

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética**

MAYARA MATIAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *DNMT3A* E SEU IMPACTO NO
PROGNÓSTICO NA LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

Recife - PE

2016

MAYARA MATIAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *DNMT3A* E SEU
IMPACTO NO PROGNÓSTICO NA LEUCEMIA MIELÓIDE
AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Co-orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Recife - PE

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Oliveira, Mayara Matias de
Avaliação de mutações no gene DNMT3A e seu impacto no prognóstico da
Leucemia Mielóide Aguda / Mayara Matias de Oliveira. – Recife: O Autor, 2016.

69 f.: il.

Orientadores: Antonio Roberto Lucena de Araujo, Marcos André Cavalcanti Bezerra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2016.

Inclui referências, anexos e apêndices

1. Leucemia aguda 2. Mutação (Biologia) 3. Prognóstico I. Araujo, Antonio Roberto Lucena de (orient.) II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (coorient.) III. Título.

616.99419

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-162

Mayara Matias De Oliveira

**Avaliação de mutações no gene *DNMT3A* e seu impacto no prognóstico na
Leucemia Mielóide Aguda
Aprovado em 25/08/2016**

Banca Examinadora:

Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Neide Santos (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Aderson da Silva Araújo (Membro Externo)
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco

Dr^a. Cíntia Gonsalves de Faria Machado (Membro Externo)
Universidade de Pernambuco

Recife - PE

2016

Aos meus pais, inspiração e amigos de todas as horas, Edson e Maria.

AGRADECIMENTOS

Durante este curso percebi que o mestrado e, em panorama mais amplo, a ciência não se faz sozinha. Para concluir este trabalho tive ajuda de muitas mãos, e outros tantos ombros e ouvidos. Agradeço a todos que participaram dessa travessia, especialmente aos aqui citados.

A Deus, por sempre conceder graças em minha vida e por colocar pessoas iluminadas em meu caminho, com as quais eu aprendo um pouco mais sobre essa complicada arte que é viver.

À minha família: Maria, Edson, Paulo e Edina por todas as referências, pelo suporte por seu amor e paciência que permitiram aturar meus desesperos, sempre de maneira muito carinhosa e otimista. Amo vocês com a certeza de que nunca encontrarei palavras ou gestos que sejam suficientes para demonstrar a magnitude deste sentimento. Ao meu namorado Alexsandro pelo apoio, compreensão, amor e solicitude desmedidos, amo você.

Aos meus falecidos avós Sônia e José, e meu padrasto Elvio, meu eterno agradecimento, sabendo que em vida talvez não tenha deixado claro o quanto seus olhares orgulhosos me motivavam nos percursos mais difíceis e o quanto suas lições e histórias fazem parte do que sou hoje.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Roberto. Uma das mais nobres missões de um orientador é indicar caminhos para descobertas. Obrigada Professor, por me confiar a execução deste projeto e por insistir em me fazer entender aspectos importantes para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Marcos André, pelo acolhimento em seu laboratório, desde a oportunidade inicial como monitora ao conhecimento compartilhado.

Ao Matheus Filgueira e a Gabriela Menezes que foram peças fundamentais na execução desse trabalho. Matheus, obrigada por me ensinar pacientemente todos os procedimentos, análises e os detalhes preciosos atrelados ao sequenciamento. À Gabriela, meus agradecimentos pelo apoio, suporte e amizade dentro e fora do laboratório.

Aos integrantes do NHCL, em especial: Pedro França, Beatriz Alburquerque, Mariana Barros e Gabriela Guedes. Conviver com qualquer ser humano diferente de você é uma tarefa árdua, mas vocês fizeram essa trajetória muito mais alegre, sempre banhada a risos e companheirismo. Obrigada por tudo, pessoal!

Às professoras Amanda Alves e Taisy Ferro, são poucos os contemplados com a sorte de ter pessoas como vocês em suas vidas. Obrigada, meninas!

À Prof^a. Sandra Lopes, minha eterna abelha rainha, pelas conversas e conselhos sempre tão carinhosos e especiais. Agradeço também por sempre ter deixado à disposição os recursos do seu laboratório, em caso de necessidade. Sua filosofia de trabalho e seus discursos sempre servirão de inspiração para mim.

À Dra Norma Lucena, Profa. Dra. Neide Santos e Prof. Dr. Will de Barros. Agradeço pelas observações e críticas fortemente construtivas durante a qualificação.

Aos amigos Amanda Luíze, Mayara Cibebe e Robinson Tavares. Vocês, pra mim, são privilégios! Obrigada por esses longos anos de irmandade.

Ao corpo médico, funcionários do laboratório e do arquivo da Fundação HEMOPE e HCP.

A todos os pacientes incluídos no estudo, por fazer de um momento tão difícil e doloroso uma oportunidade para o avanço no tratamento de suas doenças. Que todas as vezes que nessa dissertação for lida a expressão “amostra de medula óssea” nos lembremos de que se trata de um procedimento doloroso e invasivo para indivíduos já fragilizados por sua condição.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e aos órgãos de fomento que financiaram este projeto.

"Sertão não é maligno nem caridoso (...), ele tira ou dá, agrada ou amarga, ao senhor, conforme o senhor mesmo."

(ROSA, João Guimarães. Grande Sertão: Veredas.)

RESUMO

Mutações no gene *DNMT3A* foram previamente associadas com pior desfecho clínico na Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Várias mutações foram descritas, a maioria delas na posição da arginina 882, localizada no éxon 23. Grande parte das evidências associando mutações no *DNMT3A* ao prognóstico na LMA vem de ensaios clínicos, que refletem o perfil de coortes selecionadas e por isso, nem sempre são confiáveis para a tomada de decisão terapêutica. Pouco se sabe sobre a importância clínica e a frequência de mutações no *DNMT3A* em pacientes com LMA no contexto de vida real. Neste estudo, investigamos a presença de mutações no *DNMT3A* e seu perfil de expressão gênica em 201 pacientes com LMA, associando estes achados com características clínicas e laboratoriais, sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD). Foram identificadas mutações no *DNMT3A* em 27 pacientes (13%). Estas mutações foram associadas com leucocitose ($P=0,034$), no entanto, não afetaram o desfecho clínico dos pacientes (SG: 261 dias (IC95%: 1-670 dias; $P=0,13$); SLD: 182 dias (IC95%: 161–377 dias; $P=0,157$)). Além disso, mutações no *DNMT3A* não estão associadas com níveis diferenciais de expressão gênica ($P=1,000$). Em contrapartida, a baixa expressão do *DNMT3A* foi associada com uma menor SG ($P=0,044$). Em resumo, nossos dados sugerem que a baixa expressão do gene *DNMT3A* esteja associada ao pior desfecho clínico em pacientes com LMA.

Palavras-chave: Leucemia mielóide aguda. Marcador molecular. Epigenética. Prognóstico.

ABSTRACT

DNMT3A gene mutations were previously associated with poor clinical outcome in acute myeloid leukemia (AML). Several mutations have been described, most of them on arginine in position 882, located in exon 23. Interestingly, most of evidence associating *DNMT3A* mutations and clinical outcome in AML are from clinical trials, that reflect the profile of selected cohorts and therefore, which are not always trustworthy clues for decision-making therapy. To date, little is known about the clinical importance and the frequency of *DNMT3A* mutations in AML in a real life setting. Here, we performed *DNMT3A* screening mutation in exon 23 and its gene expression profile in 201 patients with AML, and associated these findings with clinical and laboratory characteristics, hematologic recovery, relapse, and survival. We identified *DNMT3A* mutations in 27 patients (13%). *DNMT3A* mutations were associated with higher white blood cell counts ($P=0.034$), but had no impact on clinical outcome (overall survival, OS: 261 days (IC95%: 1-670 days); $P=0.13$; disease-free survival, DFS: 182 days (IC95%: 161–377 days); $P=0.157$). *DNMT3A* mutations did not interfere in the gene expression levels ($P= 1.000$), although the lower *DNMT3A* gene expression had a negative impact on overall survival ($P= 0.044$). Taken together, our data suggest that lower expression of the *DNMT3A* gene is associated prognostic impact in AML.

Key words: Acute myeloid leukemia. Molecular marker. Epigenetic. Prognostic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5C	5-Citosina
5mC	5-Metilcitosina
ADD	ATRX-DNMT3-DNMT3L
Arg	Arginina
ASXL1	<i>Additional Sex Combs-Like 1</i>
C5	Carbono 5
CBF β	Fator de ligação nuclear β
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cDNA	DNA complementar
CEBPA	CCAAT / proteína potencializadora de ligação alfa
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
Ct	<i>Comparative Cycle Threshold</i>
Cys	Cisteína
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT's	DNA Metiltransferases
DNMT1	DNA Metiltransferase tipo 1
DNMT3A	DNA Metiltransferase tipo 3 α
DNMT3B	DNA Metiltransferase tipo 3 β
DNMT3L	DNA Metiltransferase tipo 3L

dNTP	Dinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
EXO1	Exonuclease I
FAB	<i>French-American-British</i>
	Fator estimulador de colônia de macrófagos- <i>like tyrosine kinase-</i>
FLT3	3
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
Hb	Hemoglobina
HDAC	Histona desacetilase
His	Histidina
HMT	Histona metiltransferase
HOX	<i>Homeobox</i>
HRM	<i>High-resolution Melting</i>
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IDH1	isocitrato desidrogenase 1
IDH2	isocitrato desidrogenase 2
IL3	Interleucina 3
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITD	<i>in tandem</i>
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i> (Gene)
H3K9me3	Trimetilação do resíduo lisina 9 da histona H3
LABCEN	Laboratório Central
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MLL	Leucemia de Linhagem Mista
MO	Medula óssea
MYH11	Miosina 11
NCBI	<i>National Centre for Biotechnological Information</i>
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
NHCL	Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial
NPM1	Nucleofosmina 1
OMS	Organização mundial de saúde
Pb	Par de Base
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RT	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
pH	Potencial Hidrogeniônico
PWWP	Prolina-Triptofano-Triptofano-Prolina
RC	Taxa de remissão completa
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA Mensageiro
Rpm	Rotações por Minuto
SAM	S- Adenosil-Metionina
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença

SMD	Síndrome mielodisplásica
SP	Sangue Periférico
TET2	TET metilcitosina dioxigenase 2
TR	Tempo de Recaída
TRC	Tempo de Remissão Completa

LISTA DE SÍMBOLOS

10^9 /L	Bilhão por litro
α	Alfa
β	Beta
G	Grama
Kb	Quilo base
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
M	Molar
Ng	Nanograma
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
%	Percentual
U	Unidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mutações-chave envolvidas na Leucemia Mielóide Aguda, demonstrando a complexidade de sua fisiopatologia.....	25
Figura 2 - Processo de metilação dos resíduos de citosina das ilhas CpG. A adição de um grupo metil para converter a citosina em 5-metilcitosina é catalisada pela DNA metiltransferase (DNMT). O grupo metil é doado pelo S-adenosilmetionina (SAM).	29
Figura 3 - Modelo de atividade da DNMT3A. A DNMT3A faz parte de um complexo proteico que está associado ao silenciamento de promotores gênicos. Além da DNMT3A, esse complexo engloba a histona metiltransferase (HMT), histona desacetilase (HDAC) e DNA metiltransferase	31
Figura 4 - Organograma da seleção de pacientes avaliados e selecionados para o estudo	35
Figura 5 - Esquema evidenciando critério de avaliação das mutações no éxon 23 do gene <i>DNMT3A</i> . Exemplificamos um caso em que há substituição de uma Arginina (R) por uma Histidina (H) no códon 882 (R882H), para a referida mutação o Poly-Phen sugere alta possibilidade de dano (Escore=0,651)	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da Organização Mundial de Saúde de 2008 para Leucemias Mieloides Agudas	27
Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na reação de sequenciamento do éxon 23 do <i>DNMT3A</i>	39
Tabela 3 - Proporções de reagentes utilizados para sequenciamento éxon 23 do <i>DNMT3A</i>	39
Tabela 4 - Mutações encontradas no éxon 23 do gene <i>DNMT3A</i> e a previsão de seus efeitos na atividade proteica.....	47
Tabela 5 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Leucemia Mielóide Aguda categorizados de acordo com o status mutacional do éxon 23 do gene <i>DNMT3A</i> e tipo de mutação encontrada	50
Tabela 6 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo categorizados de acordo com os níveis de expressão do gene <i>DNMT3A</i>	56
Tabela 7 - Análise univariada e multivariada da sobrevida global.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - (a) Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo não-promielocítica. (b) Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo não-promielocítica frente ao status mutacional do éxon 23 do gene <i>DNMT3A</i>	53
Gráfico 2 - (a) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo não-promielocítica. (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo não-promielocítica frente ao status mutacional do éxon 23 do gene <i>DNMT3A</i>	53
Gráfico 3 - (a) Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo e cariótipo normal frente ao status mutacional do éxon 23 do gene <i>DNMT3A</i> . (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo e cariótipo normal.....	54
Gráfico 4 - Comparação do nível total de expressão do gene <i>DNMT3A</i> entre indivíduos saudáveis, todos os pacientes com Leucemia Mielóide Aguda e subgrupos de risco citogenético.	54
Gráfico 5 - (a) Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo frente perfil de expressão do gene <i>DNMT3A</i> . (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo e cariótipo normal frente ao perfil de expressão do gene <i>DNMT3A</i>	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Leucemia mielóide aguda.....	23
2.1.1 Fisiopatologia da LMA	23
2.1.2 Diagnóstico e classificação da LMA.....	26
2.2 Epigenética nas neoplasias mielóides	28
2.2.1 O gene DNMT3A na leucemia mielóide aguda.....	30
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Aspectos éticos.....	34
4.2 Casuística	34
4.3 Variáveis.....	36
4.4 Análise hematológica e clínica	36
4.4.1 Coleta de dados e amostras	36
4.4.2 Diagnóstico de LMA	36
4.4.3 Desfecho	37
4.4.4 Critérios de inclusão e exclusão para a análise de sobrevida	37
4.5 Caracterização molecular dos pacientes com LMA	37
4.5.1 Extração do DNA genômico	37
4.5.2 Análise de mutações no DNMT3A por sequenciamento de Sanger	38
4.5.2.1 Montagem e avaliação dos contigs	40
4.5.3 Extração do RNA total.....	41
4.5.4 Síntese de DNA complementar	42
4.5.5 Avaliação da expressão do gene DNMT3A	43
4.6 Análises estatísticas	44
5 RESULTADOS.....	46

5.1 Frequência de mutação no éxon 23 do gene <i>DNMT3A</i> em pacientes com LMA de novo	46
5.2 Impacto das mutações no éxon 23 do gene <i>DNMT3A</i> no fenótipo clínico de pacientes com LMA de novo	48
5.3 Influência do <i>status</i> mutacional do éxon 23 do gene <i>DNMT3A</i> na sobrevida de pacientes com LMA de novo	52
5.4 Impacto da expressão diferencial do gene <i>DNMT3A</i> no fenótipo clínico de pacientes com LMA de novo	54
5.5 Influência do perfil de expressão do gene <i>DNMT3A</i> na sobrevida de pacientes com LMA de novo	58
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICE A - Publicação relacionada: <i>Clinical outcomes of patients with acute myeloid leukemia: evaluation of genetic and molecular findings in a real-life setting</i>	71
APÊNDICE B - Publicação relacionada: <i>Prognostic importance of CD56 expression in intermediate risk acute myeloid leukemia</i>	72
ANEXO A - Folha de rosto do comitê de ética	73

1 INTRODUÇÃO

Leucemia mieloide aguda corresponde a um conjunto de neoplasias hematológicas clonais, originadas a partir de um progenitor hematopoiético anômalo, que adquiriu progressivamente alterações genéticas ou epigenéticas importantes, levando à desregulação das vias de proliferação, morte celular e perda da capacidade de diferenciação. Como resultado, há um acúmulo de células leucêmicas (blastos) na medula óssea, prejudicando a hematopoiese normal. Ademais, estes blastos podem infiltrar-se em outros tecidos e órgãos, cujas funções são frequentemente comprometidas.

Estudos epidemiológicos sugerem que fatores genéticos, ambientais e ocupacionais estejam envolvidos na patogênese da LMA. Embora os mecanismos envolvidos neste processo não estejam completamente elucidados, sabe-se que o desenvolvimento do fenótipo leucêmico está associado ao acúmulo de alterações genéticas esporádicas que afetam fatores de transcrição mieloide, responsáveis por controlar a diferenciação hematopoiética e mutações ativadoras em intermediários da transdução de sinais, que conferem vantagens proliferativas e/ou de sobrevivência aos progenitores hematopoiéticos nos quais ocorrem.

Ainda que a LMA seja tratada como um conjunto de doenças, dentro desta entidade há uma ampla variedade morfológica, imunofenotípica, citogenética e molecular, as quais podem definir o curso clínico da doença. Neste sentido, a estratificação de risco para avaliação prognóstica das LMA é de extrema importância, uma vez que permite agrupar os pacientes com base no seu perfil de marcadores prognósticos, podendo, desta maneira, prever a evolução clínica dos pacientes e assim direcioná-los para o protocolo terapêutico específico. Dentre alguns fatores importantes na determinação prognóstica estão idade, contagem de leucócitos e de blastos ao diagnóstico, dificuldade de obter remissão completa e os achados citogenéticos e moleculares.

O estudo dos marcadores genéticos e dos seus impactos prognósticos permite o desenvolvimento de abordagens terapêuticas adaptadas ao risco, cujas chances de sucesso são potencialmente maiores. Os achados citogenéticos são de grande auxílio na avaliação prognóstica, visto que a detecção de alterações cromossômicas pode ser determinante no direcionamento terapêutico. Um exemplo disso é a t (15; 17), característica da leucemia promielocítica aguda, cujo tratamento específico com ácido

all-trans retinóico (ATRA) tem sido responsável pelos altos índices de sobrevida neste subtipo de LMA. Porém, nem todos os pacientes apresentam alterações citogenéticas. Cerca de 50% pacientes com LMA são categorizados como citogeneticamente normais e, portanto, enquadrados no grupo de risco intermediário, apesar da considerável heterogeneidade no comportamento da doença.

Os avanços no sequenciamento do genoma têm destacado mutações que são frequentemente encontradas nos pacientes com LMA que não possuem anormalidades cromossômicas detectáveis. Mutações em alguns genes como no gene da Nucleofosmina 1 (*NPM1*), do CCAAT / proteína potencializadora de ligação alfa (*CEBPA*) e do *FLT3* (FMS -fator estimulador de colônia de macrófagos- *like tyrosine kinase- 3*) foram incorporadas no modelo de estratificação prognóstica da *LeukemiaNet* e da Organização Mundial da Saúde. Mutações em outros genes em sendo reportadas pela literatura, porém a frequência e o significado prognóstico de muitas delas ainda é incerto.

A complexidade da patogênese atrelada ao desenvolvimento leucêmico tornou-se ainda maior com a descoberta de mutações em genes cruciais na regulação epigenética. Mutações em genes relacionados com a metilação do DNA tais como *DNMT3A*, *TET2* e *IDH1* e *IDH2*, têm sido reportadas numa parcela significativa dos pacientes com LMA. Particularmente, o gene *DNMT3A* (DNA Metil-transferase 3 alfa) apresenta-se mutado em aproximadamente 20% dos pacientes com LMA. Devido à sua marcante presença nas células tronco pré-leucêmicas, mutações neste gene foram apontadas como iniciadoras do processo leucêmico.

Mais da metade das mutações no gene *DNMT3A* ocorrem no éxon 23, sendo a maioria na posição da arginina 882. Apesar de sua importância e frequência na LMA, o significado prognóstico das mutações no *DNMT3A* ainda é incerto. Alguns estudos tem associado a presença de mutações no *DNMT3A* ao pior prognóstico em pacientes com LMA. No entanto, esses resultados são oriundos de coortes selecionadas e que por vezes, não refletem a realidade clínica.

Além da sua aparente relevância nos processos oncohematológicos, o gene *DNMT3A* tem ganhado destaque por possuir funções centrais na regulação da expressão gênica. Análises de metilação mostraram que mutações no *DNMT3A* estão associadas com alterações no padrão de metilação genômico, afetando a transcrição de genes cruciais no processo de controle do ciclo celular, diferenciação e comunicação celular. No entanto, pouco se sabe sobre a repercussão destas

mutações na expressão no próprio *DNMT3A*, nem se alterações na sua expressão são capazes de interferir no fenótipo clínico dos pacientes com LMA. Deste modo, nos propusemos a investigar o impacto das mutações no *DNMT3A* em pacientes com LMA, avaliando suas repercursões no perfil de expressão deste gene e no desfecho clínico dos pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leucemia mielóide aguda

As leucemias mielóides agudas constituem um grupo heterogêneo de doenças clonais da medula óssea que afetam progenitores hematopoiéticos, tornando-os incapazes de se diferenciarem terminalmente e de responderem aos reguladores naturais de proliferação e morte celular. Como consequência, essas células malignas (mieloblastos) se acumulam na medula e prejudicam a produção normal das células sanguíneas. Além disso, essas células também podem se acumular em outros tecidos e órgãos, cujas funções são frequentemente comprometidas (LOWENBERG et al. 1999; ESTEY; DÖHNER et al. 2006).

Ainda que as apresentações clínicas das LMAs sejam semelhantes, elas possuem diferentes características morfológicas, citogenéticas e imunofenotípicas, as quais definem curso clínico e resposta terapêutica heterogêneos. A perda de função e substituição das células normais da medula óssea resulta em anemia, trombocitopenia e diminuição da contagem de leucócitos normais, resultando sintomas característicos como: fraqueza, aparecimento de petéquias, sangramentos e dor óssea (DÖHNER et al. 2010).

A LMA representa o tipo mais comum de leucemia aguda em adultos, correspondendo a cerca de 90% dos casos (DORES et al. 2012). Nos Estados Unidos, estima-se uma incidência anual de 3,5 casos para cada 100.000 habitantes, o que a torna uma doença relativamente rara (DESCHLER; LUBBERT et al. 2006). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer Americano, 12.972 pessoas foram diagnosticadas com LMA entre 2003 e 2007. No mesmo período, 41.714 pessoas morreram em decorrência da doença. A incidência de LMA no Brasil ainda é desconhecida, uma vez que o Instituto Nacional do Câncer (INCA) relata apenas dados referentes às leucemias em geral. Um estudo desenvolvido no Rio Grande do Sul estimou a ocorrência de 1,11 casos/100.000 habitantes/ano (CAPRA et al. 2007).

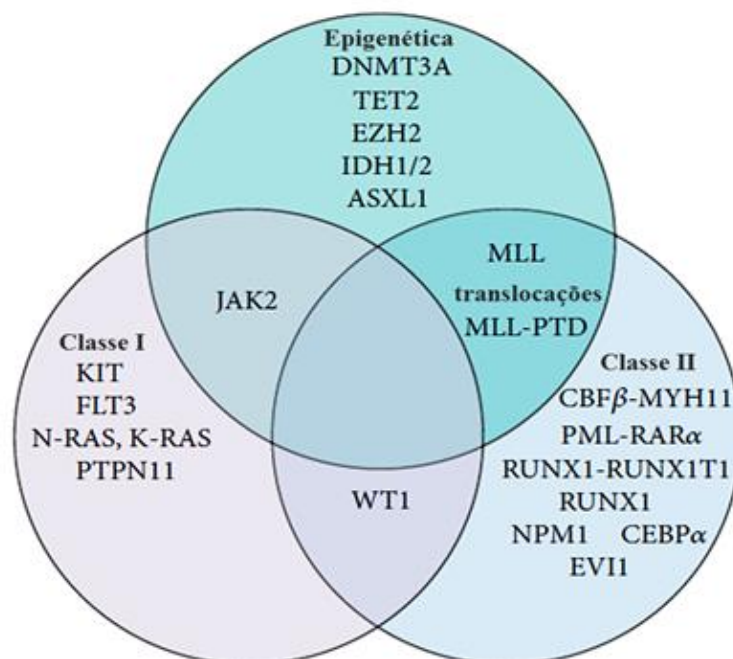
2.1.1 Fisiopatologia da LMA

Durante os últimos anos, houve um progresso notório na busca da elucidação da patogênese molecular da LMA. Trata-se de uma doença genética adquirida que está associada à ocorrência de alterações citogenéticas, mutações somáticas

recorrentes, mudanças na expressão gênica e na regulação epigenética (SANDERS; VALK, 2013). Acredita-se que a leucemogênese esteja associada ao acúmulo de modificações gênicas que conferem ao clone leucêmico vantagem proliferativa e perda da capacidade de resposta a sinais de diferenciação e morte celular (CONWAY O'BRIEN.; PRIDEAUX; CHEVASSUT, 2014).

Gilliland *et al.* apresentaram um modelo para explicar a patogênese da LMA, o chamado “*two hit*”. De acordo com o modelo proposto, o desenvolvimento da LMA é considerado um processo multipasso que requer a colaboração de ao menos duas classes de mutações. Mutações de classe I são aquelas envolvidas na desregulação da proliferação celular, evasão da apoptose, ativação constitutiva de receptores ou desregulação de moléculas das vias de transdução de sinal. Enquanto que mutações de classe II compreendem as translocações cromossômicas e afetam fatores de transcrição e proteínas envolvidas no controle transcricional, estando associadas com a perda da capacidade de diferenciação hematopoiética. Mutações que afetam os genes *FLT3*, *KIT* e os genes *RAS* são consideradas mutações de classe I, enquanto que alterações cromossômicas como *t(8;21)*, *inv(16)* e *t(15;17)* que geram, respectivamente, os rearranjos gênicos *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11* e *PML/RARA*, juntamente com as mutações nos genes *RUNX1*, *CEBPA* e *MLL* são consideradas integrantes da classe II (Figura 1). De acordo com esse modelo, o acúmulo de mutações de classe I e II culminaria no desenvolvimento de progenitores hematopoéticos transformados, capazes de propagar o fenótipo leucêmico (GILLILAND; GRIFFIN, 2002).

Figura 1 - Mutações-chave envolvidas na Leucemia Mielóide Aguda, demonstrando a complexidade de sua fisiopatologia.



Fonte: adaptado de CONWAY O'BRIEN, PRIDEAUX, CHEVASSUT, 2014.

Estudos recentes revelaram a presença de modificações epigenéticas no genoma de pacientes com LMA, sugerindo que as mutações de classe I e II sejam apenas parte de uma patogênese mais complexa. Mutações em genes relacionados a processos de controle epigenético do genoma, como a metilação do DNA e modificações das histonas estão presentes em uma parcela significativa dos pacientes com LMA (SINGH et al. 2012; KHASAWNEH; ABDEL-WAHAB, 2014; SHLUSH et al. 2014). Além de proporcionar maiores esclarecimentos acerca do processo leucêmico, a descoberta dessas alterações epigenéticas evidenciou um forte componente temporal na leucemogênese, denotando que as mutações ocorrem em um estágio do desenvolvimento celular específico, numa determinada ordem essencial para a transformação leucêmica (SHLUSH et al. 2014). Tomados os recentes avanços em consideração, percebe-se a necessidade de caracterizar essas novas mutações a fim de compreender a gênese da doença e ampliar as possibilidades de condução terapêutica.

2.1.2 Diagnóstico e classificação da LMA

O diagnóstico da LMA é feito a partir da observação do quadro clínico, caracterizado por fraqueza generalizada devido à anemia, febre em consequência de infecções ou não, petéquias e/ou outras manifestações hemorrágicas. Devido à intensa e descontrolada proliferação, pode haver infiltração leucêmica em outros órgãos, como fígado e baço, levando às organomegalias e outras complicações como hipertrofia gengival, dor óssea e infiltração cutânea. (DÖHNER et al. 2010)

No hemograma, ao diagnóstico, é frequente encontrar anemia normocítica e normocrômica, plaquetopenia, a contagem de leucócitos pode variar entre $<1.000/\mu\text{l}$ e $200.000/\mu\text{l}$, a contagem diferencial de leucócitos revela neutropenia e presença de blastos. De acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico de leucemia mieloide aguda, a contagem dos mieloblastos na medula óssea deve ser igual ou superior a 20%. Juntamente com o hemograma e mielograma, a citoquímica e a imunofenotipagem são essenciais para demonstrar a linhagem e diferenciação dos blastos, auxiliando no diagnóstico e na classificação do subtipo de LMA (BULLINGER; ARMSTRONG, 2010; Döhner et al. 2010).

A heterogeneidade das LMA motivou o estabelecimento de uma classificação e estratificação de risco (BULLINGER, ARMSTRONG, 2010). A primeira classificação foi realizada em 1976 pelo grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) baseada estritamente nos aspectos morfológicos e citoquímicos do clone leucêmico e assim, categorizou seis subtipos de LMA (M1 a M6) (BENNETT et al., 1976). Em 1985 essa classificação foi revisada, resultando na inclusão de dois novos subtipos (M0 e M7) aos seis existentes, cujo diagnóstico também passou a levar em consideração os marcadores imunofenotípicos (BENNETT et al., 1985; BENNETT et al., 1991) Apesar da sua relevância, a classificação FAB tornou-se obsoleta devido ao fato de não incorporar os achados citogenéticos e moleculares relevantes à fisiopatologia da doença, estando limitada no que concerne à biologia, determinação prognóstica e terapêutica.

Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou uma nova classificação para as LMA, incorporando os achados citogenéticos. Nesta classificação, as LMA foram divididas em quatro categorias: LMA com anormalidades genéticas repetitivas, LMA com displasia de múltiplas linhagens, LMA associada a tratamento prévio e LMA não categorizada nos itens anteriores, esta última sendo

baseada na classificação FAB (VARDIMAN, HARRIS, BRUNNING, 2002). No entanto, esse sistema logo se tornou insatisfatório, pois em cerca de 50% dos casos não é possível identificar nenhuma anormalidade citogenética, sendo esse grupo definido como citogeneticamente normal (LMA-CN) (ESTEY; DÖHNER et al. 2006).

Tabela 1 - Classificação da Organização Mundial de Saúde de 2008 para Leucemias Mieloides Agudas

LMA com anormalidades genéticas repetitivas

LMA com t(8;21)(q22;q22); (*RUNX1-RUNX1T1*)

LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16) (p13.1;q22); (*CBFB-MYH11*)

Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); (*PML-RARA*)

LMA com t(6;9)(p23;q34); (*DEK-NUP214*)

LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2); (*RPN1-EVI1*)

LMA com t(1;22)(p13;q13); (*RBM15-MKL1*)

Subtipo provisório: LMA com mutação *NPM1*

Subtipo provisório: LMA com mutação *CEBPA*

LMA relacionada com mudanças mielodisplásicas

Neoplasma mielóide relacionado à terapia

LMA não categorizado nos itens anteriores

LMA com diferenciação mínima

LMA sem maturação

LMA com maturação

Leucemia mielomonocítica aguda

Leucemia monoblástica e monocítica aguda

Leucemias eritróides agudas

Leucemia eritróide pura

Eritroleucemia, mielóide/eritróide

Leucemia megacarioblástica aguda

Leucemia basofílica aguda

Pan-mielose aguda com mielofibrose

Sarcoma mielóide

Proliferação mielóide relacionada à Síndrome de Down

Mielopoesse anormal transitória

Leucemia mieloide associada com a Síndrome de Down

Fonte: Adaptado de VARDIMAN et al. 2009

Diversas anormalidades genéticas têm sido identificadas nos pacientes com LMA. Trata-se de mutações ou alterações na expressão de alguns genes, que estão associados à leucemogênese e à resposta clínica ao tratamento (SCHLENK et al.

2008; WAKITA et al. 2013). Esses marcadores, juntamente com as alterações cromossômicas, auxiliam em uma melhor caracterização e refinamento da estratificação de risco dos pacientes com LMA. Dentre eles estão mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *CEBPA* (DÖHNER et al. 2010).

Diante disso, a Organização Mundial de Saúde revisou a classificação de 2001 e, em 2008, lançou um novo sistema, que corresponde ao atualmente utilizado. Essa classificação destacou a importância da associação dos achados citogenéticos aos moleculares no diagnóstico e categorização dos subtipos. Além disso, ampliou o número de subtipos com translocações cromossômicas recorrentes, refinou o diagnóstico de LMA associado à mielodisplasia e passou a classificar separadamente as proliferações mielóides relacionadas à Síndrome de Down (tabela 1) (VARDIMAN et al. 2009).

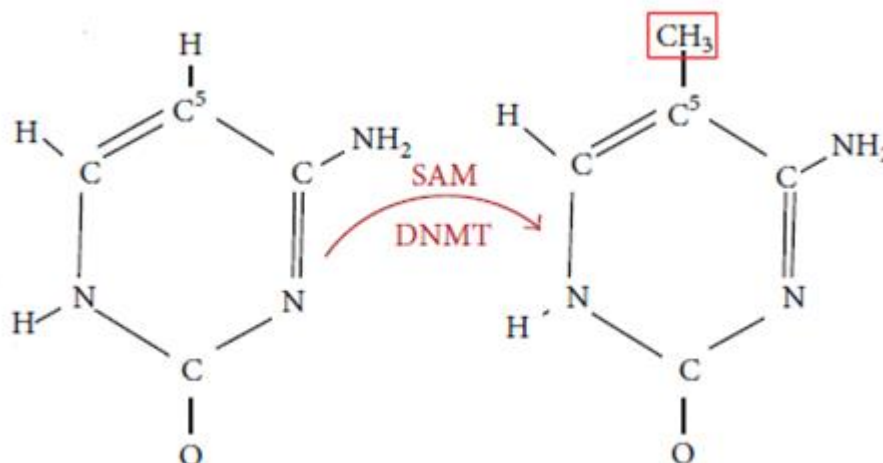
2.2 Epigenética nas neoplasias mielóides

Regulação epigenética refere-se à modulação da transcrição e expressão gênica sem alteração na sequência de nucleotídeos. As modificações epigenéticas podem ser transitórias ou fisiologicamente irreversíveis e são fundamentais para o desenvolvimento embrionário. Os principais mecanismos epigenéticos são a metilação de promotores e modificações nas histonas (CONWAY O'BRIEN, PRIDEAUX, CHEVASSUT, 2014). Tais alterações podem causar impacto significativo na estrutura da cromatina e na atividade transcricional, levando a modificações no padrão de expressão gênica (QU Y et al. 2014).

A metilação do DNA é uma modificação epigenética importante e intimamente relacionada ao controle da expressão de alguns genes, estando associada à compactação da cromatina e ao silenciamento gênico. O padrão de metilação é crucial para o desenvolvimento embrionário, *imprinting* parental e inativação do cromossomo X (PORTELA; ESTELLER et al. 2010).

O processo de metilação do DNA consiste na adição de grupos metil na posição C5 do anel pirimídico da citosina, convertendo 5-citosina (5C) a 5-metilcitosina (5mC). Essa reação ocorre quando citosina é seguida por guanina (dinucleotídeo CpG), sendo catalisada por metiltransferases do DNA (DNMTs) e tendo S-adenosil-metionina (SAM) como doador de grupos metil (Figura 2) (CONWAY O'BRIEN, PRIDEAUX, CHEVASSUT, 2014; IM et al. 2014).

Figura 2 - Processo de metilação dos resíduos de citosina das ilhas CpG. A adição de um grupo metil para converter a citosina em 5-metilcitosina é catalisada pela DNA metiltransferase (DNMT). O grupo metil é doado pelo S-adenosilmetionina (SAM).



Fonte: adaptado de CONWAY O'BRIEN, PRIDEAUX, CHEVASSUT, 2014.

Regiões ricas em dinucleotídeos CpG (chamadas ilhas CpG) encontram-se associadas a regiões promotoras em aproximadamente 50% dos genes em humanos, sobretudo aqueles relacionados a diferenciação tecidual e ao desenvolvimento (PORTELA; ESTELLER et al. 2010). Em células normais, apenas os dinucleotídeos CpG que não compõem ilhas CpG (presentes ao longo do gene e fora de regiões promotoras) encontram-se metilados, levando à inibição da transcrição críptica e manutenção da estabilidade genômica. Em células cancerosas, há hipometilação global do genoma e hipermetilação de ilhas CpG em promotores gênicos. Esses padrões aberrantes de metilação promovem instabilidade genômica e silenciamento de genes importantes na diferenciação e no controle do ciclo celular (BONIFER; BOWENM, 2010).

Diversos genes envolvidos em diferentes vias de sinalização celular têm sido descritos como afetados por metilação associada ao silenciamento transcrricional em desordens hematopoéticas (MELDI et al. 2014). Mutações nos genes *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* e *TET2* foram associadas com resposta eficaz diante da combinação de agentes demetilantes com a quimioterapia padrão em pacientes refratários (TRAINA et al.,

2014). Porém, o mecanismo biológico exato que justifica esta associação ainda não é inteiramente compreendido.

2.2.1 O gene *DNMT3A* na leucemia mielóide aguda

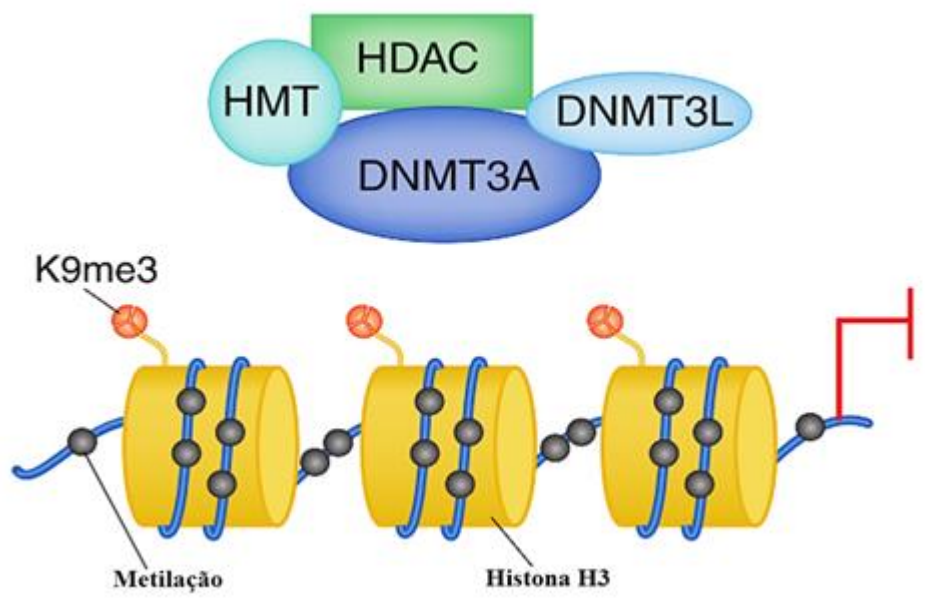
O gene *DNMT3A* está localizado no cromossomo 2p23 e codifica uma proteína membro família de enzimas denominadas DNA metiltransferases, sendo umas das principais enzimas envolvidas na metilação do DNA (GAIDZIK et al. 2013).

A família das DNA metiltransferases, que catalisam essas modificações e as controlam em diferentes níveis na célula, é composta por três membros: DNMT1, DNMT3A, e DNMT3B. A DNMT1 é considerada uma metiltransferase de manutenção porque se localiza próxima a loci de replicação e apresenta uma afinidade maior (de 7 a 21 vezes) por substratos hemimetilados, comparando-se com substratos não metilados (XIE, S. et al. 1999). Já as DNMT3A e DNMT3B, são essenciais para o desenvolvimento embrionário e apresentam afinidades a substratos não metilados, formando novos padrões específicos de metilação em uma fita de DNA sem a necessidade de qualquer modelo (GAIDZIK et al. 2013).

Sabe-se que mutações e expressão alterada das DNMTs podem modificar o padrão normal de metilação do DNA. Por um lado, a expressão reduzida de DNMTs pode resultar em hipometilação global que está associada a instabilidade genética característica de células neoplásicas (PORTELA; ESTELLER et al. 2010). Em contrapartida, a expressão aumentada das DNMTs no câncer pode cooperar para o silenciamento epigenético de genes supressores tumorais (CONWAY O'BRIEN, PRIDEAUX, CHEVASSUT, 2014).

A proteína DNMT3A é constituída de uma porção N-terminal que contém uma região rica em cisteína chamada domínio ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L). O domínio ADD adiciona íons zinco e constitui uma plataforma de interação entre proteínas que interagem com a histona H3 e auxiliam a guiar a metilação do DNA em resposta a modificações específicas nas histonas. A proteína DNMT3A possui também um domínio PWWP (prolina-triptofano-triptofano-prolina), que é o alvo da enzima para o ácido nucleico, e uma porção C-terminal que contém os sítios conservados C5 metiltransferases do DNA (domínio metiltransferase) (Figura 3) (SHAH; LICHT, 2011).

Figura 3 - Modelo de atividade da DNMT3A. A DNMT3A faz parte de um complexo proteico que está associado ao silenciamento de promotores gênicos. Além da DNMT3A, esse complexo engloba a histona metiltransferase (HMT), histona desacetilase (HDAC) e DNA metiltransferase.



Fonte: adaptado de SHAH; LICHT, 2011.

A participação do gene *DNMT3A* na hematopoese normal foi evidenciada em estudos utilizando modelos murinos. Em células progenitoras hematopoéticas que tiveram o gene *DNMT3A* silenciado, observou-se aumento da expressão de genes envolvidos com a capacidade de autorrenovação e concomitante redução da expressão de genes responsáveis pela diferenciação celular. Células hematopoéticas silenciadas para o gene *DNMT3A* exibiram hipometilação global e silenciamento ineficaz dos genes responsáveis pelo fenótipo pluripotente (CHALLEN et al. 2012).

Mutações no gene *DNMT3A* foram descritas como recorrentes em pacientes com LMA, indicando uma importante participação deste na gene hematopoese normal e neoplásica (TIE et al. 2014). Ley e colaboradores identificaram mutações no *DNMT3A* em 62 (22,1%) de 281 pacientes com LMA, onde a maior parte presentes nos pacientes com perfil citogenético de risco intermediário (33,7%), e 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 as mutações (12,3 meses em comparação a 41,1 meses) (LEY et al. 2010). Estes resultados sugerem que as mutações no gene *DNMT3A* estão

independentemente associadas a um pior prognóstico, sendo frequentes em pacientes com cariótipo normal, os quais possuem uma resposta variável ao tratamento, indicando que a identificação de tais mutações clinicamente seja relevante.

A maioria das mutações descritas no gene *DNMT3A* ocorre no domínio metiltransferase da proteína, localizado no éxon 23, onde aproximadamente metade destas acontece especificamente na posição da arginina 882 (Arg882 ou R882) (IM et al. 2014). Outro fato importante é que a mutação *DNMT3A* Arg882 parece ocorrer exclusivamente em heterozigose, sugerindo ganho de função (SHAH; LICHT et al. 2011). O estudo enzimático de proteínas purificadas selvagens e mutantes para *DNMT3A* de *Escherichia coli* demonstrou que, comparados ao selvagem, mutantes Arg882 possuem atividade de metilação reduzida. Estudos com células 32D, uma linhagem celular mielóide murina dependente de interleucina-3 (IL3), demonstraram que o aumento da expressão de mutantes Arg882His e Arg882Cys promoveu a proliferação celular mesmo na ausência de IL-3. O mesmo estudo comparou o padrão de expressão gênica entre amostras de seis pacientes com LMA portadores da mutação Arg822 e quatro pacientes sem mutação, através de microarranjos de DNA. A análise do microarranjo revelou um aumento na expressão de genes da família *HOX* e *IDH* em indivíduos com a mutação, sugerindo que mutações no gene *DNMT3A* estejam fortemente envolvidas na alteração de importantes componentes da patogênese da LMA (YAN et al. 2011).

Estudos recentes têm associado à mutação Arg882 no gene *DNMT3A* com elevada contagem de leucócitos e de blastos na medula óssea, além de menores taxas de remissão completa e menor sobrevida global e sobrevida livre de doença (IBRAHEM et al., 2015; LOGHAVI et al., 2014; PLØEN et al., 2014). Apesar do impacto negativo do *status* mutacional do gene *DNMT3A* na LMA ter ganhado destaque, a expressão de *DNMT3A* em neoplasias mielóide foi pouco estudada até o momento e portanto, seu impacto na doença permanece obscuro.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar pacientes adultos com leucemia mielóide aguda de novo de acordo com mutações e níveis de expressão do gene *DNMT3A*, e correlacionar esses achados com características clínicas e laboratoriais e com o desfecho clínico (remissão completa, sobrevida global e recaída) dos pacientes.

3.2 Objetivos específicos

- 1.** Determinar a frequência de mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A*;
- 2.** Classificar os tipos de mutações somáticas encontradas no éxon 23 do gene *DNMT3A*;
- 3.** Determinar os níveis de expressão do gene *DNMT3A*;
- 4.** Categorizar os pacientes de acordo com a presença de mutações (mutado *versus* não mutado), associando esses achados com o desfecho clínico e características clínicas e laboratoriais;
- 5.** Investigar a influência das mutações no *DNMT3A* na sua expressão;
- 6.** Avaliar a aplicabilidade da pesquisa de mutações Arg882 no gene *DNMT3A* como marcador prognóstico no contexto de vida real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente trabalho é parte de um projeto maior, que objetiva a caracterização de alterações moleculares em LMA, e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/CCS/UFPE) (anexo I). Após a aprovação, foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Todos os pacientes envolvidos foram orientados sobre a proposta do projeto e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo II). A fundação de Hematologia de Pernambuco (HEMOPE) e o Hospital do Câncer de Pernambuco foram incluídas no presente trabalho como instituições co-participantes, uma vez que suas colaborações permitiram a obtenção dos pacientes.

4.2 Casuística

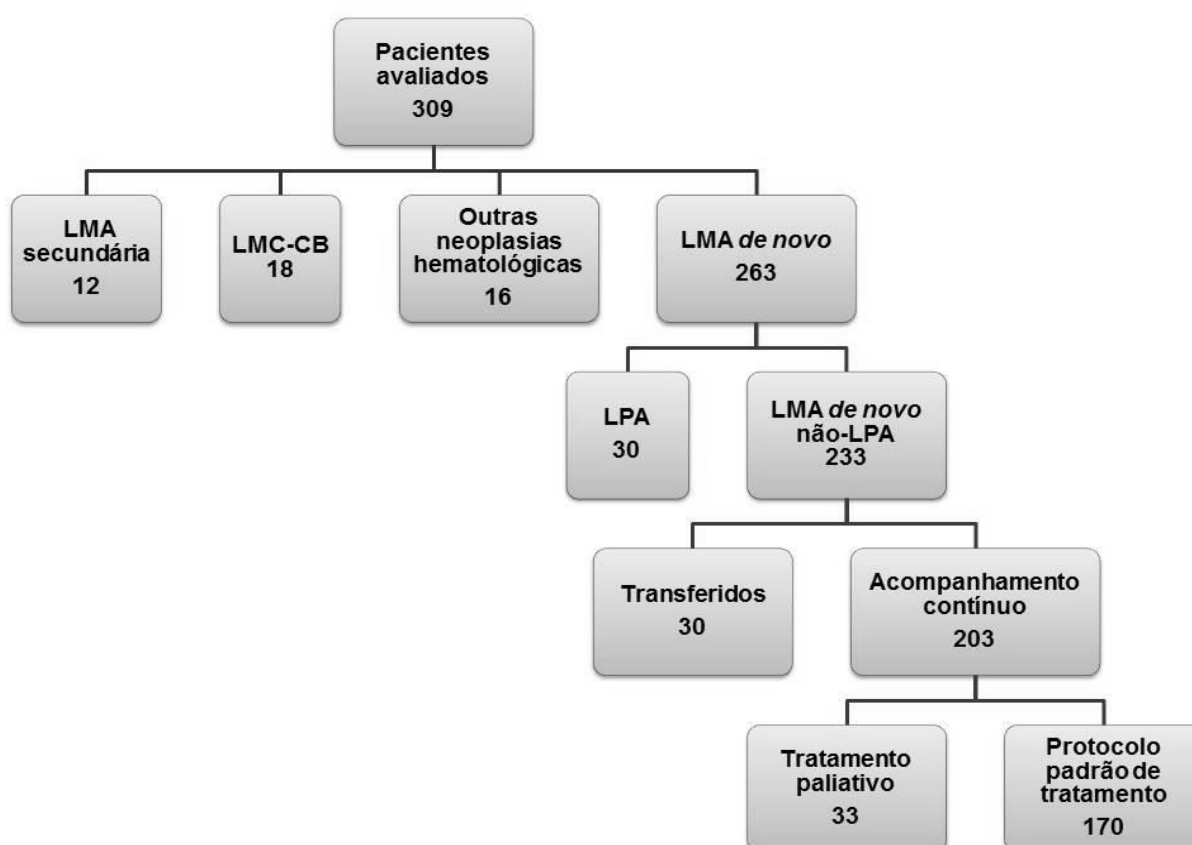
O estudo é do tipo coorte com comparação de grupos internos, realizado pelo Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas (NHCL LabCen/CCB/UFPE). Todos os pacientes incluídos no presente estudo foram diagnosticados e tratados no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE ou no Hospital do Câncer de Pernambuco, Recife-PE, no período de janeiro de 2010 a julho de 2016.

Os critérios de exclusão empregados foram: pacientes pediátricos, ausência de dados para diagnóstico de LMA (segundo critérios preconizados pela OMS apresentados previamente durante a revisão bibliográfica), casos de outras neoplasias hematológicas, casos de LMA secundária a neoplasia mieloproliferativa/mielodisplásica, ou ainda indisponibilidade ao acesso dos prontuários dos pacientes para uma caracterização clínica e laboratorial da doença. Por ser considerada uma entidade com características e tratamento próprio, pacientes com LPA também foram excluídos das análises.

Foram avaliados 309 pacientes adultos com suspeita de LMA, destes, 12 (3,9%) foram diagnosticados com LMA secundária à neoplasia mieloproliferativa ou síndrome mielodisplásica, 263 (85,1%) com LMA *de novo*, 18 (5,8%) com leucemia

mielóide crônica em crise blástica (LMC/CB) e 16 (5,2%) com outras patologias hematológicas hematológicas (leucemia linfóide aguda, leucemia mioelomonocítica crônica). Desses 263 pacientes adultos com LMA de novo 30 (11,4%) tinham sido diagnosticados com leucemia promielocítica aguda (LPA) e 233 (88,6%) com LMA *de novo* não-LPA. A figura 4 ilustra de forma detalhada esses resultados.

Figura 4 - Organograma da seleção de pacientes avaliados e selecionados para o estudo



Dentre os 233 pacientes com LMA, 30 (12,8%) foram transferidos para outros hospitais após o diagnóstico e, portanto perderam seguimento, foram excluídos do presente estudo. Os outros 203 (87,1%) pacientes deram seguimento ao tratamento e acompanhamento nos centros hospitalares aos quais o projeto está vinculado. Dentre estes pacientes acompanhados continuamente, 170 (83,8%) foram submetidos ao protocolo de tratamento padrão e 33 (16,2%) receberam tratamento paliativo (objetivando redução da leucometria).

Das 203 amostras de pacientes com LMA *de novo* não-LPA acompanhados na Fundação HEMOPE e no Hospital do Câncer de Pernambuco, 201 (99%)

apresentavam material genético (DNA genômico) com qualidade e disponibilidade satisfatória para a pesquisa de mutações no gene *DNMT3A*. Duas amostras (1%) não possuíam qualidade satisfatória para serem utilizadas no sequenciamento.

4.3 Variáveis

As variáveis analisadas ao diagnóstico foram: idade; sexo; subtipo de LMA com base em critérios FAB e OMS; dados do hemograma (leucometria, contagem de plaquetas e níveis de hemoglobina); percentual de blastos na medula óssea (MO); achados citogenéticos ao diagnóstico; rearranjos moleculares; mutações ITD do gene *FLT3* e mutações no gene *NPM1* e mutações no gene *DNMT3A*. Para a análise de sobrevida foram avaliadas a sobrevida global (SG), a sobrevida livre de doença (SLD) e a taxa de remissão completa (RC).

4.4 Análise hematológica e clínica

4.4.1 Coleta de dados e amostras

O material utilizado na pesquisa foi o mesmo encaminhado aos laboratórios de rotina para fins diagnósticos, não sendo necessária coleta adicional nos pacientes. Foi utilizado o material proveniente do aspirado de medula óssea (MO) anticoagulado em EDTA. Parte dos dados clínicos e demográficos dos pacientes foram obtidos por meio da análise de prontuário, sempre levando em consideração os resultados do diagnóstico.

4.4.2 Diagnóstico de LMA

O diagnóstico da doença foi estabelecido com base em achados clínicos e laboratoriais de acordo com critérios estipulados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (VARDIMAN et al., 2009). De acordo com a OMS, para que seja fechado o diagnóstico de uma leucemia aguda, é necessária contagem de blastos na medula óssea e/ou sangue periférico igual ou superior a 20%. Assim, os pacientes foram diagnosticados com base em critérios morfológicos, citoquímicos, imunofenotípicos e achados citogenéticos e/ou detecção dos rearranjos moleculares *PML/RARA*, *CBFB/MYH11* e *AML1/ETO*. Salientando que na presença dos rearranjos gênicos

supracitados a contagem igual ou superior a 20% de blastos na medula óssea e/ou sangue periférico não é necessária para o diagnóstico.

4.4.3 Desfecho

Os pacientes vivos foram censurados em julho de 2016 e, os demais cujo seguimento foi perdido e/ou foram submetidos a transplante de medula óssea, foram censurados na última data em que sabidamente estavam vivos ou na data do transplante. Taxa de remissão completa (RC) corresponde ao percentual de pacientes que entraram em remissão após um ou dois ciclos de quimioterapia de indução. Esta remissão foi atestada com aspirados de medula óssea “normocelulares”, ou seja, aqueles que se apresentaram com menos de 5% de blastos na medula óssea e com evidências de maturação normal dos outros elementos após três semanas do final da indução. Sobrevida global (SG) refere-se ao tempo compreendido entre o diagnóstico e o óbito/censura. Sobrevida livre de doença (SLD) é o tempo entre a remissão completa e o primeiro evento (recaída ou óbito) ou censura.

4.4.4 Critérios de inclusão e exclusão para a análise de sobrevida

Foram incluídos na análise de sobrevida 144 pacientes com LMA de novo não-LPA, tratados e acompanhados na Fundação HEMOPE e do Hospital do Câncer de Pernambuco que receberam terapia de indução segundo protocolo padrão preconizado tanto pelo Ministério da Saúde (portaria nº 705, de 12 de agosto de 2014) quanto pela OMS. Este protocolo é conhecido como “3+7” e consiste na administração de antraciclina (daunorrubicina ou idarrubina ou mitoxantrona) durante três dias, seguidos de administração de citosina arabinosídeo durante sete dias.

Foram excluídos dessas análises pacientes que receberam outro tipo de tratamento (tratamento paliativo) ou que foram tratados e acompanhados em outros hospitais. Além disso, também foram excluídos os pacientes para os quais não foi possível determinar o *status* mutacional do éxon 23 do gene *DNMT3A*.

4.5 Caracterização molecular dos pacientes com LMA

4.5.1 Extração do DNA genômico

Para o estudo das mutações no gene *DNMT3A*, foi realizada a extração do DNA genômico (DAVIS et al. 1986) a partir do material excedente proveniente do diagnóstico do paciente.

Resumidamente, as amostras de MO foram submetidas a lise dos eritrócitos com auxílio de uma solução hipotônica (NH_4Cl 0,144M e NH_4HCO_3 0,01M), seguido de centrifugação a 1.200rpm por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, uma solução de lavagem (TKM1, Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 10 μL de Triton X-100. Após homogeneização e centrifugação a 1.200rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, um precipitado de leucócitos. A este precipitado foi adicionado 400 μL da solução de lise de leucócitos (TKM2, Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; NaCl 0,4M; EDTA 20mM) e 25 μL de SDS 10%, em seguida foi incubado à 55°C durante 45 minutos. Após esse período, 180 μL de NaCl 5M foram adicionados e a solução mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, esse material foi centrifugado a 14.000rpm por 5 minutos e o sobrenadante recuperado e transferido para um novo microtubo.

Em seguida, foi adicionando 400 μL de fenol tamponado e 400 μL de uma solução SEVAG, composta de 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico, seguido de homogeneização e centrifugação a 14.000rpm por 5 minutos. Mais uma vez o SEVAG foi misturado ao sobrenadante para última separação, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Neste novo microtubo, foram adicionados acetato de sódio 3M pH5,2 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (*NanoDrop Technologies*, EUA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1%.

4.5.2 Análise de mutações no *DNMT3A* por sequenciamento de Sanger

A pesquisa das mutações do gene *DNMT3A* foi realizada por sequenciamento direto dos produtos de PCR. Os *primers* utilizados na pesquisa foram descritos na tabela 2. O objetivo foi pesquisar a presença de mutações no éxon 23, visto que mais da metade das mutações no gene *DNMT3A* ocorre nesta região, sendo estas descritas na literatura como mutações clinicamente relevantes.

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na reação de sequenciamento do éxon 23 do *DNMT3A*

Primer	Sentido	Sequência
DNMT3A seq FW	→	5'-GTGTGGTTAGACGGCTTCC-3'
DNMT3A seq RV	←	5'-CTCTCCCACCTTTCCTCTG-3'

Legenda: (→) sense; (←) antisense

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando o MasterMix GoTaq® (Promega, EUA) e avaliadas em gel de agarose a 1%. Antes de submeter os produtos de PCR à reação de sequenciamento, estes foram purificados utilizando o *mix* de enzimas Exo-Sap IT® (USB Laboratories, EUA) composto por Exonuclease I e SAP (*Shrimp Alkalyne Phosphatase*). A química utilizada para o sequenciamento foi a do kit *BigDye Cycle Sequencing®* (Applied BioSystems, EUA), utilizando o protocolo descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Proporções de reagentes utilizados para sequenciamento éxon 23 do *DNMT3A*

Reagente	Volume (µL)
Produto de PCR purificado	5,0
Tampão de sequenciamento (5x)	2,0
<i>BigDye Premix®</i>	0,5
<i>Primer</i> (5pmol)	1,0
Água ultrapura	1,5

A precipitação da placa utilizou o protocolo EDTA-acetato de sódio-etanol, a partir do qual os produtos provenientes da reação de sequenciamento foram precipitados utilizando 2µL de acetato de sódio 3M pH5,2, 2µL de EDTA 125mM e 50µL de etanol 100% gelado e centrifugados a 2250g por 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado com *spin* da placa invertida a 180g por 1 minuto. Os produtos foram lavados com etanol 70% gelado e centrifugados novamente a 2250g por 15 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, os produtos foram ressuspensos em *Hi-Di® Formamide* (Applied BioSystems, EUA) no momento da injeção.

O sistema automático utilizado foi o *3500 XL Genetic Analyzer®* (Applied BioSystems, EUA). Ao menos duas sequências de cada conjunto de *primers* para

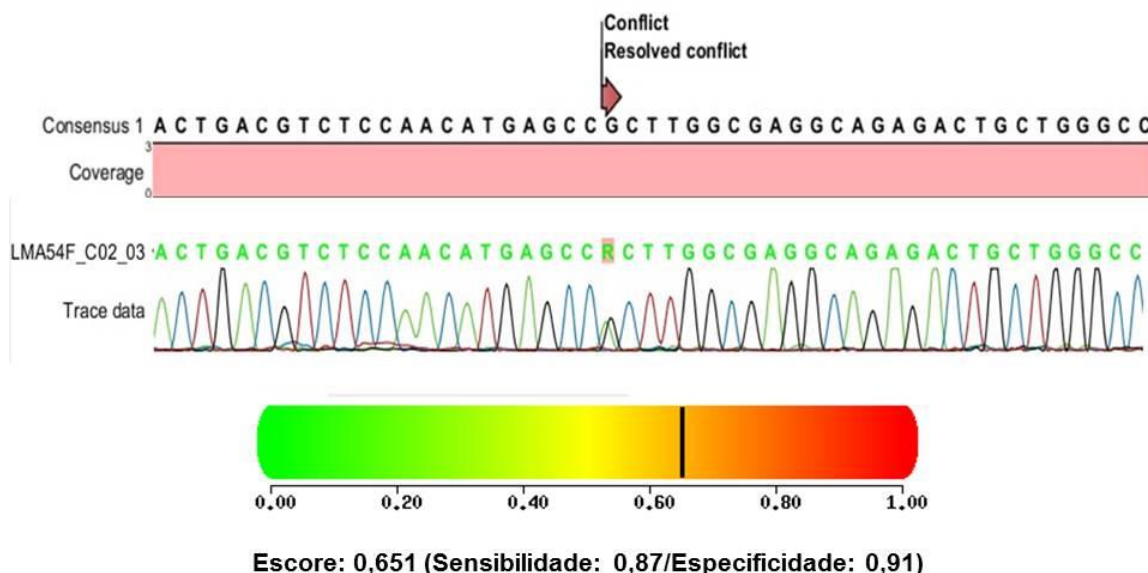
cada paciente foram produzidas, obtendo deste modo as sequências referentes às fitas molde e complementar.

4.5.2.1 Montagem e avaliação dos contigs

Após confirmação da qualidade das sequências, estas foram comparadas com a sequência de referência (NG_029465.2) referendada pelo *NCBI* (do inglês, *National Centre for Biotechnological Information*). O alinhamento das sequências (*contigs*) foi montado e avaliado utilizando o *Software CLC MainWorkBench® 6.9.1*. O mesmo programa foi utilizado para identificar as consequências das variações identificadas.

Após identificação das alterações, estas foram classificadas nos seguintes tipos: silenciosas (sem alteração na sequência de aminoácidos), *missense* (com substituição de aminoácidos), *nonsense* (com inserção de códons de parada prematuros) e *frameshift* (em que há alteração na matriz de leitura proveniente de inserções e/ou deleções). Em seguida, utilizamos do *software PolyPhen-2* para prever o grau de comprometimento funcional ocasionado pelas mutações encontradas. Este *software* classifica as alterações encontradas de acordo com a sua repercussão na atividade proteica, separando em três tipos: provavelmente prejudicial, possivelmente prejudicial, ou benigna. O escore gerado é a probabilidade da substituição de aminoácidos ser prejudicial e a confiança da previsão é dada pela sensibilidade e especificidade. O efeito prejudicial previsto também é indicado por um marcador preto vertical dentro de uma barra de gradiente de cor, onde o verde é benigno e vermelho é prejudicial (Figura 5).

Figura 5 - Esquema evidenciando critério de avaliação das mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A*. Exemplificamos um caso em que há substituição de uma Arginina (R) por uma Histidina (H) no códon 882 (R882H), para a referida mutação o Poly-Phen sugere alta possibilidade de dano (Escore=0,651)



4.5.3 Extração do RNA total

O RNA total das amostras foi extraído utilizando reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), que consiste numa solução monofásica à base de fenol e isotiocianato de guanidina, que deriva de uma modificação do método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (PUISSANT; HOUDEBINE,1990).

As amostras foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos para separar as células do plasma, que foi descartado. O precipitado celular foi transferido para um tubo tipo Falcon de 50mL, estéril e livre de RNase, em que foram acrescentados 35mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos, composto de nove partes de cloreto de amônio e uma parte de bicarbonato de amônio, seguindo-se uma incubação em gelo por 20 minutos. O lisado celular foi então centrifugado a 3.000 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) de leucócitos foi finalmente ressuspensionado em 1mL de salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffer Saline* -

PBS) [1x]. A partir dessa ressuspensão foram feitas alíquotas em tubos tipo *Eppendorf* de 1.500µl, livres de RNase, aos quais foi adicionado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), numa proporção de 3 partes de Trizol para 1 parte de células. Nessa etapa, se faz necessária uma homogeneização com o auxílio de pipeta, para que o Trizol promova a lise dos leucócitos e dissolução dos componentes celulares, enquanto mantém a integridade do RNA.

Após um período de incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, foram acrescentados 200µl de clorofórmio (MERCK, EUA) aos tubos, seguindo-se agitação intensa em vórtex por 15 segundos, incubação por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 15 minutos. A adição do clorofórmio, seguida de centrifugação, separa a solução em uma fase orgânica e outra aquosa, sendo esta última a fase em que o RNA total permanece exclusivamente. Esta fase aquosa foi então transferida para tubos novos de 1.500µl livres de RNase e o RNA total foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico. Após centrifugação a 12.000 x g a 4°C por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado a 10.000 x g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* posto para secar à temperatura ambiente. Finalmente, o *pellet* foi ressuspendido em água destilada e deionizada, tratada com o inibidor de RNase dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (SIGMA, EUA), o RNA foi quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (*NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington*) e conservado em freezer -80°C até o momento do uso.

4.5.4 Síntese de DNA complementar

Uma vez extraído e quantificado, o RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) com o kit *High-Capacity cDNA Archive* (*Applied Biosystems*, EUA). As reações ocorreram em volumes de 25µl, contendo um micrograma de RNA total, 2,5µl de 10x RT *Buffer*, 1µl de 25x dNTP *mixture*, 2,5µl 10x *Random Primers*, 1,25µl de *MultiScribe RT* (50U/µl), 0,65µl de *RNasin® Plus RNase Inhibitor* (Promega, EUA) e H₂O deionizada tratada com DEPC 0,1% (SIGMA, EUA) suficiente para completar o volume final. As reações ocorreram durante 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 segundos a 85°C.

4.5.5 Avaliação da expressão do gene *DNMT3A*

Para avaliar a expressão do gene *DNMT3A*, foram utilizadas 85 amostras de pacientes com LMA *de novo* não-LPA, das quais conseguiu-se obter RNA total. Além disso, também foram utilizadas 12 amostras de indivíduos saudáveis (controle normal). Realizamos o PCRq (*Real-Time Quantitative PCR*) para determinar a expressão gênica, onde cada amostra foi avaliada para os genes alvo e o controle endógeno.

Neste método, o número de cópias amplificadas de um dado gene é proporcional à fluorescência quantificada pelo aparelho, oriunda da liberação e ativação de um fluorocromo ligado à sonda específica para o gene de interesse (método *Taqman*®). Para tanto, são utilizadas sondas acopladas a dois fluorocromos diferentes em cada uma das extremidades. Na extremidade 5' existe um doador de elétrons chamado repórter e na extremidade 3' um receptor denominado de *quencher*. Quando a sonda encontra-se intacta, a proximidade entre os dois fluorocromos induz a uma supressão da fluorescência por meio de um fenômeno de transferência de energia conhecido como FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transference*). Durante a reação de PCRq propriamente dita, a sonda é degradada pela atividade exonuclease da enzima Taq polimerase, o que faz com que ocorra uma separação física entre os dois fluorocromos, permitindo, desta forma, a emissão de fluorescência pelo repórter. Esta fluorescência é proporcional à quantidade de sonda degradada e, conseqüentemente, proporcional ao produto de PCR formado ao longo da reação, permitindo assim, uma análise em “tempo real” da reação.

Para realização deste ensaio, todas as amostras foram processadas em duplicatas em placas de 96 poços. A amplificação foi realizada em volume final de 20 µl, utilizando 5µl do cDNA diluído 5 vezes, 10µl do reagente 2X *TaqMan*® *Universal Master Mix* (*Applied BioSystems*, EUA) e 1µl de cada sonda para os genes analisados (*DNMT3A* e *GAPDH*). As sondas utilizadas na determinação do padrão de expressão gênica do *DNMT3A* foram sintetizadas pelo sistema *TaqMan*® *Gene Expression - Assay-on-Demand* sob código de identificação descrito (*DNMT3A* - Hs:01027166_m1 e *GAPDH* - Hs: Hs:99999905_m1; *Applied BioSystems*, EUA). A expressão do gene constitutivo da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi utilizada para normalização da expressão do gene *DNMT3A*, de modo a compensar diferenças na quantidade de cDNA utilizadas em cada reação, devido a erros de pipetagem. Os

genes foram amplificados separadamente. Os experimentos foram realizados no aparelho *7500 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*, EUA), utilizando o software *7500 v2.0.5* para análise (*Applied BioSystems*, EUA).

Para determinar os níveis relativos de expressão do gene *DNMT3A*, utilizou-se o método *Comparative Cycle Threshold* (Ct). Resumidamente, uma vez concluída a reação, um limite de fluorescência na fase exponencial de amplificação é estipulado, de forma a determinar o ciclo (Ct) no qual a fluorescência decorrente da amplificação de cada amostra foi superior à fluorescência inespecífica emitida. Amostras que apresentaram expressão do gene constitutivo *GAPDH* detectável após o Ct de número 30, foram excluídas da análise. Para normalizar os valores de Ct para as diferentes amostras, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, ou mesmo diferenças na eficiência da transcrição de cada amostra, o determinado Ct de cada amostra é subtraído pelo Ct do seu respectivo gene constitutivo (*GAPDH*), gerando assim o ΔCt . Para um mesmo gene, os valores de ΔCt podem ser diretamente comparados de maneira a obtermos uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A diferença entre o ΔCt de uma amostra teste e o ΔCt da amostra de uma referência ($\Delta\Delta Ct$) reflete a diferença existente entre as amostras analisadas. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa pode ser obtida de forma aproximada aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. No gráfico logarítmico, a expressão do controle é dada como uma linha basal, representada por 1, e a expressão relativa de cada variante para cada amostra tratada é demonstrada, comparada com o controle. Valores superiores a 1 indicam super-expressão e valores inferiores a 1, indicam sub-expressão.

4.6 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada de forma descritiva com o auxílio do *software SPSS Statistics 19.0*. Os pacientes com LMA foram categorizados de acordo com a presença ou ausência de mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A*. Pacientes que apresentaram mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A* foram classificados com “mutados” (*DNMT3A*mut), enquanto que, na ausência dessas mutações, os pacientes foram incluídos no grupo “não mutado” (*DNMT3A*wt). Além disso, os pacientes mutados foram classificados de acordo com a presença ou ausência da mutação R882 em: *DNMT3A*mut R882 e *DNMT3A*mut não-R882, respectivamente. Para a análise de

expressão, os pacientes foram divididos conforme os níveis de expressão do gene *DNMT3A* em dois grupos: baixa e alta expressão.

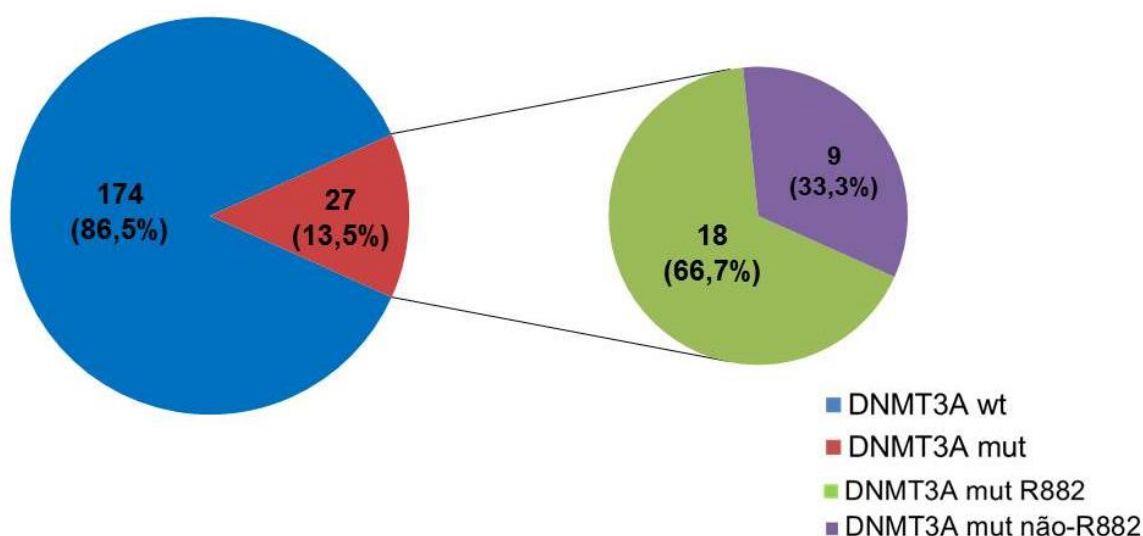
Para avaliar a normalidade da distribuição dos dados foi utilizado o teste de Kolmogorov- Smirnov. As variáveis contínuas foram comparadas utilizando o teste de Mann-Whitney, enquanto que para variáveis categóricas foi utilizado o teste do *Chi-quadrado* ou teste exato de Fisher. As probabilidades estimadas, a média e a mediana para curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e o teste de logrank, utilizado para comparar as diferenças entre as curvas. A análise de regressão de Cox foi utilizada para investigar a independência de fatores prognósticos. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Frequência de mutação no éxon 23 do gene DNMT3A em pacientes com LMA *de novo*

Foram avaliados 201 pacientes adultos com LMA *de novo* não-LPA, dentre estes 27 pacientes (13,5%) possuíam algum tipo de alteração/mutação no gene *DNMT3A*. Ao todo, foram observadas nove mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A*: p.D876E (1/27 – 3,7%), p.L883M (1/27 – 3,7%), p.P896P (1/27 – 3,7%), p.M880V (1/27 – 3,7%), p.R882C (3/27 - 11,1%), p.R882H (14/27 - 51,9%), p.R882P (1/27 – 3,7%), p.V897L (1/27 – 3,7%), p.I898S (2/27 - 7,4%), p.P871L (1/27 – 3,7%), p.P904A (1/27 – 3,7%) (Tabela 4). Sendo as mutações R882, mais frequentes (18/27 - 66,7%) ($P < 0,001$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Frequência de mutações no éxon 23 do *DNMT3A* em Leucemia Mielóide Aguda de novo.



Algumas das mutações identificadas no presente trabalho foram descritas em trabalhos prévios (Gaidzik et al. 2013). Contudo, as mutações p.I898S e p.L883M (ambas mutações do tipo *missense*) parecem não terem sido descritas até a presente data. A I898S é resultante de substituição de uma timina na posição 2693 (c.2693T → G), resultando na troca de isoleucina por serina na posição 898. A mutação L883M é resultante da substituição de uma timina por uma adenina na posição 2648 (c. 2648T → A), ocasionando a permuta de leucina por metionina na posição 883. Todas as

outras mutações previamente encontradas também foram do tipo *missense*. A análise no *software Polyphen 2.0* revelou que a maioria (7/9 – 78%) das mutações encontradas, relacionam-se com prováveis danos à função proteica. A tabela 4 resume as alterações encontradas e a previsão de seus respectivos efeitos na atividade proteica.

Tabela 4 - Mutações encontradas no éxon 23 do gene *DNMT3A* e a previsão de seus efeitos na atividade proteica

ID			Probabilidade		Sensibilidade/ especificidade
Paciente	Mutação	Frequência	de dano		
14	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
23	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
26	p.L883M	3,7%	0,935	Possivelmente prejudicial	0,80/ 0,94
49	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
54	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
73	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
94	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
97	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
109	p.P896P	3,7%	0	Sem danos à proteína	-
176	p.M880V	3,7%	0,758	Possivelmente prejudicial	0,85/ 0,92
178	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
184	p.R882C	11,1%	1	Provavelmente prejudicial	0,00/ 1,00
196	p.R882C	11,1%	1	Provavelmente prejudicial	0,00/ 1,00
198	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
204	p.D876E	3,7%	1	Provavelmente prejudicial	0,00/ 1,00
207	p.R882P	3,7%	0,855	Possivelmente prejudicial	0,83/ 0,93
214	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
244	p.V897L	3,7%	0,999	Provavelmente prejudicial	0,14/ 0,99
248	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91

256	p.I898S	7,4%	0,998	Provavelmente prejudicial	0,27/ 0,99
260	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
1230	p.R882C	11,1%	1	Provavelmente prejudicial	0,00/ 1,00
203	p.I898S	7,4%	0,998	Provavelmente prejudicial	0,27/ 0,99
991	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
1166	p.P871L	3,7%	0,999	Provavelmente prejudicial	0,14/ 0,99
97	p.R882H	51,9%	0,651	Possivelmente prejudicial	0,87/ 0,91
157	p.P904A	3,7%	0,997	Provavelmente prejudicial	0,41/ 0,98

5.2 Impacto das mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A* no fenótipo clínico de pacientes com LMA *de novo*

Os grupos analisados foram formados levando em consideração a presença (n=27) ou não (n=174) de mutações no éxon 23 do *DNMT3A* (*DNMT3A*mut x *DNMT3A*wt, respectivamente). Além disso, o grupo *DNMT3A*mut posteriormente foi classificado e analisado quanto a mutação R882 (*DNMT3A*mut R882 x *DNMT3A*mut não-R882).

As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes estão sumarizadas na tabela 5. A mediana de idade da coorte de pacientes foi de 49 anos, com 91 pacientes do sexo masculino (45,3%). Quanto à classificação FAB, os subtipos M2 (34,1%) e M4 (31,3%) apresentaram-se com maior frequência na coorte, enquanto que a frequência mais baixa foi vista no subtipo M7 (0,5%). A frequência de sexo (P=0,681) e subtipo FAB (P=0,664) foram similares entre os pacientes com *DNMT3A* mutados e não-mutados.

Dos 201 casos diagnosticados como LMA *de novo*, 110 (55%) não possuíam análise citogenética. Dentre os 91 pacientes restantes, 12 apresentaram mutação no *DNMT3A*, dentre os quais 8 (66,7%) possuíam cariótipo normal, dois a t(8;21)(q22;q22), um apresentou cariótipo complexo e um possuía trissomia do cromossomo 8. Dentro do grupo não-mutado foi observada uma maior variedade de anormalidades citogenéticas como: t(8;21)(q22;q22) (17,7%),

inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22) (8,9%), cariótipo complexo (11,4%), seguidas de outras alterações em menor frequência. Com base nos resultados obtidos da citogenética, os pacientes foram estratificados em grupos de risco, seguindo os critérios estabelecidos pelo *UK Medical Research Council* (MRC) (Grimwade et al. 2010). Neste sentido, pudemos verificar que nenhum paciente do grupo de risco favorável apresentou mutação na R882 do gene *DNMT3A* e que pacientes com essas mutações se distribuem entre o grupo de risco intermediário (87,5%) e adverso (12,5%) ($P=0,082$).

Ao avaliarmos a presença de mutações no gene *NPM1*, verificamos a ocorrência dela em 23,7% (46/194) pacientes com LMA. Além disso, quando comparamos a incidência desta mutação entre os grupos *DNMT3A*mut (40% - 10/27) e *DNMT3A*wt (21,3% - 36/169), observamos maior incidência dentro do grupo mutado ($P=0,047$).

Baseados na presença de mutações nos genes *FLT3* e *NPM1*, os pacientes foram segregados quanto ao risco molecular onde: o grupo molecular de alto risco foi definido como *NPM1*^{não-mutado}/*FLT3*-ITD^{negativo}, *NPM1*^{não-mutado}/*FLT3*-ITD^{positivo}, ou *NPM1*^{mutado}/*FLT3*-ITD^{positivo} e o grupo de baixo risco foi definido pela presença que qualquer mutação no *NPM1* com comitante ausência de mutações *FLT3*-ITD. A maioria dos pacientes da coorte avaliada (163/193) foi enquadrada no grupo de alto risco molecular. Esse achado também foi visto dentro dos grupos avaliados, sendo tanto a maioria dos pacientes mutados (79,2%), quanto a dos não mutados (85,2%) pertencentes ao grupo de alto risco molecular.

A mediana do número de leucócitos dos pacientes mutados (90.200/mm³) foi superior a dos pacientes não-mutados (48.150/mm³) ($P= 0,003$). Sendo a hiperleucocitose (WBC >100.000/mm³) um achado mais frequente dentro do grupo *DNMT3A*mut (47,1%) do que no grupo sem mutações no *DNMT3A* (21,6%) ($P=0,034$). Não houve diferenças entre os pacientes com *DNMT3A* mutados e *DNMT3A* não-mutados com relação a número de plaquetas, hemoglobina e porcentagem de blastos na medula óssea. Também não foram observadas diferenças entre os grupos com ou sem a mutação R882 (*DNMT3A*mut R882 x *DNMT3A*mut não-R882).

Tabela 5 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Leucemia Mielóide Aguda categorizados de acordo com o status mutacional do éxon 23 do gene *DNMT3A* e tipo de mutação encontrada

Características	Total (n=201)		DNMT3Awt (n=174)		DNMT3Amut (n=27)		P-valor	DNMT3Amut R882 (n=18)		DNMT3Amut não-R882 (n=9)		P-valor
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	
Gênero												
Masculino	91	45,3	80	46,9	11	40,7	0,681	8	44,4	3	33,3	0,757
Feminino	110	54,7	94	54,0	16	59,3		10	55,6	6	66,7	
Idade (anos), mediana	49,65		49,12		54,44		0,148	60		45		0,209
Intervalo	18 - 94		18 - 94		26 - 91			33 - 91		26 - 71		
Idade												
18-39 anos	64	33,5	59	35,3	5	20,8	0,310	3	18,8	2	25,0	0,607
40-59 anos	61	31,9	53	31,7	8	33,3		5	31,3	3	37,5	
≥60 anos	66	34,6	55	32,9	11	45,8		8	50	3	37,5	
Ausência de dados	10	0,05	4	0,02	3	0,11		2	0,11	1	0,11	
Subtipo FAB												
M0	17	9,3	14	9,0	3	11,5	0,664	2	11,1	1	12,5	0,832
M1	26	14,3	22	14,1	4	15,4		2	11,1	2	25,0	
M2	62	34,1	56	35,9	6	23,1		4	22,2	2	25,0	
M4	57	31,3	47	30,1	10	38,5		8	44,4	2	25,0	
M5	17	9,3	15	9,6	2	7,7		1	5,6	1	12,5	
M6	2	1,1	1	0,6	1	3,8		1	5,6	0	0	
M7	1	0,5	1	0,6	0	0		0	0	0	0	
Ausência de dados	19	0,09	11	0,06	1	0,03		0	0	1	0,11	
Perfil citogenético												
Cariótipo normal	42	46,2	34	43	8	66,7	0,310	6	75,0	2	50,0	0,130
t(8;21)(q22;q22)	24	15,4	14	17,7	0	0		0	0	0	0	
inv(16)(p13;q22)/ t(16;16)(p13;q22)	9	9,9	7	8,9	2	16,7		0	0	2	50,0	
Cariótipo complexo	10	11,0	9	11,4	1	8,3		1	12,5	0	0	
Outros	16	17,6	15	19,0	1	8,3		1	12,5	0	0	
Ausência de dados ¹	110	55,0	79	0,47	15	0,83		10	0,55	5	0,55	
Risco Citogenético ²												
Favorável	23	25,3	21	26,6	2	16,7	0,443	0	0	2	50	0,082

Intermediário	53	58,2	44	55,7	9	75,0		7	87,5	2	50	
Adverso	15	16,5	14	17,7	1	8,3		1	12,5	0	0	
Ausência de dados	110	55,0	79	0,47	15	0,83		10	0,55	5	0,55	
<i>FLT3</i> -ITD												
Mutado	38	19,5	30	17,6	8	32	0,199	6	64,7	2	25,0	1,00
Não-mutado	157	80,5	140	82,4	17	68		11	35,3	6	75,0	
Ausência de dados	6	0,03	3	0,02	2	0,07		1	0,05	1	0,11	
<i>NPM1</i>												
Mutado	46	23,7	36	21,3	10	40	0,047*	7	41,2	3	23,7	1,00
Não-mutado	148	76,3	133	78,7	15	60		10	58,8	5	76,3	
Ausência de dados	7	0,03	5	0,03	2	0,07		1	0,05	1	0,11	
Risco molecular ³												
Baixo risco	30	15,5	25	14,8	5	20,8	0,545	4	23,5	1	14,3	1,00
Alto risco	163	84,5	144	85,2	19	79,2		13	76,5	6	85,7	
Ausência de dados	8	0,04	5	0,03	3	0,11		1	0,05	2	0,22	
Blastos na medula óssea (%), mediana	65		65		62		0,701	66		59		0,737
Intervalo	20 - 97		20 - 97		21 - 97			21 - 97		36 - 93		
WBC ($\times 10^9/L$), mediana	48.150		45.500		90.200		0,003*	101.500		79.430		0,991
Intervalo	490 – 435.943		490 – 300.000		1200 – 435.943			1200 - 435.940		1670 - 312500		
Hemoglobina (g/dL), mediana	7,8		7,8		7,8		0,276	7,6		10,6		0,276
Intervalo	3 - 14		4 - 14		3 -14			3 -11		6 -14		
PLT ($\times 10^9/L$), mediana	47.000		47.000		50.000		0,671	52.500		50.000		0,631
Intervalo	235 – 652.000		8.000 – 652.000		235 – 404.000			235 – 404.000		18.000 – 142.000		

NOTAS:

1. Material não analisado ou sem metáfases.¹2. Os grupos de risco citogenéticos foram definidos de acordo com os critérios do Medical Research Council (MRC).²3. O grupo molecular de alto risco foi definido como *NPM1*^{não-mutado}/*FLT3*-ITD^{negativo}, *NPM1*^{não-mutado}/*FLT3*-ITD^{positivo}, ou *NPM1*^{mutado}/*FLT3*-ITD^{positivo}. O grupo molecular de baixo risco foi definido pela presença que qualquer mutação no *NPM1* e ausência de mutações *FLT3*-ITD.³

5.3 Influência do *status* mutacional do éxon 23 do gene *DNMT3A* na sobrevida de pacientes com LMA *de novo*

Foram incluídos nas análises de sobrevida 144 pacientes seguindo os critérios citados previamente no item Materiais e Métodos (Seção 4.3.4). Destes, 20 apresentaram mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A* (*DNMT3A*mut) e 124 não tinham mutação no referido gene (*DNMT3A*wt).

A taxa de remissão completa (CR) da coorte foi de 47,9% (69/144). As taxas de CR entre o grupo mutado (10/20 - 50%) e não mutado (59/124 - 47,5%) foram semelhantes ($P=1,00$).

A mediana de SG da coorte foi de 190 dias (IC95%: 82 – 298 dias), com sobrevida global estimada em cinco anos de 15,1% (Gráfico 2a). Dos 105 (72,9%) pacientes que evoluíram para óbito, 31 (29,5%) morreram antes do 30º dia após o diagnóstico, dentre estes 10 (32,2%) morreram ainda na primeira semana de internamento. A mediana de sobrevida global dos pacientes *DNMT3A* mutado foi discretamente maior do que a dos pacientes sem mutação, sendo estas 261 dias (IC95%: 1– 670 dias) e 160 (IC95%: 53 – 266 dias) dias respectivamente, embora a diferença não tenha sido significativa ($P = 0,13$) (Gráfico 2b). A sobrevida global estimada em 5 anos do grupo mutado foi de 31,8%, enquanto que no grupo não-mutado esse valor foi de 12,1%. A mediana de sobrevida livre de doença (SLD) da coorte foi de 392 dias (IC95%: 220 – 564 dias) (Gráfico 3a), com SLD estimada em cinco anos de 37,3%. Não foram observadas diferenças entre os grupos com e sem mutação, apresentando SLD de 182 dias (IC95%: 161 – 377 dias) e 355 dias (IC95%: 171 – 528 dias) respectivamente ($P=0,157$) (Gráfico 3b).

Gráfico 2 - (a) Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo não-promielocítica. (b) Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo não-promielocítica frente ao status mutacional do éxon 23 do gene *DNMT3A*.

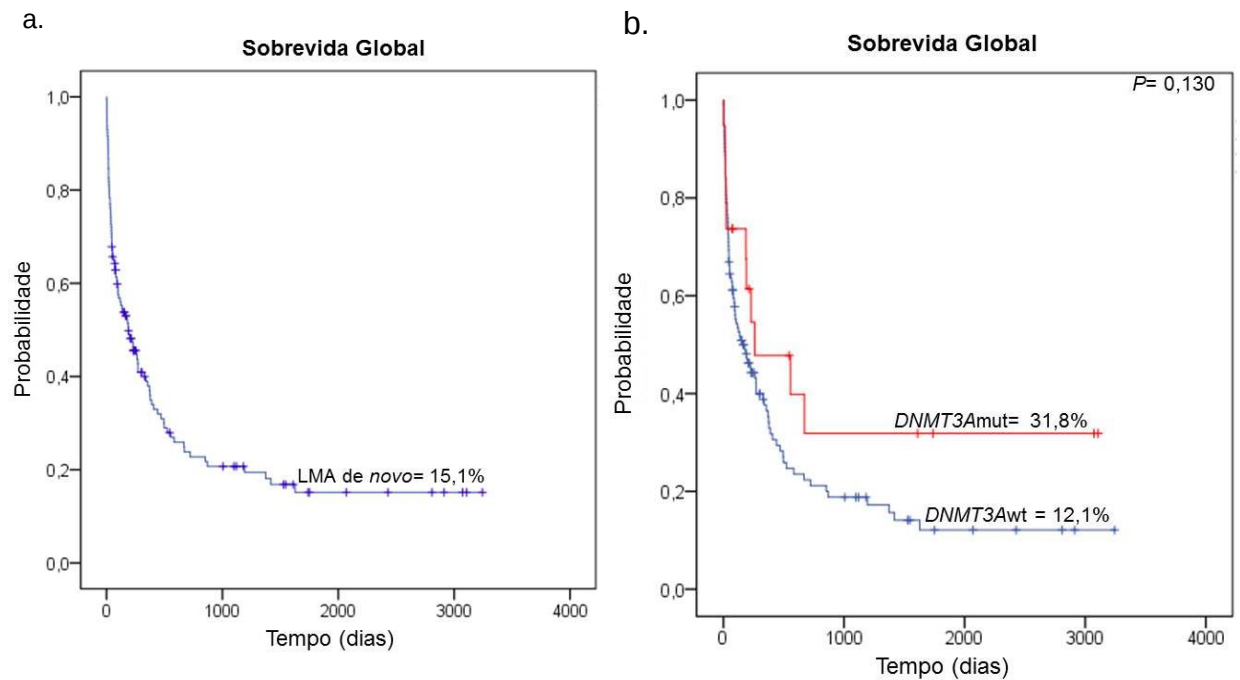
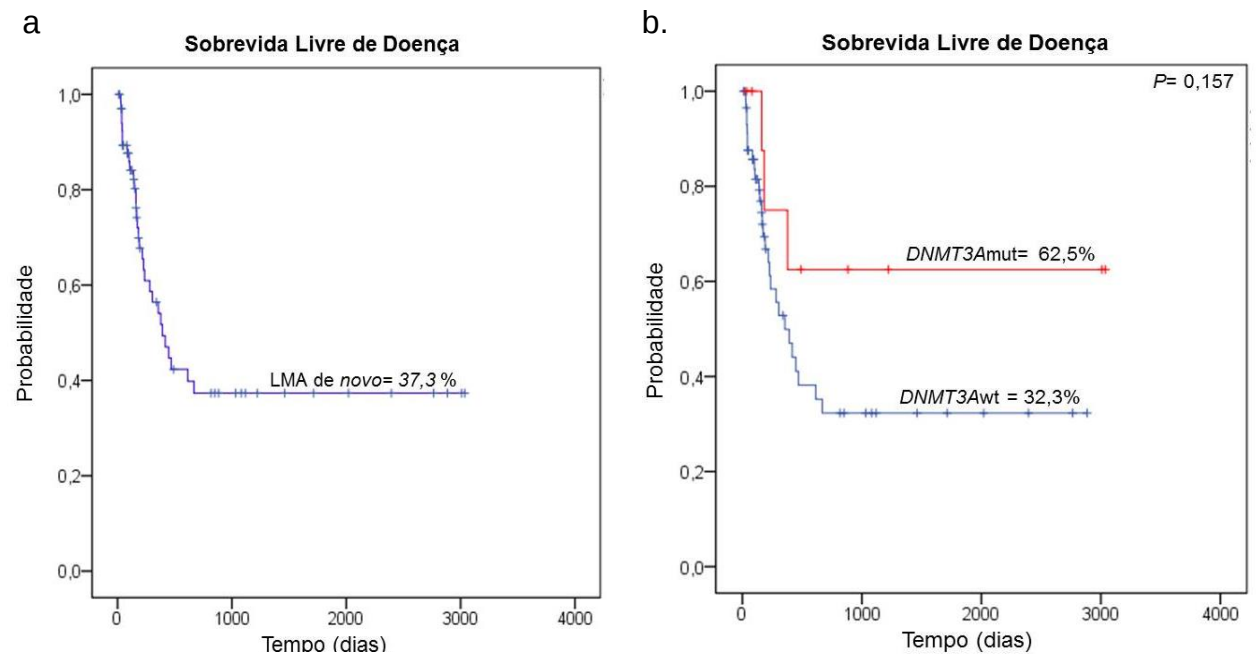


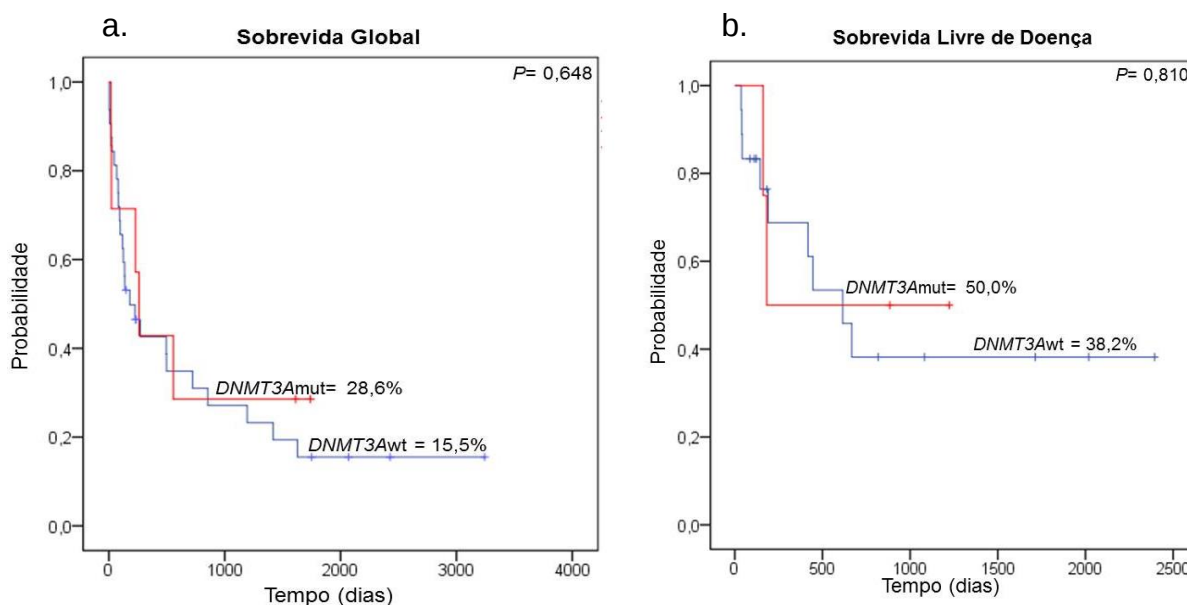
Gráfico 3 - (a) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo não-promielocítica. (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo não-promielocítica frente ao status mutacional do éxon 23 do gene *DNMT3A*.



Diante da alta frequência de mutações no gene *DNMT3A* em pacientes com cariótipo normal (66,7%), buscou-se investigar o impacto desta mutação na sobrevida desse grupo. Observamos que a taxa de remissão completa (*DNMT3A*mut: 57,1%; *DNMT3A*wt: 56,3%; $P = 1,00$), assim como a taxa de recaída (*DNMT3A*mut: 50%; *DNMT3A*wt: 50%; $P = 1,00$) foi semelhante entre os grupos.

Não houve diferenças entre a mediana de sobrevida global dos pacientes com mutações no *DNMT3A* (261dias; IC95%: 1 - 340 dias) e sem a mutação (181 dias IC95%:7 - 374 dias; $P=0,697$) (Gráfico 4a). A sobrevida global estimada em 5 anos do grupo mutado foi de 28,6%, enquanto que no grupo não-mutado esse valor foi de 15,5%. A sobrevida livre de doença estimada em cinco anos foi de 50% para o grupo mutado e 38,2% para o grupo sem mutação no gene *DNMT3A*, não sendo observadas diferenças entre as curvas ($P=0,810$) (Gráfico 4b).

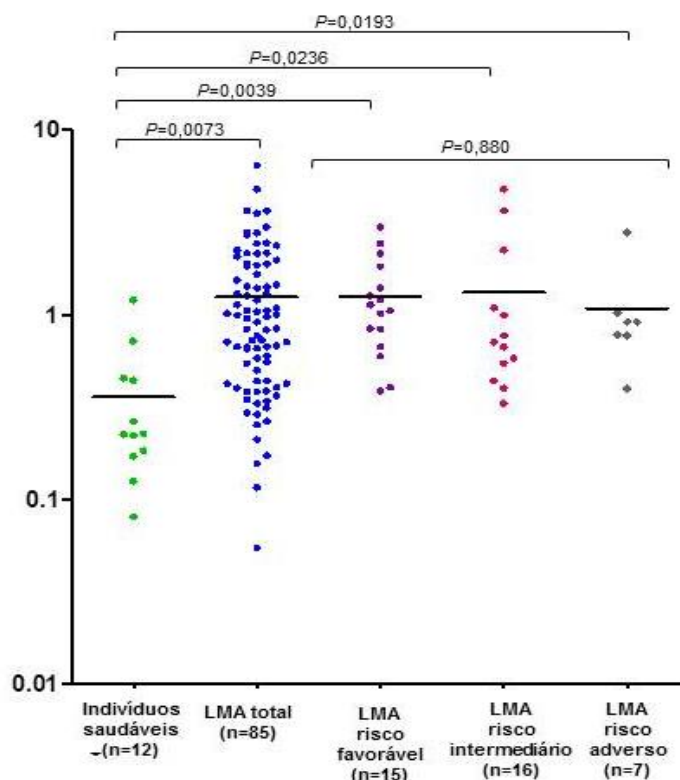
Gráfico 4 - (a) Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo e cariótipo normal frente ao status mutacional do éxon 23 do gene *DNMT3A*. (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo e cariótipo normal frente ao status mutacional do éxon 23 do gene *DNMT3A*.



5.4 Impacto da expressão diferencial do gene *DNMT3A* no fenótipo clínico de pacientes com LMA *de novo*

Conforme previamente descrito no item materiais e métodos (seção 4.4.5), a avaliação da expressão gênica do *DNMT3A* foi realizada utilizando-se 85 amostras de pacientes com LMA *de novo* não-LPA e 12 amostras de indivíduos saudáveis. A expressão do gene *DNMT3A* (mediana= 0,91; 0,05 – 6,43) mostrou-se elevada nos pacientes com LMA quando comparados aos indivíduos saudáveis (mediana= 0,22; 0,08 – 1,20) ($P= 0,0073$). Observamos que a expressão diferencial entre os controles e os pacientes com LMA se manteve mesmo com a estratificação dos subgrupos de risco citogenético (risco favorável= 1,04; 0,08 – 2,98; $P=0,0039$; risco intermediário= 1,06; 0,33 – 4,78; $P= 0,0236$; risco desfavorável= 0,08; 0,40 – 1,02 ; $P= 0,0193$). Entretanto, os níveis de expressão do *DNMT3A* foi semelhante nos grupos de risco citogenético, quando comparados entre si ($P= 0,880$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Comparação do nível total de expressão do gene *DNMT3A* entre indivíduos saudáveis, todos os pacientes com Leucemia Mielóide Aguda e subgrupos de risco citogenético.



Os pacientes com LMA *de novo* foram categorizados em dois grupos baseados na expressão do gene *DNMT3A*: baixa expressão de *DNMT3A* (mediana = 0,417; 0,054 – 0,729) e alta expressão de *DNMT3A* (mediana = 0,417; 0,771 – 6,430). Os

principais parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com LMA pertencentes às categorias resultantes da análise de expressão estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo categorizados de acordo com os níveis de expressão do gene *DNMT3A*

Características	Baixa expressão <i>DNMT3A</i> (n=38)		Alta expressão <i>DNMT3A</i> (n=47)		P-valor
	N	%	N	%	
Gênero					
Masculino	20	52,6	24	51,1	1,00
Feminino	18	47,4	23	48,9	
Idade (anos), mediana	59		50		0,030*
Intervalo	26 - 80		18 - 94		
Idade					
18-39 anos	6	17,1	15	33,3	0,172
40-59 anos	12	31,6	16	35,6	
≥60 anos	17	44,7	14	31,1	
Ausência de dados	3	7,9	2	4,2	
Subtipo FAB					
M0	1	3,6	6	13,0	0,042*
M1	4	14,3	6	13,0	
M2	12	42,8	24	52,2	
M4	11	39,3	8	17,4	
M5	7	25,0	2	4,4	
M6	0	0	0	0	
M7	0	0	0	0	
Ausência de dados	10	26,3	1	2,1	
Perfil citogenético					
Cariótipo normal	4	26,7	8	34,8	0,309
t(8;21)(q22;q22)	3	20,0	6	26,1	
inv(16)(p13;q22)	5	33,3	1	4,4	
/t(16;16)(p13;q22)	1	6,7	5	21,7	
Cariótipo complexo	2	13,3	3	13,0	
Outros	23	60,5	24	51,0	
Ausência de dados					
Risco Citogenético					
Favorável	8	53,3	7	30,4	0,367
Intermediário	5	33,3	11	47,8	
Adverso	2	13,2	5	21,7	
Ausência de dados	23	60,5	24	51,0	
<i>FLT3</i> -ITD					
Mutado	7	18,4	10	21,3	0,791
Não-mutado	31	81,6	37	78,7	
<i>NPM1</i>					
Mutado	8	21,2	7	10,6	0,570
Não-mutado	30	78,9	40	85,1	
Risco molecular					
Baixo risco	4	10,5	5	10,6	1,00
Alto risco	34	89,5	42	89,4	

Status éxon 23 DNMT3A					
Mutado	4	10,5	6	12,7	1,00
Não-mutado	34	89,5	41	87,2	
Blastos na medula óssea (%), mediana	69		69		0,740
Intervalo	26 - 96		20 - 97		
WBC (× 10 ⁹ /L), mediana	60.575		33.715		0,740
Intervalo	1.300 – 217.870		1.200– 285.700		
Hemoglobina (g/dL), mediana	7,5		7,8		0,850
Intervalo	4,2 – 11,5		9 – 11,7		
PLT (× 10 ⁹ /L), mediana	42.000		45.000		0,538
Intervalo	1.000 – 289.000		235 – 404.000		
NOTAS:					
1. Material não analisado ou sem metáfases. ¹					
2. Os grupos de risco citogenéticos foram definidos de acordo com os critérios do Medical Research Council(MRC). ²					
3. O grupo molecular de alto risco foi definido como <i>NPM1</i> ^{não-mutado} / <i>FLT3</i> -ITD ^{negativo} , <i>NPM1</i> ^{não-mutado} / <i>FLT3</i> -ITD ^{positivo} , ou <i>NPM1</i> ^{mutado} / <i>FLT3</i> -ITD ^{positivo} . O grupo molecular de baixo risco foi definido pela presença que qualquer mutação no <i>NPM1</i> e ausência de mutações <i>FLT3</i> -ITD. ³					

A baixa expressão do gene *DNMT3A* foi relacionada à maior mediana de idade (59 anos; $P= 0,03$), e se mostrou mais frequente em pacientes acima de 40 anos (76,3%). No grupo com alta expressão de *DNMT3A* observamos menor mediana de idade (50 anos) e distribuição homogênea dos indivíduos nas categorias de faixa etária (18 a 39 anos= 33,3%; 40 a 50 anos=35,6%; acima de 60 anos= 31,1%). Na disposição dos pacientes entre os subtipos FAB, verificamos que a alta expressão do gene *DNMT3A* foi um achado frequente no subtipo M2 (24/46 - 52,2%), sendo expressiva tanto dentro do próprio grupo de alta expressão, quanto quando comparado com o grupo de baixa expressão (12/28 - 42,8%; $P= 0,042$).

Quanto ao perfil citogenético, não houve diferenças entre as frequências das categorias citogenéticas ($P= 0,309$), repercutindo na classificação de risco citogenético, onde observamos a categorização uniforme tanto dos pacientes com baixa expressão de *DNMT3A*, quanto daqueles com alta expressão deste gene ($P= 0,367$).

Os perfis de expressão do *DNMT3A* não foram associados ao *status* mutacional do éxon 23 do referido gene ($P= 1,000$). Ademais, não foram encontradas diferenças com relação à leucometria ($P=0,740$), níveis de hemoglobina ($P= 0,850$), porcentagem de blastos na medula óssea ($P= 0,740$) ou quantidade de plaquetas ($P=0,538$).

5.5 Influência do perfil de expressão do gene *DNMT3A* na sobrevida de pacientes com LMA *de novo*

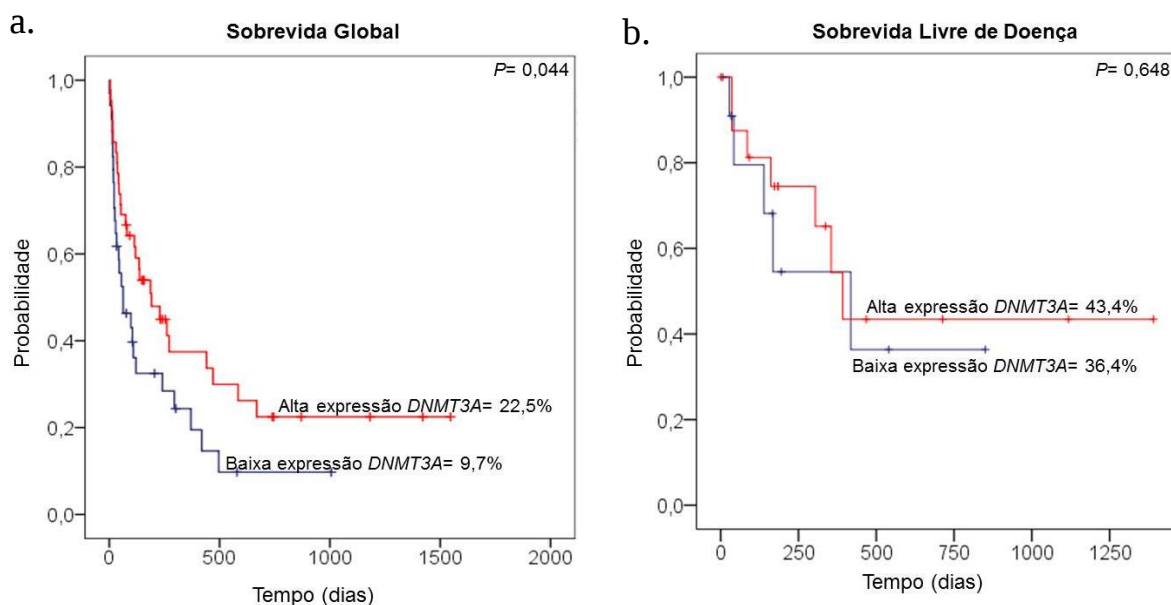
Na coorte avaliada a análise de sobrevida revelou que baixos níveis de expressão do *DNMT3A* estão associados à menor sobrevida global (63 dias, IC95%: 1 - 134 dias; $P=0,044$) (Figura 11a). No entanto, essa associação não é de maneira independente, a análise multivariada mostrou que essa menor sobrevida global dos pacientes com baixa expressão do *DNMT3A* está relacionada aos níveis de leucócitos ($P=0,015$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise univariada e multivariada da sobrevida global

Ponto final	Variáveis modelo	Análise univariada			Análise multivariada				
		HR	95% IC	P-valor	HR	95% IC	P-valor		
Sobrevida Global	Expressão do <i>DNMT3A</i> : hipoexpresso <i>versus</i> hiperexpresso;	0,58	0,34	0,99	0,047*	0,56	0,24	1,31	0,183
	Idade: variável contínua	1,01	1,00	1,03	0,032*	0,98	0,95	1,01	0,360
	Estratificação de risco citogenético: adverso <i>versus</i> intermediário <i>versus</i> favorável	0,58	0,34	1,01	0,050*	1,41	0,80	2,50	0,226
	Contagem de leucócitos (x10 ⁹): variável contínua	1.03	1.01	1.05	0,014*	1,00	1,00	1,00	0,015*
Hazard ratios (HR) > 1 ou < 1 indicam um aumento ou diminuição do risco, respectivamente, de um evento para a primeira categoria na lista.									

A mediana de sobrevida livre de doença foi 418 dias (IC95%: 95 - 741 dias) no grupo com baixa expressão e 392 dias no grupo com alta expressão do *DNMT3A*, não sendo observadas diferenças entre os grupos ($P= 0,648$) (Gráfico 6b).

Gráfico 6 - (a) Sobrevida global de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo frente ao perfil de expressão do gene *DNMT3A*. (b) Sobrevida livre de doença de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda de novo e cariótipo normal frente ao perfil de expressão do gene *DNMT3A*



A taxa de remissão completa foi de 60,81% para os pacientes com alta expressão do gene *DNMT3A* e 52,63% para aqueles que apresentaram baixa expressão deste gene ($P=0,601$). As taxas de recaída foram iguais entre os grupos avaliados (33,3%; $P= 1,000$). Não foram encontradas associações entre os perfis de expressão e taxa de mortalidade (baixa expressão *DNMT3A*: 77,78%; alta expressão *DNMT3A*: 68,89%; $P= 0,455$) ou mortalidade precoce (baixa expressão *DNMT3A*: 35,29%; alta expressão *DNMT3A*: 14,29%; $P= 0,056$).

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que mutações no éxon 23 do *DNMT3A* não afetam o desfecho clínico dos pacientes com leucemia mielóide aguda. Além disso, mutações no *DNMT3A* não estão associadas com níveis diferenciais de expressão deste gene. Em contrapartida, a baixa expressão do *DNMT3A* foi associada com uma menor sobrevida global. Nossos resultados sugerem que a baixa expressão do gene *DNMT3A* esteja associada a pior prognóstico na LMA.

Corroborando com o que foi visto por LIMA, ALEIDE S. et al. (2015), o presente estudo evidenciou baixa sobrevida global (190 dias; IC95%: 82 – 298 dias), acompanhada de elevada taxa de mortalidade precoce (29,5%). Dentre os fatores que colaboram para esse pior desfecho está: demora na obtenção do diagnóstico, a indisponibilidade de leitos e medicamentos, infraestrutura precária, dificuldade de encaminhamento ágil para uma unidade de referência, bem como a concentração do pólo médico-especializado na capital. Esses achados e situações são representativos da realidade enfrentada pelos pacientes e médicos da nossa região, evidenciando a necessidade de melhorias nos serviços ofertados e de estudos que levem em consideração a realidade na qual os pacientes estão inseridos.

A busca pela gênese molecular que leva ao desenvolvimento leucêmico e a necessidade de novos marcadores prognósticos vem colocando em destaque os fenômenos epigenéticos (CONWAY O'BRIEN, PRIDEAUX, CHEVASSUT, 2014). Inserido neste contexto, o gene da *DNMT3A* se destaca por possuir funções importantes no controle da expressão gênica, e pela sua relevância nos processos oncohematológicos (KHASAWNEH; ABDEL-WAHAB, 2014; SHLUSH et al. 2014). Contudo, apesar da sua aparente importância clínica e prognóstica, muito do que se sabe sobre o impacto das mutações no *DNMT3A* vem de estudos com coortes selecionadas (*trials* clínicos) que nem sempre traduzem a realidade da prática clínica (LEHMANN et al. 2011; LIMA, ALEIDE S. et al. 2015).

As frequências de mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A* encontradas no nosso trabalho (13%) estão em consonância com estudos anteriores (LEY et al. 2010; THOL et al. 2011; SHAH; LICHT, 2011; IM et al. 2014). Gaidzik et al. ao analisarem o *status* mutacional do gene *DNMT3A* em pacientes adultos com LMA *de novo* (n= 1770), observaram que a frequência de mutação neste gene foi de 20,5%, onde mais metade ocorrem no éxon 23 (14,41%). A maioria das mutações (64,5%) estavam localizadas no domínio metiltransferase, localizado no éxon 23, particularmente na

R882, sugerindo fortemente que trata-se de um *hotspot* mutacional no gene *DNMT3A*. Ademais, observou-se que essa mutação foi mais frequente nos pacientes com cariótipo normal (83,9%) (GAIDZIK, et al 2013).

Seguindo este mesmo raciocínio, Ley et al. ao avaliar genes potencialmente associados à LMA (n=281), identificaram que dentre as mutações no gene *DNMT3A*, a mais frequente foi a R882, aparecendo em 37 pacientes nas seguintes proporções: p.R882H (27/37), p.R882C (7/37), p.R882P(2/37) e p.R882S (1/37) (LEY et al. 2010). Em nosso estudo, observamos frequências semelhantes, onde 18 dos 27 pacientes portadores de mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A* tinham mutações R882. Por sua vez, essas mutações se apresentaram nas seguintes proporções: p.R882H (14/27), p.R882C (3/27) e p.R882P(1/27), não sendo encontrados pacientes com mutações p.R882S. Ademais, estudos anteriores demonstraram que enzimas mutantes R882 possuem atividade de metilação reduzida, afetando todo o padrão de metilação celular e conseqüentemente, o perfil de expressão gênica (QU Y et al. 2014; LEY et al. 2010).

Embora nós não tenhamos testado o significado funcional das mutações no *DNMT3A* em blastos humanos leucêmicos, dados da literatura suportam a importância funcional deste achado. A metilação do DNA está geralmente associada com repressão transcricional e pode modificar a expressão de genes que regulam negativamente a diferenciação ou auto-renovação celular (PORTELA; ESTELLER et al. 2010). A enzima DNMT3A catalisa a metilação *de novo* do DNA sendo responsável pela formação de novos padrões específicos de metilação (CONWAY O'BRIEN et al. 2014). Sua atividade parece ser necessária para a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas (HSC), uma vez que mutações no gene *DNMT3A* podem promover a auto-renovação e bloqueio da diferenciação dessas células (CHALLEN et al. 2012). Esse fenótipo é consequência da modificação da metilação nos promotores gênicos, levando ao aumento da transcrição de genes relacionados com a auto-renovação e diminuição dos genes reguladores da diferenciação celular (CHALLEN et al. 2012; KHASAWNEH; ABDEL-WAHAB, 2014).

Observamos que mutações no gene *NPM1* foram recorrentes no grupo *DNMT3A*mut ($P=0,047$). Outros autores também identificaram esta associação, embora ela ainda não seja inteiramente compreendida (LEY et al. 2010; YAN et al. 2011). Conjectura-se que estes genes poderiam cooperar por interferir nos mecanismos de regulação epigenética, uma vez que dentre as funções da NPM1 está

o controle da remodelagem cromatínica através da interação desta proteína com as histonas (GRISENDI et al. 2006). Outro indicativo desta interação é que pacientes com mutações no gene *NPM1* apresentam alterações distintas nos perfis epigenéticos e respondem bem ao tratamento coadjuvante com inibidores de metiltransferases (FIGUEROA et al. 2010). Além disso, Ley et al. observaram que mutações no *DNMT3A* agravam o pior prognóstico do grupo com cariótipo normal e *NPM1*^{não-mutado}/*FLT3-ITD*^{positivo}. Na avaliação do risco molecular, 79,2% dos pacientes se enquadraram no grupo de alto risco, caracterizado pela presença de mutações *ITD* no gene *FLT3* concomitantes ou não a mutações no gene *NPM1*, e deste modo, predizendo um pior desfecho clínico para estes pacientes.

Dentre os fatores prognósticos relacionados às condições de saúde e características do paciente estão idade e contagem de leucócitos, sendo a idade avançada e os quadros de hiperleucocitose indicativos de prognóstico adverso (VARDIMAN, HARRIS, BRUNNING, 2009). Mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A* foram associadas com altas contagens de leucocitárias, mas não foi encontrada associação com idades avançadas, corroborando apenas em parte com o que é reportado por outros estudos (PATEL et al. 2012; GAIDZIK et al., 2013). No âmbito da análise de sobrevida, não foram observadas diferenças entre os grupos com e sem mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A* ($P = 0,130$). Mesmo dentro do grupo de pacientes com cariótipo normal, as mutações no gene *DNMT3A* não foram capazes de afetar a sobrevida global ($P=0,697$), nem sobrevida livre de doença ($P= 0,810$). Esses achados vão de encontro ao que foi visto por Ribeiro et al. ao avaliarem o potencial uso do gene *DNMT3A* como marcador prognóstico. Eles observaram que este gene estava independentemente associado à menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença. Outros estudos também apontam para a associação de mutações no *DNMT3A* com pior prognóstico para pacientes com LMA (MARCUCCI et al. 2012; RENNEVILLE et al. 2012; PLØEN et al. 2014). No entanto, esses resultados são representativos de coortes específicas, restritas quando à idade e/ou cariótipo.

Shlush et al. identificaram alta incidência de mutações no gene *DNMT3A* em células tronco hematopoéticas de indivíduos com LMA. Ele demonstrou que o aparecimento destas mutações precede a aquisição de mutações em outros genes envolvidos na patogênese da LMA (ex. *NPM1*). Estes resultados evidenciam o surgimento precoce das mutações no gene *DNMT3A* na evolução da LMA, sugerindo que alterações neste gene seriam as primeiras lesões genéticas adquiridas e o

pontapé inicial para a transformação leucêmica (SHLUSH et al. 2014). Apesar de não termos visualizado impacto das mutações no gene *DNMT3A* na sobrevida dos pacientes com LMA, não podemos deixar de pontuar sua importância na patogênese da LMA.

Embora a importância do gene *DNMT3A* na leucemogênese tenha sido evidenciada, quase todos os estudos buscaram determinar a frequência e impacto clínico de mutações neste gene, sendo os relatórios sobre análise de sua expressão gênica escassos, e os poucos disponíveis apresentam resultados controversos (MIZUNO et al. 2001; ZARE-ABDOLLAHI et al. 2015).

Sabe-se a expressão alterada das DNMTs podem modificar o padrão normal de metilação do DNA, estando os altos níveis de expressão associados à metilação regional aberrante e instabilidade gênica (BONIFER; BOWENM et al. 2010). Em malignidades hematológicas, acredita-se que a hipermetilação aberrante do DNA seja relevante para o desenvolvimento do fenótipo leucêmico (MELDI et al. 2014). Além disso, alterações epigenéticas podem mimetizar os efeitos das mutações no gene *DNMT3A* através da modulação da sua expressão gênica (JOST et al. 2014).

Ao avaliarmos os níveis de expressão do *DNMT3A*, vimos que este gene encontra-se hiperexpresso nos pacientes com LMA (n=85), quando comparados com indivíduos saudáveis (n=12) ($P= 0,0073$). A expressão de *DNMT3A* foi anteriormente investigada por Mizuno et al., que avaliou 50 pacientes com neoplasias hematológicas, sendo 33 LMA e 17 LMC, e observou aumento da expressão gênica do *DNMT3A* nos pacientes com LMA comparado às células hematopoéticas normais.

Os pacientes com LMA podem ser agrupados em subtipos morfollogicamente ou geneticamente definidos. Hoje, as associações genótipo-fenótipo na LMA, ou seja, mutações moleculares recorrentes e definições morfológicas, não são totalmente compreendidas. Embora algumas mutações genéticas sejam frequentes em vários subtipos morfológicos, uma série de associações entre mutações concomitantes e fenótipos distintos foram identificadas em subgrupos molecularmente definidos. Por exemplo, mutações nos genes *FLT3*, *NPM1* e *WT1* foram associadas com fenótipo imaturo na LMA M1, ao passo que outras combinações envolvendo *ASXL1*, *RUNX1*, *CEBPA* ou *KRAS* foram mais frequentes no subtipo M2 (ROSE et al. 2017). A literatura aponta que mutações no gene *DNMT3A* estão associadas com um fenótipo monocítico (M4 e M5), embora não tenhamos visto essa relação ($P= 0,664$). Apesar da existência de associação entre mutações e morfologia, relatos sobre correlação

entre morfologia e expressão gênica são escassos, chegando a ser inexistentes como no caso do gene *DNMT3A*. Em nosso estudo vimos que a alta expressão do gene *DNMT3A* está associada à LMA com maturação (M2) ($P= 0,042$).

Ao investigar possíveis mudanças de expressão no gene *DNMT3A* resultantes do seu *status* mutacional em 96 pacientes com LMA, Zare-Abdollahi et al. não encontraram associação entre estas variáveis, sugerindo que seus efeitos no prognóstico dos pacientes sejam independentes entre si. Esses resultados reforçam nossos achados, onde observamos que a expressão do gene *DNMT3A* parece não ser afetada pela presença de mutações no éxon 23 deste mesmo gene e vice-versa ($P= 1,000$).

O impacto da expressão gênica do *DNMT3A* na sobrevida de pacientes com neoplasias mieloides ainda não foi esclarecido. Em nossa coorte de pacientes, foram verificadas associações entre a baixa expressão do gene *DNMT3A* e a idade avançada dos pacientes com LMA ($P= 0,030$). A baixa expressão do gene *DNMT3A* teve impacto negativo na sobrevida global ($P= 0,044$), mas não na sobrevida livre de doença destes pacientes ($P=0,648$). Observamos também que o impacto da baixa expressão do *DNMT3A* na sobrevida global está associado à leucometria ($P=0,015$).

Esse foi o único trabalho que avaliou o impacto da expressão do gene *DNMT3A* numa coorte não selecionada, os outros dois estudos que também avaliaram a expressão, não buscaram avaliar seu impacto na sobrevida ou verificaram apenas dentro dos grupos citogenéticos (MIZUNO et al. 2001; ZARE-ABDOLLAHI et al. 2015). Estudos prospectivos sobre o impacto de alterações no gene *DNMT3A* em populações de pacientes específicos e bem definidos são recorrentes. No entanto, a avaliação da aplicabilidade do rastreamento destas alterações em um cenário de vida real ainda não havia sido realizada. Pudemos notar que a adoção de mutações no gene *DNMT3A* como marcador prognóstico não seria aplicável na tentativa de prever a evolução e o desfecho clínico de uma coorte sem restrições. Embora não tenhamos observado impacto na sobrevida, é válido ressaltar que tanto as mutações quanto os níveis de expressão, fornecem informações que também podem representar potenciais alvos terapêuticos. Como essas alterações afetam a metilação do DNA, existe um interesse especial na avaliação do impacto de agentes hipometilantes em pacientes com LMA portadores de tais alterações.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que a expressão gênica do *DNMT3A* possui valor prognóstico e que ele é independente da presença de mutações

neste gene. Estes resultados reforçam a importância do gene *DNMT3A* na patogênese da LMA e a necessidade de estudos que busquem a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta relação.

7 CONCLUSÕES

- Tanto a frequência de mutações no éxon 23 do gene *DNMT3A* (13,5%), quanto de mutações na Arg882 (66,7%) foram similares ao que a literatura reporta (em torno de 15% e 65%, respectivamente).
- Todas as mutações encontradas foram do tipo *missense*, das quais uma era silenciosa e as outras implicavam em substituições de aminoácidos.
- A expressão de *DNMT3A* está elevada nos pacientes com LMA quando comparados aos indivíduos saudáveis.
- O *status* mutacional do éxon 23 do gene *DNMT3A* não teve impacto na sobrevida global e sobrevida livre de doença. No entanto, a baixa expressão do *DNMT3A*, foi associada com uma menor sobrevida global.
- O *status* mutacional do éxon 23 não afeta a expressão gênica do *DNMT3A*.
- O uso do rastreamento das mutações na Arg882 como marcador prognóstico é restrito, sendo aplicável dentro de coortes selecionadas quanto à idade e cariótipo, deixando de ser efetiva na realidade da prática clínica.

REFERÊNCIAS

- BENNETT J.M., et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. **Br J Haematol**, v. 33, n. 4, 1976, p. 451-8.
- BENNETT, J. M. et al. Criteria for the Diagnosis of Acute Leukemia of Megakaryocyte Lineage (M7): A Report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann Intern Med**, n. 103, v. 3, 1985, p. 460-2.
- BENNET, J. M. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). **Br J Haematol**, n. 38, v. 3, 1991, p. 325-9.
- BONIFER, C.; BOWENM D. T. Epigenetic mechanisms regulating normal and malignant haematopoiesis: new therapeutic targets for clinical medicine. **Expert Rev Mol Med**, n. 12, v. 6, 2010.
- BULLINGER, L.; ARMSTRONG, S.A. Help for AML: methylation profiling opens new avenues, **Cancer Cell**, n. 17, v. 1, 2010, p. 1-3.
- CAPRA, M. et al. Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia btween 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. **LeukLymphoma**, n. 48, 2007, p. 2381-6.
- CHALLEN, G. A. et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. **Nat Genet**, n. 44, v. 1, 2012, p. 23-1.
- CONWAY O'BRIEN, E.; PRIDEAUX, S.; CHEVASSUT, T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. **Adv Hematol**, mar. 2014.
- DAVIS LG; DIBNER MD; BATTEY JF. Basic Method in Molecular Biology. **Elsevier**, Londres, 1986, p388
- DESCHLER, B.; LUBBERT, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. **Cancer**, v. 107, n. 9, 2006, p. 2099-107.
- DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, n. 15, v. 3, 2010, p. 453-74.
- DORES, G.M. et al. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States. **Blood.**, n. 119, v. 1, 2012, p. 34-43.
- ESTEY, E.; DÖHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **Lancet**, n. 368, 2006, p. 1894-907.
- FIGUEROA, M. E. et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**, n. 17, 2010, p. 13-27.
- GAIDZIKI, V. I., et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). **Blood**, n. 121, v. 23, 2013, p. 4769-4777.

GILLILAN, G. D.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, n. 100, 2002, p. 1532-1542.

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

GRIMWADE, D. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. **Blood**, n. 116, v. 3, p. 354-65.

IBRAHEM, L. et al. Prognostic significance of DNMT3A mutations in patients with acute myeloid leukemia, **Blood Cells Mol Dis**, n.54, v. 1, 2015, p. 84-9.

IM, A. P. et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. **Leukemia**, n. 28, v. 9, 2014, p. 1774-83.

JOST, E. et al. Epimutations mimic genomic mutations of DNMT3A in acute myeloid leukemia, **Leukemia**, n. 28, v. 6, 2014, p. 1227-34.

KHASAWNEH, M. K.; ABDEL-WAHAB, O. Recent discoveries in molecular characterization of acute myeloid leukemia, **Curr Hematol Malig Rep**, n. 9, v. 2, 2014, p. 93-9.

LARSSON, C.A.; COTE, G.; QUINTÁS-CARDAMA, A. The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. **Mol Cancer Res**, n. 11, v. 8, 2013, p. 815-27.

LEHMANN, S. et al. Continuing high early death rate in acute promyelocytic leukemia: a population-based report from the Swedish Adult Acute Leukemia Registry. **Leukemia**, n. 25, 2011, p. 1128-34.

LENNARTSSON, A. et al. Differential methylation in CN-AML preferentially targets non-CGI regions and is dictated by DNMT3A mutational status and associated with predominant hypomethylation of HOX genes. **Epigenetics**: Official journal of the DNA Methylation Society. v. 9, n. 8, 2014, p. 1108-1119.

LEY, T.J. et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, n.363, 2010, p.224-2433.

LIMA, ALEIDE S. et al. Clinical outcomes of patients with acute myeloid leukemia: evaluation of genetic and molecular findings in a real-life setting. **Blood** 126, no. 15 2015, p. 1863-1865.

LIN, J. et al. Recurrent DNMT3A R882 Mutations in Chinese Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. **PLoS One**, 2011.

LOGHAVI, S. et al. Clinical features of De Novo acute myeloid leukemia with concurrent DNMT3A, FLT3 and NPM1 mutations. **J Hematol Oncol**, n. 7, v. 74. 2014.

LOWENBERG, B.; DOWNING, J.R.; BURNETT, A. Acute Myeloid Leukemia. **N Engl J Med**, n. 341, 1999, p. 1051-1062.

MARCUCCI, G. et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, n. 30, 2012, p. 742-750.

MELDI, K.M.; FIGUEROA, M.E. Epigenetic deregulation in myeloid malignancies. **Transl Res**, n. 165, 2014, p. 102-114.

MIZUNO, S. et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. **Blood**, n. 97, v. 5, 2001, p-1172-9.

PATEL, J.P. et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, n. 366, 2012, p. 1079-1089.

PLØEN, G. G. et al. Persistence of DNMT3A mutations at long-term remission in adult patients with AML. **Br J Haematol**, 2014, p. 478-486.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, n. 28, p. 1057-1068.

PUISSANT, C.; HOUDEBINE, L.M. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Biotechniques**, n. 8, 1990, p. 148-149.

QU, YING et al. Differential methylation in CN-AML preferentially targets non-CGI regions and is dictated by *DNMT3A* mutational status and associated with predominant hypomethylation of HOX genes. **Epigenetics**. 2014, n. 9, p. 1108-1119.

RENNEVILLE, A. et al. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association, **Leukemia**, n. 26, 2012, p. 1247-1254.

RIBEIRO, A.F.T. et al. A marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. **Blood**, n. 119, 2012, p. 5824-31.

ROSE, D. et al. Subtype-specific patterns of molecular mutations in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, n. 31, 2017, p. 11-17.

RUSSLER-GERMAIN, D. et al. The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers. **Cancer Cell**, n. 25, 2014, p. 442-54.

SANDERS, M.; VALK, P.J.M. The evolving molecular genetic landscape in acute myeloid leukaemia. **Curr Opin Hematol**, n. 20, 2013, p. 79-85.

SCHLENK, R.F. et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, n. 358, 2008, p. 1909-18.

SHAH, M.Y.; LICHT, J.D. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. **Nat Genet**, n. 43, 2011, p. 289-90.

SHLUSH, L.I. et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. **Nature**, n. 506, 2014, p. 328-33.

SINGH, R.R. et al. Detection of high-frequency and novel DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia by high-resolution melting curve analysis. **J Mol Diagnostics**, n. 14, 2012, p. 336-345.

THOL, F. et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, n. 29, 2011, p. 2889-96.

TIE, R. et al. Association between DNMT3A mutations and prognosis of adults with de novo acute myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, 2014.

TRAINA, F. et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. **Leukemia**, n. 28, 2014, p. 78-87.

VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N.L.; BRUNNING, R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, n. 100, 2002, p. 2292-302.

VARDIMAN, J.W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. **Blood**, n. 114, 2009, p. 937-51.

WAKITA, S. et al. Mutations of the epigenetics-modifying gene (DNMT3a, TET2, IDH1/2) at diagnosis may induce FLT3-ITD at relapse in de novo acute myeloid leukemia. **Leukemia**, n. 27, 2013, p. 1044-52.

XIE, S. et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. **Gene**, n. 236, 1999, p. 87-95.

YAN, X.J. et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. **Nat Genet**, n. 43, 2011, p. 309-315.

ZARE-ABDOLLAHI, D. et al. A mutational and expressional analysis of DNMT3A in acute myeloid leukemia cytogenetic subgroups. **Hematology**, n. 20, v. 7, 2015, p. 397-404.

ZION, M. et al. Progressive de novo DNA methylation at the bcr-abl locus in the course of chronic myelogenous leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 91, 1994, p. 10722-26.

APÊNDICE A

Publicação relacionada



Leading the way in experimental
and clinical research in
hematology

Home / October 8, 2015; Blood: 126 (15)

Clinical outcomes of patients with acute myeloid leukemia: evaluation of genetic and molecular findings in a real-life setting

Aleide S. Lima*, Mariana R. de Mello*, Eliana Fernandes, Matheus F. Bezerra, Mayara M. Oliveira, Bruno K. Duarte, Reijane A. de Assis, Fernanda R. Souto, Clarisa F. Ramos, Cintia G. Machado, Katia Pagnano, Antonio R. Lucena-Araujo, Irene Lorand-Metze, and Marcos A. Bezerra

APÊNDICE B

Publicação relacionada

**bjh** correspondence**Prognostic importance of CD56 expression in intermediate risk acute myeloid leukaemia****Authorship Contributions**

J.L.C-S. collected, analysed and interpreted data and drafted the manuscript. A.R.L-A performed the statistical analyses, interpreted data and drafted the manuscript. L.E.C., M.F.B., M.M.O., P.L.F-N., M.A.N., M.C.B-C., C.G.M. and D.M.M. obtained the samples, updated the clinical data and reviewed the manuscript. M.A.B., D.M.M. and A.R.L-A reviewed the paper and gave final approval for the submitted version.

Juan L Coelho-Silva¹

Luany E Carvalho²

Mayara M Oliveira¹

Pedro L Franca-Neto¹

Adryanna T Andrade¹

Aleide S Lima¹

Matheus F Bezerra¹

Marinus M Lima³

Maria A Neves⁴

Julia M Fonseca⁴

Maria C Barros-Correia⁴

Cintia G Machado⁴

Marcos A Bezerra¹

Daniel M Matos²

Antonio R Lucena-Araujo¹

ANEXO A

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	---

Continuação do Parecer: 064.427

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com recomendação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avallado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação " e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado .

RECIFE, 28 de Maio de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS		
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-800	
UF: PE	Município: RECIFE	
Telefone: (81)2128-8588	Fax: (81)2128-8588	E-mail: cepcos@ufpe.br