicando assim a diferenciação hematopoética, e conferindo propriedades de ilimitada auto-renovação. Geralmente não é possível identificar uma causa para o desenvolvimento da LMA, seja como uma predisposição hereditária para a doença ou como consequência das exposições ambientais.²⁶

Diversas alterações cromossômicas, moleculares e epigenéticas ocorrem nas células leucêmicas e sua presença restrita ao clone leucêmico sugere que as leucemias são adquiridas e não herdadas. Contudo em torno de 5% das leucemias mielóides e linfóides agudas estão associadas com a hereditariedade ou síndromes reconhecidamente genéticas, a mais comum é provavelmente a Síndrome de Down, que está associada a um aumento de 10 a 18 vezes do risco de desenvolvimento da LMA²⁷, além de outras

com: síndrome de Bloom's, anemia de Fanconi, telangiectasia ataxia, e neurofibromatose,²⁸ cujos genes envolvidos codificam funções relacionadas à estabilidade genética e reparo ao ácido desoxirribonucléico (DNA).²⁹

Fatores ambientais também tem sido implicados na gênese desta doença, apesar de uma associação incontestável ser de difícil demonstração. Vários estudos apontam para a associação entre exposição a solventes orgânicos como benzeno e produtos de petróleo e LMA. Estudos de casos e controles concluíram um risco de 2 a 4,5 vezes maior em pessoas expostas.³⁰ Do mesmo modo a radiação ionizante também se constituiu um fator associado. Sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki apresentaram uma incidência muito superior desta patologia, sendo o período de latência observado de 5 a 21 anos.³¹

Diversas drogas com ação no ciclo celular estão associadas à LMA, principalmente os agentes alquilantes e os inibidores da topoisomerase II. A patologia mais estudada é a leucemia pós-tratamento da doença de Hodgkin. O risco aumenta de 11 a 89 vezes nesta população, iniciando cerca de 2 anos após o tratamento.³²

Embora não seja causa única e exclusiva, uma resposta imune anormal a infecções tem surgido como um possível mecanismo etiológico. Greaves criou a hipótese que crianças não expostas a infecções comuns, durante os primeiros anos de vida, têm um inadequado preparo do sistema imunológico e infecções futuras. Naqueles pacientes que apresentam suscetibilidade ou predisposição pelo genótipo, podem predispor a uma resposta imunológica inapropriada, aumentando o risco de leucemias linfóides e mielóides.^{29,30}

2.4 CLASSIFICAÇÕES

As leucemias são classificadas com base no tipo celular envolvido e no estado de maturidade das células leucêmicas. Os primeiros sistemas de classificação das leucemias agudas eram baseados somente em investigações citomorfológicas e citoquímicas. A morfologia ainda representa um modelo central, mas foi incorporada em sistemas de classificações atuais, como imunofenotipagem para um delineamento mais preciso da linhagem hematopoética, e estágio de diferenciação de leucemias em particular.³³

2.4.1 Classificação Morfológica e Citoquímica (FAB)

O pleomorfismo da LMA, assim como uma possível diferença de comportamento biológico, motivou o estabelecimento de uma classificação. Em 1975, pela primeira vez, o grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs a classificação em seis diferentes subtipos, baseado estritamente em aspectos morfológicos e citoquímicos. Em 1985 esta classificação foi revisada, originando a atual, onde foram acrescentados dois novos subtipos (FIGURA 2).^{34,35} As frequências dos subtipos estão representadas da figura 3.

- LMA M0: LMA sem diferenciação morfológica, infiltração da medula óssea por células blásticas, as quais possuem reação citoquímica para mieloperoxidase (MPO) negativa.³⁶ Os blastos são pequenos, com cromatina frouxa e nucléolo evidente, apresentando citoplasma agranular, sem bastonete de Auer.³⁷
- LMA M1: LMA com mínima diferenciação, > 90% de blastos das células nucleadas da medula óssea (MO). Os blastos têm tamanho médio ou grande, com um ou mais nucléolos, ocasionais bastonetes de Auer e raros grânulos citoplasmáticos.

- LMA M2: LMA com diferenciação (componente monocítico <20%) A maior parte das M2 tem maturação granulocítica neutrofílica, mas a maturação eosinofílica ou basofílica pode ocorrer raramente, sendo estas leucemias designadas M2Eo e M2Baso respectivamente. Os bastonetes de Auer são mais numerosos do que nas M1 e a MPO e *Sudan black B* (SBB) mais intensas e positivas em maior número de blastos.
- LMA M3: LMA com predomínio de Promielócitos. Os blastos apresentam núcleo excêntrico e citoplasma com abundante granulação com inúmeros bastonetes de Auer que se dispõem em feixes.³⁸
- LMA M4: LMA mielomonocítica (células monocíticas $\geq 20\%$). Este subtipo tem a particularidade de requerer para o seu diagnóstico não só o estudo da medula óssea como também do sangue periférico, no qual pode ser feita a distinção entre LMA M4 e M2, devido ao grande número de monócitos e promonócitos circulantes na primeira.³⁹
- LMA M5: Componente monocítico >80%. Os monoblastos têm citoplasma volumoso e basofílico, com um ou mais nucléolos proeminentes e cromatina delicada, podendo haver raros grânulos azurófilos citoplasmáticos. A LMA M5 divide-se em LMA M5a, monoblástica (sem diferenciação, blastos $\geq 80\%$) e LMA M5b, LMA monocítica (com diferenciação, blastos <80%).
- LMA M6: Eritroblastos >50% das células nucleadas da MO. A série eritróide tem maturação megaloblástica, o que exige diferenciação de processos benignos. Podem existir eritroblastos multinucleados, fragmentação nuclear e vacuolização citoplasmática.
- LMA M7: Megacarioblastos > 30% de células mononucleadas na MO. Os blastos mostram brotamentos citoplasmáticos de plaquetas ou quando há uma população de células leucêmicas mais maduras, com diferenciação megacariocítica.^{40,41}

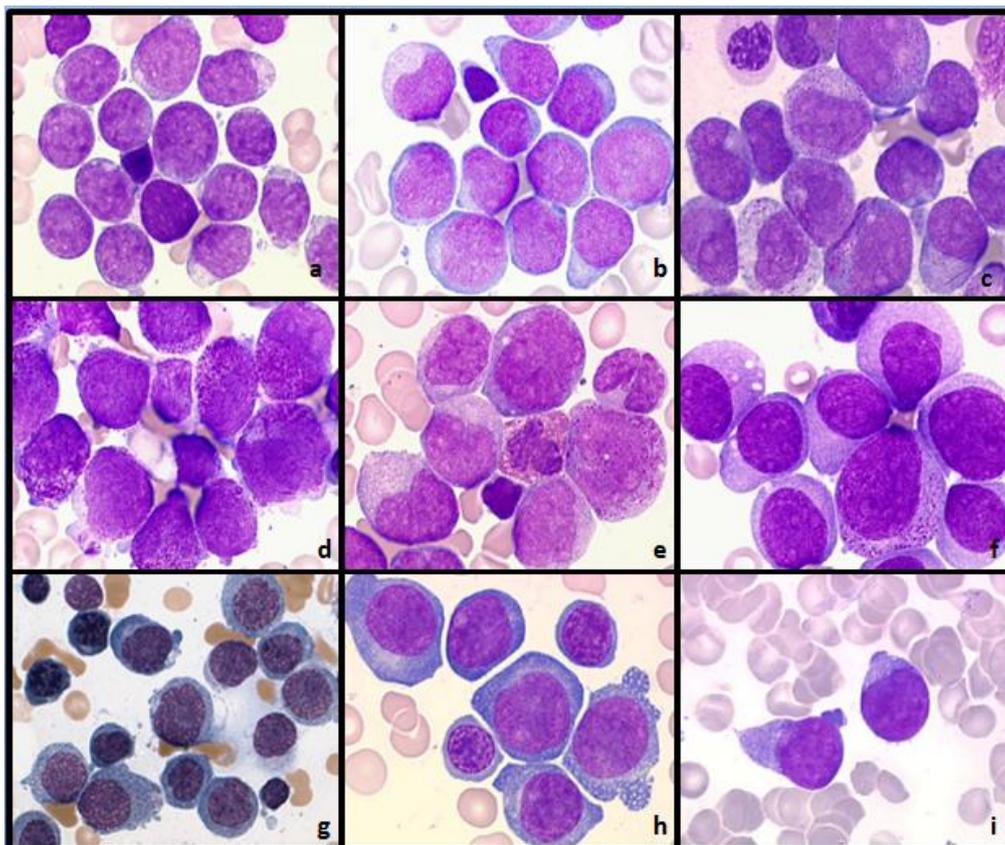


FIGURA 2: Morfologia celular da leucemia mieloide aguda de acordo com a classificação FAB: a, LMA M0; b, LMA M1; c, LMA M2; d, LMA M3; e, LMA M4eo; f, LMA M5b; g, LMA M5a; h, LMA M6; i, LMA M7.

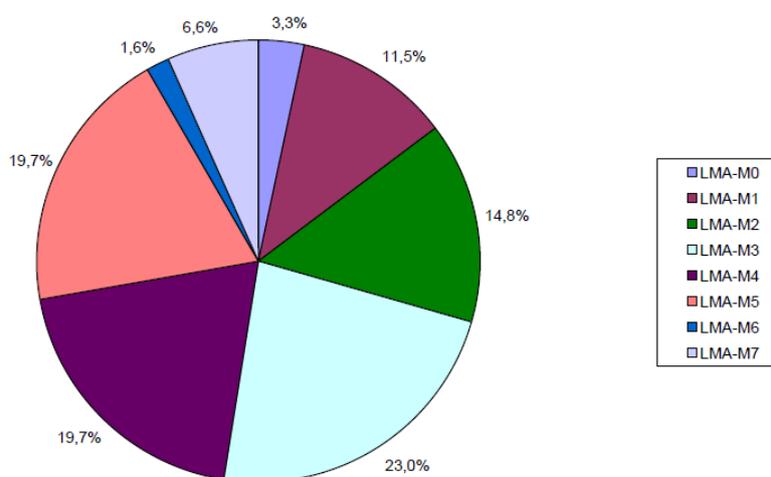


FIGURA 3: Frequência dos subtipos FAB em LMA *de novo*.⁴²

2.4.2 Classificação da OMS

A Classificação FAB tornou-se insuficiente por alguns aspectos como a não incorporação de dados citogenéticos e moleculares, sendo assim, substituída pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). A classificação da OMS apresenta recomendações atualizadas e modificadas dos critérios diagnósticos utilizados pela FAB, valorizando critérios citogenéticos, onde as LMA pode ser classificada em cinco categorias: (a) LMA com alterações citogenéticas recorrentes, (b) LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia; (c) neoplasias mielóides relacionadas à terapia; (d) LMA não especificadas; (e) sarcoma mielóide; (f) proliferações mielóides relacionadas à síndrome de Down; (g) neoplasia de células dendríticas blásticas plasmocitóides. (Tabela 1)⁴³

Tabela 1. Classificação da LMA e das neoplasias mielóides relacionadas segundo a OMS.

LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA t(8;21) (q22;q22):RUNX1-RUNX1T1
LMA inv(16) (p13.1q22) ou t(16;16) (p13.1;q22); CBF β -MYH11
LPA t(15;17) (q22;q12): PML-RAR α
LMA t(9;11) (p22;q23); MLLT3-MLL
LMA t(6;9) (p23;q34);DEK-NUP214
LMA inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2); RPN1-EVI1
LMA (megacarioblástica) t(1;22) (p13;q13); RBM15-MKL1
LMA com mutação NPM1
LMA com mutação CEBPA
LMA com alterações relacionadas a mielodisplasia
Neoplasias mielóides relacionadas a terapias
Leucemia mielóide não especificadas
LMA com diferenciação mínima
LMA sem maturação
LMA com maturação

Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica/monocítica aguda
Leucemia eritróide aguda
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielose aguda com mielofibrose
Sarcoma mielóide
Proliferações mielóides relacionadas a síndrome de Down
Neoplasmas blásticos plasmocitóides da célula dendrítica

Fonte: Swerdlow e cols, 2008.⁴⁴

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Primeiramente o diagnóstico de LMA tem seu início com uma observação de características clínicas como: palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, febre em consequência de infecções, faringite, petéquias ou outras manifestações hemorrágicas, dor óssea, hipertrofia gengival e infiltrações cutâneas, juntamente com análise do sangue periférico que pode apresentar: contagem de plaquetas e hemoglobinas baixas, contagem de leucócitos de $< 1.000/\mu\text{l}$ a $200.000/\mu\text{l}$, contagem diferencial de leucócitos anormais com neutropenia e presença de blastos e anemias normocrômica e normocítica⁴⁵. Conquanto a morfologia das células sejam sempre fundamentais para o diagnóstico, outras técnicas adicionais, incluindo imunofenotipagem, avaliação citogenética e estudos de genética molecular, tornaram-se essenciais e, em alguns casos específicos, obrigatórias.⁴⁶ A utilização destas, permite a identificação do tipo celular envolvido na neoplasia, o qual é indispensável para definição das características diagnósticas bem como decisão terapêutica.⁴⁷

2.5.1 Citoquímica

A citoquímica, utilizada na classificação e diagnóstico das leucemias podem ser aplicadas à medula óssea e ao sangue periférico, auxiliando na confirmação da origem

mielóide e/ou monocítica, sendo que as colorações citoquímica ainda seguem úteis apesar dos progressos da imunofenotipagem. As principais colorações em uso são fosfatase alcalina; mieloperoxidase (MPO); *sudan black B* (SBB); naftol AS-D; cloroacetato esterase (CAE); esterases inespecíficas, como alfa-naftil acetato esterase (ANAE); reação do ácido para-aminossalicílico (ácido periódico de Schiff [PAS]) e fosfatase ácida. A mieloperoxidase ou SBB positiva confirma a natureza mielóide dos blastos e revela os bastonetes de Auer em aproximadamente 65% dos casos. Ela é específica para as linhagens de granulócitos, eosinófilos e monócitos (Tabela 2).^{48,49}

Tabela 2. Colorações Citoquímicas

M0	MPO -; SBB- ; esterases-
M1	MPO/SBB+ em $\geq 3\%$ das células
M2	MPO+ ; SBB+
M3	MPO++; SBB++
M4	MPO+; SBB+ ;esterase inespecífica+ com inibição pelo NaF; ANAE+
M5	MPO-; esterase++
M6	MPO-; SBB-; ANAE++
M7	MPO-; SBB-; ANAE+ na zona de Golgi

MPO: mieloperoxidase; SBB: *sudan black B*; ANAE: alfa-naftil acetatoesterase; NaF: fluoreto de sódio; (+): positivo; (-): negativo.⁵⁰

2.5.2 Imunofenotipagem

A realização da imunofenotipagem se dá por meio de anticorpos monoclonais marcados, que reconhecem epítomos específicos de antígenos celulares. As técnicas empregadas na imunofenotipagem podem ser a citometria de fluxo ou a imunocitoquímica. A importância da imunofenotipagem reside, principalmente, no diagnóstico das LMA M0 e M7, mas também em alguns casos de M5a, além de auxiliar no diagnóstico das LMA M3, LMA M2 e LMA M1/M2, bem como ser essencial para a

identificação da leucemia bifenotípica aguda.⁵¹ Os principais marcadores imunofenotípicos relacionados a subtipos da LMA estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Classificação Imunofenotípica da LMA.

	M0	M1	M2	M3	M4	M5a/M5	M6	M7
CD13/CD33	+	+	+	++	++	++	+	++
CD65	+-	+	++	+	++	++	+/-	+/-
CD11c	- ou +-	- ou +-	- ou +-	-	++	++	+	-
CD14	-	-	-	-	+	+ / ++	-	-
CD15	+-	+-	++	+-	-	-	-	-
CD36	-	-	-	-	+	+	++	+
CD235a	-	-	-	-	-	-	+	-
CD41/CD61	-	-	-	-	-	-	-	++
CD42	-	-	-	-	-	-	-	+
CD34	++	++	+	+-	+-	+ / +-	+	++
CD117	++	++	++	+	+	+	+	+
HLA-DR	++	++	+	-	++	++	+	++

-: < 10% das leucemias são positivas; ±: 10%-25% das leucemias são positivas; +: 25%-75% das leucemias são positivas; ++: > 75% das leucemias são positivas.⁵²

2.5.3 Análise Citogenética e Hibridização Fluorescente *in Situ* (FISH)

A Citogenética é a área mais antiga da genética que atua diagnosticando alterações numéricas e/ou estruturais que podem ocorrer nos cromossomos. A análise citogenética é feita nas células hematopoiéticas, preferencialmente, em amostra de medula óssea por estar em completo processo de divisão celular e conter mais material para análise. A análise citogenética se dá através do estabelecimento de uma cultura não estimulada de curta duração, seguida de processamento para obtenção dos cromossomos, coloração ou bandeamento G e finalmente a análise microscópica.⁵³

A análise citogenética é de fundamental valor para o manejo clínico de pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA). Outrossim, vale ressaltar que de acordo com as alterações cromossômicas detectadas, pode-se dividir os pacientes em 4 grupos: favorável, intermediário, desfavorável e desconhecidas. É considerado pelo grupo SWOG (*Southwestern Oncology Group*) como cariótipo favorável: $inv(16)/t(16;16)/del(16q)$, $t(15;17)$ com ou sem alterações secundárias, $t(8;21)$ sem $del(9q)$ ou cariótipo complexo; como intermediário: cariótipo normal, $+8$, $+6$, $-Y$, $del(12p)$ enquanto como cariótipo desfavorável alterações envolvendo os cromossomos 3, 9, 11, 20, 21, $del(5q)$, -5 , $del(7q)$, -7 e cariótipos complexos.⁵⁴

Criticamente, a identificação de translocações recorrentes e inversões cromossômicas associadas a esta doença pavimentou o caminho para a caracterização molecular das regiões de pontos de quebra.⁵⁵ As aberrações citogenéticas adquiridas são detectadas em 55%-75% de pacientes recentemente diagnosticados com LMA, e estão descritas na FIGURA 4.⁵⁶

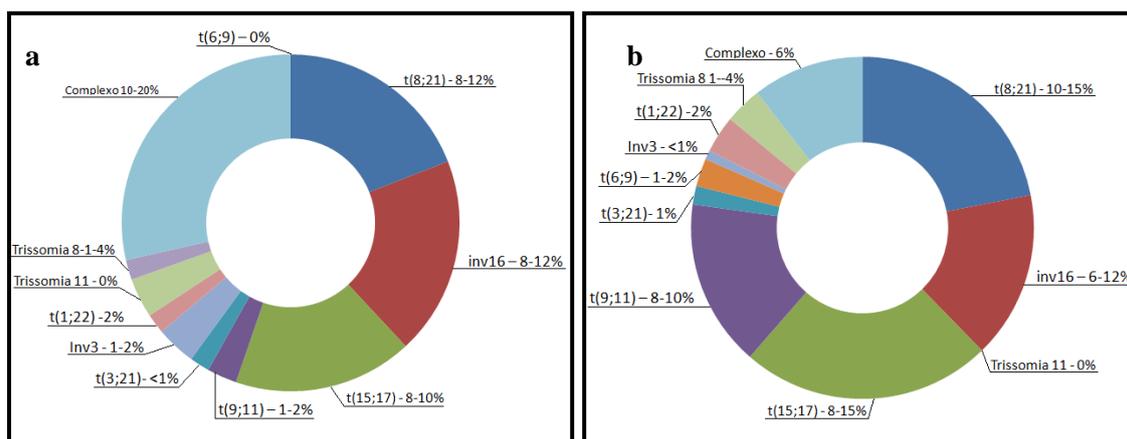


FIGURA 4: Frequência das alterações cromossômicas mais comuns detectadas pela análise citogenética; A: Adultos. B: Crianças.⁵⁷

Já a Hibridização *in situ* por Fluorescência é a técnica de citogenética molecular mais comumente utilizada. Utiliza sondas de DNA marcadas com fluorescência para detectar anomalias cromossômicas⁵⁸ que estão além do poder de resolução da citogenética de rotina, como micro deleções e rearranjos cromossômicos complexos.⁵⁹

2.5.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O advento do PCR revolucionou a tecnologia molecular em muitas especialidades médicas. Seu uso laboratorial teve grande progresso devido a simplicidade técnica e rapidez na obtenção dos resultados. A técnica do PCR é um processo rápido de replicação seletiva de um determinado trecho do DNA “*in vitro*”.

A citogenética e/ou biologia molecular tornaram-se, portanto ferramentas prognósticas indispensáveis para LMA⁶⁰, sendo que a análise citogenética tem sido até hoje o método eletivo para a identificação dessas translocações. Entretanto além de não detectar alguns tipos de translocações, esse tipo de análise é tecnicamente difícil e sujeita a resultados não interpretáveis, devido à ausência de metáfases ou material insuficiente, enquanto métodos como a reação de cadeia da polimerase, são mais rápidos, sensíveis, específicos e utilizam quantidades mínimas de material. Rápidos, pois obtém-se o resultado dentro de poucas horas; sensíveis porque, através de técnicas como o PCR, é possível detectar uma célula leucêmica entre 10^5 e 10^6 células normais, e específicos, pois está sendo pesquisado um determinado rearranjo, portanto só ele será identificado.⁶¹ Devido a sua sensibilidade é também indicada durante o tratamento para o acompanhamento da presença de células residuais proporcionando aos pacientes o uso de regimes terapêuticos adequados.⁶²

Além disso, em algumas situações o PCR por transcriptase reversa (RT-PCR) é a única alternativa diagnóstica evidenciando transcritos quiméricos representativos de translocações em ausência de alteração citogenética detectável.

Devido a estes dados um estudo de J. S. PARK, 2007 concluiu que o RT-PCR deve ser adicionado ao repertório dos testes realizados por laboratórios de hematologia, proporcionando melhorias ao diagnóstico e tratamento da leucemia.⁶³

2.6 BIOLOGIA MOLECULAR E LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

2.6.1 Principais translocações cromossômicas recorrentes e seus transcritos de fusão

As translocações cromossômicas podem afetar a célula por dois mecanismos principais: justaposição de uma unidade de transcrição intacta de um cromossomo a um elemento potenciador de um gene localizado em outro cromossomo, ou pela formação de proteínas de fusão quiméricas. Por exemplo, na t(14;18) encontrada no Linfoma não-Hodgkin, o gene BCL-2 é translocado para o locus IgH, levando à expressão inadequada de BCL-2. No entanto, a proteína transcrita pelo gene BCL-2 é idêntica à do tipo selvagem. Alternativamente, translocações cromossômicas podem perturbar dois genes diferentes dentro de suas seqüências codificadoras, levando à criação de uma proteína quimérica. Por exemplo, a t(9;22) presente na Leucemia Mielóide Crônica culmina na formação de uma proteína de fusão quimérica BCR-ABL que possui uma atividade alterada. Na LMA, a grande maioria das translocações cromossômicas resultam na geração de genes de fusão quiméricos que nunca são expressos em células do tipo selvagem.⁶⁴ As principais e mais freqüentes alterações

cromossômicas encontradas em LMA são a t(8;21), t(15;17), t(9;11) e inv(16), e serão caracterizadas a seguir.

2.6.1.1 t(8;21)

A t(8; 21)(q22;q22) está associada com o subtipo M2, e foi a primeira translocação cromossômica recorrente na LMA a ser identificada.⁶⁵ A translocação t(8;21) foi descrita pela primeira vez por Rowley em 1974 através do uso de banda Q, e esta presente em cerca de 6% a 12% das leucemias mielóides agudas, em 18% das leucemias com alteração de cariótipo e em 30% das LMA M2. Este blastos muitas vezes possuem morfologia característica, com bastonetes de Auer proeminentes, grânulos de cor salmão e citoplasma com grânulos grandes e vacúolos. Quando a apresentação morfológica for sugestiva, mas a citogenética não confirmar a t(8;21), o transcrito de fusão deve ser evidenciado por RT-PCR.⁶⁶

A translocação resulta em um produto de fusão envolvendo o gene AML1 (também conhecido como RUNX1) no cromossomo 21 e o gene ETO (também conhecido como RUNX1T1) no cromossomo 8 (FIGURA 5). A presença dessa anomalia genética é um diagnóstico da LMA, independente da contagem de blastos⁶⁷. A t(8;21) é indicativa de bom prognóstico, pois os pacientes são, via de regra, jovens e respondem a quimioterapia habitual com alta taxa de remissão completa e mediana de sobrevida relativamente longa. Em crianças, no entanto, aparentemente, o prognóstico não é tão bom como em adultos.⁶⁸

O AML1-ETO é um repressor transcricional que recruta de maneira aberrante complexos co-repressores nucleares, como a histona deacetilase (HD), para domínios *Core Binding Factor* (CBF). Os membros do grupo CBF funcionam como complexos

heterodímeros que regulam vários genes envolvidos na diferenciação, em muitos tecidos, podendo conferir certas propriedades de auto-regeneração às células.^{69,70}

As correlações clínicas e morfológicas deste subtipo de LMA incluem uma alta incidência de blastos leucêmicos extramedulares conhecidos como sarcoma granulocítico.⁷¹

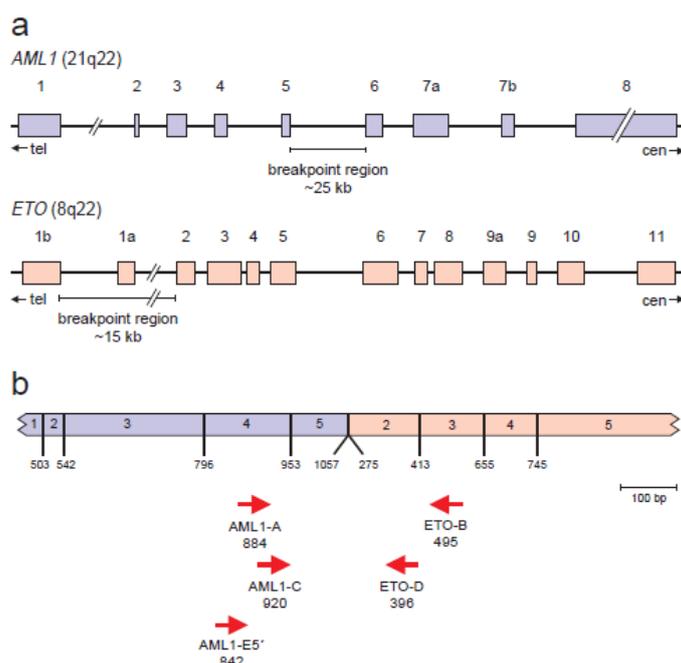


FIGURA 5: a) Representação esquemático dos genes AML1 e ETO e pontos de quebra. b) Gene de fusão AML1/ETO gerado como produto da translocação t(8;21).⁷²

2.6.1.2 t(15;17)

Esta translocação está associada à Leucemia Promielocítica Aguda (APL), um distinto subtipo com citomorfologia M3. A APL é um subtipo distinto de leucemia mielóide aguda, que representa cerca de 10% de todos os casos LMA⁷³. Clinicamente, difere das outras LMAs por estar associada à coagulopatia em cerca de 60% a 90% dos pacientes. A doença representa uma forma altamente maligna de leucemia com curso fatal em apenas algumas semanas.⁷⁴

A t(15;17) (q22, q21) resulta da fusão do gene promielocítico (PML) no cromossomo 15q22, com o receptor do ácido retinóico (RAR α) no cromossomo 17q21, produzindo uma proteína de fusão, a PML-RAR α (FIGURA 6).⁷⁵ Além de interferir nas proteínas que normalmente interagem com o RAR α , esta fusão interfere no funcionamento da proteína PML nativa que desempenha o papel de gene supressor tumoral,⁷⁶ O prejuízo das atividades dominantes causado pela fusão PML-RAR α resulta em um bloqueio de diferenciação celular no estágio promielocítico. No entanto modelos murinos de leucemia promielocítica aguda indicam que múltiplas mutações são necessárias para que surja o fenótipo da LMA M3. Em alguns casos a mutação ativadora do FLT3 pode ser este “algo mais” requerido para desencadear a doença.⁷⁷

A translocação t(15;17) representa a base molecular de cerca de 98% dos casos de APL, sendo que em alguns casos que não apresentam alterações citogenéticas detectadas pelos métodos clássicos, apresentarão o rearranjo PML-RAR α em nível molecular.⁷⁸

Os pontos de quebra cromossômica podem ser variáveis e capazes de gerar produtos com diferentes tamanhos em diferentes pacientes. No entanto, no mesmo paciente o produto de fusão é invariável, o que demonstra a natureza clonal do fenômeno. Os pontos de quebra no cromossomo 17 estão localizados dentro de um fragmento de DNA de 15kb do intron 2 RAR α . Em contrapartida, três regiões do locus PML estão envolvidos na translocação: o intron 6 (bcr1, 55% dos casos), exon 6 (bcr2; 5%) e intron 3 (bcr3; 40%). A observação de que os transcritos PML-RAR α estão presentes na maioria mas não em todos os casos de APL, tem favorecido o uso destas como alvo de PCR para detecção de células APL no diagnóstico e durante o monitoramento.⁷⁹

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é o primeiro modelo de doença genética adquirida tratada com uma droga específica, o ácido *all-trans*-retinóico (ATRA), que induz diferenciação terminal seguida de apoptose das células leucêmicas. Atualmente, o tratamento adequado, incluindo a combinação de ATRA e antracíclicos, induz à remissão em mais de 90% dos pacientes e a sobrevida livre de doença em seis anos é superior a 80%⁸⁰. Entretanto, o prognóstico depende do diagnóstico imediato e acurado, assim como da instituição precoce da terapêutica específica.

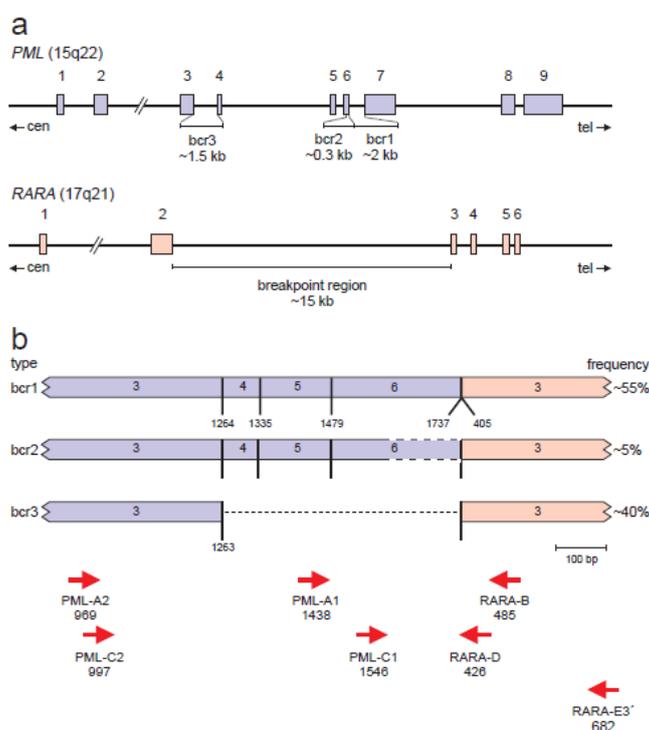


FIGURA 6: a) Representação esquemático dos genes *PML* e *RARα* e pontos de quebra. b) Gene de fusão *PML/RARα* gerado como produto da translocação t(15;17).⁷²

2.6.1.3 *Inv16*

A del(16)(q22) foi descrita inicialmente em LMA em 1982. E esta deleção foi rapidamente correlacionada com a inversão pericêntrica do cromossomo 16 (inv16 p13q22) que parecia estar ligada com a LMA M4 eosinofílica. Enquanto que a t(16;16) foi identificada como uma variação aberrante.⁸¹ Pacientes com este tipo de alteração têm

prognóstico relativamente bom e grande probabilidade de resposta a regimes que incluam citarabina em altas doses.⁸²

LMA com um $\text{inv}(16) (p13; q22)$ ou $t(16; 16) (p13; q22)$ representa 10% dos adultos, e aproximadamente 6% da LMA na infância. Resulta da fusão dos genes subunidade beta do fator central de ligação (CBF β) em 16q22 e um gene que codifica a cadeia pesada de miosina do músculo liso (MYH11) em 16p13. (FIGURA 7)

O CBF é um importante regulador da hematopoese, capaz de ativar um espectro de genes fundamentais para o desenvolvimento das linhagens mielóide e linfóide. A proteína quimérica CBF β -MYH11 mantém sua capacidade de ligar-se ao AML1 e também consegue formar multímeros de alto peso molecular através do domínio MYH11 e é um inibidor negativo dominante da transativação mediada por CBF.⁸⁴ Estudos relatam que em camundongos a simples expressão do CBF β -MYH11 é suficiente para causar LMA.⁸³

Dez diferentes transcritos da fusão CBF β -MYH11 foram relatados, sendo que mais de 85% dos pacientes tem o tipo A. A natureza sutil das alterações cariotípicas em $\text{inv}(16)$ tornam difícil a sua detecção por citogenética, especialmente quando sua presença não é suspeita a partir dos achados morfológicos. Por estas razões o RT-PCR é altamente recomendado.⁸⁴

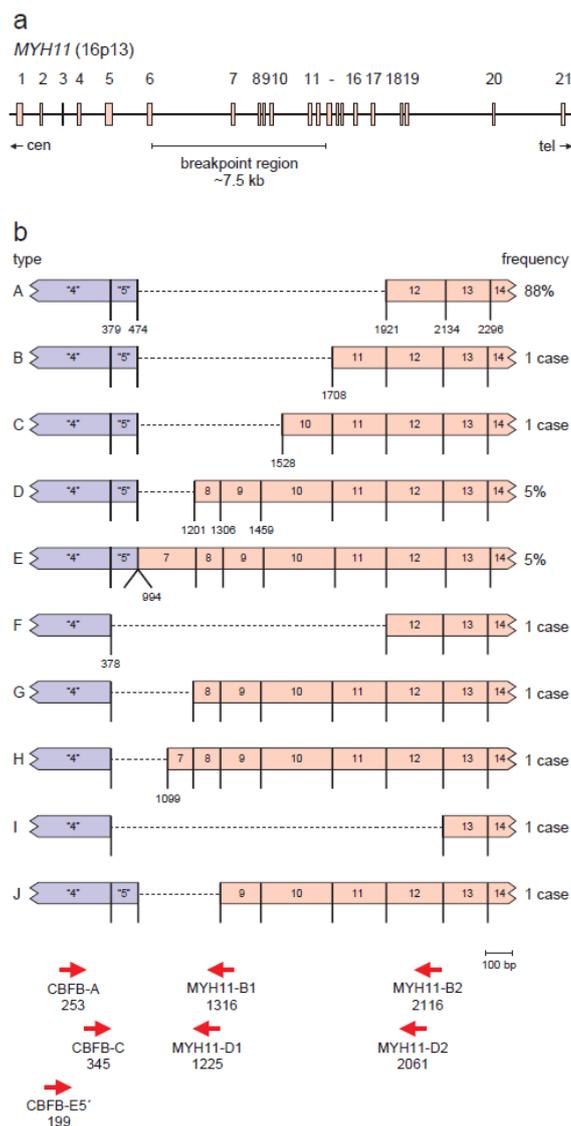


FIGURA 7: a) Representação esquemático dos genes CBF β e MYH11 e pontos de quebra. b) Gene de fusão CBF β -MYH11 gerado como produto da translocação t(16;16).⁷²

2.6.1.4 t(9;11)

Translocações envolvendo o gene MLL no cromossomo 11q23 encontram-se em aproximadamente 6% dos casos de LMA e estão associados com mais de 50 genes parceiros diferentes, estando os pontos de quebra restritos a uma região de 8.3kb.⁸⁵ Em 2008, a classificação da OMS reconhece agora só a t(9;11) (p22; q23) (MLLT3-MLL)

como uma entidade específica. A t(9;11) (MLLT3-MLL) AML geralmente ocorre em crianças, com um prognóstico intermediário.⁸⁶

A fusão dos genes MLL-AF9 leva a geração de uma proteína de fusão que parece desempenhar um papel crucial na leucogenese.⁸⁷ Tipicamente o RNA mensageiro (mRNA) do gene AF9 é fundido com os exons 5,6,7 ou 8 do gene MLL.

Na maioria dos casos a translocação recíproca entre o braço curto do cromossomo 9 e o braço longo do cromossomo 11, está associada a subtipos FAB com características monocíticas M4 e M5.⁸⁸

2.6.2 Principais alterações moleculares em leucemia mieloide aguda

A Leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença complexa associada a alterações cromossômicas como translocações, mutações, e modificações epigenéticas; levando a uma proliferação aumentada e diminuição da diferenciação de células progenitoras hematopoéticas.⁸⁹ Nos últimos anos, vários importantes marcadores moleculares têm sido descobertos.⁹⁰ Estes marcadores não só auxiliaram uma melhor caracterização dos pacientes, mas também, uma melhora na estratificação de risco, especialmente no grande grupo de pacientes citogeneticamente normais(CN-LMA). Exemplos importantes são mutações em *Nucleophosmin 1*(NPM1)⁹¹, *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (CEBPA)⁹², sendo ambos associados com um resultado favorável e no gene MLL o qual codifica uma proteína necessária para a manutenção da expressão do gene HOX com impacto no prognóstico ainda não elucidado.⁹³ Em contraste mutações no *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3), o gene mais corriqueiramente mutado na LMA, as quais conduzem a um conjunto de duplicação interna (ITD), resultando na ativação desta quinase, estão

associados a um pior prognóstico.⁹⁴ As mutações FLT3 podem surgir acompanhadas de rearranjos gênicos conhecidos, como AML1-ETO, PML-RAR α e CBF β -MYH11 ou MLL.

Outra mutação altamente investigada está localizada no gene que codifica a proteína *tirosina-cinase* (c-KIT), envolvida em processos de regulação da multiplicação celular na LMA. Estas mutações são freqüentes e clinicamente relevantes devido a disponibilidade de certos inibidores da enzima *tirosina-cinase*, como *sunitinib* e *imatinib*, cuja ação pode bloquear farmacologicamente a atividade do gene *c-KIT*.⁸⁹ As mutações FLT3 e KIT formam um grupo complementar no qual raramente se sobrepõem no mesmo paciente, e cada uma delas gera a ativação constitutiva das vias de transdução do sinal nas células leucêmicas. Coletivamente, representam cerca de 50% dos casos.

Como se sabe, estas mutações clássicas em proteínas, bem como translocações comuns, são encontradas em uma minoria de pacientes com LMA.⁹⁵ Os componentes distintos da maquinaria epigenética, ou seja, a metilação do DNA de dinucleotídeos CpG, modificações covalentes das histonas e RNAs não codificantes, foram descritos como controladores da expressão, e no contexto de câncer podendo, assim, contribuir também para estas neoplasias.⁹⁶

2.6.3 Epigenética

O seqüenciamento genômico permitiu conhecimento sobre os processos biológicos nas plantas e animais. No entanto, além da seqüência de nucleotídeos no DNA, a organização da cromatina exerce função chave na expressão gênica: por exemplo regiões menos compactadas da cromatina são mais acessíveis à transcrição e

vice-versa. Assim, a epigenética surge como essencial para a genômica funcional revolucionando a genética molecular.

O epigenoma refere-se a todas as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não alteram a seqüência de nucleotídeos do DNA. A epigenética é o estudo dessas modificações no DNA, sendo os padrões epigenéticos sensíveis a modificações ambientais que podem causar mudanças fenotípicas que serão transmitidas aos descendentes.⁹⁷

Existem algumas características que, distinguem a epigenética dos mecanismos da genética convencional: a reversibilidade, os efeitos de posicionamento, a habilidade de agir em distâncias não esperadas maiores do que um único gene.⁹⁸

São três os principais mecanismos epigenéticos: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores, os quais atuam modificando a acessibilidade da cromatina para a regulação da transcrição localmente ou globalmente, pelas modificações no DNA e pelas modificações ou rearranjos dos nucleossomos. Ao contrário do genoma, que é idêntico nos diferentes tipos celulares, o epigenoma é dinâmico e varia de uma célula para outra, pois, o epigenoma corresponde à cromatina, às proteínas associadas e aos padrões de modificações covalentes do DNA obtidos pela metilação e que permitem a organização e manutenção dos programas de expressão dos genes.⁹⁹

Estes mecanismos são componentes críticos no desenvolvimento normal e no crescimento das células. A regulação epigenética do gene colabora com as alterações genéticas do desenvolvimento do câncer.¹⁰⁰

2.6.3.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética melhor caracterizada até o momento, sendo esta indispensável para as funções do genoma dos vertebrados, e está relacionada com processos de regulação gênica, estabilidade cromossômica e silenciamento. Consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH₃) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina (5-Mec) que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo cpG), pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA metiltransferase (DNMT) (FIGURA 8).¹⁰¹ As DNA metiltransferases estão divididas em duas classes de representantes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA (fitas de DNA em processo de replicação), conhecidas como metilases de manutenção como a DNMT1; e outro grupo, responsável pela maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorre em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia, denominadas DNMT2, DNMT3A e DNMT3B. DNMT3A e 3B são expressas principalmente em células embrionárias e não diferenciadas. São críticas durante o desenvolvimento embrionário quando ocorrem ondas seqüenciais de metilação *de novo* no genoma. As duas, são assim, conhecidas como DNMTs *de novo*. Entretanto, alguns relatos indicam que DNMT1 assim como DNMT3A e 3B podem ter ambas as funções de manutenção e *de novo* in vivo, cooperando para a geração de um padrão global de metilação.^{102,103}

O processo de metilação do DNA controla diversas funções do genoma, sendo essencial para que ocorra o desenvolvimento normal. Entre essas funções, podem ser citadas: recombinação durante a meiose, controle da replicação, controle de DNAs “parasitas” que se inserem no genoma humano (ex.: DNA viral), estabilização e

manutenção da expressão gênica, regulação da diferenciação celular e inativação do cromossomo X. Entretanto, a aberração no padrão de metilação no promotor de um gene pode levar à perda de função desse gene e ser muito mais freqüente do que a mutação genética.¹⁰⁴

Os dinucleotídeos CpG podem aparecer de forma isolada distribuída pelo genoma ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG (regiões maiores do que 200pb com presença de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG), sendo que, a maioria dos CpG isolados encontram-se metilados enquanto que os pertencentes as ilhas de CpG permanecem desmetilados. As ilhas CpG são alvos de proteínas que se combinam com os CpG não metilados e iniciam a transcrição do gene. Tipicamente as regiões não metiladas dos pares CpG são localizadas em genes essenciais (*housekeeping*), que estão envolvidos na preservação da rotina celular e são expressos na maioria dos tecidos.¹⁰⁵ A metilação de ilhas CpG presentes nas regiões promotoras dos genes impede diretamente, através de uma barreira física, o seu reconhecimento pelos fatores de transcrição, resultando em silenciamento gênico^{106,102} Em mamíferos, também é observada metilação em citosinas não-CpG, mas esta é exclusivamente encontrada em células-tronco embrionárias.¹⁰⁷

Apesar do câncer ter como característica molecular ser globalmente hipometilado em comparação com tecidos normais, a hipermetilação nas ilhas CpG nos promotores dos genes supressores de tumor é comum em muitos tumores. Os genes supressores tumorais atuam normalmente reprimindo o crescimento celular e metilações nestes genes levam ao seu silenciamento e, por conseguinte, a sua perda de função. Os genes conhecidos como protooncogenes atuam favorecendo o crescimento celular de

forma ordenada. A hipometilação nesses genes promove o crescimento desordenado da célula e a formação de tumores.

A hipometilação leva à instabilidade genômica, que provoca quebras cromossômicas, servindo como um mecanismo de ativação de genes prometastáticos em estágios avançados de câncer. A hipermetilação serve como um mecanismo para um crescimento descontrolado dessas células metastáticas.¹⁰⁴

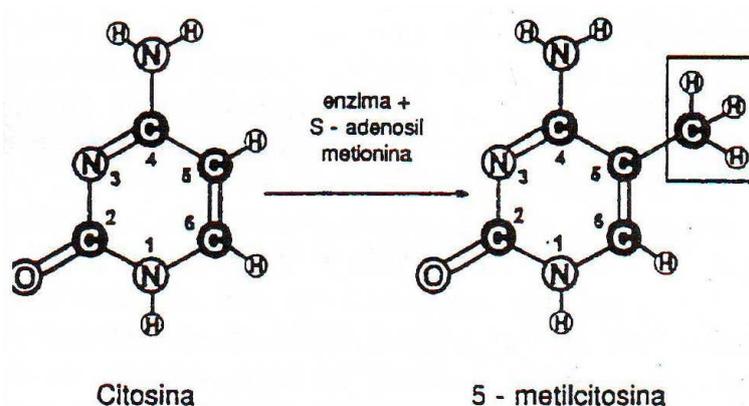


FIGURA 8: Representação esquemática da Metilação do DNA. Adptado de RIBEIRO MM, 1997.¹⁰⁸

2.6.3.2 Mutações somáticas no gene DNA Metiltransferase 3A (*DNMT3A*)

O *DNMT3A* possui em sua estrutura, três domínios principais: *methyltransferase* (MTase), *zinc-finger* (ZNF) e *conserved proline-tryptophan-tryptophan-proline* (PWWP). O domínio PWWP é o alvo da enzima para o ácido nucléico, enquanto o ZNF medeia a interação proteína-proteína com os fatores de transcrição.¹⁰⁹

O seqüenciamento de todo o genoma tornou-se uma ferramenta útil para encontrar novas mutações. Recentemente Ley *et al* identificaram mutações somáticas no gene DNA Metiltransferase 3A (*DNMT3A*) em 62 (22,1%) de 281 pacientes com LMA e em 33,7% dos pacientes com perfil citogenético de risco intermediário, e estavam

ausentes em todos os 79 pacientes com perfil citogenético favorável. A sobrevivência média entre os pacientes com mutações *DNMT3A* foi significativamente menor do que entre os pacientes sem tais mutações (12,3 meses em comparação a 41,1 meses).¹¹⁰ Este resultados sugerem que as mutações *DNMT3A* estão independentemente associadas a um pior prognóstico, sendo muito freqüentes em pacientes com um perfil citogenético de risco intermediário, os quais possuem uma resposta ao tratamento muito variável e, sendo portanto, a identificação da tais mutações de alta relevância clínica. No entanto os mecanismos exatos da ação de mutações *DNMT3A* ainda não estão claros, pois os padrões de metilação global do genoma não foi significativamente alterado,¹⁰¹ ainda que *Yan et al* relatou que com uma expressão forçada de *DNMT3A* mutado em uma linhagem celular mielóide de camundongo estimulou a proliferação celular, sugerindo um ganho de função.⁹²

Quase todas as mutações encontradas foram heterozigotas, e cerca da metade ocorreu na posição Arg882. Estudos enzimáticos mostraram que em comparação com o tipo selvagem *DNMT3A*, todos os mutantes Arg882 mostraram uma redução em suas atividades de metilação do DNA.^{111,112}

Publicações posteriores mostraram que a incidência desta mutação em LMA variou de 4,1% em um estudo japonês,¹¹² 8-9% em um estudo com pacientes chineses,¹¹³ e cerca de 20% em dois estudos ocidentais^{110,114}. Devido a estes dados essa diferença geográfica da incidência de mutações *DNMT3A* que parece haver precisa ser determinada.

Mutações no *DNMT3A* estão presentes em vários subtipos morfológicamente definidos, embora um estudo alemão publicado recentemente demonstrou que estas são

mais freqüentes nos subtipos M4 e M5.¹¹⁴ Além disso paciente com mutações DNMT3A tem com mais freqüência mutações FLT3/ITD, NPM1, IDH1 ou IDH2, em contraste *Licht, J et al* quase não encontraram mutações DNMT3A em pacientes com transcritos de fusão PML-RAR α , RUNX1-RUNX1 ou CBF β -MYH11.¹¹⁵

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a incidência e o impacto clínico de mutações no gene DNMT3A, correlacionando-as com dados clínicos e com translocações já bem definidas na LMA, nos pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre que tiveram suas amostras de sangue periférico ou medula óssea criopreservadas e armazenadas no banco de criopreservação do Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoiéticas desde o ano de 2001, até a presente data.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a incidência de transcritos de fusão oriundos de translocações cromossômicas no grupo estudado;
2. Determinar a incidência de mutações somáticas no gene DNMT3A;
3. Classificar os tipos de mutações somáticas encontradas no gene DNMT3A;
2. Correlacionar o tipo de translocação cromossômica com dados clínicos;
3. Correlacionar a presença de mutação no gene DNMT3A com a presença de transcritos de fusão.
4. Correlacionar a presença de mutação no gene DNMT3A com dados clínicos como: idade, sexo, leucometria, classificação de risco, sobrevida livre de evento, e a sobrevida global.

4. REFERÊNCIAS

1. Goldman L, Benn ETT. Tratado de Medicina Interna. 21 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001.
2. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, et al. Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 6285-6295.
3. Brunning RD. Classification of acute leukemias. *Semin Diagn Pathol*, 2003; 20: 142-53.
4. Szczepanski T, van Velden, VHJ, van Dongen, JJM. Classification systems for acute and chronic leukemias. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2003; 16: 561-82.
5. Jaffe E, Falcão R. Leucemia mielóide aguda- Diagnóstico: Morfologia, Imunofenótipo e citogenética. Série de monografias da escola brasileira de hematologia. Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. 2002; 9: 54-65.
6. Ferrara F. Unanswered questions in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2004; 5: 443-50.
7. Licht JD, Sternberg DW. The Molecular Pathology of Acute Myeloid. *Leukemia Hematology.* 2005: 137-142.
8. Lusa MKP. Classificação FAB das leucemias mielóides agudas. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2000; 22: 1175-8.
9. Cammenga J. Gatekeeper pathways and cellular background in the pathogenesis and therapy of AML. *Leukemia.* 2005.

10. Robbins SL, et al. *Patologia Estrutural e Funcional*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
11. Look T. Oncogenic transcript factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278: 1059-64.
12. Hoffman R, et al. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 4.ed. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
13. Bain JB. *Diagnóstico em Leucemias*. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
14. Estey EH. Prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2001; 15: 670–72.
15. Bishop J. The treatment of adult acute myeloid leukemia. *Semin Oncol*. 1997; 24: 57-69.
16. Mayer RJ, et al. Intensive post-remission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1994; 331: 896–903.
17. Appelbaum FR. Hematopoietic cell transplantation beyond first remission. *Leukemia*. 2002; 16: 157–159.
18. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 majors cancers in 1990. *Int J Cancer*. 1999; 80: 827-841.
19. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*. 2002; 52(1): 23-47.
20. Douer D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003; 16: 357-67.

21. Capra M, Vilella L, Pereira WV, et al. Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia between 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48(12): 2381-6.
22. Linet MS. The leukemias: Epidemiologic aspects. In Lilienfeld AM (ed): *Monographs in Epidemiology and Biostatistics*. New York, Oxford University Press, 1985.
23. Bhatia S, Neglia JP. Epidemiology of childhood acute myelogenous leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1995; 17-94.
24. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Estimativa de Câncer 2005. www.inca.gov.br/estimativa/2005.
25. Greaves MF. A etiology of acute leukaemia. *Lancet*. 1997; 349: 349-349.
26. Levine EG, Bloomfield CD. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol*. 1992; 19: 47-84.
27. Evans D, Steward J. Down's syndrome and leukaemia. *Lancet*, 1972; 7790-1322.
28. Hoffmann R, et al. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5ed., 2005.
29. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 2006 ;6: 193-203.

30. Cronkite E. Chemical leukemogenesis: Benzene as a model. *Sem Hematol* 1987; 24: 2-4.
31. Folley J, Borges W, Yamawaki T. Incidence of leukemia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima e Nagasaki, Japan. *Am J Med.* 1982; 13-311.
32. Andrieu J, Ifrah N, Payen C, et al. Increase risk of secondary acute nonlymphocitic leukemia after extended-field radiation therapy combined with MOPP chemotherapy for Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1148-1154.
33. Szczepanski T, van Velden VHJ, van Dongen, JJM. Classification systems for acute and chronic leukemias. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2003; 16: 561-82.
34. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French American British Cooperative Group. *Ann Int Med.* 1985; 103: 620-625.
35. Jennings DC, Foon AK. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90: 2863-2892.
36. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Br J Haematol.* 1991; 78: 325-329.
37. Vidriales MB, Orfao A, Lópes-Berges MC, et al. Light scatter characteristics of blasts cells in acute myeloid leukaemia: association with morphology and immunophenotype. *J Clin Pathol.* 1995; 48: 456-462.
38. Castoldi GL, Liso V, Specchia G, Tomasi P. Acute promyelocytic leukemia; morphological aspects. *Leukemia.* 1994; 2: S27-S32.

39. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 1997; 90: 2863-92.
40. Lusa MKP. Classificação FAB das leucemias mielóides agudas. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2000; 22: 1175-8.
41. Pimenta G. Perfil imunofenotípico de 441 casos encaminhados ao laboratório Sérgio Franco medicina diagnóstica no Rio de Janeiro, no período de junho/2004 a Junho/2005. *Boletim Médico*. 2006; 1:1-2.
43. Bruce D, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 4642-9.
44. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. WHO-OMS. International Agency for Research on Cancer, 2008.
45. Bain JB. Diagnóstico em Leucemias. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
46. Swirsky DM, Richards SJ. Laboratory diagnosis of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001; 14: 1-17.
47. Farias, MG, Castro SM. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J Bras Patol Med Lab*, 2004; 40: 91-8.
48. Liesner RJ, Goldstone AH. ABC of clinical haematology: the acute leukemias. *Br J Haematol*. 1997; 314-733.

49. Swirsky DM, Richards SJ. Laboratory diagnosis of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001; 14: 1-17.
50. Yamamoto M. Imunofenotipagem em leucemias mielóides agudas. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2000; 22: 169-74.
51. Bain B, et al. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haem.* 2002; 24: 1-13.
52. Szczepanski T, Van Velden VHJ, Van Dongen JJM. Classification systems for acute and chronic leukemias. *Best Pract Res Clin Haematol,* 2003; 16: 561-82.
53. Nussbaum RL, Mcinnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genética médica.* 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
54. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML; analysis of 1612 patients entered into the MRC AML10 trial. *Blood.* 1998; 92: 2322-33.
55. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science.* 1997; 278: 1059-1064.
56. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001; 14: 497-529.
57. Bench AJ, Erber WN, Scott MA. Molecular genetic analysis of haematological malignancies: I. Acute leukaemias and myeloproliferative disorders. *Clin Lab Haematol.* 2005; 27: 148-71.

58. Naoum CP. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. Rev. Bras. Hematol. Hemoterapia. 2001; 23.
59. Grimwade D. et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into MRC AML trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood. 1998; 92: 2322-33.
60. Mrózek K, et al. Clinical significance of cytogenetics on acute myeloid leukemia. Semin Oncol. 2007; 24: 17-31.
61. Friedman AM, Weinstein HJ. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Oncologist. 2000; 4: 321-8.
62. Pui ching-hon, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 1998; 9: 605-15.
63. Park JS, et al. Comparison of multiplex reverse transcription polymerase chain reaction and conventional cytogenetics as a diagnostic strategy for acute leukemia. 2008; 30: 286-91.
64. Rabbitts TH: Chromosomal translocations in human cancer. Nature. 1994; 372.
65. Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. Blood. 1995; 86:1.
66. Nucifora G, et al. Correlation between cell morphology and expression of the AML1/ETO chimeric transcript in patients with acute myeloid leukemia without the (8;21). Leukemia. 1994; 8(9): 1533-38.

67. Arber DA, Brunning RD, LeBeau MM, et al. Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edition. Lyon: IARC Press; 2008; 110–23.
68. Caligiuri MA, Bloomfield CD. Molecular biology of leukemias, in De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 2001: 2389-2404.
69. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 502-13.
70. Higuchi M, et al. Expression of a conditional AML1/ETO oncogene by passes embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002; 1 :63-74.
71. Campos MG, Arantes AM, Pellosos LAF, et al. Cloroma de mastóide em paciente com LMA t(8;21). *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2003; 25 :80.
72. Van Dogen, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999; 13: 1901-1928.
73. Jing Y, et al. The PML-RARalpha fusion protein and targeted therapy for acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2004; 45: 639-648.
74. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008; 111: 2505-2515.

75. Borrow J, Goddard AD, Sheer D, Solomon E. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 1990; 249: 1577–1580.
76. Salomoni P, Pandolfi PP. The role of PML in tumor suppression. *Cell*. 2002; 108(2): 165-70.
77. Tallman MS, et al. Acute promyelocytic leukemia: Evolving therapeutic strategies. *Blood*. 2002; 99(3): 759-67.
78. Lemons RS, Eilander D, Waldmann RA, Rebentisch M, Frej AK, Ledbetter DM, Willmann C, McConnell T, O'Connell P. Cloning and characterization of the t(15;17) translocation breakpoint region in acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosom. Cancer*. 1990; 2: 79–87.
79. Borrow J, Goddard AD, Sheer D, Solomon E. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 1990; 249: 1577–1580.
80. Sanz MA, Martin G, Gonzalez M, Leon A, Rayon C, Rivas C, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*. 2004; 103(4): 1237-43.
81. Liu PP, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Collins FS. Fusion between transcription factor $CBF\beta$ /PEBP2 β and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*. 1993; 261: 1041–1044.

82. Mrozek K, et al. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* 1997;24(1):17-31.
83. Castilla LH, et al. Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CBF β -MYH11. *Cell.* 1996;87:687-96.
84. Dissing M, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J. Inversion of chromosome 16 and uncommon rearrangements of the CBF β and MYH11 genes in therapy-related acute myeloid leukemia: rare events related to DNA-topoisomerase II inhibitors? *J Clin Oncol.* 1998; 16: 1890–1896.
85. Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila* trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell.* 1992; 71: 691–700.
86. Arber DA, Brunning RD, LeBeau MM, et al. Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 2008; 110–23.
87. Corral J. et al. Acute leukemias of different lineages have similar MLL gene fusions encoding related chimeric proteins resulting from chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 8538–8542.
88. Bower M, Parry P, Carter M, Lillington DM, Amess J, Lister TA, Evans G, Young BD. Prevalence and clinical correlations of MLL gene rearrangements in AML-M4/5. *Blood.* 1994; 11: 3776–3780.

89. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, et al. Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2005; 23:6285-6295.
90. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H: Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: Prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 475-486.
91. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 2005; 352: 254-266.
92. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, et al. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 619-628.
93. Haferlach T. et al. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 256-65.
94. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1909-1918.
95. Galm O. et al. Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia. *Hematol.* 2005 ;84: 39-46.
96. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007. 128(4):683-92.
97. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(11): 1148-1159.

98. Feinberg A P. Cancer epigenetics take center stage. PNAS. 2001; 98(2): 392-94.
99. D'Alessio AC, Szyf M. Epigenetic: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. Biochem Cell Biol. 2006; 84: 463-76.
100. Lund A H, Lohuizen M V. Epigenetics and cancer. Genes Dev. 2004;18:2315-3
101. Szyf M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. Toxicol Sci. 2007 ;100(1): 7-23.
102. Espada J, Esteller M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. Semin Cell Dev Biol. 2010. 21(2):238-46.
103. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat Rev Genet. 2007; 8(4): 286-98.
104. Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. Cancer Sci 2010; 101 (2): 300-5.
105. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. CAMJ. 2006:174(3);341-48.
106. Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, PetersenMahrt SK. Activation-induced cytidine deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. J Biol Chem 2004; 279(50): 52353–60.
107. Lister R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature. 2009; 462: 315-22.

108. Ribeiro MM. Expressão gênica e metilação: causa ou consequência. *Agroforum*. 1997; 11: 9-14.
109. Chen T, Li E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;301:179-201.
110. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010; 363: 2424-2433.
111. Yan XJ, et al. Recurrent DNMT3A R882 Mutations in Chinese Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Nat. Genet*. 2011; 43: 309–315.
112. Yamashita Y, et al. *Oncogene*, Array-based genomic resequencing of human leukemia. 2010; 29, 3723–3731.
113. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011; 43(4): 309-315.
114. Thol F, Damm F, Ludeking A, et al. Incidence and Prognostic Influence of DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29:2889-2896.
115. Mrinal YS, Jonathan DL. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Nature genetics*. 2011; 43: 289-90.

5. ARTIGO EM INGLÊS

DNMT3A MUTATIONS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN SOUTH BRAZIL.

Annelise Pezzi^{1,2}, Lauro Moraes¹, Vanessa Valim^{1,2}, Bruna Amorin^{1,2}, Gabriela Melchiades¹, Fernanda Oliveira¹, Maria Aparecida da Silva^{1,2}, Maria S. Pombo-de-Oliveira³, Rosane Bittencourt⁴ and Lúcia Silla^{1,2,4}

¹Cellular Therapy Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Center for Experimental Research, Porto Alegre - Rio Grande do Sul – Brazil

²Post-graduation in Medicine: Medical Sciences – Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brazil

³ Pediatric Hematology-Oncology Program - Research Center, Instituto Nacional de Câncer-Rio de Janeiro - Brazil

⁴Hematology and Bone Marrow Transplantation of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre - Rio Grande do Sul - Brazil

Correspondence: Professor Lucia Silla, Md, Phd

Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoéticas

Centro de Pesquisa Experimental/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350

CEP: 90035-903- Porto Alegre/RS, Brasil

Telephone: (51) 33598317

E-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

Summary

Introduction: Acute Myeloid Leukemia (AML) is a complex and heterogeneous hematopoietic tissue neoplasm. Several molecular markers have been described for AML, helping to classify patients into risk groups. *DNMT3A* gene mutations have been recently identified in about 22.0 % of AML patients and associated with poor prognosis as independent risk factor. **Aims:** Determine the frequency of somatic mutations in the gene *DNMT3A* and major chromosomal translocations in a sample of patients with AML. **Methods:** We investigated in 82 samples of bone marrow of patients with AML treated at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, for somatic mutations in *DNMT3A* gene by sequencing and major fusion transcripts by RT-PCR. **Results:** The frequency of mutations in the *DNMT3A* gene was 8%(6) 3 being type R882H. The relative frequency of fusion transcripts AML1/ETO, PML/RAR α , MLL/AF9, and CBF β /MYH11, respectively were: 6,1%(5), 14,6% (12), 0%(0) and 2,4%(2). **Conclusion:** The discovery of recurrent mutations in the *DNMT3A* gene and its possible prognostic implications can be a valuable tool for making treatment decisions. This is the first study on the presence of somatic mutations of the *DNMT3A* gene in patients with AML in Brazil. The found frequency of these mutations suggests a possible ethnogeographic variation.

Keywords:

AML, DNMT3A, RT-PCR, sequencing, fusion transcripts, risk groups.

Introduction

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a complex and heterogeneous hematopoietic tissue neoplasm caused by gene mutations, chromosomal rearrangements, deregulation of gene expression and epigenetic modifications. These changes lead to unregulated proliferation and loss of differentiation capacity of myeloid hematopoietic cells. In recent years, several important prognostic molecular markers have been described for AML which not only improved disease characterization, but also allowed stratification of patients into risk groups, guiding therapeutic decision-making (Frohling *et al*, 2005). However, these molecular markers are often unable to provide accurate prognostic and therapeutic information, since the course of the disease varies significantly between patients belonging to the same risk category (Brunner, 2003; Szczepanski *et al*, 2003; Peter *et al*, 2011).

The traditional view of cancer as a disease caused by some genetic mutation has been replaced by a context of a complex network of gene deregulation and epigenetic changes. Additionally, although extremely important, the already described mutations are found in a minority of patients with AML (Plass *et al*, 2008; Galm *et al*, 2005; Boulwood *et al*, 2007). The distinct components of epigenetic machinery as DNA methylation, covalent modifications of histones and non-coding RNAs, have been described as co-controllers of gene expression and within a context of cancer may contribute to leukemogenesis (Jones & Baylin, 2007). Methyltransferases such as DNMT1, DNMT3A and DNMT3B are key components of the epigenetic regulation of genes as they catalyze the addition of methyl groups to the cytosine residue of CpG dinucleotides.

Recently, in a study using whole genome sequencing, recurrent somatic mutations have been described in the DNA methyltransferase 3A gene (*DNMT3A*) in 22% of patients with AML (Ley *et al*, 2010). In this study, *DNMT3A* mutations were independently associated with a poor prognosis and more frequent in patients with normal cytogenetics and as such, of utmost clinical relevance. Eighteen different mutations were found, most of them *missense* mutations. Preliminary data showed that the incidence of these mutations in AML ranged from 4.1% in a Japanese study (Yamashita *et al*, 2010), 9% in a study with Chinese patients (Yan *et al*, 2011) and about 20% in two Western studies (Ley *et al*, 2010; Thol *et al*, 2011). These possible ethno-geographic differences in the incidence of *DNMT3A* mutations as well as its prognostic role need, however, to be better characterized. The exact mechanisms of *DNMT3A* mutations' effects are still unclear, since the global pattern of methylation in the genome of such patients with AML does not appear to be significantly changed (Ley *et al*, 2010).

The aim of this study is to characterize the frequency and clinical impact of mutations in the *DNT3A* gene, correlating it with clinical data and already well defined translocations in AML in a group of patients treated at the Hospital das Clinicas, in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Materials and Methods

Patients

We have studied 87 samples of bone marrow from patients with AML, at diagnosis and prior to any chemotherapy, cryopreserved at the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells belonging to the Center for

Experimental Research at the Hospital de Clinicas of Porto Alegre (CPE-HCPA) since 2001 to the present date. The patients' clinical information were obtained from the AML database of the Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation of HCPA. Patients were stratified into risk groups - favorable, intermediate and high, according to the WHO (Swerdlow *et al*, 2008).

Extraction of DNA and RNA

Samples of cryopreserved bone marrow were thawed, washed with PBS1x with 5% albumin and then had their DNA and RNA extracted with *Trizol Reagent*® (*Invitrogen*), according to the manufacturer's recommendations.

Identification of Fusion Transcripts

After RNA extraction we proceeded to reverse transcription using the *SuperScript III* kit (*Invitrogen*). The effectiveness of RNA extraction and of cDNA synthesis was monitored by the amplification of the constitutive gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and negative samples were discarded.

The sequences of interest were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) according to BIOMED-1 (Van Dongen *et al*, 1999), using the primer sequences described below for each fusion transcript (Table I). PCR products were visualized by electrophoresis on 1.5% agarose gel and bands were considered positive in the following sizes: *AML-A/ETO-B*: 395bp, *PML-A1/RAR α -B*: 381bp, *PML-A2/RAR α -B*: 376bp, *CBF β -A/MYH11-B2*: 418 and *MLL6S/AF9A53*: 651bp (Van Dongen *et al*, 1999; Mitterbauer *et al*, 1999).

Identification of Mutations in DNMT3A gene

The extracted DNA was amplified by PCR at the exons 19, 20, 21, 22 and 23, with primers described by Thol *et al* (2011), as shown in Table I. After electrophoresis on 1.5 agarose gel, PCR products were subjected to purification using *Exonuclease I* and *Shrimp Alkaline Phosphatase* (EXO-SAP, GEHealthcare) and, then sequenced.

Sequencing

Samples were sequenced at the Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) using ABI 3500 Genetic Analyzer with 50 cm capillaries and POP7 polymer (Applied Biosystems). PCR products were labeled with 3.2 pmol of the *foward primer* and 1 μ L of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a final volume of 10 μ L. Labeled samples were purified using BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) and electroinjected in the automatic sequencer. Electropherograms were compared to the reference sequence (NM_022552). Altered sequencing results were confirmed by reverse strand sequencing.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSSTM V18. Overall Survival and Disease-Free Survival curves were calculated using the *Kaplan Meier* survival function and comparison by the *Long Rank* test. For categorical data *Fisher's* exact test was used. P-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Characterization of the sample

Of the 87 AML samples taken from the cell bank of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cell, 82 could be analyzed. Of the studied patient population, 58.5% (48) were male with a median age of 42 years. According to the FAB classification, 6.8%(5) were AML M0, 21.9%(16) AML M1, 30.1%(22) AML M2, 19.2%(14) AML M3, 17.8%(13) AML M4, 1.4%(1) AML M5 and 2.7%(2) were classified as AML and not M3. The median white blood cells (WBC) count at diagnosis was $6.6 \times 10^9/L$ ranging from 0.16 to $374.50 \times 10^9/L$. There were 23 (41.8%) cases with karyotype alterations. As for risk stratification, 18 (29%) patients were allocated in the favorable group, 38 (61.3%) in the intermediate group and 6 (9.7%) belonged to the unfavorable risk group (Table II).

As shown in Table II, we were able to stratify into risk categories only 62 patients since for 20 of them we didn't have enough information. Eighteen (29.0%) were in the favorable, 38 (61.3%) in the intermediate, and 6 (9.7%) in the unfavorable risk group. Except for the group of patients with AML M3 who were treated according to the APL protocol (Jácomo *et al*, 2007), all other patients received remission induction and consolidation using the protocol 7+3, and intensification with high doses of AraC. Of these, 8 were subsequently submitted to autologous and 22 to allogeneic bone marrow transplantation (BMT). Of the entire group, 14 (19.2%) were refractory to treatment. Of these, 1 (7.1%) belonged to the favorable, 8 (57.1%) to the intermediate, 2 (14.2%) to the unfavorable, and 3 (21.4%) belonged to the unclassified group. The overall survival (OS) of the 62 categorized patients, with a follow up of 120 months, was 54.9%, 39.0%, and 16.7% for favorable, intermediate and unfavorable risk category, respectively ($p=0.15$) (Fig 1). The OS and disease-free survival (DFS) of the entire group of patients, with a follow-up of 120 months, was 41.7% and 23.4%, respectively (Fig 2).

Fusion transcripts

Nineteen patients (23.1%) had fusion transcripts identified by RT-PCR. Five (6.1%) presented the *AML1/ETO*, 12 (14.6%) *PML/RAR α* , and 2 (2.4%) the *CBF β /MYH11* fusion genes. The presence of *MLL/AF9* t(9;11) was not found in our series of AML patients. The transcript *PML/RAR α* was identified in 78.5% (11) of the cases classified as APL. Of the 12 *PML/RAR α* positive patients only 4 had a compatible karyotype, positive for t(15;17), the remaining had either normal (3) or no karyotype (5).

When comparing the overall survival for positive and negative *PML/RAR α* patients, with a follow-up of 120 months, we observed that the OS was 72.7% for positive and 37.6% for the negative (p=0.19) (Fig1). A tendency for prognostic value was also shown for the presence of *AML1/ETO* with an OS of 22.7% and 60.2% for positive and negative, respectively (p=0.19). Finally, one of the inv16 patients died during remission induction and the other is still alive in continuous complete remission.

DNMT3A

Somatic mutations were found in 8% (6) of the samples, being 5 *missense* mutations and one *silent* mutation, including the p.R882H mutation described by Ley *et al* (2011) that was identified in 3 patients. All variant sequences were heterozygous and no patient had more than one mutation. The new mutations found were: p.R973Q, p.D748N and p.H896 (Fig4). The mutations location domains are shown in figure 3. Of the 6 cases with *DNMT3A* mutations, the majority (5, or 83.3%) were located in exon 23. Four (80.0%) patients with mutations belonged to the intermediate risk group with normal karyotype, 1 to the favorable group and 1 unclassified. Of the patients with *DNMT3A* mutation, only 1 was positive for the fusion transcript *PML/RAR α* and died

of coagulopathy during induction; the patient with trisomy 4 and 8 is alive in continuous remission (Table III).

The characteristics of patients with or without *DNMT3A* gene mutation are represented in table IV. Although the sample size does not allow a comparative analysis of survival, with a follow-up of 120 months, OS for patients with wild *DNMT3A* gene was 41.4% and for patients with mutated *DNMT3A* was 44.4%(p=0.59); the SLD was 22.7% and 0%, respectively (p=0.32).

Discussion

Of the 82 patients studied, we were able to classify 73 according to the FAB classification, and the frequency of FAB subtypes M0, M1 and M2 was similar to that reported in the literature except for subtypes M4, M5, M6 and M7 whose frequency was lower (Table II). The M3 subtype was more frequent (19.2%) in our group when compared with international studies, but confirms the results reported by Capra *et al* (2007) in a study in Rio Grande do Sul, Brazil, and is similar to that reported by others for the Latin American population (Phekoo *et al*, 2006; Douer *et al*, 1996). Regarding the classification of risk found in our sample of 29.0%, 61.3% and 9.7% for the favorable, intermediate and unfavorable risk categories, respectively, in spite of having a significant number of cases not classified, in general, it agrees with the distribution described in the literature, and is virtually identical to reported in patients in the same region of the country (Capra *et al*, 2007).

The frequency of fusion transcripts, particularly the *AML1/ETO* found in 6.1% of our sample was similar to that described in the literature (6 a 12%) (Schoch *et al*, 1996; Chauffaille *et al*, 2004), while the relative frequency of *PML/RAR α* (14.6%) was

higher (5-8%) (Arber *et al*, 2008), probably reflecting the highest incidence of AML M3 in our population. For the transcript *CBF β /MYH11* we had a relative frequency of 2.4%, slightly lower than the reported 5-8% (Schoch *et al*, 2002), and none positive for the transcript *MLL/AF9*, which correlates with the literature, that indicates an approximate frequency of 1% (Mitterbauer *et al*, 1999). However, in general, the finding of rearrangements in 22% of our patients is consistent with the frequency of 20% found in 1065 patients in the UK (Grimwade *et al*, 2001). Finally, the analysis of chromosomal translocations by RT-PCR proved to be advantageous in our center since of the 19 patients with fusion transcripts, only 7 were detected by karyotype analysis, explaining the frequency of only 41.8% of karyotype abnormalities found in our group of patients, less than the 65% reported by Look *et al*, 1997.

The search for recurrent somatic mutations in the gene DNA methyltransferase 3A (*DNMT3A*) was performed in all our 82 patients. We chose to sequence the last five exons of the gene *DNMT3A* since, as demonstrated by Ley *et al*, 2010, approximately 80% of the mutations were located in these exons, with 58% of them in the last one (exon 23), where, in fact, most mutations in our study were found (Fig 3). The frequency of somatic *DNMT3A* mutations found in 8% of our 82 cases is less than the 22% reported in 281 patients by Ley *et al*, 2010 and from the 17.8% found by Thol *et al*, 2011 also in Western patients, including about 500 patients. Interestingly, although the first study has sequenced the entire gene, in the latter only the last nine exons were studied. The lowest frequency of mutations in our sample appears similar to that reported for patients of other ethnic groups. In a Japanese study (Yamashita *et al*, 2010), including 74 patients and sequencing the entire gene, the frequency of mutations was found to be only 4.1%, all located in exon 23, while in a Chinese study (Yan *et al*,

2011) including 355 patients, and also sequencing the entire gene, the frequency of mutations, predominately affecting exon 23, was approximately 9%.

As for the sequences of *DNMT3A* gene variants, in accordance with a study of Stegelmann *et al*, 2011, all our cases were heterozygous and no patient had more than one mutation; in addition, 3 of 6 mutations were p.R882H, already described by Ley *et al*, 2010, who found a frequency of 59% of such mutation.

Five, or 80%, of our patients harboring a *DNMT3A* mutation belonged to the intermediate risk category, as was reported by others (Ley *et al*, 2010). We also found a tendency ($p=0.28$) to an increased leukocyte number at diagnosis for patients with mutation ($20.67 \times 10^9/L$) comparing to the ones without mutation ($6.41 \times 10^9/L$) which is in agreement with those reported in numerous studies (Ley *et al*, 2010; Yan *et al*, 2011; Yamashita *et al*, 2010; Thol *et al*, 2011a,b; Lin *et al*, 2011). Interestingly, and worth mentioning, in our group of patients there was one case of *DNMT3A* mutation that also harbored *PML/RAR α* .

Finally, the OS according to risk category in our group of 62 patients showed a prognostic trend to that reported in the literature (Fig 1). A prognostic evaluation for *DNMT3A* somatic mutations or its concurrency with fusion transcripts could not be determined in our study, due to our sample size. There was, however, a tendency for better prognosis for patients with *PML/RAR α* rearrangement (Fig 1).

In conclusion, to our knowledge, this is the first study on the presence of somatic mutations of the gene *DNMT3A* in patients with AML in Brazil. Although in a small number of patients, the found frequency of these mutations, lower than the reported for Western patients, could indicate an ethno-geographical variation already suggested in

the literature for Eastern and Caucasian patients. The discovery of recurrent mutations in the gene *DNMT3A* and its possible prognostic implications can provide valuable information for risk stratification for patients with AML, and represents, if its prognostic value is confirmed, a valuable tool for making therapeutic decisions.

Acknowledgements

The study received financial support from the Research and Event Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), has been supported by CNPq research scholarships #309091/2007-10.

References

- Arber DA, et al. Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edition. Lyon: IARC Press; p. 110–23, 2008.
- Boultonwood J, Wainscoat JS. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2007;138(1):3–11.
- Brunning, RD. Classification of acute leukemias. *Semin Diagn Pathol.* 2003; 20: 142-53.
- Capra M, Vilella L, Pereira W, et al. Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia between 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. *Leukemia and Lymphoma.* 2007; 48(12): 2381–2386.
- Chauffaille MF, Borri D, Martins SR. Leucemia mielóide aguda t(8;21): frequência em pacientes brasileiros. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2004;26(2):99-103.
- Douer D, Preston-Martin S, Chang E, Nichols PW, Watkins KJ, Levine AM. High frequency of acute promyelocytic leukemia among latinos with acute myeloid leukemia. *Blood.* 1996; 87:308 – 313.
- Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, et al. Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2005; 23:6285-6295.

- Galm O, et al. Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia. *Hematol.* 2005; 84:39–46.
- Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia: analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML 11 trial. *Blood* 2001;98:1312 – 1320.
- Jácomo RH, Melo RA, Souto FR, et al. Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines. *Haematologica.* 2007;92(10):1431-2.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128(4):683–92.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363: 2424–2433.
- Lin J, Yao Dm, Qian J, et al. Recurrent DNMT3A R882 Mutations in Chinese Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. 2011:10-1371.
- Look T. Oncogenic transcript factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278: 1059-64.
- Mitterbauer G, et al. Monitoring of minimal residual leukaemia in patients with MLL-AF9 positive acute myeloid leukemia by RT-PCR. *Leukemia.* 1999; 13: 1519-1524.
- Peter T and Andrew H. The epigenomics revolution in myelodysplasia: a clinic-pathological perspective. *Hematopatology.* 2011; 43: 536–546.

Plass C, et al. Epigenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 2008; 35(4):378–87.

Phekoo KJ, Richards MA, Moller H, Schey SA. The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2112 adult patients in South East-England. *Haematologica/Haematol J*. 2006; 91:1400–1404.

Schoch C, Haase D, Haferlach T, et al. Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor. *Leukemia*. 1996; 10(8):1.288-95.

Schoch C, Haferlach T. Cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep*. 2002; 4: 390-7.

Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, et al. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011;25: 1217-1219.

Szczepanski T, van Velden, VHJ, van Dongen JJM. Classification systems for acute and chronic leukemias. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16: 561-82.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008.

Thol F, Damm F, Lüdeking A, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29:2889-96.

Tho, F, Damm F, Ludeking A, et al. Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 29. 2011: 10-1200.

Thol F, Winschel C, Lüdeking A, et al. Rare occurrence of DNMT3A mutations in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2011; 96:112.

Van Dongen, J.J.M., et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999; 13: 1901–1928.

Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, et al. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. 2010;29(25):3723-3731.

Yan XJ, Xu J, Gu ZH, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(4):309-315.

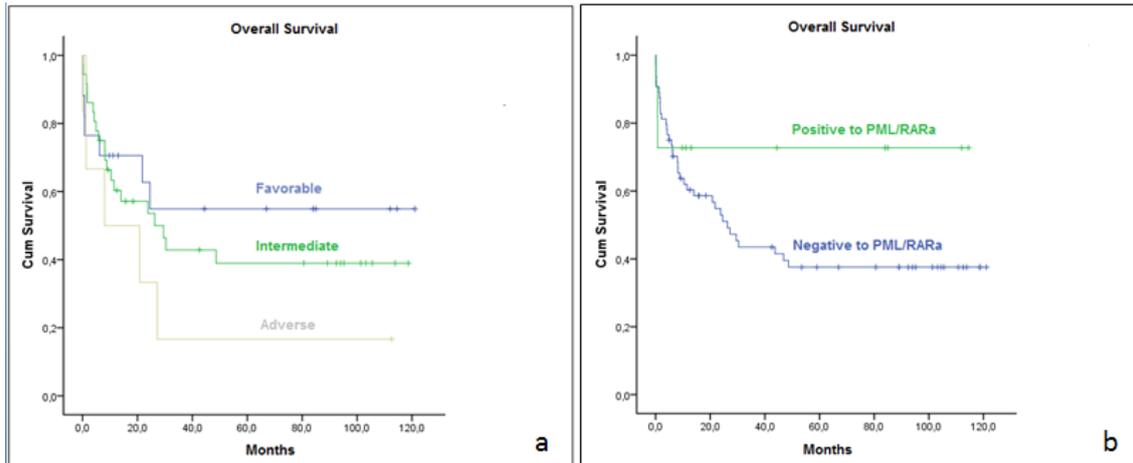


Fig 1: a) Comparison of the estimated overall survival according to the risk category with a follow-up of 120 months: favorable (54.9%), intermediate (39%) and unfavorable (16.7%). ($p=0.15$); b) Comparison of OS among positive and negative patients for PML/RAR α ($p=0.19$)

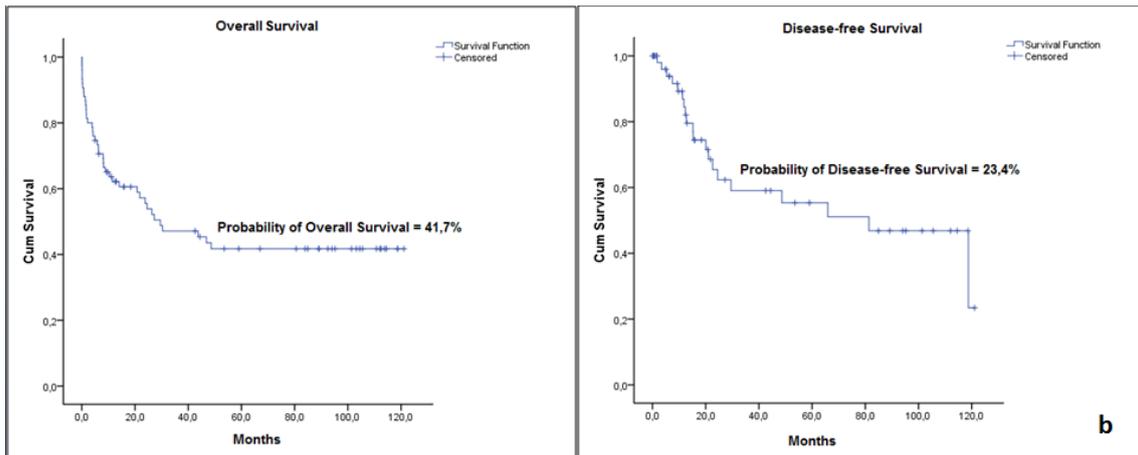


Fig 2: Overall survival and Disease-free survival. a) Overall survival in a follow-up of 120 months, with estimated probability of overall survival of 41.7%; b) Disease-free survival in a follow-up of 120 months, with an estimated probability of disease-free survival of 23.4%.

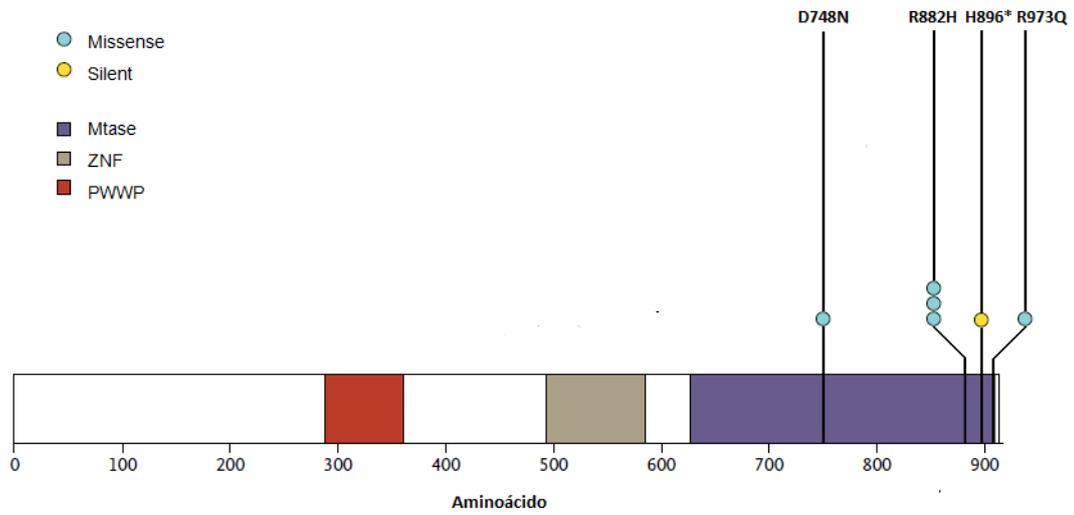


Fig 3: Representation of the DNMT3A gene and its domains: *methyltransferase* (MTase), *zinc-finger* (ZNF) and *conserved proline-tryptophan-tryptophan-proline* (PWWP). Location and classification of gene mutations found in gene DNMT3A.

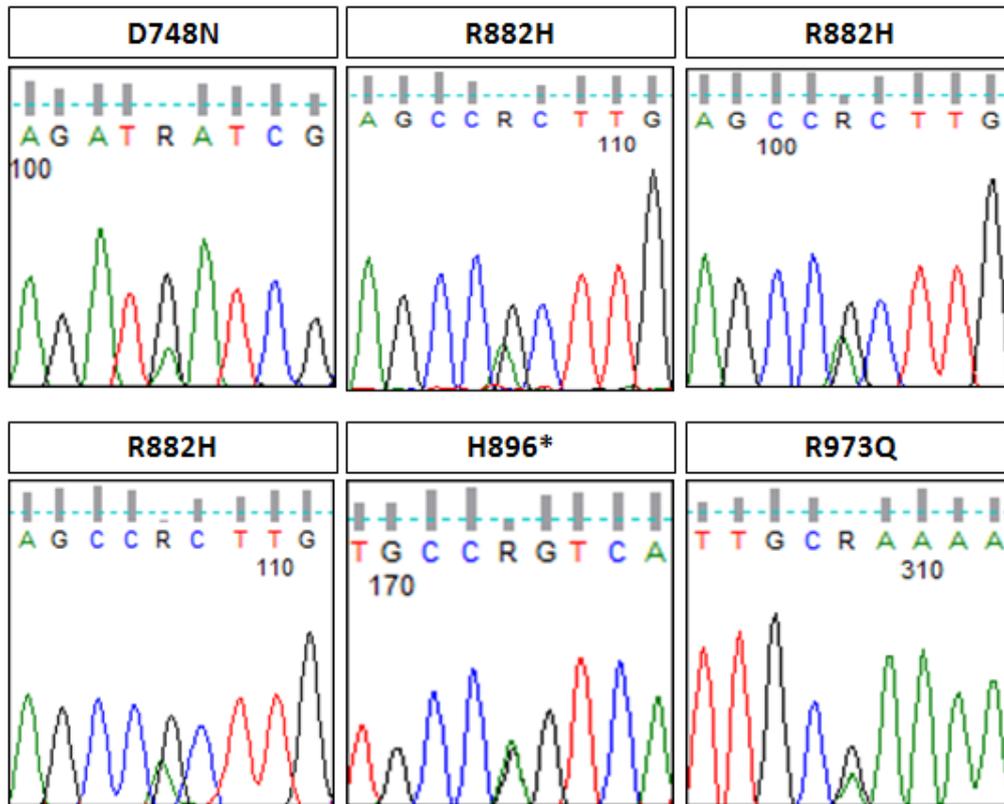


Fig 4: Sequencing in which mutations in gene DNMT3A were found. a, b, c, d and f: G>A; e: A>G.

Table I: Primer sequences for genes of interest.

Chromosomal translocation	Fusion transcript	Sequence (5'-3')
t(8;21)	AML1-A	CTACCGCAGCCATGAAGAACC
	ETO-B	AGAGGAAGGCCCATTTGCTGAA
t(15;17)	PML-A1	CAGTGTACGCCTTCTCCATCA
	PML-A2	CTGCTGGAGGCTGTGGAC
	RAR α -B	GCTTGTAGATGCGGGGTAGA
inv16	CBF β -A	GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG
	MYH11-B2	TCCTCTTCTCCTCATTCTGCTC
t(9;11)	MLL6S	GCAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCCG
	AF9AS3	TCACGATCTGCTGCAGAATGTGTCT
Gene	Exon	Sequence (5'-3')
<i>DNMT3A</i>	Exon 19	CACCACTGTCCTATGCAGACA
		ATTAGTGAGCTGGCCAAACC
<i>DNMT3A</i>	Exon 20	CCTTGGCTCATCTTCAAACC
		CACTATGGGTCATCCCACCT
<i>DNMT3A</i>	Exon 21	CCGCTGTTATCCAGGTTTCT
		CCCAGCAGAGGTTCTAGACG
<i>DNMT3A</i>	Exon 22	TTTGGTAGACGCATGACCAG
		AGCACAGCAATCAGAACAGC
<i>DNMT3A</i>	Exon 23	TCCTGCTGTGTGGTTAGACG
		ATGATGTCCAACCCTTTTCG

Table II- Characteristics of the entire patient population.

Variable	Result
Age – n =82	
Median (SD)	42(18.5)
Mean(SD)	40.6(18.5)
Range	3-75
Sex – n =82	
Male	48%(58.5)
Female	34%(41.5)
FAB Classification - n =73	
M0	5%(6.8)
M1	16%(21.9)
M2	22%(30.1)
M3	14%(19.2)
M4	13%(17.8)
M5	1%(1.4)
M6	0%(0)
M7	0%(0)
AML not M3	2%(2.4)
Karyotype – n =55	
Normal	58.2%(32)
With alteration	41.8%(23)
Risk classification – n= 62	
Favorable	29%(18)
Intermediate	61.3%(38)
Unfavorable	9.7%(6)
Leukocytes (x10 ⁹ /L) n=82	
Median(SD)	6.6(51.9)

Table III: Description of somatic mutations found in gene DNMT3A

Patient Identification	Mutation	Allelic Change	Exon	Type of Mutation	FAB Subtype	PCR	Risk Group	Karyotype
39	D748N	G>A	19	<i>Missense</i>	M1	Negative	Intermediate	Normal
79	R882H	G>A	23	<i>Missense</i>	M1	Negative	Intermediate	Trisomy(8)(9)
4	R882H	G>A	23	<i>Missense</i>	M3	Negative	Intermediate	Normal
70	R882H	G>A	23	<i>Missense</i>	M2	Negative	Intermediate	Normal
41	H896*	A>G	23	<i>Silent</i>	M3	PML/RAR α	Favorable	t(15;17)
78	R973Q	G>A	23	<i>Missense</i>	-	Negative	-	-

Table IV: Comparison between the characteristics from patients with or without DNMT3A mutated and not mutated.

Characteristics	DNMT3A mutated	DNMT3A not mutated	P
Age			
Mean	40.2	44.8	0.56
Sex			
Male	50%(3)	59.3%(45)	0.68
Female	50%(3)	40.7%(31)	
Subtype FAB			
M0	0%	7.2%(5)	0.56
M1	60%(3)	18.8%(13)	
M2	20%(1)	30.4%(21)	
M3	20%(1)	20.3%(14)	
M4	0%	18.8%(13)	
M5	0%	1.4%(1)	
LMA not M3	0%	2.9%(2)	
Risk Groups			
Favorable	20%(1)	29.8%(17)	1.000
Intermediate	80%(4)	59.6%(34)	
Unfavorable	0%	10.5%(6)	
Leukocytes (x10 ³)	20.67	6.41	0.28
Death	50%(3)	51.4%(37)	1.000
Refractory	20%(1)	19.1%(13)	0.96
Relapses	50%(2)	30.9%(17)	0.58

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A visão tradicional do câncer como uma doença causada por algumas mutações, genéticas está em constante modificação e cada vez mais, posta em um contexto de redes complexas de desregulação gênica e mudanças epigenéticas. Como sabido, apesar de extremamente importantes, translocações comuns e mutações clássicas são encontradas em uma minoria de pacientes com LMA e a classificação de risco baseada nestas alterações, é muitas vezes incapazes de oferecer prognósticos e informações terapêuticas precisas, de forma que o curso da doença varia significativamente entre pacientes pertencentes ao mesmo grupo de classificação. A identificação de alterações adicionais, sobretudo, epigenéticas de impacto prognóstico seria de extrema relevância para a estratificação de risco e manejo terapêutico dos portadores de LMA.

Na verdade, o seqüenciamento do genoma está abrindo uma nova e complicada fase na compreensão dos mecanismos genéticos na LMA. A descoberta de mutações recorrentes no gene DNA Metiltransferase 3A, veio reafirmar a importância da investigação da patogênese da LMA em um contexto epigenético, pois, aparentemente, estas mutações tem valor prognóstico. Ainda em fase de caracterização (frequência, tipo de mutação, associação com outras alterações cromossômicas ou gênicas, etc) estas mutações parecem implicar em uma regulação epigenética aberrante sem que, no entanto, o link exato, ou seja, a expressão alterada do gene ou a instabilidade do genoma, tenha sido elucidado.

Em suma, nossos achados sobre os primeiros relatos desta mutação em pacientes brasileiros cuja frequência parece semelhante a relatada em pacientes orientais e significativamente inferior a encontrada na população caucasiana, contribuem de

alguma forma para a caracterização desta importante e recentemente descrita alteração. Estudos futuros são necessários a fim de confirmar o seu valor prognóstico e, assim, discriminar melhor as faixas de risco de portadores de LMA, ou até mesmo, permitir o desenvolvimento de novas moléculas para terapia específica/alvo.