



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Hematologia

### **Factores de Prognóstico na Leucemia Mielóide Aguda: o que há de novo**

Suse Isabel Cardoso da Conceição

---

**Julho'2018**



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Hematologia

### **Factores de Prognóstico na Leucemia Mielóide Aguda: o que há de novo**

Suse Isabel Cardoso da Conceição

**Orientado por:**

Dra. Graça Luzia de Oliveira Pereira Neto Vasconcelos Esteves

---

**Julho'2018**

## Resumo

Desde há algum tempo que as alterações citogenéticas se tornaram marcadores diagnósticos e prognósticos bem estabelecidos. Nos tempos mais recentes, com os avanços nos testes de sequenciamento, houve um aumento do conhecimento da heterogeneidade molecular da leucemia mielóide aguda (LMA). O que se traduziu numa melhor classificação da doença, na estratificação do seu prognóstico e nos cuidados clínicos individualizados para cada doente. Desta forma, várias alterações citogenéticas e moleculares foram incluídas na actualização da classificação da LMA da OMS, em 2016, e no relatório European Leukemia Net (ELN), em 2017.

A LMA é caracterizada por múltiplas mutações somaticamente adquiridas que afetam genes de diferentes categorias funcionais, tendo uma arquitetura clonal complexa. Existem várias mutações recorrentes que são sistematicamente associadas a LMA, assim como genes que apenas mais recentemente têm sido implicados na leucemogénese. Com as constantes descobertas que se têm verificado, as implicações dos critérios de risco pré-tratamento como factores prognósticos estão constantemente sob avaliação.

Assim, continuam a ser realizados estudos com o objectivo de se compreender melhor alguns mecanismos de acção e, também de modo a que se descubram outras alterações que possam afectar o prognóstico. Nesta revisão, fez-se um compêndio do que há de novo em relação aos factores de prognóstico da LMA, com maior incidência ao nível das alterações genéticas uma vez que estas são, actualmente, o factor de prognóstico independente mais importante.

Palavras-chave: Leucemia mielóide aguda, prognóstico, mutações, genes.

## **Abstract**

For some time cytogenetic changes have become well established diagnostic and prognosis markers. In recent times, with advances in sequencing tests, there has been an increase in the knowledge of the molecular heterogeneity of acute myeloid leukemia (AML). Which resulted in better classification of the disease, stratification of its prognosis and individualized clinical care for each patient. Thus, several cytogenetic and molecular changes were included in the update of the WHO AML classification in 2016 and in the European Leukemia Net report (ELN) in 2017.

AML is characterized by multiple somatically acquired mutations that affect genes of different functional categories, having a complex clonal architecture. There are several recurrent mutations that are systematically associated with AML, as well as genes that have only recently been implicated in leukemogenesis. With the constant discoveries that have taken place, the implications of the pre-treatment risk criteria as prognostic factors are constantly under evaluation.

Thus, studies are still carried out in order to better understand some mechanisms of action and also in order to discover other changes that may affect the prognosis. In this review, a summary was made of what is new in relation to the prognostic factors of AML, with a greater incidence in the genetic alterations because these are currently the most important independent prognostic factor.

Keywords: Acute myeloid leukemia, prognosis, mutations, genes.

# Índice

Índice .....	4
Introdução .....	5
Factores de Prognóstico .....	6
• Idade .....	7
• Doença residual mínima (MRD) .....	7
• Células-tronco embrionárias .....	8
• FLT3 .....	9
• Mutação dupla DNMT3A e FLT3-ITD .....	10
• BCRP e MDR-1 .....	11
• NPM1 .....	12
• Mutações CEBPA bialélicas .....	13
• IDH2R172 .....	14
• Complexo spliceossoma-cromatina .....	14
• MicroRNAs .....	14
• MN1 .....	15
• OLIG2 .....	16
• Ring 1A e Ring 1B .....	16
• RUNX1 .....	17
• SATB2 .....	18
• Trissomia cromossoma 8 .....	19
• SHB .....	19
• Gene TET2 .....	20
• TP53 .....	20
Conclusão .....	22
Agradecimentos .....	23
Referências Bibliográficas .....	24

## Introdução

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação clonal de mieloblastos que se acumulam na medula óssea e na circulação sanguínea periférica (1). É a leucemia aguda mais comum em adultos e é uniformemente fatal sem tratamento (2), sendo responsável por aproximadamente 42% de todas as mortes leucémicas (3).

Apesar de uma melhor compreensão das alterações genéticas que contribuem para a LMA (4), a taxa global de sobrevida aos cinco anos permanece baixa em doentes com menos de 60 anos (30-40%) e ainda menor em pacientes acima de 60 anos (menos de 20%) (5). O desfecho é pior em pacientes mais velhos que não conseguem receber quimioterapia intensiva devido aos efeitos colaterais, com uma sobrevivência média de 5 a 10 meses (6).

Com o sequenciamento do genoma completo, a LMA surge como uma doença complexa e dinâmica (7). A LMA, marcada por proliferação e diferenciação anormais de células-tronco mieloides leucémicas, é uma doença heterogênea a nível molecular, biológico e clínica. Havendo também genes que controlam a epigenética celular e todo o conjunto coopera para promover o clone leucémico (7,8).

A LMA está associada a mutações recorrentes, incluindo genes como NPM1, FLT3, CEBPA, DNMT3A, IDH1 e IDH2, bem como genes mais recentemente implicados na leucemogênese, incluindo EZH2, U2AF1, SMC1A e SMC3. As mutações genéticas podem ser classificadas em várias categorias funcionais distintas (6). Mutações em genes que codificam modificadores epigenéticos (regulação de modificações de DNA), como DNMT3A, ASXL1, TET2, IDH1 e IDH2, são comumente adquiridas precocemente e estão presentes em células-tronco hematopoiéticas pré-leucémicas (6). Estas têm a capacidade de se diferenciar nas múltiplas linhagens, sobreviver à quimioterapia e podem-se expandir durante a remissão, levando, eventualmente, à recidiva. Em contraste, mutações envolvendo NPM1 ou moléculas de sinalização (por exemplo, FLT3, RAS) são tipicamente eventos secundários que ocorrem mais tarde durante a leucemogênese (8).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu um sistema de classificação da LMA que, devido aos vários avanços feitos nesta área, sofreu uma revisão em 2016, com alterações na seção de LMA com alterações genéticas recorrentes. Além desta actualização, também o European Leukemia Net (ELN), em 2017, reviu todo o

manuseamento da LMA, desde o diagnóstico, critérios de resposta até ao tratamento. As alterações genéticas e moleculares recentemente descobertas entraram na estratificação do risco e do prognóstico da LMA (9). Essa atualização foi simplificada num sistema de classificação de três grupos (favorável, intermédio e adverso), com base no facto de que em pacientes mais velhos (a maioria dos casos de LMA) a diferença no resultado do valor prognóstico não foi estatisticamente significativa para as categorias intermédio-I e intermédio-II. Estas actualizações acontecem porque foram estudadas, e continuam a ser, alterações genéticas que influenciam o prognóstico da LMA.

## **Factores de Prognóstico**

Os factores de prognóstico podem ser subdivididos em factores relacionados com o paciente e factores relacionados com a doença. Os factores relacionados com o paciente (por exemplo, aumento da idade, comorbilidades e performance status baixo) comumente predizem morte precoce associada ao tratamento, enquanto factores relacionados com a doença (por exemplo, contagem de leucócitos, síndrome mielodisplásica prévia ou terapia citotóxica para outra doença e alterações genéticas de células leucémicas) predizem resistência à terapêutica-padrão atual. Como houve melhorias significativas nos cuidados de suporte, o risco de morte associada ao tratamento é consideravelmente menor do que o risco se a doença for resistente ao tratamento (6).

A alteração cromossómica é, no momento do diagnóstico, o fator prognóstico mais importante, prevendo a remissão, a recidiva e a sobrevivência global. É com base nos achados citogenéticos que os pacientes são divididos em vários grupos de risco (4,5,10). Contudo, a estratificação pode ser insuficiente, uma vez que mais de metade dos pacientes são colocados no grupo de prognóstico intermédio, sendo que 40-50% destes têm um cariótipo normal (NK) (11). Deste modo, têm-se pesquisado outras alterações genéticas e moleculares de forma a tentar determinar da melhor maneira possível o prognóstico destes pacientes (12). Os resultados sugerem que a presença de certas mutações genéticas - FLT3-ITD, NPM1, CEBPA e RUNX1 - constituem factores prognósticos, tendo sido reconhecidos na revisão da classificação da LMA pela OMS, em 2016 (13). No entanto, os grupos genéticos já estudados são observados apenas em cerca de 30% dos pacientes no grupo intermédio, indicando a necessidade de identificar novos factores prognósticos (14).

Na actualização da ELN, as mutações RUNX1, ASXL1 e TP53 foram adicionadas ao grupo de risco adverso, devido à sua associação independente com pior desfecho. Por outro lado, outros marcadores, como por exemplo mutações de DNMT3A, IDH1, IDH2 ou genes no grupo cromatina/spliceossoma (exceto ASXL1 e RUNX1), as evidências não foram consideradas altas o suficiente para atribuí-las a um grupo de prognóstico do ELN (9). Também a avaliação da doença residual mínima (MRD) foi considerada importante, sendo que, nesta actualização, foi proposta uma nova categoria de resposta – Remissão completa sem MRD (CRM RD-) (9,15).

De seguida, será apresentado o que há de novo em relação às alterações cromossómicas, genéticas e epigenéticas que ocorrem na LMA e como afectam o seu prognóstico.

- **Idade**

A idade faz parte dos factores de prognóstico da LMA, sendo que uma idade mais alta está associada a pior prognóstico. Sabe-se que pacientes com idade igual ou superior a 60 anos têm piores resultados, com uma sobrevivência mediana de aproximadamente 1 ano (16,17). Num estudo realizado em doentes com LMA submetidos a quimioterapia de indução, observaram-se resultados diferentes consoante a idade: pacientes com idade > 60 anos apresentaram uma média de 8,7 meses de sobrevivência, enquanto pacientes com idade <60 anos tinham uma média 23,1 meses (18,19).

As alterações genómicas subjacentes à LMA em idosos têm sido menos bem caracterizadas. Com base num estudo abrangente de sequenciamento, o espectro mutacional difere entre pacientes mais jovens e mais idosos (4). Com o aumento da idade observaram-se maior número de mutações em grupos genómicos mais desfavoráveis (por exemplo, mutações no gene TP53, aneuploidia cromossómica ou ambos) e menos pacientes com mutações associadas a melhor prognóstico (por exemplo, CEBPA com mutação bialélica) (15).

- **Doença residual mínima (MRD)**

O tratamento da LMA assenta na terapêutica de indução com o objetivo de alcançar a remissão morfológica completa (RC), evidenciada por menos de 5% de blastos. Após a remissão, pode ser feita quimioterapia de consolidação ou transplante alogénico de células hematopoiéticas (alo-HCT).

Após terapêutica de indução, a negatividade de doença residual mínima (MRD) está associada a um risco reduzido de recidiva na LMA depois do alo-HCT (20). Além disso, o status de MRD, no momento do transplante, é indiscutivelmente o determinante prognóstico mais importante do risco de recidiva, sendo superior a um conjunto de outros factores prognósticos. No entanto, cerca de 30% dos pacientes que são submetidos a alo-HCT num estado MRD negativo recidivam, o que está a favor da presença de outros factores prognósticos adicionais (1).

Neste estudo, demonstrou-se que, entre os pacientes com MRD negativos submetidos a transplante, aqueles com antecedentes de consolidação têm menor risco de recidiva e maior sobrevida livre de recidiva (1). Contudo, o presente estudo apresenta algumas limitações, sendo uma o facto de não se conseguir determinar se a consolidação converteu pacientes MRD-positivos num estado MRD-negativo ou induziu uma remissão mais profunda em pacientes MRD-negativos. Por isso, serão necessários outros estudos para que estes resultados possam começar a ser utilizados na prática clínica (1).

Tem-se tornado claro que, no futuro, serão necessárias avaliações integradas que incluem triagem mutacional no diagnóstico e seguimento da monitorização da doença residual mínima. Como exemplo, na LMA com mutação NPM1, houve melhor predição de risco de recidiva por avaliação de doença residual mínima do que usando a presença de mutações cooperantes (por exemplo, FLT3- ITD, DNMT3A e WT1) (21).

Assim, a determinação de MRD por fenótipo é muito importante no prognóstico, sendo um guia muito útil para orientar as estratégias pós-remissão na LMA (21). Este deve ser incorporado na prática clínica com o objectivo de orientar as decisões terapêuticas na altura da primeira remissão completa (RC1) (15).

- Células-tronco embrionárias

Existe uma forte correlação entre a proporção das células-tronco no diagnóstico e na remissão e o risco de recidiva e morte por leucemia. Nos primeiros estudos efectuados foi definido o fenótipo das células-tronco hematopoiéticas e das células-tronco leucémicas com base nos marcadores de diferenciação ou na expressão alterada de marcadores de linhagem (22,23).

As células-tronco embrionárias exibem características de autorrenovação, paragem de diferenciação e pluripotência. Os genes que controlam essas propriedades foram identificados recentemente e codificam uma variedade de factores de transcrição

(OCT4, SOX2 e NANOG) e de marcadores de superfície (SSEA1 também chamado de CD15). A sobreexpressão destes foi capaz de restaurar a pluripotencialidade em células somáticas de ratos e humanos (23).

Num recente estudo avaliou-se a expressão de antígenos embrionários (OCT4, NANOG, SOX2, SSEA1, SSEA3) em subgrupos de células-tronco hematopoiéticas (CD34 + CD38<sup>-</sup> e CD34 + CD38<sup>+</sup>) de medula óssea normal e em amostras de pacientes com LMA. Observou-se uma regulação positiva dos fatores de transcrição OCT4 e SOX2 nas células leucémicas. Por outro lado, a proteína SSEA1 foi regulada negativamente nas células leucémicas. A taxa de remissão completa não foi influenciada pelo nível de expressão dos marcadores. Contudo, a sobrevivência global foi significativamente melhor para pacientes com altos níveis de SOX2, o que foi inesperado devido à correlação inversa com subtipos genéticos favoráveis (23).

Em relação aos pacientes em remissão completa após tratamento de indução, os níveis de todos os marcadores, excepto SSEA3, foram significativamente diferentes daqueles medidos no diagnóstico, estando dentro da faixa dos observados nas medulas controlo. O papel de OCT4, NANOG e SOX2 precisa ser investigado neste contexto para saber se estão diretamente implicados na oncogénese ou são apenas uma consequência de um padrão anormal de diferenciação (23).

Assim, estes resultados poderiam levar à avaliação do papel potencial desses marcadores na leucemogénese e testar a sua relevância para uma melhor identificação de células-tronco leucémicas.

- FLT3

O FLT3 é um membro da família de receptores de tirosina quinase do tipo III e desempenha um papel importante na proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas precoces (24). As duplicações internas tandem do domínio justamembrana de FLT3 (FLT3-ITD) representam cerca de 30% das mutações na LMA (25). A sua mutação resulta numa activação constitutiva da quinase e os pacientes têm frequentemente uma alta contagem de leucócitos periféricos e de blastos na medula óssea. Apresentam também altas taxas de recidiva, implicando que a mutação FLT3-ITD prenuncia um prognóstico particularmente mau (25). As mutações FLT3-ITD são adquiridas relativamente tarde na evolução da leucemia e são incapazes de produzir um

fenótipo LMA em modelos animais sem outras mutações, contudo são capazes de conferir um estado de dependência oncogênica pela ativação de vias de sobrevivência (7,8).

Apesar dos pacientes que apresentam esta mutação serem submetidos a transplante após atingirem a primeira remissão completa, observou-se que o alo-HCT não anula o risco maior de recidiva e a menor sobrevivência associada a FLT3-ITD (25). Num estudo recente, observou-se que as mutações em TP53, WT1 e FLT3-ITD estavam associadas a um risco aumentado de recidiva após alo-HCT (26).

Mais recentemente, a nova geração de inibidores de tirosina quinase FLT3 (TKI) tem mostrado resultados promissores, todavia o resultado de pacientes com LMA com mutação FLT3-ITD permanece mau. Neste recente estudo, revelou-se que as células FLT3-ITD desenvolvem uma dependência metabólica do metabolismo da glutamina após a inibição da tirosina quinase FLT3. Esta inibição parece suprimir o metabolismo central de carbono, típico das células FLT3-ITD, impedindo principalmente a absorção e utilização da glicose. No entanto, a atividade do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e a função respiratória são menos afetadas e são suportadas pela absorção contínua de glutamina, o outro combustível principal para o metabolismo do carbono central. A supressão combinada da atividade da tirosina quinase FLT3 e do metabolismo da glutamina, utilizando a inibição química e o silenciamento genético da glutaminase, leva a um aumento da morte celular nas células FLT3-ITD. Estes achados foram estendidos para vários subtipos de LMA associados a outras mutações ativadoras da tirosina quinase (TK) (8).

Estes dados mostraram que, especificamente na LMA com mutação FLT3-ITD, a inibição de glutaminase, por si só, produz apenas efeitos antiproliferativos leves e só se torna uma vulnerabilidade metabólica após a inibição de FLT3 TK. No entanto, os melhores resultados foram observados quando as células FLT3-ITD foram privadas de glutamina em vez de seguirem a inibição da glutaminase. Isto sugere que as células mutadas FLT3-ITD podem também depender das vias auxiliares do metabolismo da glutamina (8).

- **Mutação dupla DNMT3A e FLT3-ITD**

A mutação DNMT3A é uma mutação no gene de regulação da metilação do DNA, associada a um pior prognóstico, mesmo em pacientes com citogenética normal (14).

A mutação DNMT3A R882H, que leva à redução da atividade metiltransferase, foi frequentemente encontrada na LMA com cariótipo normal, com uma proporção de mutação de cerca de 20% (27). Estudos de sequenciamento genómico em larga escala identificaram um subconjunto de pacientes com mutações concomitantes de FLT3-ITD e DNMT3A, o que está associado a um resultado clínico desfavorável (7). Um novo estudo foi desenvolvido para perceber qual o prognóstico dos pacientes com LMA com dupla mutação após o alo-HSCT. O estudo analisou retrospectivamente os resultados clínicos de um subgrupo de 206 pacientes chineses com LMA com essa dupla mutação após quimioterapia e tratamento com alo-HSCT (25).

Para esta investigação, examinaram-se 6 genes frequentemente mutados (incluindo FLT3-ITD, DNMT3A, C-kit, CEBPA, FLT3-TKD e NPM1). Os resultados mostraram que em comparação com outros três grupos de pacientes com LMA, o resultado do grupo FLT3-ITD + DNMT3A R882 + foi o pior em termos de sobrevivência global aos 2 anos, sobrevivência livre de doença aos 2 anos e incidência cumulativa de recidiva. O facto de estar em remissão no momento do transplante não eliminou o aumento do risco de recidiva, tendo-se verificado o mesmo no grupo com dupla mutação após alo-HCT. Isto quer dizer que a população chinesa que apresenta dupla mutação FLT3-ITD e DNMT3A R882 tem um prognóstico desfavorável ao receber quimioterapia ou tratamento com alo-transplante (25).

As análises univariada e multivariada confirmaram que o estado da doença antes do transplante, a mutação FLT3-ITD e a dupla mutação FLT3-ITD e DNMT3A R882 eram fatores independentes para o mau prognóstico após o alo-HCT, o que está de acordo com outro estudo anterior (25).

Este estudo apresentava algumas limitações, como o pequeno tamanho da amostra, a heterogeneidade da coorte e a natureza retrospectiva. Portanto, são necessários estudos em coortes maiores para uma validação prospectiva (25). Contudo, houve concordância entre vários pequenos estudos o que poderia impulsionar um estudo com um coorte maior.

- **BCRP e MDR-1**

No estudo apresentado fez-se uma análise multivariada em adultos com LMA com cariótipo intermédio ou normal, com o objectivo de estimar a significância de MDR-1 e BCRP e correlacioná-los com a presença de FLT3-ITD (12).

Observou-se que a sobrevivência livre de doença foi influenciada negativamente pelo FLT3-ITD, simultaneamente com alta expressão de mRNA BCRP e alta contagem de leucócitos no diagnóstico. Além disso, FLT3-ITD e mRNA BCRP influenciaram negativamente a sobrevivência global, enquanto a taxa de recidiva da doença apenas foi influenciada negativamente pela elevada expressão de mRNA BCRP, o que está de acordo com observações anteriores (12,28).

A biologia da expressão e função do BCRP na LMA é complexa e precisa de estudos clínicos mais padronizados. Isto porque o BCRP pode ser considerado como um factor prognóstico em pacientes com LMA de cariótipo normal ou intermédio. Também o gene MDR requer uma investigação mais aprofundada para determinar o seu valor clínico real e estabelecer a posição deste gene e das suas proteínas na patogénese e no prognóstico da LMA (12).

- NPM1

A mutação no gene NPM1 está presente em aproximadamente 33% dos pacientes com LMA, sendo a lesão molecular mais comum nos pacientes adultos mais jovens. No grupo dos que têm LMA citogeneticamente normal, 50% apresenta mutação na NPM1 (21). Esta mutação parece ser uma mutação tardia e está associada a um curso clínico que pode ser modificado por outras mutações que ocorrem juntamente com esta, contudo é considerada uma entidade de LMA distinta (4,15).

Cerca de 75% destes pacientes também apresentam mutações nos genes de metilação ou hidroximetilação do DNA (DNMT3A, IDH1, IDH2R140, TET2), 40% têm mutações simultâneas de FLT3-ITD, 20% apresentam mutações no NRAS e aproximadamente 20% têm mutações em genes complexos de coesina (15). O padrão de co-mutações molda amplamente os desfechos clínicos (4).

Outra importante alteração no ELN 2017 foi reclassificar a LMA com mutação Nucleofosmina 1 (NPM1mut) com baixo índice alélico FLT3-ITD (FLT3-ITD-L) como risco favorável, assim como a LMA com NPM1mut e ausência de FLT3-ITD. A evidência que sustenta o NPM1mutFLT3-ITD-L como risco favorável é conflituante. Em conjunto, a literatura não fornece uma mensagem consistente sobre o prognóstico ou tratamento ideal de pacientes com LMA com NPM1mutFLT3-ITD-L.

Um grupo de investigação tentou perceber quais as características dos pacientes com NPM1mutFLT3ITD-L. Estes apresentaram características de alto risco, incluindo

aumento da lactato desidrogenase (LDH), da contagem de leucócitos e da percentagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea (29).

A presença de NPM1mutFLT3ITD-L foi associada a sobrevivência global inferior e aumento da recidiva apenas numa coorte, tendo sido confirmado numa análise multivariada. Na coorte onde apresentaram diminuição da sobrevivência global, foram identificados outros fatores de mau prognóstico. Por exemplo, no grupo de pacientes com risco citogenético intermédio o pior prognóstico estava associado a aumento da idade e dos leucócitos e no grupo com NPM1mutFLT3ITD-L observaram-se mutações concomitantes no DNMT3A em aproximadamente metade dos pacientes (29). Os pacientes com mutação no gene NPM1 e mutações coexistentes no gene FLT3-ITD ou DNMT3A têm pior prognóstico e podem ser considerados candidatos ao transplante logo após a primeira recidiva completa (21).

Em pacientes <60 anos, o NPM1mutFLT3ITD-L têm sobrevivência inferior a outros pacientes com prognóstico favorável. Por outro lado, pacientes com idade igual ou superior a 60 anos com mutações no NPM1, com ou sem FLT3ITD, apresentaram resultados adversos e não devem ser considerados como risco favorável (29).

Um estudo muito recente avaliou a significância da frequência do alelo variante do NPM1 (VAF). Observaram que a sua expressão elevada está correlacionada com sobrevivência global mais baixa, assim como menor sobrevivência livre de doença. Apresentou um efeito prognóstico particularmente adverso no subgrupo de pacientes tratados com transplante de células-tronco em RC1 e em pacientes com mutação em DNMT3A. Estes achados, indicam que o efeito prognóstico da mutação NPM1 na LMA de novo pode ser influenciado pela abundância relativa do alelo mutado. Estes achados levantam a possibilidade de que a biologia deste subtipo de leucemia possa diferir com base no tamanho do clone de NPM1. Porém, requerem uma validação numa coorte maior de pacientes. Contudo, sugerem que a quantificação de rotina da carga mutacional do NPM1 no diagnóstico pode fornecer informações prognósticas importantes para pacientes com LMA de novo (30).

- **Mutações CEBPA bialélicas**

O CEBPA é um fator de transcrição que é crucial para regular o desenvolvimento da linhagem mielóide. Mutações no CEBPA são observadas em 5% a 15% dos pacientes

com LMA. A mutação CEBPA bialélica é considerada um factor de bom prognóstico na LMA (7,31).

Pacientes que apresentam LMA com mutações CEBPA bialélicas estão associados a mutações em GATA2, NRAS, WT1 e CSF3R, e carecem de mutações de mau prognóstico, como FLT3-ITD (4,7). Neste caso, o prognóstico é influenciado principalmente por mutações genéticas concomitantes e não por alterações cromossómicas secundárias, sendo categorizados independentemente do seu cariótipo (4,15).

Estudos recentes concluíram que pacientes com LMA com mutação CEBPA bialélica exibem desregulação e dependência da sinalização do transdutor de sinal Janus quinase e do sinalizador ativador de transcrição (JAK-STAT) (31).

- IDH2R172

No estudo de Papaemmanuil et al., emergiram três categorias genómicas de LMA: mutações no complexo spliceossoma-cromatina, aneuploidia TP53 e, provisoriamente, IDH2R172. Neste estudo, o pequeno subconjunto de pacientes com LMA com mutação IDH2R172 foi identificado como uma classe de doença provisória, principalmente com base na exclusão mútua com a mutação NPM1 e outras lesões de definição de classe (4). Sendo que já existem moléculas inibidoras anti-IDH1 (ivosidenib) e anti-IDH2 (enasidenib).

- Complexo spliceossoma-cromatina

Numa nova análise concluiu-se que a categoria de spliceossoma-cromatina representa o segundo maior subgrupo de pacientes com LMA e nenhum gene isolado define esse grupo. Os pacientes do subgrupo spliceossoma-cromatina eram, em média, mais velhos e tinham menor contagem de blastos. 20% dos pacientes tinham antecedentes de síndrome mielodisplásico (SMD) ou evidência de displasia, 80% não apresentavam tais características displásicas e apresentavam risco intermédio com LMA de novo (4).

- MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs curtos, não-codificantes, que têm interesse como reguladores pós-transcricionais da expressão genética, muitas vezes visando centenas de mRNAs diferentes com especificidade temporal e espacial (32).

O miR-193b orchestra a via de sinalização que controla a viabilidade e a proliferação, que muitas vezes é constitutivamente ativada na LMA.

Num estudo, observou-se que o knockout de miR-193b no modelo *in vivo* Hoxa9/Meis1 causou uma forma mais agressiva de leucemia, resultando numa diminuição significativa da sobrevivência dos camundongos receptores. Além das suas funções já conhecidas no controlo da autorrenovação das células-tronco hematopoiéticas (via STAT5) e na expansão através da modulação da expressão do KIT, o miR-193b também apresentou uma função crítica como supressor do crescimento leucémico. A expressão de miR-193b em blastos de pacientes com LMA diminuiu o crescimento leucémico *in vitro* e em xenoenxertos de camundongos (32).

Observou-se que é um regulador-chave que controla simultaneamente múltiplas vias importantes. Actualmente, existe uma modesta resposta terapêutica a vários fármacos que visam apenas um único oncogene. Além de que aumentam a possibilidade de adquirir mutações que causam resistência à terapêutica. Esta observação apoia o desenvolvimento de terapêuticas baseadas em miRNA, uma vez que teriam a capacidade de reprimir muitos oncogenes e que o fariam através de diferentes vias oncogénicas (32).

A expressão de miR-193b-3p melhorou o valor prognóstico da estratificação de grupo de risco da European LeukemiaNet. Pacientes no grupo de risco intermédio/adverso desta classificação, que têm baixa expressão de miR-193b-3p, têm um prognóstico pior e podem ser alocados para o transplante de células-tronco hematopoiéticas (32). O facto de este ser um estudo retrospectivo é uma limitação potencial, mas abre o caminho para novos estudos sobre o miRNA.

- MN1

O gene meningioma 1 (MN1) é um oncogene potente na hematopoiese que aumenta a proliferação e a autorrenovação e bloqueia a diferenciação por reprimir a transcrição de genes associados à diferenciação. Cerca de metade dos pacientes com LMA têm células leucémicas com um cariótipo normal em que a expressão elevada de MN1 se correlaciona com um pior prognóstico (33).

Foi realizado um estudo em doentes com LMA no Egipto com o objectivo de perceber qual o papel do gene meningioma 1 (MN1) no prognóstico. Neste estudo, pacientes com alta expressão de MN1 têm maior incidência de linfadenopatia e baixa contagem de plaquetas. Concluiu-se que a sobreexpressão de MN1 pode ser um novo

marcador de prognóstico na LMA, especialmente nas LMA citogeneticamente normais. Este está associado a má resposta à terapia de indução, a maior taxa de recidiva e à menor sobrevivência livre de doença. É, deste modo, um marcador que prediz um desfecho clínico possivelmente pior. A utilização deste gene poderia melhorar a estratificação do risco em pacientes que pertencem a esse grupo heterogêneo de pacientes com LMA (33).

- **OLIG2**

OLIG2 é um fator de transcrição que é crucial para a diferenciação e proliferação de células progenitoras neuroepiteliais. Curiosamente, a expressão alterada de OLIG2 fora do sistema nervoso central tem sido raramente relatada. Contudo, numa recente observação, verificou-se que o OLIG2 é regulado epigeneticamente nas linhagens de células LMA, exercendo actividade antiproliferativa e estando associado ao prognóstico da LMA (34).

A metilação do DNA de OLIG2 está associada à diminuição da expressão do seu mRNA em linhagens de células de pacientes com LMA. Esta correlação inversa foi traduzida para a expressão da proteína, sendo que houve elevada expressão da proteína OLIG2 em linhas celulares com baixa metilação e com menor extensão em linhas celulares com metilação média. As linhas celulares altamente metiladas apresentaram quase nenhuma expressão proteica. Demonstrou-se que OLIG2 é regulado epigeneticamente via metilação do DNA e que é ectopicamente expresso em pacientes com LMA. Também se verificou que a expressão da proteína OLIG2 pode atuar como um fator inibidor do crescimento de células leucémicas, o que pode justificar uma investigação adicional sobre o seu potencial papel supressor na LMA (34).

- **Ring 1A e Ring 1B**

Ring 1A e Ring 1B são componentes dos complexos repressivos Polycomb 1 (PRC 1). Polycomb 1 e 2 (PRC1 e PRC2) funcionam como repressores transcricionais e regulam a expressão de genes que determinam a identidade celular. Um componente do PRC1 desempenha um papel fundamental na manutenção de células-tronco hematopoiéticas normais e leucémicas. Como este estimula a atividade de ubiquitinação de Ring1A e Ring1B (Ring1A/B) essas proteínas podem desempenhar papéis importantes na regulação da homeostase das células-tronco (35).

O Ring 1A está sobreexpresso em células-tronco hematopoiéticas e em células LMA de pacientes com mau prognóstico, enquanto o Ring 1B está sobreexpresso em linfomas, tumores gástricos e do cólon (35).

Num modelo de rato com LMA que expressa a fusão MOZ-TIF2, descobriu-se que os componentes Ring1A/B desempenham papéis cruciais na manutenção de células-tronco hematopoiéticas na LMA. A deleção de Ring1A/B das células diminuiu a capacidade de autorrenovação e induziu a expressão de vários genes, incluindo GLIS2. A sobreexpressão deste gene provocou a diferenciação em células maduras, enquanto o knockdown de GLIS2 em células com ausência Ring1A/B inibiu a diferenciação. Assim, Ring1A/B regula e mantém as células-tronco hematopoiéticas na LMA, em parte, devido à repressão que exerce sobre a expressão de GLIS2. Embora a diferenciação das células MOZ-TIF2 tenha sido promovida pela sobreexpressão de GLIS2, a capacidade de autorrenovação dessas células foi mantida independentemente da expressão desse gene. Esta observação sugere que outros alvos de Ring1A/B regulam a capacidade de autorrenovação de células LMA MOZ-TIF2 (35).

Mais estudos são necessários para definir o mecanismo subjacente à regulação da capacidade de autorrenovação das células LMA por Ring1A/B e a via Ring1A/B-GLIS2, uma vez que, muito possivelmente, estão associados a um mecanismo complexo.

- **RUNX1**

RUNX1 é o principal regulador transcricional hematopoiético e a categoria mais comum de rearranjo é o produto da translocação cromossômica t (8; 21), RUNX1-ETO (RUNX1-RUNX1T1), que funciona como um repressor por recrutamento de desacetilases de histona. O RUNX1-ETO leva a um bloqueio na diferenciação mielóide, e sua expressão é necessária para a propagação de leucemia (36).

O produto de outra translocação RUNX1, t (3; 21) (q26; q22), é RUNX1-EVI1 (RUNX1-PRDM3), sendo EVI1 um essencial regulador da auto-renovação em células-tronco hematopoiéticas. A translocação t (3; 21) é raramente encontrada em pacientes com LMA de novo.

Na actualização da classificação LMA pela OMS, a mutação de RUNX1 foi incluída como uma entidade provisória (13). Na realidade, a LMA com mutação RUNX1 é quase mutuamente exclusiva das restantes nesta categoria, sendo caracterizada por apresentar características clínicas e patológicas específicas (15,37).

As duas classes RUNX1-ETO e RUNX1-EV11 possuem características clínicas distintas. A translocação t(8;21) geralmente tem um resultado clínico melhor do que a translocação t(3;21) (173).

O estudo aqui apresentado utilizou análises globais para investigar diferenças e semelhanças entre os dois tipos de LMA associada a RUNX1. Determinou-se que os perfis epigenético e transcricional dos dois tipos de LMA diferem. O domínio de ligação ao DNA de cada proteína de fusão não é o único factor determinante para a selecção de locais de ligação no genoma. Cada tipo de LMA exhibe uma rede de transcrição única e estável que depende da presença de cada proteína de fusão, mas requer um conjunto diferente de factores de transcrição associados (36).

A translocação t(8;21) é um desarranjo citogenético que atinge uma célula-tronco precoce, enquanto t(3;21) é frequentemente encontrada em pacientes com LMC após crise blástica.

Um novo estudo, mais recente, analisou diferentes factores prognósticos com o objectivo de fazer uma estratificação do risco em doentes com LMA positiva para RUNX1-ETO. Os resultados desta análise mostraram que 73,4% dos pacientes apresentavam mutações genéticas no diagnóstico e 54,5% tinham alterações genéticas na recidiva, na qual a mutação c-KIT foi a mais frequente. A análise de factores univariados mostrou que as características clínicas no início da doença, incluindo leucemia extramedular, taxa de celularidade da medula óssea  $\geq 90\%$  e mutações adicionais (especialmente mutações no MET, ASXL1, DNMT3A, MLH1 e c-KIT), afectavam gravemente a sobrevivência livre de recidiva e a sobrevivência global. Assim, a mutação ASXL1 foi considerado um factor de mau prognóstico neste estudo (38).

- SATB2

A proteína 2 de ligação à sequência rica em AT (SATB2) é uma nova proteína de ligação ao DNA, que está envolvida na regulação da expressão genética. Em doentes com LMA, observou-se sobreexpressão relativa de SATB2, sendo que os pacientes que alcançaram a RC tinham uma expressão muito inferior em comparação com os que apresentavam um diagnóstico recente (39).

Pacientes com maior expressão SATB2 tiveram uma sobrevivência global relativamente baixa, assim como uma sobrevivência livre de doença curta, sendo um

factor de mau prognóstico independente tanto para a sobrevivência global como para a sobrevivência livre de doença (39).

- **Trissomia cromossoma 8**

A trissomia do cromossomo 8 é a alteração cromossômica numérica mais frequente na LMA, no entanto, o seu significado prognóstico não é claro e não há consenso.

Num estudo recente, investigou-se as características clínicas e genéticas, bem como o seu significado prognóstico. Observou-se que a trissomia do cromossomo 8 é mais comum na faixa etária mais avançada, com o mais novo dos pacientes a apresentar 47 anos. Entre os pacientes com trissomia do cromossoma 8, 38% apresentaram trissomia isolada, 8% tiveram apenas mais uma alteração cromossômica adicional, 54% apresentavam trissomia 8 como parte de um complexo cariótipo e nenhuma alteração cromossômica estava associada com citogenética de risco favorável. As mutações NPM1 e FLT3 foram negativas na maioria dos pacientes com trissomia do cromossomo 8, o que levanta uma questão sobre a possível exclusão mútua. A tendência para uma melhor sobrevivência global foi observada com trissomia 8 isolada em comparação com a combinação com outras alterações citogenética, embora não estatisticamente significativa. É necessária uma coorte maior de pacientes para validar estes resultados (40).

- **SHB**

O gene SHB codifica uma proteína que actua a jusante dos receptores de tirosina quinase, exercendo efeitos pleiotrópicos na célula (proliferação, diferenciação e apoptose) e no citoesqueleto. O camundongo knockout de SHB mostra comprometimento na reprodução, na angiogénese, no extravasamento de leucócitos, na atividade de células-tronco hematopoiéticas e na tolerância à glicose. Destaca-se o facto de que muitos dos efeitos fenotípicos foram observados em camundongos SHB +/-, sugerindo que pequenas alterações na expressão do gene SHB pode ter efeitos nas respostas celulares (41).

Ao examinar genes co-expressos com SHB na LMA, quatro outros genes (PAX5, HDAC7, BCORL1, TET1) relacionados com a leucemia foram identificados. O conjunto destes genes identificados, mais o SHB, foram associados a certas características fenotípicas, tais como imunes, vasculares e apoptóticas. Através do resultado

experimental de camundongos, conclui-se que a expressão alterada desse gene pode alterar o fenótipo celular e, portanto, as características da doença, assim como relacionar-se com a sobrevivência da LMA (41).

Provavelmente, SHB está relacionado com as várias características fenotípicas, entre as quais a sobrevivência é uma variável. Assim, o prognóstico favorável de LMA com baixo mRNA de SHB provavelmente está relacionado com a menor proliferação de células leucêmicas. Sendo que as consequências das características fenotípicas imunes e vasculares das células leucêmicas permanecem por investigar (41).

A experiência com o knockdown de SHB neste estudo mostrou redução da proliferação celular e falha na seleção de clones em expansão, sugerindo que SHB é importante para a proliferação celular na leucemia mielóide humana. Apesar de uma baixa frequência de mutações no gene SHB na LMA, muitos tumores sobreexpressam o mRNA de SHB em comparação com células sanguíneas mielóides normais. Pacientes com LMA que expressam baixo mRNA de SHB apresentaram maior tempo de sobrevivência (41).

- Gene TET2

Este gene codifica uma enzima que promove a desmetilação do DNA, sendo que mutações neste gene podem levar à desregulação da metilação do DNA. Mais de 25% dos pacientes com LMA apresenta mutações com perda da função de TET2, sendo que esta é uma mutação iniciadora que ocorre precocemente na LMA (4,42). Estudos em modelos de células pré-leucêmicas com mutação TET2 e amostras de pacientes com LMA mostraram que essas mutações resultam num DNA hipermetilado (preferencialmente na zona dos potenciadores) e, conseqüentemente na sobreexpressão de genes regulados por esses potenciadores (43).

- TP53

O TP53 é um gene supressor de tumor cujo papel é a reparação de células normais com dano mantido no DNA ou induzir a morte celular nas células danificadas nas quais o reparo não é possível. Na LMA a mutação do gene TP53 é observada em aproximadamente 5-10% de todos os casos, ocorrendo frequentemente em idosos e casos com cariótipo cromossômico complexo, o que está associado a prognóstico desfavorável (44,45).

Uma análise multivariada realizada recentemente demonstrou que a mutação do gene TP53 no domínio de ligação do DNA e fora do domínio de DNA foi um fator de mau prognóstico independente para sobrevivência global e sobrevivência livre de recidiva entre a coorte total. No tratamento estratificado, a pesquisa completa da mutação do gene TP53 é, portanto, muito importante (14).

Neste estudo, a mutação do gene TP53 foi observada em 7,3% dos casos, tendo existido vários tipos de mutações (missense, deleção). Na comparação entre as características clínicas, os casos com alteração do gene TP53 tiveram uma média de idade maior, menor contagem de leucócitos, menor frequência de prognóstico citogenético favorável, menor frequência de prognóstico citogenético intermédio, maior frequência de prognóstico citogenético desfavorável, maior frequência de cariótipo complexo e uma frequência menor de cariótipo normal (14).

A anormalidade do gene TP53 foi mutuamente exclusiva com FLT3-ITD, e casos com alterações no gene TP53 tiveram uma taxa significativamente menor de co-presença de mutação NPM1. A mutação do gene co-presente mais frequente nos casos com anormalidade do gene TP53 foi a mutação RUNX1. Ao analisarem todos os casos de LMA de novo, observaram que aqueles que tinham mutação do gene TP53 tiveram taxas de remissão significativamente menores, percentagem menor de sobrevivência global aos 5 anos e menor tempo de sobrevivência livre de recidiva (14).

Dos casos com idade igual ou inferior a 70 anos e com anormalidade do gene TP53, os casos que receberam alo-HCT no primeiro período de remissão tenderam a ter uma taxa de sobrevivência global mais alta, apesar de não ser estatisticamente significativa. Apresentaram também uma taxa maior de sobrevivência livre de recidiva, esta estatisticamente significativa. Enquanto isso, a sobrevivência global e a sobrevivência livre de recidiva não foram significativamente diferentes nos casos que receberam alo-HCT noutra período que não o primeiro período de remissão, em comparação com pacientes que não receberam transplante. O que leva a concluir que a anormalidade do gene TP53 pode ser um importante fator prognóstico na determinação do tratamento (14).

Os casos com mutação no gene TP53 apresentaram uma contagem de alterações cromossômicas significativamente maior, estando muitas vezes associada a aneuploidias cromossômicas específicas (15). É sugerido que a mutação do gene TP53 está associada a um mecanismo de leucemogênese substancialmente diferente de outras mutações génicas, como a mutação do gene de regulação de metilação do DNA. Como houve alguns

casos em que a mutação do gene TP53 desapareceu no momento da recidiva, parece altamente provável que esta não seja uma mutação do gene fundador que induz condições pré-leucémicas, mas sim uma mutação genética condutora mais tardia.

A mais recente classificação prognóstica da European Leukemia Net (ELN) relata a mutação TP53 como um fator prognóstico desfavorável na LMA (9). Neste estudo, esta observação foi corroborada e estabeleceu-se também que a anormalidade do gene TP53 é um fator prognóstico desfavorável independente na LMA. Também se observou que é um fator prognóstico desfavorável em casos de LMA FLT3-ITD-negativo, com idade igual ou inferior a 70 e com prognóstico citogenético intermédio. Foi demonstrado que a mutação do gene TP53, na LMA, é um fator de prognóstico desfavorável ainda mais poderoso do que o FLT3-ITD, e que a LMA com mutação no gene TP53 merece uma classificação de doença independente (4). O fato de ser mutuamente exclusivo com a mutação FLT3-ITD e NPM1, que são considerados fatores prognósticos importantes na LMA, é um ponto significativo.

## **Conclusão**

Já foram descritas inúmeras alterações nas vias de expressão genética em diferentes subconjuntos de LMA. Contudo, a complexidade da doença faz supor que muitas das alterações de sinalização que podem ter um impacto nas características e no prognóstico da doença permanecem desconhecidas.

Usar novas informações genéticas para orientar a prática clínica continua a ser um campo ativo de pesquisa. Dada a enorme heterogeneidade genômica da LMA, estudos de vários milhares de pacientes provavelmente serão necessários para perceber o significado clínico da arquitetura genética complexa.

Todavia, há ainda uma proporção substancial de doentes com LMA que, apesar de terem um desarranjo genômico subjacente, a técnica usada ainda não o conseguiu demonstrar o que faz com que não se consiga indicar um provável prognóstico. Assim, é de extrema importância caracterizar clínica e biologicamente os subtipos genômicos de LMA e quais os genes e vias de sinalização/transcrição predominantes de modo a adequar a terapêutica.

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família, em especial, aos meus pais que sempre me apoiaram ao longo de toda a minha vida e me deram toda a força para seguir os meus sonhos, sem eles nada disto seria possível. Agradeço também à minha orientadora, Dra Graça Esteves, pela sua disponibilidade e apoio na realização deste trabalho. Por último, mas não menos importante, aos meus amigos de toda a vida por estarem sempre lá, apesar das muitas vezes que foram trocados pela Medicina, e aos amigos da faculdade pelo bonito caminho que percorremos juntos. Estes 6 anos foram muito mais fáceis devido às maravilhosas pessoas que estiveram sempre ao meu lado e me apoiaram em todas as alturas.

## Referências Bibliográficas

1. Rashidi A, Linden MA, Defor TE, Warlick E, Bejanyan N, Yohe S, et al. History of consolidation is prognostic in AML patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation in minimal residual disease-negative first complete remission. *American Journal of Hematology*. 2017;1–11.
2. Deschler B. Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. *American Cancer Society*. 2006;107(9).
3. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5–29.
4. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(23):2209–21.
5. Döhner H, Estey EHE, Amadori S, Appelbaum FRFR, Büchner T, Burnett AK a. K, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453–74.
6. Hartmut Döhner, M.D., Daniel J. Weisdorf, M.D., and Clara D. Bloomfield MD, From. Acute myeloid leukemia. *The new england journal of medicine*. 2015;76(11):635–8.
7. Leukemia AM. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(22):2059–74.
8. Gallipoli P, Giotopoulos G, Tzelepis K, Costa ASH, Vohra S, Medina-Perez P, et al. Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3<sup>ITD</sup> acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood*. 2018;44(0):blood-2017-12-820035.
9. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Ebert BL, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424–48.
10. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(5):454–64.
11. Espirito Santo A, Chacim S, Ferreira I, Leite L, Moreira C, Pereira D, et al. Southwestern Oncology Group pretreatment risk criteria as predictive or

- prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Molecular and Clinical Oncology*. 2017;6(3):384–8.
12. Nasilowska-Adamska B, Warzocha K, Solarska I, Borg K, Pienkowska-Grela B, Czyz A. BCRP mRNA and FLT3-ITD are independent poor risk factors in adult patients with acute myeloid leukemia and intermediate or normal karyotype. *European Journal of Haematology*. 2017;99:255–61.
  13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–406.
  14. Terada K, Yamaguchi H, Ueki T, Usuki K, Kobayashi Y, Tajika K, et al. Full-length mutation search of the TP53 gene in acute myeloid leukemia has increased significance as a prognostic factor. *Annals of Hematology*. 2017.
  15. Bullinger L, Konstanze D. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(9).
  16. Klepin HD. Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia in the Elderly. *Clinical Geriatric Medicine*. 2016;32:155–73.
  17. Welch JS, Petti AA, Miller CA, Fronick CC, O’Laughlin M, Fulton RS, et al. *TP53* and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(21):2023–36.
  18. Tawfik B, Pardee TS, Isom S, Sliesoraitis S, Winter A, Lawrence J, et al. Comorbidity, age, and mortality among adults treated intensively for acute myeloid leukemia (AML). *Journal of Geriatric Oncology*. 2016;7(1):24–31.
  19. Ahmed T, Koch AL, Isom S, Klepin HD, Bishop JM, Ellis LR, et al. Outcomes and changes in code status of patients with acute myeloid leukemia undergoing induction chemotherapy who were transferred to the intensive care unit. *Leukemia Research*. 2017;62(September):51–5.
  20. Oran B, Jorgensen JL, Marin D, Wang S, Ahmed S, Alousi AM, et al. Pre-transplantation minimal residual disease with cytogenetic and molecular diagnostic features improves risk stratification in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2017;102(1):110–7.
  21. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic J V., Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(5):422–33.
  22. van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, Feller N, Nieuwint AWM, Zweegman S,

- et al. Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia*. 2007;21(8):1700–7.
23. Picot T, Aanei CM, Fayard A, Flandrin-Gresta P, Tondeur S, Gouttenoire M, et al. Expression of embryonic stem cell markers in acute myeloid leukemia. *Tumor Biology*. 2017;39(7):101042831771662.
  24. Volpe G, Clarke M, García P, Walton DS, Vegiopoulos A, Del Pozzo W, et al. Regulation of the *flt3* gene in haematopoietic stem and early progenitor cells. *PLoS ONE*. 2015;10(9):1–18.
  25. Tang S, Shen H, Mao X, Dai H, Zhu X, Xue S, et al. FLT3-ITD with DNMT3A R882 double mutation is a poor prognostic factor in Chinese patients with acute myeloid leukemia after chemotherapy or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Hematology*. 2017;
  26. Luskin MR, Carroll M, Lieberman D, Morrissette JJD, Zhao J, Crisalli L, et al. Clinical Utility of Next-Generation Sequencing for Oncogenic Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2016;22(11):1961–7.
  27. Thol F, Damm F, Lüdeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(21):2889–96.
  28. Damiani D, Tiribelli M, Calistri E, Geromin A, Chiarvesio A, Michelutti A, et al. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Haematologica*. 2006;91(6):825–8.
  29. Straube J, Ling VY, Hill GR, Lane SW. The impact of age, NPM1<sup>mut</sup> and FLT3<sup>ITD</sup> allelic ratio in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;blood-2017-09-807438.
  30. Patel SS, Kuo FC, Gibson CJ, Steensma DP, Soiffer RJ, Alyea EP, et al. High NPM1 Mutant Allele Burden at Diagnosis Predicts Unfavorable Outcomes in de novo AML. *Blood First Edition Paper*. 2018
  31. Tyner JW. JAKed up phenotype of CEBPA-mutant AML. *Blood*. 2016;127(24):2946–7.

32. Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, Jammal R, Emmrich S, Obulkasim A, et al. Endogenous Tumor Suppressor microRNA-193b : Therapeutic and Prognostic Value in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(10):1007–16.
33. Shafik RE, Hassan NM, Meligui YM El, Shafik HE. The Meningioma 1 ( MN1 ) Gene is an Independent Poor Prognostic Factor in Adult Egyptian Acute Myeloid Leukemia Patients. 2017;18:609–13.
34. Yalcin A, Kovarbasic M, Wehrle J, Claus R, Becker H, Abdelkarim M, et al. The oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2) is epigenetically regulated in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*. 2017;2.
35. Shima H, Takamatsu-Ichihara E, Shino M, Yamagata K, Katsumoto T, Aikawa Y, et al. Ring1A and Ring 1B inhibit expression of Glis2 to maintain murine *MOZ-TIF2* AML stem cells. *Blood*. 2018;blood-2017-05-787226.
36. Loke J, Assi SA, Imperato MR, Ptasinska A, Cauchy P, Grabovska Y, et al. RUNX1-ETO and RUNX1-EVI1 Differentially Reprogram the Chromatin Landscape in t(8;21) and t(3;21) AML. *Cell Reports*. 2017;19(8):1654–68.
37. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. Vol. 30, *Leukemia*. 2016. 2160-2168 p.
38. Guo-Pan Yu, Changxin Yin, Fuqun Wu, Dan Xu, Zhongxin Zheng, Ling Jiang, Fang Chen, Xuejie Jiang QL and FM. A New Multi-Factor Risk Score System Depending on Gene Mutation and Overexpression for Predicting the Outcome in AML1-ETO-Positive Acute Myeloid Leukemia. *blood journal*. 2017;130(Suppl1):5088.
39. Lihua X, Jingmei Y, Xiaodan L, Huo T. Expression of SATB2 in Acute Myeloid Leukemia and Its Prognostic Significance. *Blood*. 2017;130(suppl1):4986.
40. Gbadamosi B, Ezekwudo DE, Ogunleye F, Bastola S, Coffey M, Yu Z, et al. The Clinical Characteristics, Genetic Alterations and Prognostic Significance of Acute Myeloid Leukemia (AML) with Trisomy 8. *Blood*. 2017;130(suppl1):5101.
41. Jamalpour M, Li X, Cavelier L, Gustafsson K, Mostoslavsky G, Höglund M, et al. Tumor *SHB* gene expression affects disease characteristics in human acute myeloid leukemia. *Tumor Biology*. 2017;39(10):101042831772064.
42. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*.

- 2012;26(5):934–42.
43. Bhagwat AS, Lu B, Vakoc CR. Enhancer dysfunction in leukemia. *Blood*. 2018;131(16):1795–804.
  44. Kadia TM, Jain P, Ravandi F, Garcia-Manero G, Andreef M, Takahashi K, et al. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. *Cancer*. 2016;122(22):3484–91.
  45. Stengel A, Kern W, Haferlach T, Meggendorfer M, Fasan A, Haferlach C. The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: An analysis of 3307 cases. *Leukemia*. 2017;31(3):705–11.