

Mariana Rezende Bandeira de Mello

**Interação das Características Morfológicas,
Fenotípicas e Moleculares e Sua Importância
Prognóstica na Leucemia Mielóide Aguda**

Campinas, 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**Interação das Características Morfológicas,
Fenotípicas e Moleculares e Sua Importância
Prognóstica na Leucemia Mielóide Aguda**

Mariana Rezende Bandeira de Mello

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração Biologia estrutural, celular, molecular e do desenvolvimento. Sob orientação da Prof Dra. Irene G.H. Lorand-Metze e co-orientação do Prof Dr. Fernando Ferreira Costa.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652 - BIBLIOTECA DA FACULDADE
DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M489i

Mello, Mariana Rezende Bandeira de, 1980
Interação das características morfológicas,
fenotípicas e moleculares e sua importância prognóstica
na leucemia mielóide aguda. / Mariana Rezende
Bandeira de Mello. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Irene Lorand-Metze
Coorientador: Fernando Ferreira Costa
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia mielóide aguda. 2. Prognóstico. 3.
Mutações. 4. Morfometria. 5. Metilação. I. Lorand-
Metze, Irene. II. Costa, Fernando Ferreira. III
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Interaction of morphological, molecular and phenotypic characteristics and its prognostic significance in acute myeloid leukemia.

Palavra-chave em inglês:

Acute myeloid leukemia

Prognostic

Mutations

Morphometry

Methylation

Área de concentração: Biologia estrutural, celular, molecular e do desenvolvimento

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze [Orientador]

Fernando Ferreira Costa [Coorientador]

Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso

Daniel Onofre Vidal

Carmen Silvia Passos Lima

José Barreto Campello Carvalheira

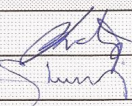
Data da defesa: 27-05-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da tese de Doutorado
Mariana Rezende Bandeira de Mello

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze 

2. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Passos Lima 

3. Prof(a). Dr(a). José Barreto Campello Carvalheira 

4. Prof(a). Dr(a). Elvira Deolinda R. Pereira Velloso 

5. Prof(a). Dr(a). Daniel onofre Vidal 

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/05/2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Arquimedes e Elizabeth, por serem meus exemplos de vida. Por todo apoio, incentivo e amor incondicional.

Às minhas irmãs, Luciana e Paula, pela amizade, estímulo e por todo carinho.

Ao meu marido, Marcos André, pelo apoio, incentivo, compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

À Dra Irene, pela sua admirável competência, dedicação e profissionalismo na vida acadêmica. Pelo apoio, paciência, compreensão e confiança durante todos estes anos de trabalho.

Ao Dr Fernando Costa, pela colaboração, por fornecer toda a infraestrutura do seu laboratório para a realização deste trabalho.

Ao Dr Konradin, pela dedicação e colaboração na elaboração e finalização do trabalho.

À Dulcinéia pela profissional competente que é. Pela paciência e disponibilidade em ajudar.

À Nicete e Dener, pelo fácil acesso, simpatia e competência.

À Arlete e Leonardo, pelo apoio didático, sempre ajudando na confecção e formatação de posters e teses.

À Salete, secretária da Pós-graduação, pelas orientações até o término da tese.

Aos amigos do Laboratório de Marcadores Celulares, Fernanda, Suiellen, Eliane, Rosângela e Felipe, por todo suporte técnico na citometria. Pelo apoio, incentivo, amizade e pelos bons momentos de convívio no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobina e Genoma, Flávia Leonardo, Carol, Kleber, Andrey, Daniela, Ana Flávia, Cayo Bruno, Fernanda, Cíntia, Flávia, Sheley, Ucha e Anderson, pela colaboração, amizade e carinho. Pelos bons anos de convívio dentro e fora do laboratório.

Aos grandes amigos, Dulcinéia, Magnun e Emanuel, pela amizade e todo carinho. Por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar. Dú e Magnun, também não poderia esquecer de agradecer a moradia e convívio nesses últimos meses.

Aos amigos Carla e Mário e toda família Penteadó, principalmente pela amizade e pelo carinho que sempre fui recebida. Pela alegria da chegada do meu “sobrinho” Geovanne.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Novamente, aos meus pais, Arquimedes e Elizabeth, pelos exemplos de honestidade, dignidade, respeito, luta e capacidade de “dar a volta por cima”. Por estarem sempre presentes em minha vida.

Às minhas irmãs, Luciana e Paula, pelo incentivo, amizade e companheirismo. Por “segurarem a barra” na minha ausência.

À minha segunda família, Ernesto, Margareth, Eduarda, Marcela e José Ernesto, por estarem sempre presentes. Por todo amor, apoio e disponibilidade.

Ao meu marido, Marcos André, pelo amor, amizade e paciência. Por sempre estar ao meu lado em qualquer situação. Pela compreensão e incentivo apesar da distância nesse último ano.

À minha avó Lígia, por confiar e torcer sempre por mim. Por me fazer presente em suas orações.

À minha avó, Almarinda, que mesmo não estando mais fisicamente entre nós, está sempre olhando por mim e me protegendo.

Às amigas de Recife, Liciania, Kaliny, Jemima e Pollyanna pela amizade e incentivo apesar da distância.

A todos meus familiares, por todo carinho e amor.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1.1- Leucemias Agudas	25
1.2- Leucemia Mielóide Aguda	25
1.3- Fatores Prognósticos	29
1.4- Metilação	32
1.5- Análises Morfométricas e de Textura da Cromatina Nuclear	34

OBJETIVOS	37
------------------------	----

PACIENTES E MÉTODOS

3.1- Critérios de Inclusão e Exclusão e Aspectos Éticos da Pesquisa	43
3.2- Dados Avaliados	43
3.3- Técnicas	44
3.4- Análise Estatística	51

RESULTADOS

4.1- Análise Descritiva	55
4.2- Características da Leucemia Promielocítica	58
4.3- Características dos Outros Subtipos de LMAs	64
4.4- Análise de Sobrevida	72
4.4.1- Análise de Sobrevida Uni e Multivariada das LMA M3	74
4.4.2- Análise de Sobrevida Uni e Multivariada dos Outros Subtipos de LMA	75

DISCUSSÃO	77
------------------------	----

CONCLUSÕES

6.1- Conclusões das LMA M3	89
6.2- Conclusões dos Outros Subtipos de LMA	89

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
---	----

ANEXOS	105
---------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Aloficocianina

BD - Becton Dickinson

CD - *Cluster Differentiation*

COBRA - *Combined Bisulfite Restriction Analysis*

CpG – pares de citosina guanina

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

dNTPs - Desoxirribonucleótidos trifosfato

DF – Dimensão Fractal

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

FAB - Franco, Americano e Britânico

FITC - Isitiocianato de Fluoresceína

Hb - Hemoglobina

HC – Hospital das Clínicas

IMF - Intensidade Média de Fluorescência

ITD – *Internal Tandem Duplication*

KCl – Cloreto de Potássio

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMA-CN – Leucemia Mielóide Aguda com Cariótipo Normal

LMC - Leucemia Mielóide Crônica

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MO - Medula Óssea

MPO – Mieloperoxidase

MSP – *Methylation Specific PCR*

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb – pares de base

PBS - Tampão Fosfato

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PE – Ficoeritrina

PerCP - Proteína Piridina de Clorofila

R^2 – “goodness of fit” da dimensão fractal do núcleo (taxa de ajuste da dimensão fractal da cromatina ao fractal ideal)

R^{245} - coeficiente corrigido do R^2

SLD – Sobrevida Livre de Doença

SMD – Síndromes Mielodisplásicas

SP - Sangue Periférico

TA – Temperatura Ambiente

TMO - Transplante de Medula Óssea

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das LMAs de acordo com os critérios FAB	27
Tabela 2: Classificação das LMAs segundo a OMS 2008	28
Tabela 3: Sequência dos <i>primers</i> e condições da bissulfito PCR utilizados	49
Tabela 4: Sequência dos <i>primers</i> e enzima utilizados nas reações para <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> ...	50
Tabela 5: Frequência quanto à classificação FAB	55
Tabela 6: Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LMA	56
Tabela 7: Cariótipo dos pacientes com LMA (n=71)	57
Tabela 8: Alterações cariotípicas e moleculares encontradas nos diferentes subtipos de LMA	58
Tabela 9: Frequência dos diferentes genótipos <i>FLT3</i> ITD/ <i>NPM1</i> nos pacientes com LMA M3 e nos outros subtipos de LMA	59
Tabela 10: Dados clínicos, hematológicos e moleculares dos pacientes com LMA M3 com e sem a presença da mutação <i>FLT3</i> -TKD	59
Tabela 11: Dados hematológicos, fenotípicas e moleculares dos pacientes com LMA M3 com e sem a presença da mutação <i>FLT3</i> -ITD	60
Tabela 12: Dados hematológicos dos pacientes com LMA M3 com o gene <i>CDKN2B</i> metilado e não metilado	60
Tabela 13: Dados hematológicos e fenotípicos dos pacientes com LMA M3 com o gene <i>CDKN2A</i> metilado e não metilado	61
Tabela 14: Dados hematológicos e fenotípicos dos pacientes com LMA M3 e nos outros subtipos de LMA	61
Tabela 15: Variáveis morfométricas e de textura da cromatina estudadas	62
Tabela 16: Variáveis morfométricas e de textura da cromatina estudadas nos pacientes LMA M3 com e sem a presença da mutação <i>FLT3</i> -ITD	63

Tabela 17: Dados hematológicos dos pacientes com LMA não M3 com e sem a mutação <i>FLT3</i> -TKD	64
Tabela 18: Mediana do número de leucócitos ($\times 10^9/l$) e IMF do CD34 nos grupos com e sem a presença das mutações	66
Tabela 19: Dados hematológicos e fenotípicos dos pacientes com o gene <i>CDKN2B</i> metilado e não metilado	69
Tabela 20: Dados hematológicos e fenotípicos dos pacientes com o gene <i>TP73</i> metilado e não metilado	69
Tabela 21: Frequência de alterações encontradas nos diferentes grupos de LMA	70
Tabela 22: Dados fenotípicos dos pacientes com LMA agrupados pelo grau de maturação	70
Tabela 23: Variáveis morfométricas e de textura da cromatina estudadas	71
Tabela 24: Análise de sobrevida uni e multivariada das LMAs M3	74
Tabela 25: Análise de sobrevida uni e multivariada dos outros subtipos de LMA	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios de diferenciação das LMAs	26
Figura 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados na classificação das leucemias agudas	45
Figura 3: Imagem de um núcleo segmentado	47
Figura 4: Imagem em escala de cinza de um núcleo segmentado e sua transformação pseudo 3D	47
Figura 5: Digestão com a enzima <i>EcoRV</i>	64
Figura 6: A- Paciente sem a mutação <i>FLT3</i> ITD. B- Paciente com a mutação <i>FLT3</i> ITD	65
Figura 7: A- Paciente sem a mutação no gene <i>NPM1</i> . B- Paciente com a mutação no gene <i>NPM1</i>	65
Figura 8: Pesquisa de metilação no gene <i>ESR1</i>	66
Figura 9: Pesquisa de metilação no gene <i>CDKN2B</i>	67
Figura 10: Pesquisa de metilação no gene <i>CDKN2A</i>	67
Figura 11: Pesquisa de metilação no gene <i>CDKN1C</i>	67
Figura 12: Pesquisa de metilação no gene <i>TP73</i>	68
Figura 13: Pesquisa de metilação no gene <i>ABCB1</i>	68
Figura 14: Sobrevida global dos pacientes em relação ao tipo de LMA	72
Figura 15: Sobrevida global dos pacientes LMA M3 quanto à presença da mutação <i>FLT3</i> -ITD	73
Figura 16: Sobrevida global dos pacientes quanto aos diferentes genótipos <i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i>	73

RESUMO

A classificação atual da OMS para LMA reconhece a importância da pesquisa de anormalidades genéticas para diagnóstico e manejo adequado do paciente. A textura da cromatina dos núcleos está relacionada com fenômenos epigenéticos como a metilação. Nosso estudo teve como objetivos estudar o status de metilação dos genes *CDKN2B* (*p15*), *CDKN2A* (*p16*), *CDKN1C* (*p57*), *TP73* (*p73*), *ESR1* (*ER*) e *ABCB1* (*MDR1*), verificar a frequência das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* e analisar parâmetros da morfometria e textura da cromatina. Verificamos também a associação entre o perfil imunofenotípico, textura nuclear e características moleculares. Além disso, analisamos a relação destas variáveis com a sobrevida global. Foram estudados 106 pacientes com LMA *de novo* (19 com LMA M3 e 87 com outros subtipos de LMA) diagnosticados no nosso Serviço. Nas LMAs M3 foi encontrado 15,8% de pacientes com *FLT3*-TKD e 10,5% *FLT3*-ITD. Os pacientes com LMA M3 foram mais jovens, apresentaram menor número de leucócitos e plaquetas. Tiveram também maior expressão de CD45 e MPO do que os outros subtipos de LMA. Os pacientes com LMA M3 tiveram melhor sobrevida que os outros subtipos. Dentre esses pacientes as LMA M3 *FLT3*-ITD+ apresentaram pior sobrevida. O desvio padrão do nível de cinza foi um fator independente de prognóstico. Em relação aos casos de LMA não M3 foi encontrado 23,3% dos pacientes com presença da mutação *FLT3*-ITD, 8,1% *FLT3*-TKD e 29,1% da mutação no gene *NPM1*. As mutações nos genes *NPM1* e *FLT3* foram mais frequente em pacientes com cariótipo normal. Dos pacientes com outros subtipos de LMA, 3,4% apresentaram metilação no gene *ESR1*, 26,4% no gene *CDKN2B*, 11,5% no gene *CDKN2A*, 1,1% no *CDKN1C* e 23,0% no gene *TP73*. Os pacientes que apresentaram o gene *CDKN2B* metilado tiveram menor dosagem de hemoglobina e expressão do CD13. Os pacientes com metilação no gene *TP73* apresentaram menor contagem de leucócitos, expressão de CD45, CD13, CD33 e MPO. Os pacientes com LMA sem maturação apresentaram menor R^{245} . Na análise de sobrevida dos pacientes com LMA, excluindo M3, os casos com *NPM1*+ *FLT3*-ITD- tiveram melhor sobrevida. O R^{245} , a entropia e a mutação *FLT3*-ITD foram fatores independentes de prognóstico. A frequência das mutações e de metilação encontrada foram semelhantes a outros estudos. O R^{245} pode ser uma variável nova para avaliação da textura da cromatina.

ABSTRACT

The WHO classification for acute myeloid leukemia (AML) has emphasized the cytogenetic and molecular aspects for diagnosis and proper management of the patients. The nuclear chromatin texture is related to epigenetic phenomena such as methylation. In our study we examined the frequency of mutations in *FLT3* and *NPM1* genes, the methylation status of genes *CDKN2B* (*p15*), *CDKN2A* (*p16*), *CDKN1C* (*p57*), *TP73* (*p73*), *ESR1* (*ER*) and *ABCB1* (*MDR1*) and analyzed features of nuclear morphometry and chromatin texture. We studied the association between the immunophenotypic profile, nuclear texture and molecular features. In addition, we analyzed the relationship between these variables and overall survival of the patients. We studied 106 patients with *de novo* AML: 19 with promyelocytic leukemia (APL) and 87 with other subtypes of AML diagnosed in our Service. Patients with APL were younger, had lower peripheral leukocyte counts and platelets. They also showed a higher expression of CD45 and MPO than other subtypes of AML. Among them, 15.8% presented *FLT3*-TKD and 10.5% showed *FLT3*-ITD. *CDKN2B* was methylated in 21.0%, *CDKN2A* in 21.0% and *TP73* in 10.5% of the patients. Methylation in *CDKN1C*, ER and *MDR1* were not found. Patients with APL had better survival than other subtypes. The standard deviation of gray level was an independent factor of prognosis. Among the other cases of AML, we found the *FLT3*-ITD mutation in 23.3%, the *FLT3*-TKD mutation in 8.1%, and 29.1% of the patients had mutation of the *NPM1* gene. Mutations in *NPM1* and *FLT3* were more frequent in patients with a normal karyotype. Among these patients, 3.4% had methylation of the *ESR1* gene, 26.4% in *CDKN2B*, 11.5% in *CDKN2A*, 1.1% in the *CDKN1C* and 23.0% in *TP73*. Patients with methylated *CDKN2B* showed lower hemoglobin levels and a lower expression of CD13. Patients with methylation in the *TP73* gene had lower peripheral leukocyte counts and lower expression of CD45, CD13, CD33 and MPO. Patients with AML without maturation had lower R²₄₅. In the survival analysis of patients with AML, except APL, the cases with *NPM1*+ *FLT3* ITD- had better survival. The R²₄₅, entropy and *FLT3*-ITD mutation were independent predictors of prognosis. The frequency of mutations and methylation found were similar with other studies. The R²₄₅ can be a new variable for evaluation of chromatin texture.

Introdução

1.1- Leucemias Agudas

A leucemia aguda pode ser definida como uma proliferação clonal maligna de células precursoras na medula óssea (MO) de etiologia desconhecida que leva à substituição da hematopoese normal por células imaturas capazes de infiltrar linfonodos, baço, fígado e outros órgãos (MARTINS E FALCÃO, 2000; PELLOSO, 2003).

A transformação maligna pode ocorrer durante qualquer estágio de diferenciação das células linfóides ou mielóides, o que explica a heterogeneidade da doença (SMITH, 1996). As leucemias agudas podem ser derivadas de 3 linhagens: linfóide B ou T e mielóide.

1.2- Leucemia Mielóide Aguda

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença clonal de células hematopoéticas caracterizada pela proliferação anormal e suspensão da diferenciação de células progenitoras da linhagem mielóide com acúmulo dessas células imaturas na MO. A infiltração da MO é frequentemente acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia (MARTINS, 2005; POLLYEA, 2011).

O mecanismo que leva a célula precursora mielóide a perder o controle da proliferação celular, ocasionando a expansão do clone leucêmico, permanece incerto. A alteração que desencadeia o processo neoplásico pode ocorrer em qualquer estágio da diferenciação das células precursoras mielóides (Figura 1), dando origem aos vários tipos de LMA atualmente conhecidos (MARTINS, 2005).

A LMA representa cerca de 15-20% das leucemias agudas da infância e 80% das leucemias dos adultos (MARTINS e FALCÃO, 2000). Os sinais e sintomas clínicos da LMA devem-se à infiltração da MO e eventualmente de outros órgãos pelo clone leucêmico, com subsequente inibição da hematopoese normal. Os pacientes podem apresentar anemia, sangramentos e febre. A infiltração leucêmica de vários órgãos pode levar a hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia das gengivas e dor óssea. Podem existir,

eventualmente, infiltração de pele e comprometimento do sistema nervoso central (SNC) (LLACER, 2005).

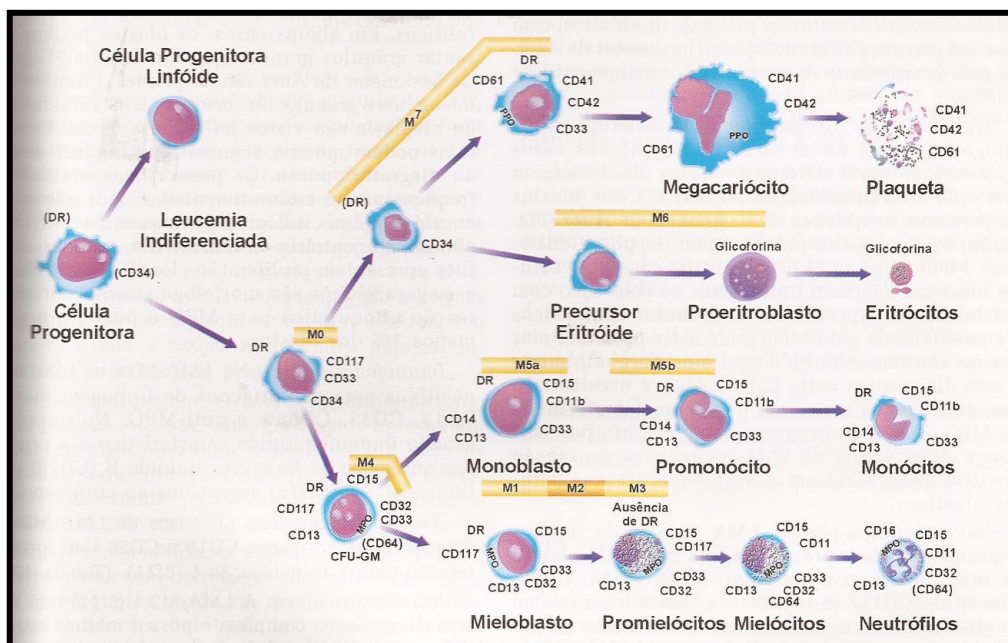


Figura 1: Estágios de diferenciação das LMAs.

O diagnóstico das leucemias agudas é baseado na presença de células blásticas, as quais devem constituir 30% das células nucleadas na MO do paciente, segundo o critério do Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) e 20% segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (MARTINS e FALCÃO, 2000; VARDIMAN, 2002; PELLOSO, 2003). A detecção da $t(8;21)$, $inv(16)$, $t(16;16)$ ou $t(15;17)$ é diagnóstico de leucemia aguda mesmo quando a contagem de blastos for menor que 20% (HEEREMA-MCKENNEY E ARBER, 2009).

O grupo FAB classifica as LMAs (Tabela 1), de acordo com aspectos morfológicos e citoquímicos, em 8 diferentes subtipos (M0 a M7). A classificação segundo a OMS de 2001 incorporou características imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares e introduziu importantes correlações prognósticas (VARDIMAN, 2002; CHEN, 2009; HEEREMA-MCKENNEY E ARBER, 2009). A classificação atual da OMS (Tabela 2) expandiu o número de classes caracterizadas por translocações cromossômicas recorrentes

e inclui duas classes provisórias caracterizadas por mutações gênicas, LMA com mutação no gene *NPM1* e LMA com mutações no gene *CEBPA* (HEEREMA-MCKENNEY E ARBER, 2009).

Tabela 1: Classificação das LMAs de acordo com os critérios FAB.

FAB	
M0	LMA minimamente diferenciada
M1	LMA sem maturação
M2	LMA com maturação
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia megacariocítica aguda

Tabela 2: Classificação das LMAs segundo a OMS 2008.

1. LMA com alterações genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22); (<i>RUNX1/RUNX1T1</i>)
LMA com inv(16) ou t(16;16)(p13.1;q22); (<i>CBFβ/MYH11</i>)
Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q12); (<i>PML/RARα</i>)
LMA com t(9;11)(p22;q23) (<i>MLLT3/MLL</i>)
LMA com inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); (<i>RPN1/EVII</i>)
LMA (megacariocítica) com t(1;22)(p13;q13); (<i>RBM15/MKLI</i>)
Classe provisória: LMA com mutação no gene <i>NMP1</i>
Classe provisória: LMA com mutação no gene <i>CEBPA</i>
2. LMA com alterações relacionadas à SMD
3. Neoplasias mielóides relacionada a terapia
4. LMA sem outra categorização
LMA com diferenciação mínima
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica/monocítica aguda
Leucemia eritróide aguda
Leucemia eritróide pura
Eritroleucemia, eritróide/mielóide
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielose aguda com mielofibrose
5. Sarcoma mielóide
6. Proliferações mielóide relacionadas à Síndrome de Down
Mielopoiese anormal transitória
LMA associada à Síndrome de Down

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo distinto da LMAs caracterizada pela presença da t(15;17). Esta translocação provoca a fusão do gene *PML* no cromossomo 15 com o gene *RARα* (receptor α do ácido retinóico) no cromossomo 17 (JÁCOMO, 2007; SWERDLOW, 2008; BEITINJANEH, 2010; CHILLÓN, 2010; SINGH, 2010).

No Brasil, a LPA representa aproximadamente 20% das LMAs *de novo*, uma incidência aumentada quando comparada a encontrada em estudos na Europa e Estados Unidos (JÁCOMO, 2007; SWERDLOW, 2008; LUCENA-ARAÚJO, 2010). Nas últimas décadas, o prognóstico da LPA teve grande melhora com o uso de quimioterapia associada ao uso do ácido *trans* retinóico (ATRA) e ao trióxido arsênico (BEITINJANEH, 2010).

As células leucêmicas de pacientes com LPA mostram um perfil de expressão antigênica distinto que inclui positividade forte de CD33, expressão de CD13 e CD117, rara expressão de HLA-DR e CD34, perda de CD7, CD11a, CD14 e CD18, e baixa expressão de CD15 (ORFAO, 2004; LO-COCO, 2006).

Muitos fatores prognósticos têm sido descritos, como a variante morfológica, padrões de fusão do gene *RARα* e contagem de leucócitos e plaquetas ao diagnóstico (SWERDLOW, 2008; CHILLÓN, 2010; SINGH, 2010). Como nos outros subtipos de LMA onde a citogenética e a presença de mutações gênicas representam fatores prognósticos importantes, o valor de anormalidades cariotípicas adicionais e/ou mutações moleculares ainda é incerto nesses pacientes (SWERDLOW, 2008; SINGH, 2010).

1.3- Fatores Prognósticos

A idade mais avançada é um fator prognóstico adverso associado à diminuição da remissão completa, sobrevida livre de doença (SLD), sobrevida livre de recidiva e sobrevida global e com maiores taxas de mortalidade relacionada ao tratamento e recaída em comparação a pacientes mais jovens (SMITH, 2010; POLLYEA, 2011).

Marcadores clínicos e laboratoriais como hepatoesplenomegalia, dosagem sérica de LDH elevada e alta contagem de leucócitos no sangue ao diagnóstico estão associados a

um pior prognóstico. A contagem de leucócitos elevada é um preditivo de morte na indução da remissão (SMITH, 2010).

A estratificação de risco da LMA em favorável, intermediário e desfavorável é baseada na citogenética e no status de mutações gênicas (*FLT3*, *KIT*, *NPM1* e *CEBPA*) e são usados para identificar quais pacientes se beneficiarão com transplante de medula óssea (TMO) alogênico (HEEREMA-MCKENNEY E ARBER, 2009).

Anormalidades cromossômicas caracterizadas por translocações balanceadas, perda e ganho de cromossomos são peculiares às leucemias e encontradas em mais de 65% dos casos. É considerada como prognóstico favorável a presença da translocação t(15;17), t(8;21) ou inv(16) (VAN DONGEN, 1999; VARDIMAN, 2002; PELLOSO, 2003). São consideradas desfavoráveis alterações envolvendo os cromossomos 3, 9, 11, 20, 21, del(5q) ou del(7q) (PELLOSO, 2003).

O estudo de novos fatores prognósticos na LMA tem ajudado a desenvolver novos alvos terapêuticos e permite um melhor entendimento da doença (FORAN, 2010). Muitos dos novos fatores prognósticos importantes foram identificados nos pacientes com LMA com cariótipo normal (LMA-CN), que compreendem o maior subgrupo de pacientes com LMA (40-50%) e são classificados como sendo de risco intermediário. Dentre esses fatores, as mutações envolvendo os genes *FLT3*, *NPM1*, *MLL*, *CEBPA*, *NRAS*, *C-KIT* e *RUNX1* são as alterações mais comuns na LMA-CN (HASLAM, 2010; FORAN, 2010).

Dentre as trocas genéticas, mutações no gene *FLT3* são de particular interesse. Em paralelo com mutações no gene *NPM1* e *KIT*, mutações no *FLT3* são uma das mais freqüentes alterações somáticas na LMA, ocorrendo em aproximadamente 20-30% dos pacientes (KOH, 2009).

O gene *FLT3*, encontrado no cromossomo 13q12, codifica uma proteína de membrana, membro da família do receptor da tirosina quinase classe III e está envolvido na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose dos progenitores das células hematopoéticas (BALDUS, 2007; MRÓZEK, 2007; HASLAM, 2010). A duplicação em *tandem* interna (ITD) do gene *FLT3* ocorre dentro do domínio justamembrana do gene (éxons 14 e 15) variando no comprimento da região duplicada de três a mais de 400

nucleotídeos, é uma das alterações moleculares mais prevalentes em pacientes com LMA-CN sendo detectada numa frequência de 28-40%. Clinicamente, pacientes com *FLT3*-ITD diferem dos pacientes sem esta mutação no que diz respeito a características pré-tratamento e resposta ao tratamento. Pacientes *FLT3*-ITD positivos estão associados com leucocitose, alta porcentagem de blastos na MO, aumento do risco de recaída na remissão completa e redução da sobrevida (BALDUS, 2007; MRÓZEK, 2007; GALE, 2008). Os primeiros estudos retrospectivos demonstraram que a mutação *FLT3*-ITD está associada a uma sobrevida significativamente pior em adultos jovens (<60 anos). A incidência de mutações *FLT3* aumenta com a idade, mas a presença da mutação parece ter impacto menor no prognóstico entre os pacientes mais idosos (>60 anos), possivelmente em função de outros fatores prognósticos adversos serem mais prevalentes (FORAN, 2010).

Além disso, 5-14% dos pacientes LMA-CN apresentam uma mutação missense no éxon 20 do gene *FLT3*, isto é, dentro da alça de ativação do domínio da tirosina quinase (*FLT3*-TKD). As substituições D835Y constituem aproximadamente 50% das mutações *FLT3*-TKD. Mutações *FLT3*-TKD menos frequentes envolvem outros resíduos de aminoácidos, incluindo o Y842C, K662Q e V592A (BALDUS, 2007; WHITMAN, 2008). O *FLT3*-ITD e *FLT3*-TKD promovem a fosforilação da proteína *FLT3*, levando à interrupção da hematopoese normal. Pacientes com mutação no *FLT3* apresentam pior prognóstico do que os pacientes sem esta alteração (BALDUS, 2007; MRÓZEK, 2007; HASLAM, 2010).

A descoberta de mutações no gene *NPM1* na LMA foi baseada na observação da localização citoplasmática aberrante da proteína NPM (em vez de nuclear) por imunohistoquímica. NPM é uma proteína de transporte núcleo-citoplasmática localizada principalmente no nucléolo e tem várias funções como: interagir com *p53* no controle da proliferação celular e apoptose; está envolvida na manutenção da estabilidade genômica controlando o reparo do DNA e a duplicação do centrômero durante a mitose; e desempenha um papel fundamental na biogênese do ribossomo (FORAN, 2010).

O gene *NPM1*, localizado no cromossomo 5q35, codifica a proteína NPM. Esse gene pertence a uma nova categoria que funciona tanto como oncogene como gene

supressor de tumor, dependendo dos níveis de expressão do gene, interação com parceiros e compartimentalização (FORAN, 2010). Mutações no gene *NPM1* normalmente ocorrem no éxon 12 do gene, mas raramente podem envolver outros éxons (por exemplo, 9 e 11). Mutações nesse gene são encontradas em várias desordens hematológicas e são frequentes lesões genéticas identificadas em adultos com LMA, ocorrendo em cerca de 30% dos casos. Em crianças com LMA as mutações no gene *NPM1* são menos frequentes (cerca de 7% dos casos), indicando aumento de frequência da alteração genética com a idade. Tanto em crianças quanto em adultos com LMA, as mutações no *NPM1* estão associadas com cariótipo normal, embora com frequências diferentes (cerca de 53% dos adultos com LMA-CN e 24% das crianças com LMA-CN). Mutações no gene *NPM1* identificam um subgrupo de pacientes de prognóstico favorável associados com alta taxa de remissão completa e maior sobrevida livre de eventos (BALDUS, 2007; FALINI, 2007). Cerca de 40% dos pacientes com mutações no gene *NPM1* também são *FLT3-ITD* positivos. O prognóstico desfavorável dos pacientes com *FLT3-ITD* não é afetado pela presença ou ausência de mutações no gene *NPM1*. Em contraste, pacientes sem *FLT3-ITD* e com mutações no gene *NPM1* têm significativamente melhor sobrevida livre de eventos e sobrevida global do que os pacientes sem mutações no *NPM1* (BALDUS, 2007).

O estudo de fatores prognósticos na LMA é muito importante, principalmente, para estratificação dos pacientes com LMA quanto ao grupo de risco e escolha do tratamento adequado para esses pacientes.

1.4 – Metilação

Alterações epigenéticas têm um papel importante na biologia do câncer. Fatores epigenéticos são definidos como modificações no genoma, ocorridos durante a divisão celular, que não envolvem troca na seqüência de DNA. Ou seja, são aqueles que alteram o fenótipo sem alterar o genótipo (FEINBERG, 2001; MOMPARDLER, 2003; DAS e SINGAL, 2004).

Como principal processo epigenético envolvido na regulação da expressão gênica, a metilação consiste na adição de um radical metil (CH_3) nas bases nitrogenadas citosinas

(C) em pares de citosina guanina (CpG). Pares CpG tendem a estar em conjunto em áreas conhecidas como ilhas CpG que estão presentes, principalmente, nas regiões promotoras dos genes (GARCIA-MANERO, 2003; MOMPALER, 2003).

Metilação nas ilhas CpG nas regiões promotoras de genes está associada com o silenciamento do gene e fenômenos fisiológicos observados em processos como a inativação do cromossomo X na mulher e no *imprinting* genômico. Em contraste, metilação aberrante em genes supressores do tumor é observada frequentemente em doenças malignas humanas, incluindo leucemias agudas (GARCIA-MANERO, 2003; MOMPALER, 2003).

A metilação de promotores gênicos está associada ao silenciamento do gene. Esta observação em células tumorais pode sugerir que a metilação aberrante do DNA seria uma via para inativação de genes supressores de tumor (DAS e SINGAL, 2004).

A metilação está associada às leucemias e outras doenças hematológicas (DAS e SINGAL, 2004; GUTIERREZ, 2005). Muitos genes foram encontrados metilados nos cânceres. Os genes susceptíveis são os genes envolvidos na regulação do ciclo celular (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *Rb*, *p14^{ARF}*, *CDKN1C*, *TP73*), com o sistema de reparo do DNA (*BRCA1*, *MGMT*), apoptose (*DAPK*, *TMS1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *p14^{ARF}*, *TP73*), resistência a drogas, diferenciação, angiogênese e metástase (DAS e SINGAL, 2004; ZÖCHBAUER-MÜLLER, 2001).

A metilação aberrante do DNA de genes supressores de tumor parece ocorrer em estágios precoces do desenvolvimento tumoral e aumenta progressivamente, levando ao fenótipo maligno. A detecção da metilação anormal tem sido utilizada como marcador em potencial para o câncer (HERMAN, 1998; JONES e LAIRD, 1999; MOMPALER, 2003). Alterações epigenéticas, como a metilação, são frequentemente encontradas em pacientes com síndromes mielodisplásicas (SMD), leucemia linfóide aguda (LLA) e LMA (CHEN e WU, 2002; GUTIERREZ, 2005). Além disso, o aumento da taxa de metilação nas regiões promotoras dos genes está associado com pior prognóstico da doença, e a sobrevida em pacientes com LMA e SMD com metilação no DNA genômico é significativamente menor comparado com aqueles sem metilação anormal no DNA (MAHMUD, 2009).

Alguns genes têm sido avaliados quanto ao seu padrão de metilação em desordens hematopoéticas, principalmente nas leucemias agudas. Estudos sugerem que *p14* e *CDKN2A* são raramente metilados na LLA, embora Roman-Gomez *et al.* tenham encontrado recentemente uma frequência elevada. O *CDKN1C* está metilado em 50% dos adultos, mas é aparentemente raro em crianças com LLA. O *CDKN2B* encontra-se frequentemente metilado nas leucemias agudas. Metilação do *p21* é rara em alguns cânceres. O *TP73* encontra-se metilado em cerca de 20% das crianças e adultos com LLA e 15% das LMAs (GUTIERREZ, 2005; GARCIA-MANERO, 2003). O gene *CDH1*, envolvido na adesão celular, foi descrito como metilado em 32 a 78% de pacientes com LMA e em 53% dos pacientes com LLA. O gene *HIC1*, gene supressor de tumor, está metilado em 10% dos pacientes com LMA e em 50-100% para LLA (LEONE, 2002). O gene *ESR1* e *ABCBI* foram encontrados frequentemente metilados nas LLAs e LMAs (GARCIA-MANERO, 2002; GARCIA-MANERO, 2003; EKMEKCI, 2004).

1.5 - Análises Morfométricas e de Textura da Cromatina Nuclear

Textura é o termo genericamente utilizado para indicar o aspecto de uma imagem ou parte dela (HARALICK, 1973). A textura da cromatina nuclear está relacionada com a sua distribuição devido a expressão ou supressão de genes, devido a fenômenos genéticos e epigenéticos, tais como metilação ou modificação das histonas, o que remodela profundamente a arquitetura nuclear característica de cada tipo de tecido e a maturação celular. Mudanças fisiológicas ou patológicas podem influenciar neste processo (CREMER, 2005; GILBERT 2005; MISTELI, 2005; ORR, 2005).

De Capoa *et al* (1999) demonstraram uma correlação entre os níveis de metilação e a condensação da cromatina no núcleo interfásico, analisado em esfregaços corados com Giemsa. Chen *et al* (2009) mostraram que pacientes com LMA com invaginações nucleares proeminentes apresentaram alta frequência das mutações *FLT3-ITD* e *NPM1*.

As tentativas de utilizar-se de ferramentas matemáticas aplicadas a imagens de microscopia objetivam oferecer maior confiabilidade ao processo diagnóstico (METZE e ADAM, 2005). Diversos estudos vêm demonstrando a utilidade das técnicas de análise de

textura na diferenciação objetiva de células de diversas neoplasias (ADAM, 2004 a; ADAM, 2004 b; METZE, 2004). Desta forma o estudo da textura nuclear apresenta-se como importante ferramenta na avaliação histológica e citológica. O tamanho, a forma e a textura dos núcleos são de fundamental importância na avaliação citológica de malignidade (ADAM, 2002).

Nos últimos anos, análises de imagens computadorizadas de microscopia têm sido amplamente utilizados na patologia e citologia para a diferenciação de células normais, tumores benignos e malignos, como marcador prognóstico em neoplasias e em análise do remodelamento da cromatina de células em cultura (MELLO, 2007; METZE, 2009; BEDIN; 2010). A análise de imagens tem se mostrado uma forma rápida e confiável para análises morfológicas quantitativas e, além disso, é capaz de detectar alterações morfológicas sutis que não podem ser reconhecidas por microscopia convencional (METZE, 2009; BEDIN; 2010; METZE, 2010).

Foi visto que as LLAs de origem B ou T apresentam diferenças significativas nas características de textura nuclear o que provavelmente reflete os diferentes eventos moleculares associados com a diferenciação celular, padrão de metilação dos genes e apoptose assim como eventos funcionais específicos da linhagem (MELLO, 2008).

Um aspecto importante da análise de textura é a determinação da fractalidade. A dimensão fractal e o “goodness of fit” (R^2) foram considerados fatores prognóstico independentes em outras doenças neoplásicas como, melanoma e mieloma múltiplo (BEDIN, 2010; FERRO, 2011).

Até o momento ainda não existem estudos de morfometria e textura da cromatina em pacientes com LMA. O estudo desses parâmetros da imagem dos núcleos de blastos leucêmicos e a correlação com outros fatores prognósticos conhecidos na LMA pode ser interessante e útil na classificação quanto ao grupo de risco dos pacientes com LMA.

Objetivos

- 1- Verificar a frequência das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* nas LMAs *de novo*.
- 2- Estudar o status de metilação dos genes *CDKN2B* (*p15*), *CDKN2A* (*p16*), *CDKN1C* (*p57*), *TP73* (*p73*), *ESR1* (*ER*) e *ABCB1* (*MDR1*).
- 3- Analisar diversos parâmetros da morfometria e textura da cromatina.
- 4- Verificar associação entre o perfil imunofenotípico, textura nuclear e características moleculares.
- 5- Comparar a importância prognóstica de todas estas características.

Pacientes e Métodos

3.1- Critérios de Inclusão e Exclusão e Aspectos Éticos da Pesquisa

Foram incluídos prospectivamente no estudo todos os casos de LMA *de novo* diagnosticados no Hemocentro e no HC da UNICAMP durante o período de 2007 a 2009, sem tratamento prévio. Foram excluídos aqueles pacientes com diagnóstico de leucemia bifenotípica, LLA, pacientes com LMC em crise blástica e leucemias secundárias.

O material utilizado na pesquisa foi o mesmo encaminhado aos laboratórios de rotina e não foi feita nenhuma coleta adicional nos pacientes. Os dados clínicos e laboratoriais de interesse da pesquisa de cada paciente foram obtidos dos prontuários e inseridos em base de dados para análises posteriores.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (n°389/2007).

3.2 – Dados Avaliados

Ao diagnóstico foram avaliados:

- Hemograma
- Mielograma
- Cariótipo
- Imunofenotipagem
- Morfometria
- Padrões de metilação
- Mutações nos genes *FLT3* e *NPM1*

O diagnóstico de LMA foi baseado na presença de uma população anômala de blastos na MO (>20%), Sudan positivo e α -naftil-acetato esterase negativo ou positivo. A imunofenotipagem foi realizada em todos os casos.

Os casos foram classificados de acordo com os critérios FAB e OMS. Em algumas análises os casos foram agrupados em LMA sem maturação (M0, M1 e M5) e em LMA com maturação (M2, M4, M6 e M7).

Os pacientes foram tratados segundo o protocolo utilizado por Mayer *et al* (1994) e Kern *et al* (2006). Para os pacientes acima de 65 anos foi usado o protocolo de acordo com Kantarjian *et al* (2006). Nos pacientes com leucemia promielocítica aguda foi utilizado o protocolo Aida modificado (PAGNANO *et al*, 2010). Os pacientes que tinham doador de medula relacionado compatível foram submetidos a TMO alogênico após a 1ª consolidação.

De cada paciente foi coletado a data do diagnóstico, data de óbito, transplante (censurado no dia do TMO) ou última consulta para o cálculo da sobrevida global.

3.3- Técnicas

* Imunofenotipagem

Foram coletadas de cada paciente, amostras de SP e/ou MO em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Foi realizado um ajuste na concentração de células em $5 \times 10^6/\text{ml}$ para a marcação de membrana e $2 \times 10^6/\text{ml}$ para marcação de citoplasma.

Para marcação da membrana celular incubou-se 100ul do material com 5ul de cada anticorpo por 20 minutos à temperatura ambiente (TA) no escuro. Acrescentou-se 2ml de solução lisante e foi incubado por 10 minutos à TA no escuro. As amostras foram lavadas com 2ml de PBS e ressuspensas em 0,5ml de PBS para leitura em citômetro de fluxo.

Para marcação de citoplasma incubou-se 100 ul do material com 5ul do anticorpo de membrana por 20 minutos à TA no escuro. Acrescentou-se 2ml de solução lisante e incubou por 10 minutos à TA no escuro. Foi utilizado o Kit de Permeabilização (Dako) segundo as instruções do fabricante. Acrescentou-se 5ul do anticorpo e incubado por 15 minutos à TA no escuro. As amostras foram lavadas com 2ml de PBS e ressuspensas em 0,5 ml de PBS para leitura em citômetro de fluxo.

Para tipagem das leucemias foi usada imunofenotipagem com um painel de três cores (FITC/ PE/ PERCP) (Figura 2). No painel secundário para LLA-T é utilizado um painel com quatro cores (FITC/ PE/ PERCP/ APC).

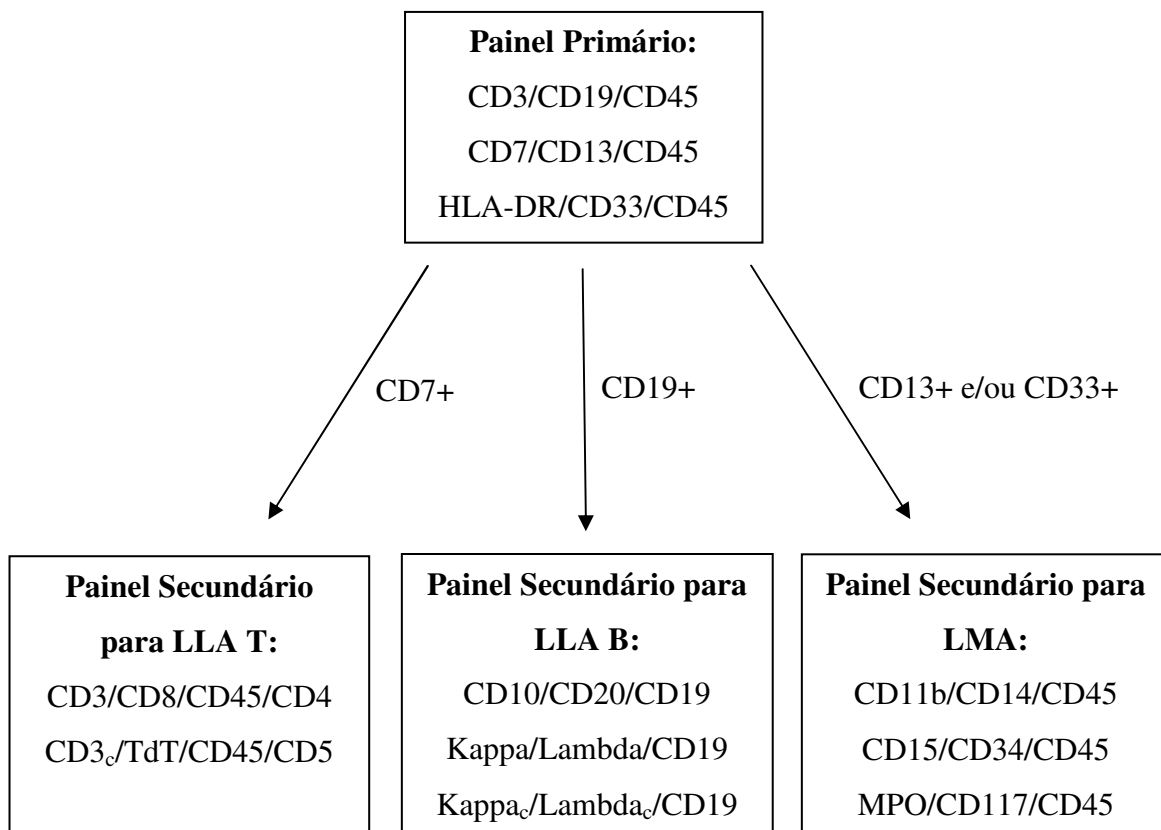


Figura 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados na classificação das leucemias agudas.

O painel primário foi utilizado para definição da linhagem celular e o secundário direcionado para os marcadores específicos de cada linhagem.

Foi realizada a aquisição de 10.000 eventos em cada tubo, efetuada em citômetro de fluxo, modelo FACs Calibur™ (Becton-Dickinson, San Jose – CA -USA), utilizando o programa Cell-Quest™ (BD). A análise foi realizada no programa Paint-a-Gate™ (BD).

* Cariótipo

A amostra de MO foi adicionada ao meio de cultura (meio RPMI 1640 + soro fetal bovino + penicilina e estreptomicina + heparina). Essa amostra foi colocada na estufa a 37°C por 24h. Acrescentou-se demecolcine para estabilizar a divisão do ciclo mitótico. Foi adicionada uma solução hipotônica de KCl 0,075M para lisar a membrana nuclear e

depois interrompeu-se a hipotonia com um fixador (diluição 3:1 de metanol + ácido acético). Foram feitas lavagens utilizando a solução fixadora. Pingou-se o material em lâminas e estas foram coradas utilizando a técnica de bandeamento G. Foram analisadas no mínimo 20 metáfases após captura das imagens com aparelho Cytovision.

* Morfometria

Para análise morfométrica foram utilizados esfregaços de MO corados pelo Leishman. Foram adquiridas 100 imagens consecutivas de blastos por paciente capturados pelo sistema Leica DC 500 (formato bmp, lente ocular com aumento de 10 X e objetiva com aumento de 100 X em óleo de imersão).

Os núcleos foram segmentados (Figura 3) de modo interativo. As imagens foram transformadas em escala de cinza (Figura 4) com níveis de luminância (graus de cinza) variando entre 0 e 255. Foram examinadas as seguintes variáveis:

- ✓ Área
- ✓ Fator de forma → permite avaliar o quanto próxima a forma do contorno da imagem segmentada é da circunferência.
- ✓ Desvio padrão do nível de cinza → variabilidade dos níveis de cinza. Pode demonstrar áreas de baixa, média ou alta condensação da cromatina.
- ✓ Variáveis da matriz de co-ocorrência de acordo com Haralick:
 - Entropia → revela a existência de um processo de diferenciação nuclear progressivo. Quando apresenta valores menores significa uma maior organização da cromatina, conseqüentemente um núcleo mais maduro.
 - Contraste → medida da quantidade de variação local de níveis de cinza.
 - Momento diagonal → valores maiores mostram as variações abruptas de brilho da imagem.
 - Proeminência de agrupamentos → medida de condensação da cromatina nuclear.
 - Homogeneidade local → medida de homogeneidade em uma imagem.

✓ Quanto a fractalidade da cromatina, foram analisados a dimensão fractal (DF) segundo o método de Minkowski-Bouligand e a sua “goodness of fit” (taxa de ajuste da dimensão fractal da cromatina ao fractal ideal – R^2) após transformação pseudo-3D (Figura 4) (METZE, 2009; BEDIN, 2010). Foi usada a correção a 45 graus (R^{245}) segundo Albrechtsen (2009).

- DF → representa o nível de irregularidade de um fractal. A fractalidade está presente, quando características semelhantes podem ser encontradas independentemente do aumento da imagem na análise. Essa análise também é importante porque independe da qualidade da coloração da imagem e pode mostrar aspectos relevantes da complexidade de uma estrutura não revelado pela morfometria clássica.

- R^{245} → coeficiente corrigido do R^2 . O R^2 é um importante critério de fractalidade e é definido como uma estimativa da “qualidade do fractal”. O R^2 pode ser interpretado como uma medida da rugosidade da superfície da imagem do núcleo (Adam, 2006).

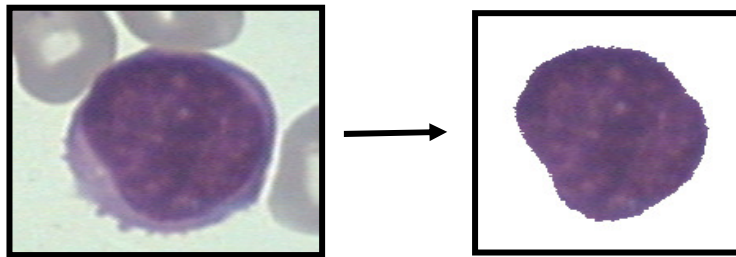


Figura 3: Imagem de um núcleo segmentado.

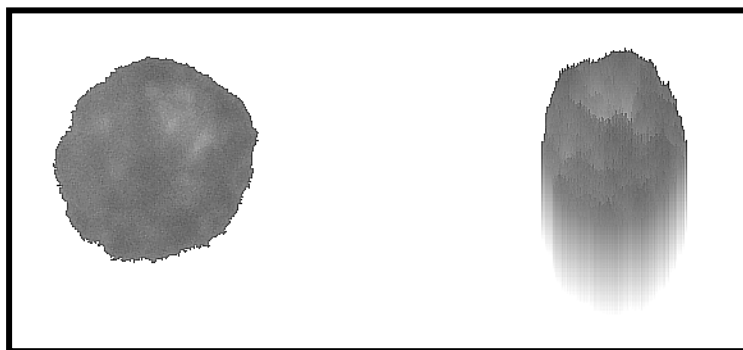


Figura 4: Imagem em escala de cinza de um núcleo segmentado e sua transformação pseudo 3D.

* Metilação

A extração do DNA foi realizada pela técnica padrão de fenol-clorofórmio (DAVIS, 1986). O DNA foi quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

Os DNAs das amostras foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio utilizando o kit EZ DNA Methylation Kit™ (Zymo Research). Este tratamento converte as citosinas não-metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas (GARCIA-MANERO, 2003).

Para os genes *CDKN2A* e *TP73* (Figura 3) foram realizadas reações de PCR específicas para detecção de metilação (*MSP – methylation specific PCR*) conforme Herman and Baylin (1998). Na amplificação por PCR foram utilizados 2 pares de *primers*. Um dos pares reconhece especificamente as seqüências com as citosinas mantidas em suas posições originais (metiladas), enquanto o outro é específico para as timinas nos lugares das citosinas (seqüências não-metiladas). Em todas as reações foram utilizados controles positivos (U937 e HL60) e negativos.

As reações de PCR foram realizadas com a preparação do mix: tampão 10x; 1,25mM de dNTP's; 6,7mM de MgCl₂; 500mM dos *primers sense e antisense*; 0,025U de Taq platinum polimerase e água estéril. Adicionou-se 1µl da amostra de DNA tratado com bissulfito. A reação de PCR foi iniciada com desnaturação por 5 minutos a 95°C. A amplificação foi feita com 45 ciclos de 95°C por 1 minuto, temperatura específica de *annealing* de cada *primer* (Tabela 3) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Para finalizar, 72°C por 7 minutos. Para visualização dos fragmentos amplificados, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio.

Para os genes *CDKN2B*, *CDKN1C*, *ESR1* e *ABCB1* (Figura 3) foi utilizado bissulfito-PCR seguido de análise de restrição (COBRA) conforme Garcia-Manero (2002). As reações de PCR foram realizadas no volume final de 50µl. Em cada reação são usados 1µl do DNA tratado com bissulfito, 1,25mM de dNTP's, 6,7mM de MgCl₂, tampão 10x, 500mM de cada *primer* e 0,025U de Taq platinum polimerase. As reações de PCR foram realizadas utilizando a temperatura de 95°C por 5 min e temperaturas específicas de

annealing de cada *primer* (Tabela 3). Após a amplificação os produtos de PCR foram digeridos com enzimas de digestão específicas (Tabela 3) e os produtos separados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio.

Tabela 3: Sequência dos *primers* e condições da bissulfito PCR utilizados.

<i>Primers</i>	Sequência	Temperatura (°C)	Enzima	Referência
<i>ESR1</i>	F: 5' GGTTTTTGAGTTTTTTGTTTTG 3' R: 5' AACTTACTATCCAAATACACCTC 3'	51	<i>BstUI</i>	Garcia-Manero <i>et al</i> (2002)
<i>ABCBI</i>	F: 5' GTTATAGGAAGTTTGAGTTT 3' R: 5' AAAAACTATCCCATAATAAC 3'	51	<i>TaqI</i>	Garcia-Manero <i>et al</i> (2003)
<i>CDKN2B</i>	F: 5' GGAGTTTAAGGGGGTGGG 3' R: 5' CCTAAATTAATTCTAAAAAAAAC 3'	58	<i>BstUI</i>	Garcia-Manero <i>et al</i> (2002)
<i>CDKN1C</i>	F: 5' GGTTGGGYGTTTTATAGGTTA 3' R: 5' ACCTAACTATCCGATAATAAACTCTTC 3'	55	<i>HhaI</i>	Shen <i>et al</i> (2003)
<i>CDKN2A U</i>	F: 5' TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT 3' R: 5' CAACCCCAAACCACAACCATAA 3'	60	-	Wong <i>et al</i> (2000)
<i>CDKN2A M</i>	F: 5' TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC 3' R: 5' GACCCCGAACCGCGACCGTAA 3'	60	-	Wong <i>et al</i> (2000)
<i>TP73 U</i>	F: 5' AGGGGATGTAGTGAAATTGGGGTTT 3' R: 5' ATCACAACCCCAAACATCAACATCCA 3'	60	-	Garcia-Manero <i>et al</i> (2002)
<i>TP73 M</i>	F: 5' GGACGTAGCGAAATCGGGGTTC 3' R: 5' ACCCCGAACATCGACGTCCG 3'	60	-	Garcia-Manero <i>et al</i> (2002)

Legenda: M – *methylated* (metilado); U – *unmethylated* (não metilado).

* Detecção das Mutações nos Genes *FLT3* e *NPM1*

Na pesquisa das mutações no gene *NPM1* e *FLT3*-ITD foi feita a técnica de genotipagem utilizando o equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare - Amersham) e analisadas pelo software *Fragment Profiler* v1.2 (Figuras 4 e 5).

As amostras foram amplificadas nas seguintes condições de reação: 0,5µl de DNA genômico; 120mM do *primer FLT3* sense marcado com fluoróforo HEX (Tabela 3) e 120mM do *primer FLT3* antisense não marcado; 240mM de *primer NPM1* sense marcado com fluoróforo FAM (Tabela 4) e 240mM do *primer NPM1* antisense não marcado; tampão 10X; 3mM de MgCl₂; 0,2mM de dNTP's; 0,05U de taq polimerase e água. Condições de ciclagem: desnaturação inicial 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 1 minuto; e 72°C por 2 minutos. Extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR marcados foram diluídos 40x em água. Em seguida, 2µl de cada diluição foi distribuída em placa de 96 poços previamente preparada com uma mistura contendo 7,75µl de *Genotyping Loading Solution* (0,1% de Tween 20 em H₂O) + 0,25µl de MegaBACE Size standards ET550-R, perfazendo um volume final de 10µl. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos antes de serem colocadas no equipamento.

Tabela 4: Sequência dos *primers* e enzima utilizados nas reações para *FLT3* e *NPM1*.

<i>Primers</i>	Sequência	Enzima
<i>NPM1</i>	F: 5' GTGGTAGAATGAAAAATAGAT 3'	-
	R: 5' CTTGGCAATAGAACCTGGAC 3'	
<i>FLT3</i> -ITD	F: 5' GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC 3'	-
	R: 5' CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC 3'	
<i>FLT3</i> -TKD	F: 5' CCGCCAGGAACGTGCTTG 3'	<i>EcoRV</i>
	R: 5' GCAGCCTCACATTGCCCC 3'	

Na análise da mutação *FLT3*-TKD foi realizado PCR com a utilização da enzima Taq DNA Polimerase (0,025U), *primers* (200nM) (Tabela 4), dNTP's (0,2mM), MgCl₂ (2mM), tampão 10x e água. As reações foram submetidas à amplificação em termociclador sob as seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 40 segundos, 72°C por 30 segundos; e extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão com a enzima *EcoRV* e separados por corrida eletroforética em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio.

3.4- Análise Estatística

Foi realizada análise estatística descritiva e as correlações foram examinadas pelo teste de Spearman. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Foi considerado significativo $p \leq 0,05$. A influência das variáveis categóricas na sobrevida global foi analisada pelo modelo de Kaplan-Meier. Para estudar a relação de todas as características clínicas, fenotípicas, morfométricas e moleculares na sobrevida global dos pacientes, foi utilizada a regressão de Cox de risco proporcional. Em uma segunda etapa, todas as variáveis com $p < 0,10$ foram incluídas em uma regressão multivariada de Cox (*input* $p \leq 0,05$ e *output* $p \leq 0,1$; seleção de backward conditional).

Resultados

4.1- Análise Descritiva

Entraram no estudo 106 pacientes com LMA *de novo* diagnosticados no Hemocentro da Unicamp. Na tabela 5 está representada a frequência em relação à classificação da LMA.

Tabela 5: Frequência quanto à classificação FAB.

Tipo LMA	Números de Casos
M0	10
M1	23
M2	27
M3	19
M4	17
M5	8
M6	1
M7	1

Como a LMA promielocítica tem características próprias, e a frequência destes casos na amostra foi grande, separamos estes casos para análises separadas. Dados relacionados à idade, sexo e índices hematológicos dos pacientes com LMA estão representados na tabela 6.

Tabela 6: Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LMA.

	Outros Subtipos de LMA	LMA M3
Idade (anos)	53,5 (9-97)	44,0 (20-82)
Masculino/Feminino	41/46	9/10
Hemoglobina (g/dl)	8,1 (3,4-13,7)	8,8 (3,0-14,1)
Leucócitos ($\times 10^9/l$)	30,0 (0,8-281,3)	5,0 (0,69-160,0)
Plaquetas ($\times 10^9/l$)	42,0 (2,0-289,0)	18,5 (5,0-85,0)

Analisando o cariótipo (Tabela 7), 34 pacientes apresentaram cariótipo normal, 37 cariótipo alterado, 12 tiveram resultado inconclusivo devido ao pequeno número ou ausência de metáfases e 17 pacientes não foram analisados. As alterações cariotípicas encontradas no diferentes subtipos de LMA estão apresentadas na tabela 8. Em 6 casos, embora o cariótipo não tivesse dado resultado, a alteração foi detectada por métodos moleculares.

Tabela 7: Cariótipo dos pacientes com LMA (n=71).

Alterações Cariotípicas	N
LMA M3 (n=10):	
t(15;17)	8
t(15;17), t(4;6)	1
t(15;17), del (7)	1
Alterações de baixo risco (n=16):	
inv(16)	3
t(8;21)	2
-X, t(8;21)	1
Cariótipo normal <i>NPM1</i> + <i>FLT3</i> ITD-	10
Alterações de risco intermediário (n=31):	
Cariótipo normal	21
+8	3
-Y	1
del(8)	1
+21	1
t(8;16)	1
t(1;11)	1
t(11;20)	1
Hiperdiploidia	1
Alterações de alto risco (n=14):	
del(5)	2
del(7)	2
i(17)	2
Cariótipos complexos	5
Cariótipo normal <i>FLT3</i> ITD+ <i>NPM1</i> -	3

Tabela 8: Alterações cariotípicas e moleculares encontradas nos diferentes subtipos de LMA.

Tipo LMA	Cariótipo	<i>FLT3-ITD</i>	<i>NPM1</i>
M0	2 nl, 4 inc, 2 del(5), 1 complexo, 1 NA	1	0
M1	10 nl, 3 inc, 1 t(8;16), 2 +8, 1 -Y, 1 complexo, 1 hiperdiploidia, 4 NA	8	6
M2	9 nl, 3 inc, 2 t(8;21), 1 -X t(8;21), 1 del(7), 1 del(8), 1 +21, 1 i (17), 2 complexo, 6 NA	5	8
M3	1 nl, 1 inc, 8 t(15;17), 1 t(4;6) t(15;17), 1 del(7) t(15;17), 1 NA, 6 análise molecular <i>PML/RARa</i>	2	0
M4	6 nl, 1 inc, 3 inv (16), 1 t(11;20), 1 i(17), 1 i(17), 1 complexo, 4 NA	4	7
M5	4 nl, 1 t(1;11), 1 del(7), 1 (+8), 1 NA	2	3
M6	1 nl	0	1
M7	1 nl	0	0

Legenda: nl – normal; inc – inconclusivo; NA – não analisado.

4.2- Características da Leucemia Promielocítica

As características clínicas e hematológicas dos pacientes com LMA M3 estão representadas na tabela 6.

O diagnóstico da LMA promielocítica foi feito pelo cariótipo em 10 casos (Tabela 7). Seis casos tiveram apenas diagnóstico molecular (*PML/RARa*) e em 3 casos o diagnóstico foi apenas morfológico devido à ausência de metáfases.

Três (15,8%) pacientes apresentaram a mutação *FLT3-TKD* e 2 (10,5%) a mutação *FLT3-ITD*. Nenhum paciente apresentou mutação no gene *NPM1*. A frequência dos diferentes genótipos *FLT3-ITD/NPM1* não foi estatisticamente diferente entre os pacientes com LMA M3 e os pacientes não M3 ($p=0,07$) (Tabela 9).

Tabela 9: Frequência dos diferentes genótipos *FLT3* ITD/*NPM1* nos pacientes com LMA M3 e nos outros subtipos de LMA.

	LMA M3	Outros Subtipos de LMA
<i>NPM1- FLT3</i> ITD-	17 (89,5%)	52 (60,5%)
<i>NPM1- FLT3</i> ITD+	2 (10,5%)	9 (10,5%)
<i>NPM1+ FLT3</i> ITD-	0 (0%)	14 (16,3%)
<i>NPM1+ e FLT3</i> ITD+	0 (0%)	11 (12,7%)

Os pacientes com presença da mutação *FLT3*-TKD apresentaram dosagem de hemoglobina (Hb) menor, maior porcentagem de blastos na MO e maior frequência de metilação no gene *CDKN2B* (Tabela 10).

Tabela 10: Dados clínicos, hematológicos e moleculares dos pacientes com LMA M3 com e sem a presença da mutação *FLT3*-TKD.

	<i>FLT3</i> -TKD +	<i>FLT3</i> -TKD -	<i>p</i>
Idade (anos)	51,0 (45-57)	38,5 (20-82)	0,48
Hb (g/dl)	6,0 (3,0-7,4)	9,6 (5,7-14,1)	0,04
Leucócitos (x10⁹/l)	12,0 (8,0-160,0)	2,0 (0,69-68,7)	0,21
Plaquetas (x10⁹/l)	10,0 (10,0-60,0)	19,0 (5,0-85,0)	0,86
Blastos na MO (%)	93,0 (92,0-98,0)	86,6 (60,0-97,0)	0,05
<i>CDKN2B</i> metilado	100,0%	6,2%	0,0002

Os pacientes com presença da mutação *FLT3*-ITD apresentaram maior expressão de HLA-DR, CD11b e CD34. Esses pacientes apresentaram maior contagem de leucócitos e porcentagem de blastos na MO ao diagnóstico, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Tabela 11).

Tabela 11: Dados hematológicos, fenotípicos e moleculares dos pacientes com LMA M3 com e sem a presença da mutação *FLT3*-ITD.

	<i>FLT3</i> -ITD +	<i>FLT3</i> -ITD -	<i>p</i>
Idade (anos)	40,0 (22-58)	44,0 (20-82)	0,78
Hb (g/dl)	8,8 (8,0-9,7)	8,7 (3,0-14,1)	0,78
Leucócitos (x10⁹/l)	63,0 (61,0-65,0)	2,0 (0,69-160,0)	0,09
Plaquetas (x10⁹/l)	27,0 (20,0-34,0)	14,5 (5,0-85,0)	0,32
Blastos na MO (%)	92,7 (89,5-96,0)	88,0 (60,0-98,0)	0,35
IMF HLA-DR	121,0 (100,8-141,2)	0,0 (0,0-25,9)	0,0004
IMF CD11b	41,1 (39,8-42,5)	0,0 (0,0-20,1)	0,01
IMF CD34	42,9 (35,4-50,4)	0,0 (0,0-63,5)	0,009

No estudo da metilação foram encontrados 4 (21,0%) pacientes com metilação no gene *CDKN2B*, 4 (21,0%) no gene *CDKN2A* e 2 (10,5%) no gene *TP73*. Não foi encontrado pacientes com metilação nos genes *ESR1*, *ABCB1* e *CDKN1C*.

Os pacientes que apresentaram o gene *CDKN2B* metilado tiveram dosagem de Hb menor do que os que não se apresentaram metilados (Tabela 12).

Tabela 12: Dados hematológicos dos pacientes com LMA M3 com o gene *CDKN2B* metilado e não metilado.

	<i>CDKN2B</i> metilado	<i>CDKN2B</i> não metilado	<i>p</i>
Hb (g/dl)	6,7 (3,0-8,0)	9,7 (5,7-14,1)	0,05
Leucócitos (x10⁹/l)	36,5 (8,0-160,0)	1,7 (0,69-68,7)	0,09
Plaquetas (x10⁹/l)	22,0 (10,0-60,0)	18,5 (5,0-85,0)	0,45

Os pacientes que apresentaram o gene *CDKN2A* metilado tiveram dosagem de Hb maior, menor contagem de leucócitos e expressão do CD13 menor do que os que não se apresentaram metilados (Tabela 13).

Tabela 13: Dados hematológicos e fenotípicos dos pacientes com LMA M3 com o gene *CDKN2A* metilado e não metilado.

	<i>CDKN2A</i> metilado	<i>CDKN2A</i> não metilado	<i>p</i>
Hb (g/dl)	10,8 (10,6-14,1)	8,0 (3,0-10,9)	0,01
Leucócitos (x10⁹/l)	0,92 (0,9-1,5)	12,0 (0,69-160,0)	0,05
Plaquetas (x10⁹/l)	26,0 (9,0-28,0)	18,0 (5,0-85,0)	0,90
IMF CD13	49,1 (0,0-63,5)	122,6 (0,0-844,5)	0,04

Quando comparados com pacientes de outros subtipos da LMA, os pacientes com LMA M3 foram mais jovens ($p=0,026$), tiveram menos leucócitos periféricos ($p=0,025$) (7 casos tiveram leucocitose), contagem de plaquetas mais baixa ($p=0,00006$) (Tabela 6) e IMF do CD45 e MPO maiores (Tabela 14). O CD34 apresentou fraca expressão em 4 casos, o HLA-DR em 3 casos e o CD11b também em 3 casos. As outras características fenotípicas não tiveram diferença em relação as LMAs de outros subtipos.

Tabela 14: Dados hematológicos e fenotípicos dos pacientes com LMA M3 e nos outros subtipos de LMA.

	LMA M3	Outros Subtipos de LMA	<i>P</i>
IMF CD45	521,8 (120,8-908,5)	214,9 (15,4-2711,2)	0,016
IMF MPO	1690,9 (861,6-2148,3)	231,9 (0,0-1812,9)	0,002

Em relação às características morfométricas e de textura do núcleo os pacientes com LMA M3 apresentaram menor fator de forma, entropia, energia, contraste e momento diagonal do que os outros subtipos de LMA (Tabela 15).

Os pacientes *FLT3-ITD+* tiveram menor desvio padrão do nível de cinza, entropia, contraste, momento diagonal e proeminência de agrupamentos e maior segundo momento angular, homogeneidade local e R^{245} (Tabela 16).

Tabela 15: Variáveis morfométricas e de textura da cromatina estudadas.

	LMA M3	Outros Subtipos de LMA	<i>p</i>
Área Nuclear (μ^2)	105,4 (83,4-126,8)	101,6 (67,0-133,8)	0,59
Fator de Forma	0,97 (0,81-1,12)	1,06 (0,82-1,14)	0,03
Desvio padrão do Nível de cinza	8,5 (6,2-10,4)	9,2 (6,4-13,8)	0,06
Entropia (Haralick)	7,72 (6,9-8,2)	7,83 (7,0-8,9)	0,04
Contraste	3,46 (2,29-4,84)	3,92 (2,53-7,96)	0,05
Momento diagonal	17,2 (12,0-20,3)	19,0 (12,6-30,6)	0,02
Proeminência de agrupamentos ($\times 10^5$)	4,63 (1,97-11,94)	5,59 (1,11-31,48)	0,08
Homogeneidade local	0,56 (0,53-0,61)	0,55 (0,48-0,59)	0,06
DF Minkowski	2,11 (2,09-2,14)	2,12 (2,09-2,15)	0,16
R^{245}	0,99853 (0,99802-0,99940)	0,99843 (0,99675-0,99935)	0,11

Tabela 16: Variáveis morfométricas e de textura da cromatina estudadas nos pacientes LMA M3 com e sem a presença da mutação *FLT3-ITD*.

	<i>FLT3-ITD+</i>	<i>FLT3-ITD-</i>	<i>p</i>
Área Nuclear (μ^2)	100,9 (86,6-115,3)	105,4 (83,4-126,8)	0,63
Fator de Forma	1,07 (1,02-1,12)	0,97 (0,81-1,11)	0,15
Desvio padrão do Nível de cinza	6,3 (6,2-6,5)	8,7 (7,4-10,4)	0,026
Entropia (Haralick)	6,95 (6,9-7,0)	7,74 (7,3-8,2)	0,026
Contraste	2,59 (2,29-2,89)	3,69 (2,87-7,83)	0,039
Momento diagonal	13,0 (12,0-14,0)	17,9 (15,0-20,3)	0,026
Proeminência de agrupamentos ($\times 10^5$)	2,09 (1,97-2,20)	5,04 (2,46-11,94)	0,026
Homogeneidade local	0,60 (0,59-0,61)	0,55 (0,53-0,58)	0,026
DF Minkowski	2,10 (2,09-2,10)	2,12 (2,10-2,14)	0,06
R²45	0,99925 (0,99910-0,99940)	0,99841 (0,99802-0,99910)	0,032

4.3- Características dos Outros Subtipos de LMA

Sete (8,1%) pacientes apresentaram a mutação *FLT3*-TKD (Figura 5), 20 (23,3%) *FLT3*-ITD (Figura 6) e 25 (29,1%) a mutação no gene *NPM1* (Figura 7). Dentre esses, 11 pacientes apresentaram associação das mutações *FLT3*-ITD e *NPM1*. Considerando apenas os pacientes com cariótipo normal a frequência da mutação *FLT3*-ITD foi 27,3%, *FLT3*-TKD 21,2% e da mutação no gene *NPM1* foi 48,5%.

Não houve diferença nos dados hematológicos dos pacientes com presença ou ausência da mutação *FLT3*-TKD (Tabela 17).

Tabela 17: Dados hematológicos dos pacientes com LMA não M3 com e sem a mutação *FLT3*-TKD.

	<i>FLT3</i> -TKD+	<i>FLT3</i> -TKD-	<i>p</i>
Hb (g/dl)	7,5 (5,6-10,3)	8,3 (3,4-13,7)	0,30
Leucócitos (x10⁹/l)	30,0 (6,4-118,6)	30,0 (0,8-281,3)	0,69
Plaquetas (x10⁹/l)	90,0 (12,0-227,0)	42,0 (2,0-289,0)	0,68
Blastos na MO (%)	60,8 (33,5-95,0)	77,0 (20,0-100,0)	0,29

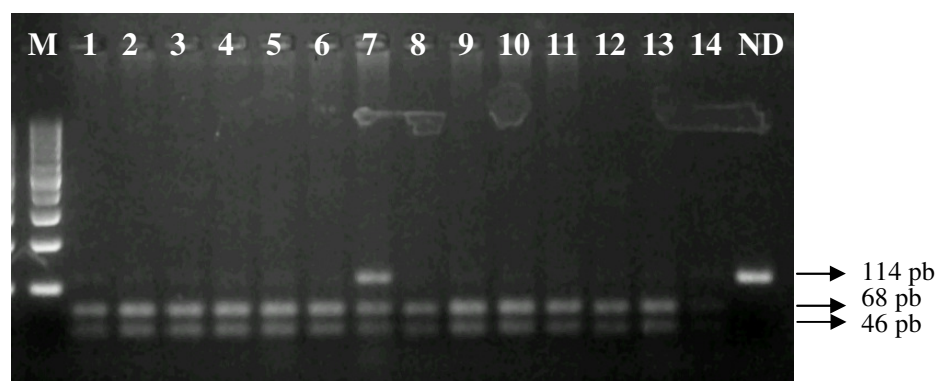


Figura 5: Digestão com a enzima *EcoRV*. Paciente 7 com presença da mutação *FLT3* TKD. Pacientes 1-6 e 8-14 sem a mutação *FLT3* TKD. M: marcador 100pb; ND: não digerido.

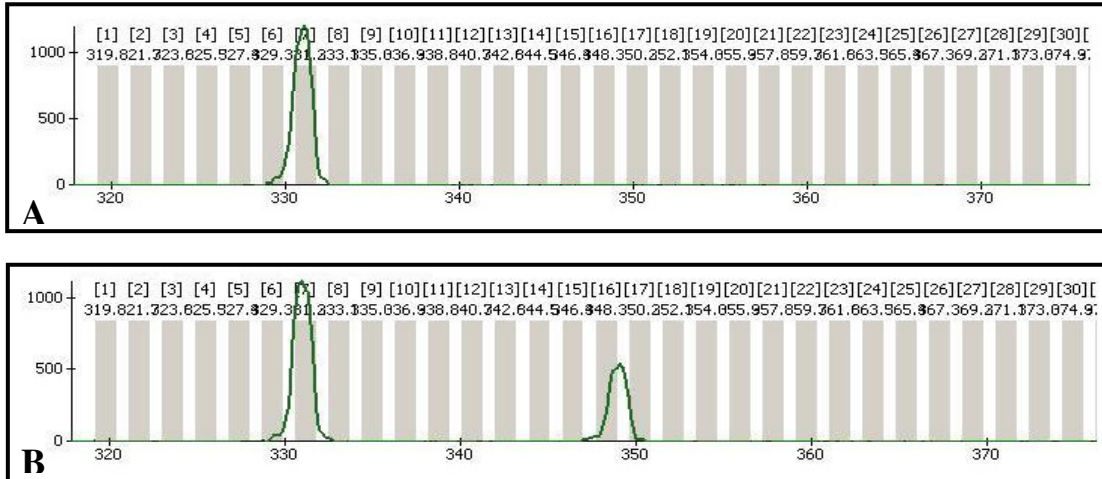


Figura 6: A- Paciente sem a mutação *FLT3* ITD com presença de apenas um pico representando o alelo selvagem. B- Paciente com a mutação *FLT3* ITD com a presença de dois picos, o primeiro representando o alelo selvagem e o segundo, o alelo mutante.

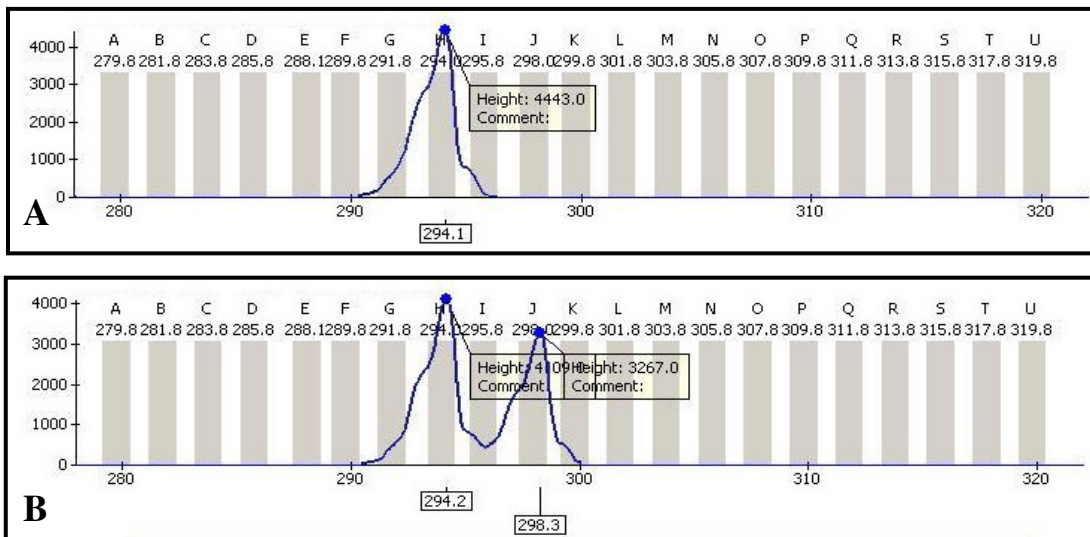


Figura 7: A- Paciente sem a mutação no gene *NPM1* com presença de apenas um pico representando o alelo selvagem. B- Paciente com a mutação no gene *NPM1* com a presença de dois picos, o primeiro representando o alelo selvagem e o segundo, o alelo mutante.

Os casos sem nenhuma das mutações *NPM1* e *FLT3*-ITD apresentaram menor contagem de leucócitos enquanto que os pacientes com presença da mutação *FLT3*-ITD tiveram maior leucocitose ($p=0,003$) (Tabela 18). Os casos com presença de mutação no gene *NPM1* apresentaram baixa expressão do CD34 ($p=0,0004$) (Tabela 18). Não houve diferença nas outras características fenotípicas em relação aos pacientes com diferentes genótipos *FLT3*-ITD/*NPM1*.

Tabela 18: Mediana do número de leucócitos ($\times 10^9/l$) e IMF do CD34 nos grupos com e sem a presença das mutações.

	Leucometria	IMF CD34
<i>NPM1</i> - <i>FLT3</i> ITD-	20,1 (0,8-182,1)	195,2 (0,0-567,5)
<i>NPM1</i> - <i>FLT3</i> ITD+	60,0 (6,4-281,3)	66,1 (23,6-387,1)
<i>NPM1</i> + <i>FLT3</i> ITD-	32,8 (1,9-217,3)	0,0 (0,0-108,3)
<i>NPM1</i> + <i>FLT3</i> ITD+	144,7 (5,4-245,0)	0,0 (0,0-219,7)

Foram encontrados 3 (3,4%) pacientes com metilação no gene *ESR1* (Figura 8), 23 (26,4%) no gene *CDKN2B* (Figura 9), 10 (11,5%) no gene *CDKN2A* (Figura 10), 1 (1,1%) no gene *CDKN1C* (Figura 11) e 20 (23,0%) no gene *TP73* (Figura 12). Não foi encontrado paciente com metilação no gene *ABCBI* (Figura 13).

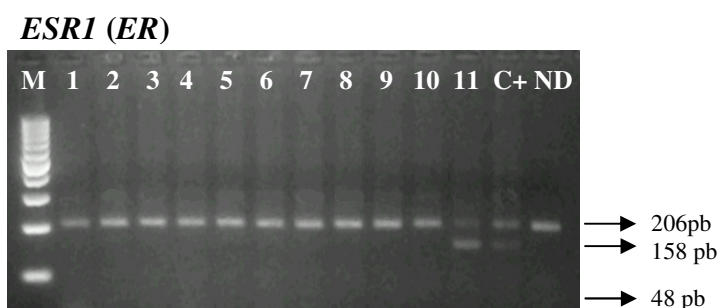


Figura 8: Pesquisa de metilação no gene *ESR1*. Pacientes 1-10 sem metilação no gene *ESR1*. Paciente 11 com metilação no gene *ESR1*. M: marcador 100pb; C+: controle positivo; ND: não digerido.

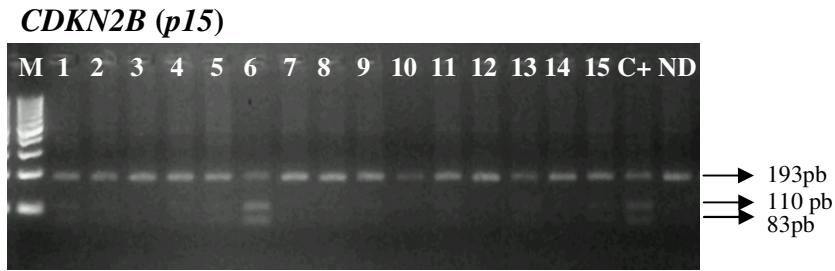


Figura 9: Pesquisa de metilação no gene *CDKN2B*. Pacientes 1-5 e 7-15 sem metilação no gene *CDKN2B*. Paciente 6 com metilação no gene *CDKN2B*. M: marcador 100pb; C+: controle positivo; ND: não digerido.

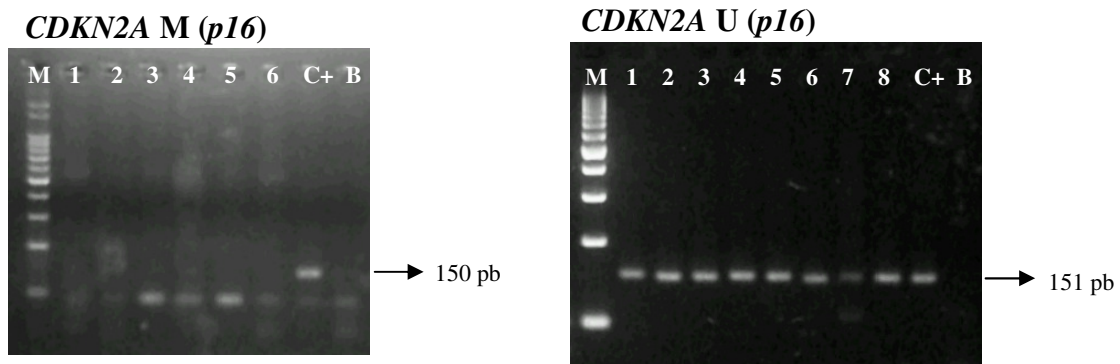


Figura 10: Pesquisa de metilação no gene *CDKN2A*. *CDKN2A M (methylated)*: Pacientes 1-6 sem presença de alelo metilado no gene *CDKN2B*. *CDKN2A U (unmethylated)*: Pacientes 1-8 com presença de alelo não metilado no gene *CDKN2B*. M: marcador 100pb; C+: controle positivo; B: branco.

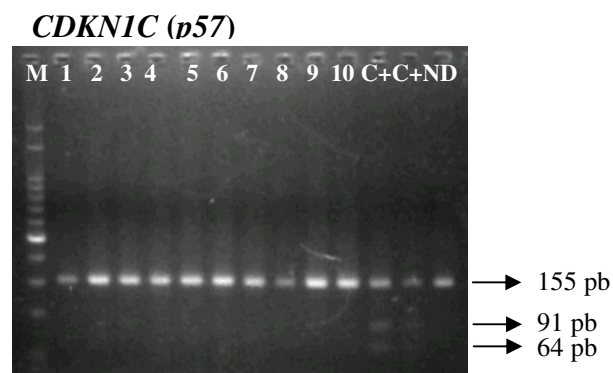


Figura 11: Pesquisa de metilação no gene *CDKN1C*. Pacientes 1-10 sem metilação no gene *CDKN1C*. M: marcador 50pb; C+: controle positivo; ND: não digerido.

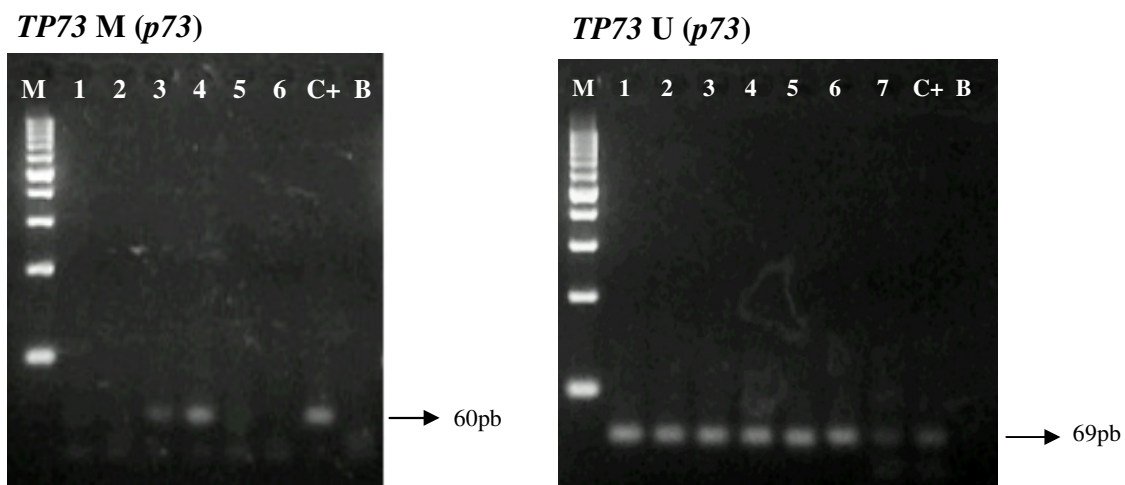


Figura 12: Pesquisa de metilação no gene *TP73*. *TP73 M (methylated)*: Pacientes 1-3 e 5-6 sem presença de alelo metilado no gene *TP73*. Paciente 4 com presença de alelo metilado no gene *TP73*. *TP73 U (unmethylated)*: Pacientes 1-7 com presença de alelo não metilado no gene *TP73*. M: marcador; C+: controle positivo; B: branco.

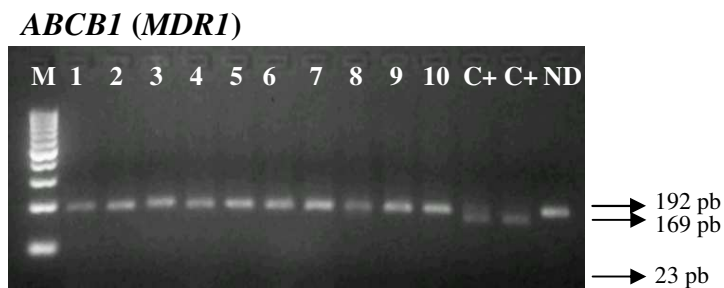


Figura 13: Pesquisa de metilação no gene *ABCB1*. Pacientes 1-10 sem metilação no gene *ABCB1*. M: marcador 100pb; C+: controle positivo; ND: não digerido.

Os pacientes que apresentaram o gene *CDKN2B* metilado tiveram dosagem de Hb menor e menor expressão de CD13 do que os que não se apresentaram metilados (Tabela 19). A metilação no *CDKN2B* foi mais frequente nos subtipos M1 e M2.

Tabela 19: Dados hematológicos e fenotípicos dos pacientes com o gene *CDKN2B* metilado e não metilado.

	<i>CDKN2B</i> metilado	<i>CDKN2B</i> não metilado	<i>p</i>
Hb (g/dl)	7,7 (3,4-11,4)	8,8 (3,4-13,7)	0,04
Leucócitos (x10⁹/l)	23,1 (0,8-172,0)	30,0 (1,0-281,3)	0,37
Plaquetas (x10⁹/l)	53,0 (9,0-227,0)	42,0 (2,0-289,0)	0,21
IMF CD13	74,5 (0,0-322,5)	125,3 (0,0-838,8)	0,03

Os pacientes com metilação no gene *TP73* apresentaram menor contagem de leucócitos, menor expressão de CD45, CD13, CD33 e MPO (Tabela 20) e maior frequência de metilação no gene *CDKN2A* (*TP73* metilado=30% vs *TP73* não metilado=6,0%; *p*=0,003).

Tabela 20: Dados hematológicos e fenotípicos dos pacientes com o gene *TP73* metilado e não metilado.

	<i>TP73</i> metilado	<i>TP73</i> não metilado	<i>p</i>
Hb (g/dl)	7,7 (3,4-13,4)	8,5 (3,4-13,7)	0,21
Leucócitos (x10⁹/l)	6,8 (1,0-172,0)	39,0 (0,8-281,3)	0,01
Plaquetas (x10⁹/l)	41,0 (9,0-188,0)	45,0 (2,0-289,0)	0,86
IMF CD45	119,5 (15,4-657,1)	306,5 (49,5-2711,2)	0,0004
IMF CD13	70,5 (0,0-299,1)	124,9 (0,0-838,8)	0,04
IMF CD33	100,9 (0,0-590,3)	221,9 (21,0-1357,8)	0,02
IMF MPO	112,6 (0,0-293,0)	332,0 (0,0-1812,9)	0,05

A expressão anômala de CD19 e de CD7 foi mais frequente na LMA M2. O CD15 esteve mais expresso nas LMAs M4 e M5, e ausente na M3.

Por causa do número restrito de casos, agrupamos em LMA sem maturação (M0, M1 e M5) e LMA com maturação (M2, M4, M6 e M7), a tabela 21 mostra a frequência das alterações encontradas nesses casos. Os pacientes com LMA sem maturação tiveram maior frequência de metilação no gene *TP73* (Tabela 21). As LMAs sem maturação apresentaram menor expressão de CD11b e MPO (Tabela 22).

Tabela 21: Frequência de alterações encontradas nos diferentes grupos de LMA.

	LMA sem maturação	LMA com maturação	<i>p</i>
<i>FLT3</i> TKD +	2 (4,8%)	5 (11,4%)	0,29
<i>FLT3</i> ITD +	11 (26,2%)	9 (20,5%)	0,45
<i>NPM1</i> +	9 (21,4%)	16 (36,4%)	0,16
<i>CDKN2B</i> metilado	13 (30,9%)	10 (22,2%)	0,29
<i>CDKN2A</i> metilado	7 (16,7%)	3 (6,7%)	0,12
<i>CDKN1C</i> metilado	1 (2,4%)	0	0,29
<i>TP73</i> metilado	15 (35,7%)	5 (11,1%)	0,019
<i>ESR1</i> metilado	1 (2,4%)	2 (4,4%)	0,63

Tabela 22: Dados fenotípicos dos pacientes com LMA agrupados pelo grau de maturação.

	LMA sem maturação	LMA com maturação	<i>p</i>
IMF CD11b	21,4 (0,0-419,3)	84,4 (0,0-462,5)	0,03
IMF MPO	75,3 (0,0-293,0)	368,7 (112,6-1812,9)	0,004

Os pacientes com LMA sem maturação apresentaram menor R^{245} do que os casos com LMA com maturação (Tabela 23).

Tabela 23: Variáveis morfométricas e de textura da cromatina estudadas.

	LMA sem maturação	LMA com maturação	<i>p</i>
Área Nuclear (μ^2)	98,9 (67,0-129,0)	104,3 (78,1-133,8)	0,14
Fator de Forma	1,07 (0,87-1,14)	1,05 (0,82-1,14)	0,33
Desvio padrão do Nível de cinza	9,3 (7,1-13,8)	9,1 (6,4-12,9)	0,12
Entropia (Haralick)	7,91 (7,1-8,9)	7,82 (7,0-8,7)	0,09
Contraste	4,02 (2,9-7,9)	3,74 (2,5-5,8)	0,06
Momento diagonal	19,3 (14,5-30,6)	18,6 (12,6-27,1)	0,08
Proeminência de agrupamentos ($\times 10^5$)	5,5 (1,7-31,5)	5,6 (1,1-15,3)	0,28
Homogeneidade local	0,55 (0,48-0,59)	0,56 (0,51-0,59)	0,11
DF Minkowski	2,12 (2,09-2,15)	2,12 (2,10-2,15)	0,09
R^{245}	0,99828 (0,99675-0,99935)	0,99859 (0,99728-0,99916)	0,02

4.4- Análise de Sobrevida

Os pacientes com LMA M3 tiveram melhor sobrevida do que os pacientes com os outros subtipos de LMA estratificados quanto ao risco cariotípico molecular ($p=0,00004$) (Figura 14).

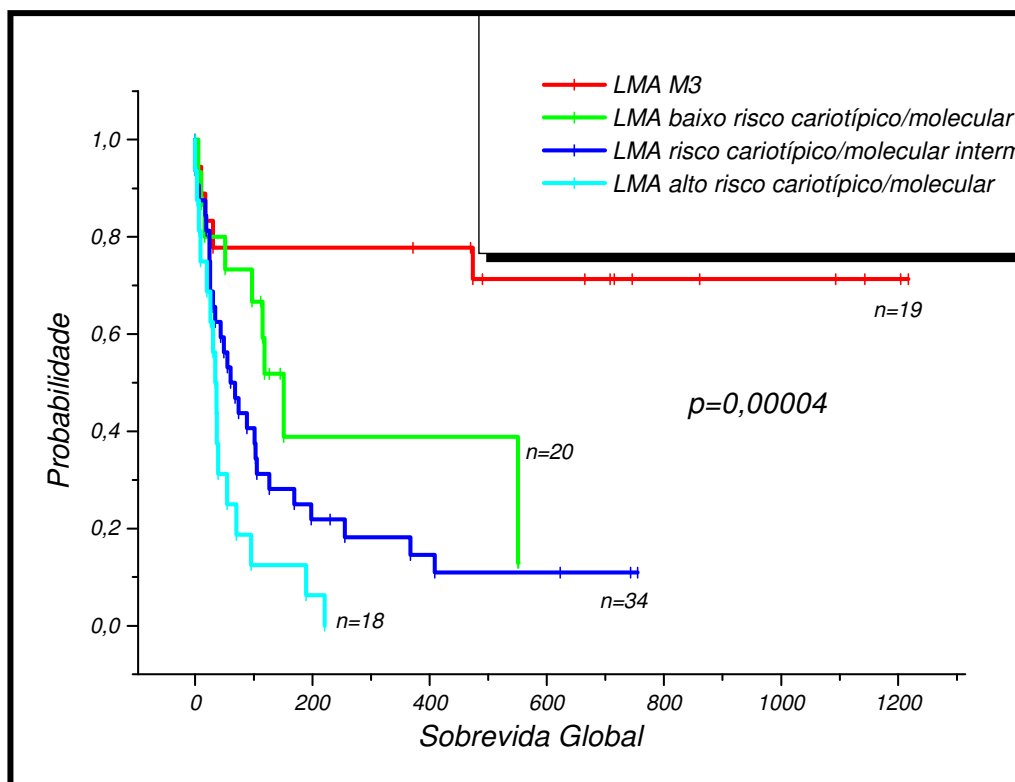


Figura 14: Sobrevida global dos pacientes em relação ao tipo de LMA.

Entre os pacientes com LMA M3 os com *FLT3*-ITD+ tiveram pior sobrevida ($p=0,001$) (Figura 15).

Entre os outros tipos de LMA os pacientes com *NPM1*- *FLT3* ITD+ tiveram pior sobrevida, os *NPM1*+ *FLT3* ITD- melhor sobrevida e os pacientes com outros genótipos *FLT3* ITD/*NPM1* tiveram sobrevida intermediária ($p=0,034$) (Figura 16).

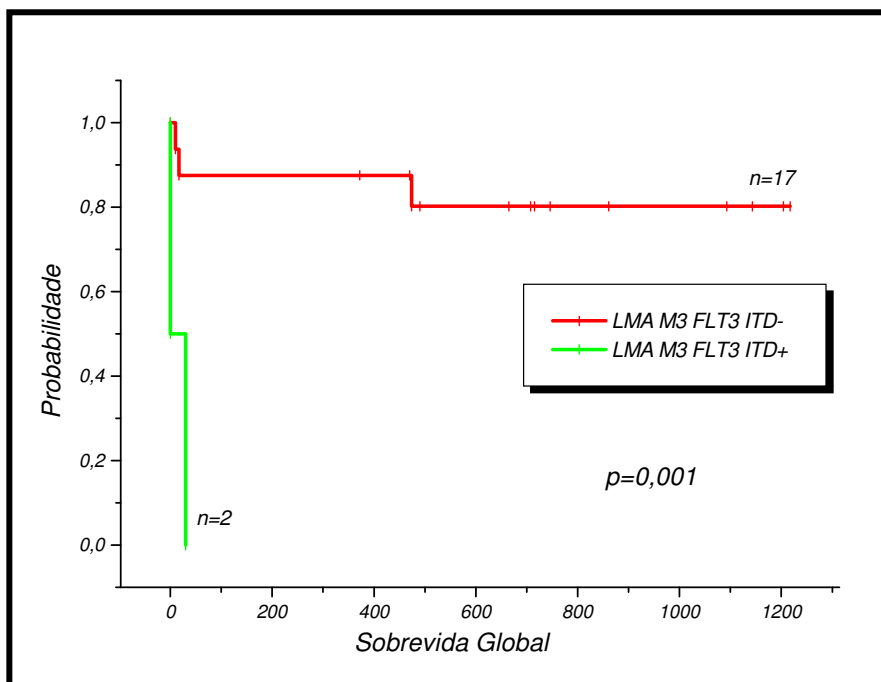


Figura 15: Sobrevida global dos pacientes LMA M3 quanto à presença da mutação *FLT3*-ITD.

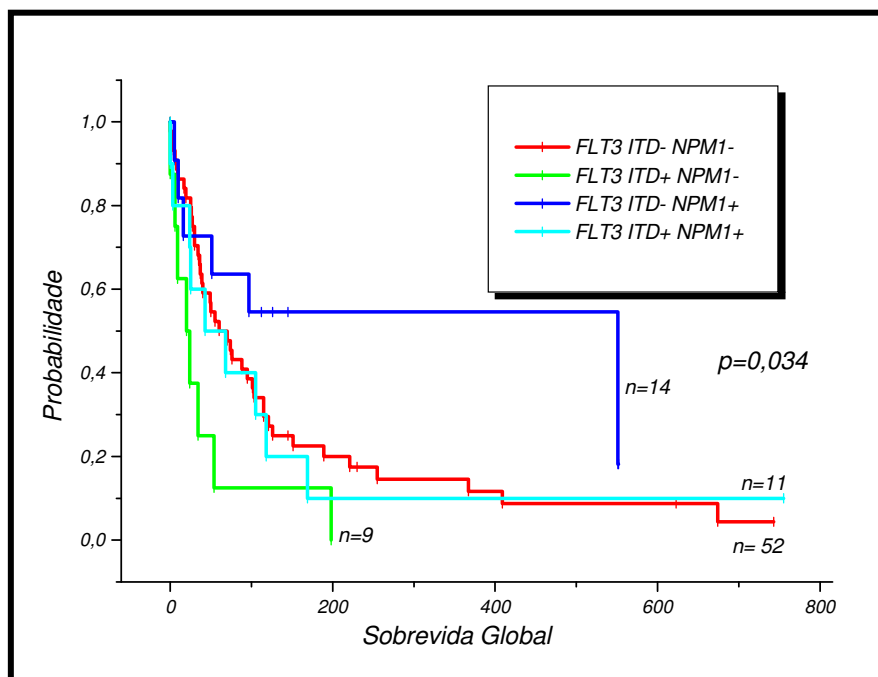


Figura 16: Sobrevida global dos pacientes quanto aos diferentes genótipos *FLT3*-ITD/*NPM1*.

4.4.1- Análise de Sobrevida Uni e Multivariada das LMA M3

Usando o modelo de Cox, na análise univariada foram significativos a contagem de leucócitos, presença da mutação *FLT3*-ITD, metilação no gene *CDKN2B*, expressão de HLA-DR, expressão de CD34, expressão de CD11b, desvio padrão do nível de cinza, homogeneidade local, entropia e dimensão fractal (Tabela 24).

Na análise multivariada explorando só a intensidade de expressão dos antígenos a análise não gerou um modelo. Juntando as alterações moleculares, a leucometria e as variáveis morfométricas apenas o desvio padrão do nível de cinza foi um fator independente de bom prognóstico (Tabela 24).

Tabela 24: Análise de sobrevida uni e multivariada das LMAs M3.

Univariada			Multivariada		
	<i>p</i>	B		<i>p</i>	B
Leucócitos	0,045	+0,000	DP do nível de cinza	0,031	-1,238
Mutação <i>FLT3</i> -ITD	0,011	+2,552			
Metilação no <i>CDKN2B</i>	0,066	+1,703			
IMF HLA-DR	0,025	+0,017			
IMF CD34	0,077	+0,028			
IMF CD11b	0,086	+0,050			
DP do nível de cinza	0,025	-1,278			
Homogeneidade local	0,044	+54,242			
Entropia	0,035	-3,634			
DF	0,056	-85,728			

4.4.2- Análise de Sobrevida Uni e Multivariada dos Outros Subtipos de LMA

Na análise univariada foram significativos a contagem de leucócitos, presença da mutação *FLT3*-ITD, expressão de CD13, homogeneidade local, entropia, dimensão fractal e R^2_{45} (Tabela 25). Na análise multivariada permaneceram no modelo a presença da mutação *FLT3*-ITD, entropia e R^2_{45} como fatores independentes de prognóstico (Tabela 25).

Tabela 25: Análise de sobrevida uni e multivariada dos outros subtipos de LMA.

Univariada			Multivariada		
	<i>p</i>	B		<i>p</i>	B
Leucócitos	0,10	+0,003	Mutação <i>FLT3</i> -ITD	<0,00005	+1,509
Mutação <i>FLT3</i> -ITD	0,10	+0,466	Entropia	0,064	-1,715
IMF CD13	0,05	+0,001	R^2_{45}	0,010	-1725,6
Homogeneidade local	0,089	-9,275			
Entropia	0,099	+0,546			
DF	0,10	+15,442			
R^2_{45}	0,056	-455,9			

Discussão

As LMAs constituem um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas quanto aos seus aspectos biológicos e clínicos. As LMAs são cada vez menos classificadas como uma entidade única de doença. A classificação das LMAs pelos critérios OMS de 2008 baseia-se na recorrência de anormalidades genéticas que predizem prognóstico e resposta à terapia (FORAN, 2010).

Recentemente, tem-se estudado novos fatores prognósticos na LMA, o que está dirigindo a nossa compreensão da biologia da doença e também o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (FORAN, 2010). No presente trabalho estudamos as características citológicas, fenotípicas, citogenéticas e moleculares de casos novos consecutivos de LMA *de novo* da nossa Instituição, e a relação destas com a sobrevida dos pacientes.

Tanto a natureza da LMA como a resposta do paciente mudam com a idade. A idade é uma variável adversa em relação ao alcance da remissão e risco de recaída. É evidente que os pacientes mais velhos são mais propensos a ter mais comorbidades e ter maior morbidade à quimioterapia do que os pacientes mais jovens. A LMA em pacientes mais velhos tem mais chances de ser precedida por uma fase mielodisplásica, tem citogenética desfavorável mais frequentemente, positividade a proteína de resistência a múltiplas drogas e responde menos à quimioterapia (APPELBAUM, 2006; SMITH, 2011). A mediana de idade encontrada em nosso estudo foi semelhante à descrita em outros trabalhos brasileiros e de outros países, tanto nas LMA M3 (SINGH, 2010; CHILLÓN, 2010) como nos outros subtipos de LMA (GALM, 2005; BALLEISEN, 2009; LUCENA-ARAÚJO, 2010).

A distribuição dos casos quanto a classificação FAB nos casos das LMAs não M3 foi semelhante a encontrada em outros estudos (THIEDE, 2002; GALM, 2005; WHITMAN, 2008).

A frequência das LMAs M3 foi similar a encontrada em outros estudos brasileiros (PAGNANO, 2000; SAGRILLO, 2005; JÁCOMO, 2007; LUCENA-ARAÚJO, 2010) e aumentada em relação à relatada na Europa e nos Estados Unidos. A frequência de LMA M3 encontrada na China (MA, 2009; RUAN, 2009) é maior que a do Japão (YANADA, 2005; MORI, 2011) e mais próxima da encontrada na população brasileira. O perfil

imunofenotípico típico da LMA M3 demonstrado por Orfao *et al* (1999) foi visto na maioria dos casos.

Muitos casos de adultos com LMA são caracterizados pela presença de várias anormalidades cromossômicas recorrentes e em muitos casos essas anormalidades se correlacionam com características clínicas específicas. A análise do cariótipo ao diagnóstico é importante para estratificação do tratamento. Aproximadamente 40-50% dos pacientes têm cariótipo normal e são classificados como tendo prognóstico de risco intermediário, mas dentro desse grupo existe um grande espectro de respostas ao tratamento e resultados de longo prazo. Tornou-se cada vez mais evidente que existem numerosas anormalidades moleculares nesses pacientes explicando a heterogeneidade da doença (HASLAM, 2010).

O cariótipo convencional por bandeamento G mostrou mitoses em 85% dos casos analisados, similar ao encontrado por Lo-Coco (2008). No entanto, ainda obtivemos um grande número de pacientes em que não foi possível obter mitoses para análise. Portanto, o emprego de técnicas moleculares pode ser útil para obter informações relevantes do paciente principalmente nesses casos de falha da citogenética convencional.

De acordo com Bacher *et al* (2009) cariótipo complexo pode ser detectado em 10-15% dos pacientes com LMA e apresentam prognóstico ruim. A frequência de cariótipo de alto risco no nosso estudo foi similar à encontrada por Krum *et al* (2009).

A investigação de possíveis alterações moleculares é determinante para estratificação do prognóstico das LMAs, o que serve de indicativo para prever o risco de recaída, a resistência à terapia, a SLD e a sobrevida global desses pacientes. Schlenk *et al* (2008) mostram que além da classificação de risco citogenético marcadores moleculares são fatores clinicamente significantes na resposta a terapia e na sobrevida.

A frequência da mutação *FLT3*-TKD no nosso estudo foi semelhante a outros trabalhos na Europa e nos Estados Unidos (THIEDE, 2002; BALDUS, 2007; WHITMAN, 2008), embora alguns trabalhos brasileiros tenham encontrado uma frequência baixa dessa mutação (CHAUFFAILLE, 2008; EMERENCIANO, 2008; LUCENA-ARAUJO, 2010). Whitman *et al* (2008) encontraram maior contagem de leucócitos e porcentagem de blastos

na MO e uma menor SLD nos pacientes *FLT3*-TKD+ o que não foi encontrado no nosso estudo.

Os nossos pacientes com presença da mutação *FLT3*-ITD apresentaram maior contagem de leucócitos, o que também foi observado por Thiede *et al* (2002). A sobrevida global dos pacientes com presença da mutação *FLT3*-ITD foi menor tanto nos casos de LMA M3 como nos outros subtipos de LMA. Lucena-Araujo *et al* (2010), estudando uma população brasileira, também encontraram menor sobrevida global em pacientes com LMA *FLT3*-ITD+. Haslam *et al* (2010) não identificaram diferença na sobrevida de pacientes *FLT3*-ITD+ e *FLT3*-ITD- e atribuíram isso ao fato de ser um estudo retrospectivo e ao pequeno número de pacientes e tempo de acompanhamento. Thiede *et al* (2002) mostraram que a presença da mutação *FLT3*-ITD está associada com uma pior resposta clínica, com sobrevida global e SLD mais curtas. Embora só tenham encontrado significância estatística para SLD. Singh *et al* (2010) estudando um grupo de pacientes com LMA M3 encontraram uma SLD inferior nos pacientes *FLT3*-ITD+. No entanto, não encontraram diferença estatística na sobrevida global dos pacientes com LMA M3 *FLT3*-ITD+ e *FLT3*-ITD-. Já Beitinjaneh *et al* (2010), em recente estudo de meta-análise, mostraram que a presença da mutação *FLT3*-ITD está associada com pior SLD e sobrevida global em pacientes com LMA M3. Além disso, na análise multivariada do nosso estudo a presença da mutação *FLT3*-ITD foi considerada fator de mau prognóstico independente nas LMAs não M3.

O status de mutação da combinação *FLT3*-ITD e *NPM1* tem sido importante para conferir respostas à terapia de indução padrão em pacientes com LMA-CN, em particular, pacientes com mutação no gene *NPM1* sem *FLT3*-ITD confere resultados relativamente favoráveis (SCHLENK, 2008; HASLAM, 2010).

A presença das mutações no gene *NPM1* e *FLT3* foi mais frequente em pacientes com cariótipo normal. A frequência encontrada dessas mutações foi similar à relatada na literatura (BALDUS, 2007; FALINI, 2007; SUSUKI, 2005; MRÓZEK, 2007; SCHOLL, 2008). A incidência dos 4 diferentes genótipos *FLT3*-ITD/*NPM1* nos pacientes estudados foi coerente com o relatados em outros estudos (BALDUS, 2007; FALINI, 2007; HASLAM, 2010), embora a frequência dos pacientes com ausência das 2 mutações tenha sido maior no nosso estudo.

Pela análise de Kaplan-Meier, no nosso estudo, os casos *NPM1*+ sem a mutação *FLT3*-ITD apresentaram melhor sobrevida global do que os outros genótipos *FLT3*-ITD/*NPM1*. Embora, na análise de Cox a presença da mutação no gene *NPM1* não foi considerada como fator prognóstico independente. Haslam *et al* (2010) não observaram diferença na sobrevida global dos pacientes com LMA com os diferentes genótipos *FLT3*-ITD/*NPM1* e atribuíram isso ao fato de ser um estudo retrospectivo, ao pequeno número de pacientes estudados e ao curto tempo de acompanhamento desses pacientes. Já num estudo realizado por Rolling *et al* (2010), estudando pacientes idosos, mostrou que a presença da mutação no gene *NPM1* teve influência significativa na sobrevida global, enquanto que a mutação *FLT3*-ITD não influenciou. A identificação das mutações no gene *NPM1* e *FLT3*-ITD são consideradas o diagnóstico molecular mínimo requerido para pacientes com LMA-CN contribuindo para estratificação prognóstica (HASLAM, 2010).

O papel de mecanismos epigenéticos na patogênese e progressão de cânceres humanos tem recebido grande atenção (EKMEKCI, 2004). A metilação do DNA é reconhecida como um elemento chave na regulação da expressão gênica. Todas as LMAs apresentam anormalidades nos padrões de metilação, sendo estes padrões ligados aos vários fenótipos da doença bem como a variações da resposta ao tratamento (BULLINGER, 2010).

Galm *et al* (2005) confirmaram que vários genes que regulam a proliferação celular (*CDKN2B*, *TP73* e *E-caderina*) e o reparo do DNA (*RAR β 2* e *SOCs-1*) podem estar simultaneamente metilados nas LMAs. A metilação aberrante nas ilhas CpG de múltiplos genes relacionados ao câncer parece ser um evento comum em adultos com LMA ocorrendo em todos os subtipos FAB e em todos os grupos de risco citogenéticos. Estes padrões de metilação têm relação com a distribuição da cromatina nuclear e a morfologia dos blastos.

A metilação do DNA, na região promotora do gene, é responsável pelo silenciamento de um grande número de genes em praticamente todos os tipos de câncer (CANLIDORO, 2008). O gene supressor de tumor *CDKN2B*, silenciado em uma variedade de doenças malignas hematológicas, é metilado de forma heterogênea. Deleção e metilação do gene *CDKN2B* ocorre comumente nas LLAs, enquanto que a metilação é o principal

modo de silenciamento do gene *CDKN2B* nos casos de LMA (ROSU-MYLES, 2008). Metilação no gene *CDKN2B* é encontrada em aproximadamente 50% dos casos de SMD e há uma correlação entre os altos níveis de metilação e a transformação de SMD para leucemia. O estudo de metilação no gene *CDKN2B* tem sido utilizado como um biomarcador para SMD e LMA e como um indicador prognóstico isolado ou em combinação com outros genes (ROSU-MYLES, 2008; CANLIDORO, 2008).

A frequência de casos apresentando metilação no gene *CDKN2B* foi similar à encontrada por Galm *et al* (2005) e abaixo da encontrada por Ekmekci *et al* (2004) e Wong *et al* (2000). Encontramos uma frequência de casos com metilação no gene *CDKN2A* menor que a encontrada por Wong *et al* (2000) e maior que a achada por Galm *et al* (2005) e Ekmekci *et al* (2004) que encontraram uma frequência muito baixa ou ausência de metilação nesse gene, respectivamente. Em nosso estudo encontramos uma frequência de metilação no gene *TP73* acima da encontrada em outros trabalhos (GALM, 2005; EKMEKCI, 2004). Embora a metilação no gene *CDKN1C* tenha sido encontrada nas LLAs (CANALLI, 2004; SHEN, 2003) estudos em pacientes com LMA não tem encontrado metilação nesse gene (BRAKENSIEK, 2005; LI, 2002) coerente com o encontrado no nosso estudo que foi encontrado em apenas 1 paciente. A frequência de metilação no gene *ESR1* foi muito abaixo da encontrada por Ekmekci *et al* (2004).

É provável que a metilação global do DNA em um determinado tumor seja modulada por fatores genéticos, étnicos e ambientais. Foi sugerido uma significativa variabilidade inter-individual na metilação global do DNA em LMA. Além disso, as variações podem ser deduzidas a partir da frequência de metilação de alguns genes-alvo. A metilação do gene *CDKN2B* tem sido relatada em 30-90% de pacientes com LMA e em 30-80% no gene *E-caderina*. Ekmekci *et al* (2004) sugerem que estas variações podem indicar diferenças nos subtipos da LMA incluídos nos estudos, que podem ser influenciados pelo ambiente, ou a diferenças no número de pacientes examinados.

A distribuição da metilação aberrante do DNA é uma característica da LMA. Lesões epigenéticas são mais frequentes e recorrentes que as lesões genéticas nos cânceres (MELNICK, 2010). A compreensão do impacto da metilação do gene na patogênese da LMA pode não só conduzir ao desenvolvimento de novos biomarcadores, mas também

ajudar a determinar pacientes candidatos a terapias com agentes demetilantes (GALM, 2005).

Nos últimos anos, a análise de imagem computadorizada tem sido amplamente utilizada em histologia e citologia de diversos tecidos, a fim de estudar a diferenciação do tecido normal, para a classificação de neoplasias e para o estabelecimento de variáveis prognósticas (FERREIRA, 2006; MELLO, 2008; METZE, 2009; JONDET, 2010; BEDIN, 2010; METZE, 2010). O remodelamento da cromatina, principalmente devido a eventos epigenéticos, pode ser encontrado durante a transformação celular maligna (DE CAPOA, 1999; METZE, 2010; MELNICK, 2010). Na hematopoiese normal, o controle e ordenamento da expressão gênica durante a maturação celular normal é controlada por fenômenos genéticos e epigenéticos (MELNICK, 2010). Blastos de LMA e SMD apresentam alterações epigenéticas e o padrão de metilação do DNA não se encaixa nos estágios de maturação mielóide normal, permitindo distinguir blastos normais e leucêmicos por características fenotípicas e moleculares. Este aspecto tem sido usado para a determinação de doença residual mínima (DE CAPOA, 1999; REIS-ALVES, 2010; MELNICK, 2010).

Análises quantitativas do núcleo podem ser feitas pela morfometria geométrica e por análise de textura da cromatina. Recentemente, demonstramos que várias características morfométricas são capazes de distinguir LLA de origem B ou T (MELLO, 2008). De Capoa *et al* (1999) demonstraram que domínios ricos em metilação no DNA equivalem a regiões de heterocromatina nos esfregaços corados pelo Giemsa.

No nosso estudo, as LMAs M3 apresentaram menor fator de forma do que os outros subtipos de LMA. Isso significa que as LMAs M3 apresentam núcleos de contornos mais irregulares que os outros subtipos de LMA. Por ser uma doença bem caracterizada molecularmente, a LMA M3 apresentou características morfométricas mais homogêneas. Além disso, foi o primeiro estudo em que o desvio padrão do nível de cinza teve importância prognóstica.

Alterações na estrutura da cromatina dos blastos leucêmicos refletem diferenças na maturação. As regiões de heterocromatina nos esfregaços corados pelo Giemsa

correspondem a domínios do DNA ricos em radicais metil, alterações na textura do núcleo podem ser interpretadas como modificações nos padrões de metilação.

Adam *et al* (2006) sugerem que o “goodness-of-fit” (R^2) da dimensão fractal do núcleo em preparações citológicas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa podem quantificar o remodelamento do padrão de metilação do DNA. Tanto a dimensão fractal como seu R^2 permitem estimar o grau de distribuição irregular da cromatina de uma forma geral nas células tumorais (METZE, 2010). Por outro lado, Metze *et al* (2009) sugerem que o R^{245} deve ser usado nas investigações sobre o R^2 da dimensão fractal para a normalização das medidas. O R^{245} é o coeficiente corrigido do R^2 . Os núcleos com maior dimensão fractal apresentam menor R^2 (Albregtsen). Valores de R^2 mais altos equivalem a valores mais próximos da dimensão fractal “ideal” do núcleo. O R^{245} foi considerado fator prognóstico independente nas LLAs B (METZE, 2009).

No nosso estudo, a textura da cromatina dos blastos leucêmicos medida pelo R^{245} e pela entropia foram considerados fatores prognósticos independentes ao lado de variáveis de risco conhecidas na LMA. Estes resultados indicam que R^{245} pode ser uma variável nova e interessante para avaliação da textura da cromatina.

Conclusões

6.1- Conclusões das LMAs M3

- Nas LMAs M3 a frequência da mutação *FLT3*-ITD foi menor que nos outros subtipos de LMA.
- Não foi encontrada mutação no gene *NPM1*.
- Os aspectos da morfometria foram muito homogêneos confirmando que a LMA M3 é uma doença homogênea por ser caracterizada molecularmente.
- As LMAs M3 apresentam núcleos de contornos mais irregulares.
- A mutação *FLT3*-ITD esteve associada com maior leucocitose.
- Os pacientes que apresentaram a mutação *FLT3*-ITD tiveram menor sobrevida global.
- O desvio padrão do nível de cinza dos blastos leucêmicos foi um fator independente de bom prognóstico, portanto os casos com núcleos mais maduros têm melhor prognóstico.

6.2- Conclusões dos Outros Subtipos de LMA

- São mais heterogêneas que as LMAs M3 por apresentarem maior variabilidade na entropia, contraste e momento diagonal.
- A frequência das mutações e de metilação encontrada foram semelhantes com outros estudos.
- As mutações no gene *NPM1* e *FLT3* são mais frequentes em pacientes com cariótipo normal.
- A presença da mutação *FLT3*-ITD foi um fator independente de mau prognóstico.
- A presença da mutação *FLT3*-ITD e as características de fractalidade e de textura da cromatina (medido pelo R^{245} e pela entropia, respectivamente) foram considerados fatores de risco mais importantes que o cariótipo e o status de metilação dos genes estudados.
- O R^{245} pode ser uma variável nova e interessante para avaliação da textura da cromatina com valor prognóstico.

Referências Bibliográficas

- ADAM, R.L. Análise espectral usando a transformada de Fourier discreta para o estudo de núcleos celulares: elaboração de programa e aplicação biológica. Dissertação - Mestrado - Universidade Estadual de Campinas. 2002.
- ADAM, R. L.; LEITE, N. J.; CARVALHO, R. B. D.; SILVA, P. V.; METZE, K. Granulometric residues as a diagnostic tool in cytology. **Cytometry Part A**. v. 59A, p.63-2004a.
- ADAM, R. L.; RIBEIRO, E.; METZE, K.; LEITE, N. J.; e LORAND-METZE, I. Morphometric and granulometric features of erythroblasts as a diagnostic tool of hematologic diseases. **Cytometry Part A** v. 59A, p.63-64, 2004b.
- ADAM, R.L.; SILVA, R.C.; PEREIRA, F.G. *et al.* The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. **Cell. Oncol.** v. 28, p. 55–59, 2006.
- ALBREGTSEN F. How to calculate the goodness-of-fit of a fractal dimension. **Cell Oncol.** v. 31, p. 501, 2009.
- APPELBAUM, F.R.; GUNDAKER, H.; HEAD, D.R. *et al.* Ager and acute myeloid leukemia. **Blood**. v. 107, n.9, p. 3481-3485, 2006.
- BACHER, U.; KOHLMANN, A.; HAFERLACH, C.; HAFERLACH, T. Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia (AML). **Best Practice & Research Clinical Haematology**. v. 22, p. 169–180, 2009.
- BALDUS, C.D.; MRÓZEK, K.; MARCUCCI, G.; BLOOMFIELD, C.D. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. **Br J Haematol**. v. 137, p. 387-400, 2007.
- BALLEISEN, S.; KUENDGEN, A.; HILDEBRANDT, B. *et al.* Prognostic relevance of achieving cytogenetic remission in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome following induction chemotherapy. **Leuk Res**. v. 33, p. 1189-1193, 2009.
- BEDIN, V.; ADAM, R.L.; SÁ, B.C.S. *et al.* Fractal dimension is an independent prognostic factor for survival in melanoma. **BMC Cancer**. v. 10, p. 260, 2010.

BEITINJANEH, A.; JANG, S.; ROUKOZ, H.; MAJHAIL, N.S. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: A systematic review. **Leuk Res.** v. 34, p. 831-836, 2010.

BENE M.C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunol Lett**, v. 98, p. 9-21, 2005.

BRUNNING, R.D.; BOROWITZ, M.; MATUTES, E. *et al.* Precursor B-cell and T-cell neoplasms. In: JAFFE E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W. **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press, 2001. 111-17.

BRAKENSIEK, K.; LANGER, F.; KREIPE, H.; LEHMANN, U. Absence of *p21CIP1*, *p27KIP1* and *p57KIP2* methylation in MDS and AML. **Leukemia Research.** v. 29, p. 1357-1360, 2005.

BULLINGER, L.; EHRICH, M.; DÖHNER, K. *et al.* Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. **Blood.** v. 115, n. 3, p. 636-642, 2010.

CAMPANA, D.; BEHM, F.G. Immunophenotyping of leukemia. **J Immunol Methods**, v. 243, p. 59-75, 2000.

CANALLI, A.A.; YANG, H.; JEHA, S.; HOSHINO, K.; SANCHEZ-GONZALEZ, B.; BRANDT, M.; SHERRY PIERCE, S.; KANTARJIAN, H.; ISSA, J.P.; GARCIA-MANERO, G. Aberrant DNA methylation of a cell cycle regulatory pathway composed of P73, P15 and P57KIP2 is a rare event in children with acute lymphocytic leukemia. **Leuk Res.** v. 29, p. 881-885, 2005.

CANLIDORO, I.L.M.; MIKESKA, T.; HOKLAND, P.; DOBROVIC, A. Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the CDKN2B (p15) gene. **Epigenetics & Chromatin.** v. 1, n. 7, 2008.

CARROLL, W.L.; BHOJWANI, D.; MIN, D.J. *et al.* Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology** (Am Soc Hematol Educ Program). p. 102-131, 2003.

CHEN, H.; WU, S. Hypermethylation of the p15^{INK4B} gene in acute leukemia and myelodysplastic syndromes. **Chinese Medical Journal.** v. 115, n. 7, p. 987-990, 2002.

CHEN, W.; KONOPLEV, S.; MEDEIROS, L.J. *et al.* Cuplike Nuclei (Prominent Nuclear Invaginations) in Acute Myeloid Leukemia are Highly Associated with *FLT3* Internal Tandem Duplication and *NPM1* Mutation. **Cancer**. p. 1-9, 2009.

CHILLÓN, M.C.; SANTAMARIA, C.; GARCÍA-SANZ, R. *et al.* Long *FLT3* internal tandem duplications and reduced *PML-RAR α* expression at diagnosis characterize a high-risk subgroup of acute promyelocytic leukemia patients. **Haematologica**. v. 95, n. 5, p. 745-751, 2010.

CREMER, T.; BOLZER, A.; KOHLER, D.; KUPPER, K.; MULLER, S.; NEUSSER, M.; SCHERMELLEH, L.; LEONHAEDT, H.; WAGLER, B.; ZINNER, R.; CREMER, M.; SOLOVEI, I. From chromosome territories to a functional nuclear architecture. **Cellular Oncology**. v. 27, p. 105–106, 2005.

DAS, P.M.; SINGAL, R. DNA Methylation and Cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v. 22, n. 22, p. 4632-4642, 2004.

DAVIS, L.; DIBNER, M.D.; BATTEY, J.F. Basis Methods in Molecular Biology. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1986.

DE CAPOA, A.; FEBBO, F.R.; GIOVANNELLI, F.; NIVELEAU, A.; ZARDO, G.; MARENZI, S.; CAIAFA, P. Reduced levels of poly(ADP-ribosyl)ation result in chromatin compaction and hypermethylation as shown by computer-assisted quantitative analysis. **FASEB**. v. 13, p. 89-93, 1999.

DE LOURDES CHAUFFAILLE, M.; BORRI, D.; PROTO-SIQUEIRA, R. *et al.* Acute promyelocytic leukemia with t(15;17): frequency of additional clonal chromosome abnormalities and *FLT3* mutations. **Leuk Lymphoma**. v. 49, n. 12, p. 2387–2389, 2008.

DI BONA, E.; SARTORI, R.; ZAMBELLO, R. *et al.* Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 87, p. 250-256, 2002.

EKMEKCI, C.G.; GUTIÉRREZ, M.I.; SIRAJ, A.K. *et al.* Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. **Am J Hematol**. v. 77, p.233-240, (2004).

- EMERENCIANO, M.; MENEZES, J.; VASQUEZ, M.L. *et al.* Clinical relevance of *FLT3* gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia. **Leuk Lymphoma**. v. 49, n. 12, p. 2291–2297, 2008.
- FALINI, B.; NICOLETTI, I.; MARTELLI, M.F.; MECUCCI, C. Acute myeloid leukaemia carrying cytoplasmic mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): molecular and clinicopathological features. **Leuk Res**. v.31, S11-S12, 2007.
- FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Linfóides Agudas. **Bras Patol Med Lab**. v. 40, n. 2, p. 91-8, 2004.
- FEINBERG, A.P. Cancer epigenetics takes center stage. **PNAS**. v. 98, n. 2, p. 392-394, 2001.
- FERREIRA, R.C.; DE MATOS, P.S.; ADAM, R.L. *et al.* Application of the Minkowski–Bouligand fractal dimension for the differential diagnosis of thyroid follicular neoplasias. **Cell Oncol**. v. 28, p. 331-333, 2006.
- FERRO, D.P.; FALCONI, M.A.; ADAM, R.L. *et al.* Fractal Characteristics of May-Grünwald-Giemsa stained Chromatin are Independent Prognostic Factors for Survival in Multiple Myeloma. **PLoS ONE**. 2011.
- FORAN, J.M. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. p. 47-55, 2010.
- FORESTIER, E.; SCHMIEGELOW, K. The incidence peaks of childhood acute leukemias reflect specific cytogenetic aberrations. **J Pediatr Hematol Oncol**. v. 28, p. 486-495, 2006.
- FRIEDMANN, A.; WEINSTEIN, H. J. The Role of Prognostic Features in the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Oncologist**. v. 5, p. 321-328, 2000.
- FRIGOLA, J.; RIBAS, M.; RISQUES, R.A.; PEINADO, M.A. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). **Nucleic Acids Res**. v. 30, p. 1-7, 2002.
- GALE, R.E.; GREEN, C.; ALLEN, C. *et al.* The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large

cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. **Blood**. v. 111, n. 5, p. 2776-2784, 2008.

GALM, O.; WILOP, S.; LÜDERS, C. *et al.* Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia. **Ann Hematol**. v. 84, p. 39-46, 2005.

GARCIA-MANERO, G.; BUESO-RAMOS, C.; DANIEL, J.; WILLIAMSON, J.; KANTARJIAN, H.M.; ISSA, J.P.J. DNA Methylation Patterns at Relapse in Adult Acute Lymphocytic Leukemia. **Clin Cancer Res**. v. 8, p. 1897-1903, 2002.

GARCIA-MANERO, G. Methylation, aging, and pediatric acute lymphocytic leukemia. **Leukemia**. v. 17, p. 2063-2064, 2003.

GARCIA-MANERO, G.; JEHE, S.; DANIEL, J.; WILLIAMSON, J.; ALBITAR, M.; KANTARJIAN, H.M.; ISSA, J.P.J. Aberrant DNA Methylation in Pediatric Patients with Acute Lymphocytic Leukemia. **Cancer**. v. 97, n. 3, p. 695-702, 2003.

GILBERT, N. Chromatin Architecture of the Human Genome. **Cellular Oncology**. v. 27, p. 106–107, 2005.

GUTIERREZ, M.I.; SIRAJ, A.K.; IBRAHIM, M.M.; HUSSAIN, A.; BHATIA, K. Childhood and Adult ALL: Differences in Epigenetic Lesions Associated With Cell Cycle Genes. **American Journal of Hematology**. v. 80, p. 158-160, 2005.

HARALICK, R. M.; SHANMUGAN, K.; DINSTEN, I. Textural features for image classification. **IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics**. v. 3, p. 610-621, 1973.

HASLAM, K.; CHADWICK, N.; KELLY, J. *et al.* Incidence and significance of FLT3-ITD and NPM1 mutations in patients with normal karyotype acute myeloid leukaemia. **Ir J Med Sci**. v. 179, n. 4, p. 507-510, 2010.

HEEREMA-MCKENNEY, A.; ARBER, D.A. Acute myeloid leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**. v. 23, n. 4, p. 633-654, 2009.

HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. Methylation Specific PCR. In: **Current Protocols in Human Genetics**, 1998.

JÁCOMO, R. H.; MELO, R. A. M.; SOUTO, F. R. *et al.* Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines. **Haematologica**. v. 92, p.1431-1432, 2007.

JONDET, M.; AGOLI-AGBO, R.; DEHENNIN, L. Automatic measurement of epithelium differentiation and classification of cervical intraneoplasia by computerized image analysis. **Diagn. Pathol.** v. 5, p. 7, 2010.

JONES, P.A.; LAIRD, P.W. Cancer epigenetics comes of age. **Nature Genetcs.** v. 21, p. 123-167, 1999.

KANTARJIAN, H.; O'BRIEN, S.; CORTES, J. *et al.* Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leucemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. **Cancer**. v. 106, p. 1090-1098, 2006.

KERN, W.; ESTEY, E.H. High-dose cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukemia: Review of three randomized trials. **Cancer**. v. 107, p. 116-124, 2006.

KOH, Y.; PARK, J.; SUNG, K. *et al.* Different Clinical Importance of FLT3 Internal Tandem Duplications in AML According to FAB Classification: Possible Existence of Distinct Leukemogenesis Involving Monocyte Differentiation Pathway. **Ann Hematol.** v. 88, n. 11, p. 1089-1097, 2009.

KRUM, E. A.; YAMAMOTO, M.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Prevalence of FMS-like tyrosine kinase 3/internal tandem duplication (*FLT3/ITD+*) in de novo acute myeloid leukemia patients categorized according to cytogenetic risk. **Sao Paulo Med J.** v. 127, n. 1, p. 23-27, 2009.

LEONE, G.; TEOFILI, L.; VOSO, M.T.; LÜBBERT, M. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. **Haematologica**. v. 87, p. 1324-1341, 2002.

LI, Y.; NAGAI, H.; OHNO, T. *et al.* Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. **Blood**. v. 100, p.2572–2577, 2002.

LLACER, P.D. Leucemia mielóide aguda no adulto. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Hematologia Fundamentos e Prática. Ed. Atheneu. 1ª edição. 2005. p. 433-446.

LO-COCO, F.; CUNEO, A.; PANE, F. *et al.* Prognostic impact of genetic characterization in the GIMEMA LAM99P multicenter study for newly diagnosed acute myeloid leukemia. **Haematologica**. v. 93, n. 7, p. 1017-1024, 2008.

LUCENA-ARAÚJO, A.R.; SOUZA, D.L.; OLIVEIRA, F.M. *et al.* Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. **Ann Hematol**. v. 89, p.225–228, 2010.

MA, Y.; WANG, X.; XU, X.; LIN G. World Health Organization sub-types, initial treatment outcome and prognostic study of unselected adult patients with acute myeloid leukaemia in Shanghai: an analysis of 623 cases. **J Int Med Res**. v. 37, n. 4, p. 1191-1201, 2009.

MAHMUD, M.; STEBBING, J. Epigenetic Modifications in AML and MDS. **Leuk Res**. 2009.

MARTINS, S.L.; FALCAO, R.P. Importance of immunophenotyping of leukemia myelocytic acute. **Rev Assoc Med Bras**. v. 46, p. 57-62, 2000.

In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Hematologia Fundamentos e Prática. Ed. Atheneu. 1ª edição. 2005. p. 433-446.

MAYER, R.J.; DAVIS, R.B.; SCHIFFER, C.A. *et al.* Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. **N Engl J Med**. v. 331, p. 896-903, 1994.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; RUSSO, I.H.; LAREEF, M.H.; RUSSO, J. DNA content and chromatin texture of human breast epithelial cells transformed with 17-betaestradiol and the estrogen antagonist ICI 182,780 as assessed by image analysis. **Mutat. Res-Rev Mutat**. v. 617, p. 1-7, 2007.

MELLO, M.R.B.; METZE, K; ADAM, R.A.; PEREIRA, F.G.; MAGALHÃES, M.G.; MACHADO, C.G.F.; LORAND-METZE, I. Phenotypic Subtypes of Acute Lymphoblastic

Leukemia are associated with different Nuclear Chromatin Texture. **Anal Quant Cytol Histol.** v. 30, n. 2, p. 92-98, 2008.

MELNICK, A.M. Epigenetics in AML. **Best Pract Res Clin Haematol.** v. 23, p.463-468, 2010.

METZE, K; ADAM, R. L.; SILVA, P. V.; CARVALHO, R. B.; LEITE, N. J. Analysis of chromatin texture by pinkus' approximate entropy. **Cytometry Part A,** v. 59A, p. 63, 2004.

METZE, K.; ADAM, R. L. Quantification in histopathology - some pitfalls. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 38, p. 141-143, 2005.

METZE, K.; LORAND-METZE, I.; LEITE, N.J.; ADAM, R.L. Goodness-of-fit of the fractal dimension as a prognostic factor. **Cell. Oncol.** v. 31, p. 503-504, 2009.

METZE, K. Fractal dimension of chromatin and cancer prognosis. **Epigenomics.** v. 2, p. 601-604, 2010.

MISTELI, T. Fundamental Principles of Nuclear Architecture in Cancer. **Cellular Oncology.** v. 27, p. 107, 2005.

MOMPARLER, R.L. Cancer Epigenetics. **Oncogene.** v. 22, n. 42, p. 6479-6483, 2003.

MORI, N.; YOSHINAGA, K.; TOMITA, K. *et al.* Aberrant methylation of the RIZ1 gene in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. **Leuk Res.** v. 35, n. 4, p. 516-521, 2011.

MRÓZEK, K.; MARCUCCI, G.; PASCHKA, P. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? **Blood.** v. 109, n. 2, p. 431-448, 2007.

NYGAARD, U.; LARSEN, J.; KRISTENSE, T.D. *et al.* Flow cytometric DNA index, G-band karyotyping, and comparative genomic hybridization in detection of high hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr Oncol.** v. 28, n. 3, p. 134-140, 2006.

ORFAO, A.; CHILLON, M.C.; BORTOLUCI, A.M. *et al.* The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic

of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. **Haematologica**. v. 84, p. 405-412, 1999.

ORFAO, A.; ORTUNO, F.; SANTIAGO M.; LOPEZ, A.; SAN MIGUEL, J. Immunophenotyping of Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. **Cytometry A**. v. 58, n. 1, p. 62-71, 2004.

ORR, J.A.; MAXWELL, P.; DIAMOND, J.; HAMILTON, P.W. Histone Acetylation Induces Chromatin Reorganization And Altered Gene Expression In Prostate Neoplasia. **Cellular Oncology**. v. 27, p. 107-108, 2005.

PAGNANO, K. B. B.; TRAINA, F.; TAKAHASHI, T. *et al.* Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. **Sao Paulo Med J/Rev Paul Med**. v. 118, n. 6, p. 173-178, 2000.

PAGNANO, K. B. B.; DUARTE, G.C.; LORAND-METZE, I. *et al.* Treatment outcome of acute promyelocytic leukemia with modified Aida protocol. **Advances in Hematology**. v. 2010, 2010.

PELLOSO, L.A.;CHAUFFAILLE MDE, L.;GHANAME, F.S.;YAMAMOTO, M.;BAHIA, D.M.;KERBAUY, J. Karyotype in acute myeloid leukemia: importance and type of aberrations in 30 patients at diagnosis. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, p. 150-455, 2003.

PUI, C.H.; RELLING, M.V.; DOWNING, J.R. Mechanisms of Disease: Acute Lymphoblastic Leukemia. **N Engl J Med**. v. 350, p. 1535-1548, 2004.

POLLYEA, D.A.; KOHRT, H.E.; MEDEIROS, B.C. Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review. **Br J Haematol**. v. 152, p. 524-542, 2011.

REIS-ALVES, S.C.; TRAINA, F.; SAAD, S.T.; METZE, K.; LORAND-METZE, I. The impact of several phenotypic features at diagnosis on survival of patients with myelodysplastic syndromes. **Neoplasma**. v. 57, p. 530-536, 2010.

RILEY, R.S.; MASSEY, D.; JACKSON-COOK, C. *et al.* Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**. v. 16, p. 245-299, 2002.

ROLLIG, C.; THIEDE, C.; GRAMATZKI, M. *et al.* A novel prognostic model in elderly patients with acute myeloid leukemia: results of 909 patients entered into the prospective AML96 trial. **Blood**. v. 116, n. 6, p. 971-978, 2010.

ROMAN-GOMEZ, J.; JIMENEZ-VELASCO, A.; CASTILLEJO, J.A.; AGIRRE, X.; BARRIOS, M.; NAVARRO, G.; MOLINA, F.J.; CALASANZ, M.J.; PROSPER, F.; HEINIGER, A.; TORRES, A. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. v. 104, n. 8, p. 2492-2498, 2004.

ROSU-MYLES, M.; WOLFF, L. p15Ink4b: Dual function in myelopoiesis and inactivation in myeloid diseases. **Blood Cells Mol Dis**. v. 40, n. 3, p. 406-409, 2008.

RUAN, G.R.; LI, J.L.; QIN, Y.Z. *et al.* Nucleophosmin mutations in Chinese adults with acute myelogenous leukemia. **Ann Hematol**. v. 88, n. 2, p. 159-166, 2009.

SAGRILLO, M. R.; CARDOSO, S. H.; SILVA, L. R. J. *et al.* Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Rev. bras. hematol. hemoter**. v. 27, n. 2, p. 94-101, 2005.

SCHABATH, R.; RATEI, R.; LUDWIG, W.D. The prognostic significance of antigen expression in leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**. v. 16, n. 4, p. 613-628, 2003.

SCHLENK, R.F.; DOHNER, K.; KRAUTER, J. *et al.* Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**. v. 358, p. 1909-1918, 2008.

SCHOLL, S.; THEUER, C.; SCHEBLE, V. *et al.* Clinical impact of nucleophosmin mutations and Flt3 internal tandem duplications in patients older than 60 yr with acute myeloid leukaemia. **Eur J Haematol**. v. 80, n. 3, p. 208-215, 2008.

SHEN, L. L.; TOYOTA, M.; KONDO, Y. *et al.* Aberrant DNA Methylation of p57KIP2 Identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. **Neoplasia**. v. 101, n. 10, p. 4131-4136, 2003.

SINGAL, R.; GINDER, G.D. DNA Methylation. **Blood**. v. 93, n. 12, 4059-4070, 1999.

SINGH, H.; WERNER, L.; DE ANGELO, D. *et al.* Clinical outcome of patients with acute promyelocytic leukemia and FLT3 mutations. **Am J Hematol.** v. 85, n. 12, p. 956-957, 2010.

SMITH, M.; ARTHUR, D.; CAMITTA, B. *et al.* Uniform Approach to Risk Classification and Treatment Assignment for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology.** v. 14, n. 1, p. 18-24, 1996.

SMITH, M.L.; HILLS, R.K.; GRIMWADE, D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukemia. **Blood Reviews.** v. 25, p. 39-51, 2011.

SUZUKI, T.; KIYOI, H.; OZEKI, K. *et al.* Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. **Blood.** v.106, n. 8, p. 2854-2861, 2005.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L. *et al.* In: WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues, IARC press. Lyon, France; p.112, 2008.

THIEDE, C.; STEUDEL, C.; MOHR, B. *et al.* Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. **Blood.** v. 99, n. 12, p. 4326-4335, 2002.

VADIRMAN, J.W.; HARRIS, N.L.; BRUNNING, R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood.** v. 100, n. 7, p. 2292-2302, 2002.

VAN DONGEN, J. J.; MACINTYRE, E. A.; GABERT, J. A. *et al.* Standardized RT-PCR Analysis of Fusion Gene Transcripts from Chromosome Aberrations in Acute Leukemia for Detection of Minimal Residual Disease. **Leukemia.** v. 13, p. 1901-1928, 1999.

WHITMAN, S.P.; RUPPERT, A.S.; RADMACHER, M.D. *et al.* FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. **Blood.** v. 111, n. 3, p. 1552-1559, 2008.

WONG, I.H.N.; NG, M.H.L.; HUANG, D.P.; LEE, J.C.K. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. **Blood.** v. 95, n. 6, p. 1942-1949, 2000.

YANADA, M.; SUZUKI, M.; KAWASHIMA, K. *et al.* Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. **Eur J Haematol.** v. 74, n. 5, p. 418-423, 2005.

YANG, Y.; TAKEUCHI, S.; HOFMANNB, W.K.; IKEZOE, T.; VAN DONGEN, J.J.M.; SZCZEPANSKI, T.; BARTRAM, C.R.; NORIHIDE YOSHINO, N.; TAGUCHI, H.; KOEFFLER, P.H. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res.** v. 30, p. 98-102, 2006.

ZÖCHBAUER-MÜLLER, S.; Fong, K.M.; Virmani, A.K.; Geradts, J.; Gazdar, A.F.; Minna, J.D. Aberrant Promoter Methylation of Multiple Genes in Non-Small Cell Lung Cancers. **Cancer Research.** v. 61, p. 249-255, 2001.

Anexos



CEP, 01/08/07.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 389/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0300.0.146.000-07

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "METILAÇÃO ABERRANTE DO DNA E ESTUDO DA MORFOMETRIA EM LEUCEMIAS AGUDAS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Mariana Rezende Bandeira de Mello

INSTITUIÇÃO: Hemocentro / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/06/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/06/08 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Verificar a frequência das mutações nos genes FLT3 e NPM1 nas LMAs. Estudar os padrões de metilação dos genes p15, p16, p57, p73, ER e MDR1. Analisar diversos parâmetros da morfometria. Verificar o perfil de metilação nas amostras analisadas e buscar associações com a morfometria.

III - SUMÁRIO

A metilação é o principal processo epigenético envolvido na regulação da expressão gênica. Pares de citosina guanina (CpG) tendem a estar em conjunto em áreas conhecidas como ilhas CpG que estão presentes, principalmente, nas regiões promotoras dos genes. A metilação do DNA nos promotores associados às ilhas CpG tem sido associada com o silenciamento gênico. A metilação aberrante em genes supressores de tumor é observada frequentemente em doenças malignas incluindo leucemias agudas. A detecção da metilação anormal tem sido utilizada como marcador em potencial para o câncer e são frequentemente encontradas em pacientes com síndromes mielodisplásticas (SMD) e com leucemias agudas. A textura da cromatina dos núcleos está relacionada com fenômenos epigenéticos, tais como metilação ou modificação da histona, o que remodela profundamente a arquitetura nuclear características de cada tipo de tecido. Estudos sugerem uma correlação entre os níveis de metilação e a condensação da cromatina no núcleo interfásico. Nosso estudo tem como objetivos estudar as características fenotípicas das pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) e correlacioná-las com características de textura nuclear. Isto é especialmente importante na diferenciação entre LMA e SMD. Estudaremos também a frequência das mutações nos genes FLT3 e NPM 1 e verificaremos o perfil de metilação nas amostras analisadas buscando associações com a morfometria. Para pesquisas das mutações será utilizada a técnica de RT-PCR. Na análise morfométrica serão adquiridas 100 imagens de blastos consecutivos de cada paciente. Os núcleos serão inteiramente segmentados e analisados por programas de computação. No estudo da metilação o DNA será tratado com bissulfito de sódio e submetido às técnicas MSP ou COBRA.



Os testes estatísticos serão executados nos programas WinStar 3.1 for Windows ou SPSS 10.0 for Windows. O nível de significância considerado será de 5% ($p=0,05$).

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um estudo do tipo série de casos envolvendo pacientes (maiores de 18 anos) que apresentem LMA que forem admitidos no Hemocentro e HC/UNICAMP entre junho de 2007 e setembro de 2009. Os dados avaliados serão: Hemograma, Mielograma, imunofenotipagem, alterações moleculares e estudo da morfometria e da metilação. Serão estudadas as associações possíveis entre os dados clínicos e laboratoriais com a morfometria e a metilação do DNA.

O projeto está de acordo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequado, após resposta do parecer.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

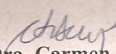
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de junho de 2007.


Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 3 -

Tabela 1: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMA.

n° Caso	Iniciais	HC	Sexo	Idade	Data Diagnóstico	Data Última Notícia	Situação	Sobrevida Global	Hb	Leucometria	Plaquetas	Blastos na MO
1	MOL	9786413	2	55	25/05/2007	30/08/2007	1	97	6,0	58300	227000	70
2	AJCL	6702648	1	64	30/05/2007	20/07/2007	1	51	6,7	13420	12000	58
3	NTMB	9794436	2	24	31/05/2007	29/09/2010	0	1217	9,6	2000	11000	72
4	JCO	23497	1	31	11/06/2007	04/10/2007	1	115	8,5	150000	17000	80
5	VMM	23566	2	48	15/06/2007	01/08/2010	0	1143	10,8	1500	9000	60
6	JLPA	23763	2	22	26/06/2007	07/10/2007	1	103	8,8	2500	68000	40
7	MASF	9817713	2	58	27/06/2007	20/10/2007	1	115	6,5	35100	100000	93
8	AGP	23806	1	27	27/06/2007	13/10/2010	0	1204	7,0	1400	85000	97
9	JCO	4101969	2	79	02/07/2007	12/07/2007	1	10	11,4	30000	129000	87,5
10	CJBN	9827910	1	48	04/07/2007	23/08/2007	1	50	9,0	1900	58000	44
11	DYO	23896	1	15	11/07/2007	04/08/2007	1	24	8,4	44600	45000	82,5
12	CNV	9869388	2	34	28/08/2007	25/08/2010	0	1093	9,5	1000	9000	80
13	JAF	2933863	1	79	31/07/2007	18/09/2007	1	49	3,4	75000	2000	100
14	BG	9877301	1	62	03/08/2007	15/09/2007	1	43	9,8	8130	180000	70
15	MCJ	9881875	2	51	10/09/2007	26/02/2008	1	169	7,1	144700	18000	77
16	SSML	9897282	2	41	25/09/2007	15/01/2008	0	112	7,8	23190	36000	92
17	MDRS	24829	2	51	02/10/2007	05/11/2007	1	34	7,8	20600	11000	65
18	RCT	25001	1	24	15/10/2007				7,8	2400	36000	75
19	GSRT	9919404	2	80	19/10/2007	18/11/2007	1	30	9,9	21880	30000	53
20	OBZ	25215	2	85	01/11/2007		1		7,5	85000	100000	60,8
21	VAA	9932456	2	58	05/11/2007	05/11/2007	1	0	8,0	61000	34000	89,5
22	OAE	25343	1	9	21/11/2007	15/01/2008	1	55	8,0	115000	150000	83,2
23	AMC	3664792	2	83	27/11/2007	27/03/2008	1	121	7,7	19570	35000	91

cont. Tabela 1: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMA.

n° Caso	Iniciais	HC	Sexo	Idade	Data Diagnóstico	Data Última Notícia	Situação	Sobrevida Global	Hb	Leucometria	Plaquetas	Blastos na MO
24	LAGR	8691586	2	43	11/11/2005	10/01/2006	1	60	9,3	2160	27000	94
25	GDO	9307516	1	25	10/11/2005	18/05/2006	1	189	11,4	57100	215000	48,5
26	JMT	9351565	1	52	13/01/2006	11/05/2006	1	118	7,4	164500	53000	94,5
27	ERS	9368996	1	25	03/02/2006	02/05/2006	1	88	3,4	1250	39000	78
28	AASN	9328570	2	57	22/05/2006	08/06/2006	1	17	7,4	12000	10000	92
29	GSB	9468730	2	32	24/05/2006	02/06/2006	1	9	7,5	100000	29000	67,5
30	SSVA	9486146	2	36	09/06/2006	25/01/2007	0	230	8,8	83380	45000	92
31	CDMJ	9522643	1	20	21/07/2006	27/02/2007	1	221	4,5	1180	32000	83,5
32	LFB	20803	1		25/09/2006				3,0	160000	10000	98
33	APB	9535325	1	52	04/08/2006	21/11/2007	1	474	9,7	24830	19000	89,5
34	CMN	9968762	1	47	19/12/2007	25/12/2007	1	6	12,6	111100	35000	94,5
35	CRB	25802	2		08/01/2008				8,0	8040	96000	55
36	SL	25900	1	72	16/01/2008	04/02/2008	1	19	9,8	2800	38000	73,5
37	FSR	4200393	2	97	17/01/2008	21/01/2008	1	4	5,2	4220	22000	38
38	JPS	10052025	1	53	01/04/2008	15/07/2008	1	105	4,7	162320	42000	71,3
39	MAR	10052623	1	26	02/04/2008	27/01/2010	0	665	10,9	58140	34000	96
40	VRS	9955694	1	71	29/11/2007	02/06/2009	1	551	5,3	6300	98000	88
41	MDP	9005097	2	72	08/02/2008	23/03/2009	1	409	3,4	2000	40000	82
42	NRS	10017233	1	25	22/02/2008	06/05/2008	1	74	13,4	7300	65000	55
43	RMSA	9702409	2	32	28/04/2008	01/09/2008	1	126	7,9	1500	37000	97,5
44	JAF	9714367	1	33	21/05/2008	15/06/2010	0	755	6,0	39690	39000	
45	ICL	27350	1	38	26/05/2008							53,2
46	LAP	10112007	2	46	05/06/2008	08/12/2009	1	551	7,2	1880	14000	25

cont. Tabela 1: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMA.

n° Caso	Iniciais	HC	Sexo	Idade	Data Diagnóstico	Data Última Notícia	Situação	Sobrevida Global	Hb	Leucometria	Plaquetas	Blastos na MO
47	NB	27495	1	79	09/06/2008	09/06/2008	1	0	10,9	171000	80000	85,5
48	MSP	27643	2	61	19/06/2008	05/07/2010	0	746				85,3
49	LRS	2394463	2	65	19/06/2008	09/07/2008	1	20	4,4	172000	64000	85
50	SCS	10139249	1	60	03/07/2008	11/11/2010	0	861	6,0	1420	7000	88
51	LAT	10102210	2	66	23/07/2008	26/10/2008	1	95	7,8	72300	138000	77
52	MCSM	10207072	2	49	23/07/2008				7,3	98000	19000	86,5
53	KK	28052	1	68	25/07/2008	30/05/2010	1	674	9,7	1000	63000	40
54	SRLS	10162258	2	48	29/07/2008	02/12/2008	0	126	12,2	11080	75000	50
55	EMM	28195	2	44	04/08/2008	13/09/2008	1	40	7,0	50000	20000	65,9
56	ARS	28230	2	62	07/08/2008	10/08/2008	1	3	13,0	23000	49000	69
57	ELS	2795061	2	54	19/08/2008	14/09/2008	1	26	10,5	36590	95000	24
58	JVN	10192655	1	66	05/09/2008	15/12/2008	1	101	10,3	11830	26000	33,5
59	BACS	29344	1	45	04/11/2008	13/10/2010	0	708	6,0	8000	60000	93
60	JAC	28604	1	51	05/09/2008	20/11/2008	1	76	9,7	3240	34000	
61	NS	28646	2	76	11/09/2008	05/10/2008	1	24	7,7	5400	68000	96
62	MMBD	28813	2	68	22/09/2008	25/09/2008	1	3	6,3	245000	74000	88,5
63	HBL	9012341	2	57	22/09/2008				10,7	28300	110000	93,5
64	TAS	10217845	2	41	26/09/2008	18/02/2009	0	145	10,1	30610	188000	72,5
65	FGO	10231724	1	73	13/10/2008				7,6	118600	23000	76,5
66	CP	29196	1	76	21/10/2008	06/07/2010	0	623	8,0	1400	26000	88
67	MAMM	10240531	2	59	21/10/2008	26/10/2008	1	5	11,3	44440	20000	64
68	LGP	29244	1		24/10/2008				5,0	70000	70000	
69	DFI	10244161	2	74	24/10/2008	02/01/2009	1	70	5,3	21010	36000	90

cont. Tabela 1: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMA.

n° Caso	Iniciais	HC	Sexo	Idade	Data Diagnóstico	Data Última Notícia	Situação	Sobrevida Global	Hb	Leucometria	Plaquetas	Blastos na MO
70	AS	9190107	1	75	29/10/2008	11/11/2010	0	743	8,1	1210	9000	84
71	EAB	10248791	2	82	03/11/2008	19/10/2010	0	715	7,2	690	34000	77,6
72	TSC	10251009	2	63	04/11/2008	13/12/2008	1	39	9,4	11110	139000	20
73	SAPR	10254130	2	47	06/11/2008	13/01/2009	1	68	9,7	180200	34000	96
74	RCF	29524	1		18/11/2008				9,5	6400	113000	95
75	LAP	10273071	1	43	01/12/2008	09/11/2010	0	708	10,6	920	26000	90
76	AMV	10273837	1	34	01/12/2008				8,6	800	85000	76,6
77	AVS	10295574	2	56	07/01/2009	17/01/2009	1	10	9,0	75000	165000	78
78	MAT	30026	2	64	13/01/2009				9,2	23200	50000	82,7
79	CMLS	30173	1	18	27/01/2009	27/01/2009	1	0	6,0	281290	87000	93,3
80	CMP	10317413	2	29	03/02/2009	16/10/2009	1	255	6,2	65890	34000	76,5
81	JRM	30430	1	66	11/02/2009	17/02/2009	1	6	7,0	40000	140000	32,9
82	TACB	31212	2	79	13/03/2009	30/03/2009	1	17	10,0	54000	68000	70,9
83	TCSP	10347846	2	43	13/03/2009	05/08/2009	0	145	11,9	5040	236000	40
84	PCS	10574255	2	20	17/03/2009	20/07/2010	0	490	5,7	68700	18000	79
85	LB	31250	1	80	17/03/2009	25/03/2009	1	8	10,6	2800	9000	81,4
86	JCC	31256	1	24	18/03/2009	24/04/2009	1	37	11,1	1300	51000	74
87	RAS	31260	2	42	18/03/2009				7,5	9600	16000	44
88	JPB	10359904	1	46	23/03/2009	23/03/2009	1	0	13,7	182090	21000	97,5
89	RRF	10362236	1	65	25/03/2009	28/09/2010	0	552	5,4	217300	182000	81,5
90	JAOS	31490	1	61	06/04/2009	30/05/2009	1	54	7,5	79320	26000	85,3
91	MPR	31514	2	52	07/04/2009	02/05/2009	1	25	9,0	8250	42000	57,6
92	ACV	31588	2	23	13/04/2009	23/04/2009	1	10	8,0	56000	5000	92,4

cont. Tabela 1: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMA.

n° Caso	Iniciais	HC	Sexo	Idade	Data Diagnóstico	Data Última Notícia	Situação	Sobrevida Global	Hb	Leucometria	Plaquetas	Blastos na MO
93	RSF	31609	1	35	14/04/2009	30/04/2009	1	16	6,9	35000	12000	48,3
94	DAR	10379239	1	60	14/04/2009	20/05/2009	1	36	8,3	125800	214000	91,5
95	VRP	3816618	2	70	15/04/2009	10/05/2009	1	25	11,1	117800	289000	66,5
96	BA	32000	1	75	12/05/2009							54,1
97	MECA	32093	2	46	19/05/2009	21/05/2010	1	367	5,6	30000	90000	58,6
98	ICO	32624	1	40	29/06/2009	13/01/2010	1	198	7,0	60000	10000	84,2
99	RCN	10454613	2	24	07/07/2009	06/08/2009	1	30	9,5	39000	24000	93,5
100	ALS	10458293	1	27	13/07/2009	26/10/2010	0	470	14,1	900	28000	74,5
101	JCA	32823	1	50	15/07/2009	22/07/2010	0	372	10,5	2000	6000	83
102	CFRS	7119270	2	76	17/07/2009	13/08/2009	1	27	9,4	2080	29600	38
103	FSA	10472421	2	65	28/07/2009	30/12/2009	1	155	9,3	14000	8500	
104	SX	10473530	1	47	29/07/2009	27/12/2009	1	151	10,6	60800	26500	38
105	JCR	33087	2	22	07/08/2009	06/09/2009	1	30	9,7	65000	20000	96
106	ZFG	33124	2	79	07/08/2009	10/09/2009	1	34	8,5	23000	122000	69,5

Tabela 2: Características citogenéticas e moleculares dos pacientes com LMA.

n° Caso	Cariótipo	Alteração Cariótipo	Cariótipo Risco	Risco Car/Mol	FLT3 TKD	FLT3 ITD	NPM1	p15	p16	p57	p73	ER	MDR1
1	nl	46XX	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
2	nl	46XY	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
3	alt	PML/RARa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	alt	46XY, inv(16)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	alt	49XX, t(15;17)(q22;q11), +3mar	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
6	inc	46XX	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
7	inc				0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	nl	46XY	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9					0	0	0	0	0	0	1	0	0
10	inc				0	0	0	0	0	0	1	0	0
11	alt	46XY, t(8;16)(q23;q24), 21q+	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
12	alt	PML/RARa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	nl	46XY	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14				2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
15	inc			2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
16	nl	46XX	2	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
17	nl	46XX	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	alt	46XY, i(17)(q10)	3	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
19	alt	45XX, -7,-10,-18,+2mar	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	nl	46XX	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
21	alt	46XX, t(15;17)(q22;q11)	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
22	alt	47XY, +21	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23					0	0	0	1	1	0	1	0	0

cont. Tabela 2: Características citogenéticas e moleculares dos pacientes com LMA.

n° Caso	Cariótipo	Alteração Cariótipo	Cariótipo Risco	Risco Car/Mol	FLT3 TKD	FLT3 ITD	NPM1	p15	p16	p57	p73	ER	MDR1
24	nl	46XX	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	alt	46XY, del(7)(q31)	3	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
26	alt	46XY[23], 46XY, inv(16)[02]	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
27	nl	46XY	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
28	alt	46XX, t(15;17)(q22;q11)[12], 46XX[08]	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
29	nl	46XX	2	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0
30	alt	46XX, t(1;11)(q21;q23)	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	alt	46XY, del(7)(q22)	3	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0
32					1	0	0	1	0	0	1	0	0
33	inc				0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	nl	46XX	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35					0	0	0	0	1	0	1	0	0
36	alt	hiperdiploidia	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37					0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	nl	46XY	2	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0
39	alt	46XY, t(4;6)(p16;q13), t(15;17)(q22;q11)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	nl	46XY	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
41	alt	46XX, t(11;20)(p15;q13)	3	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0
42	alt	47XY, +8[10], 46XY[14]	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0
43	nl	46XX	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	inc			2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
45					0	0	0	1	0	0	0	0	0
46	nl	46XX	2	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0

cont. Tabela 2: Características citogenéticas e moleculares dos pacientes com LMA.

n° Caso	Cariótipo	Alteração Cariótipo	Cariótipo Risco	Risco Car/Mol	FLT3 TKD	FLT3 ITD	NPM1	p15	p16	p57	p73	ER	MDR1
47	nl	46XY	2	2	0	1	1	0	1	0	0	0	0
48	alt	46XX, t(15;17)(q22;q11)[10], 46XX[05]	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
49	inc			3	0	1	0	1	1	0	1	0	0
50	alt	PML/RARa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	alt	46XX, -9,+11,-19,+mar[24]/ 47XX,-9,+11,+mar[03]	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	inc			1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
53	inc				0	0	0	0	0	0	1	0	0
54	nl	46XX	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
55					0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	alt	46XX, t(7;?)(q32,?),del(11)(q23),del(12)(p13)	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	alt	46XX, del(1)(q41),-5,+8,9p+,12p+,16q+,-22,+mar	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	nl	46XY	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
59	alt	46XY, t(15;17)(q22;q11)	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
60					0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	nl	46XX	2	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
62				2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
63	inc			1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
64	inc			1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
65	nl	46XY	2	2	1	1	1	1	1	0	1	0	0
66	nl	46XY	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0
67	nl	46XX	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
68					0	0	0	0	0	0	0	0	0

cont. Tabela 2: Características citogenéticas e moleculares dos pacientes com LMA.

n° Caso	Cariótipo	Alteração Cariótipo	Cariótipo Risco	Risco Car/Mol	FLT3 TKD	FLT3 ITD	NPM1	p15	p16	p57	p73	ER	MDR1
69	alt	46XX, del(5)(q13)	3	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0
70	alt	47XY, +8[10], 46XY[10]	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
71	alt	PML/RARa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	alt	45XX, del(5)(q22),t(7;19)(p15;p13),t(7;?)(p13,?)-18[09]/ 46XX, del(5)(q22), t(7;19)(p15;p13), t(11;11)(p11;q11),t(7;?)(p13;?)[09]	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	nl	46XX	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
74	nl	46XY	2	3	1	1	0	1	0	0	1	0	0
75	alt	46XY[10]/ 46XY, t(15;17)(q22;q11)[08]	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
76	nl	46XY	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
77	nl	46XX	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
78	alt	45X,t(8;21)(q22;q22),-X	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
79				3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
80	alt	46XX, del(8)(q22)[10]/ 46XX[10]	2	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0
81				3	0	1	0	1	0	0	0	0	0
82	nl	46XX	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
83	alt	46XX, t(8;21)(q22;q22)[18]/ 46XX[02]	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	alt	46XX, t(15;17)(q22;q11)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85					0	0	0	0	0	0	1	0	0
86	alt	46XY, i(17)(q10)[07]/ 46XY[08]	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
87	alt	46XX, t(8;21)(q22;q22)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	alt	45X, -Y	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	nl	46XY	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

cont. Tabela 2: Características citogenéticas e moleculares dos pacientes com LMA.

n° Caso	Cariótipo	Alteração Cariótipo	Cariótipo Risco	Risco Car/Mol	FLT3 TKD	FLT3 ITD	NPM1	p15	p16	p57	p73	ER	MDR1
90				3	0	1	0	1	0	0	0	0	0
91	nl	46XX	2	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0
92	alt	PML/RARa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93				1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
94	alt	46XY, del(5)(q13)	3	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
95	nl	46XX	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96					0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	nl	46XX	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
98	alt	46XY, +8	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
99	nl	46XX	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
100	alt	PML/RARa	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
101	alt	46XY, t(15;17)(q22;q11)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
102	inc				0	0	0	0	0	0	0	0	0
103	inc							0	0	0	0	0	0
104	alt	46XY, inv(16)(p13;q22)[14]/ 46XY[06]	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	alt	46XX, del(7)(q22), t(15;17)(q22;q11)[07]/ 46XX, t(15;17)(q22;q11)[13]	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
106	nl	46XX	2	3	0	1	0	1	0	0	0	0	0

Tabela 3: Características fenotípicas dos pacientes com LMA.

n° Caso	FAB	M3 x não M3	com mat x sem mat	IMF CD45	IMF CD19	IMF CD7	IMF CD13	IMF HLA- DR	IMF CD33	IMF CD11b	IMF CD14	IMF CD15	IMF CD34	IMF MPO
1	2	0	2	248,4	0	0	322,5	57,8	317	22	0	0	0	
2	2	0	2	197,5	34,6	31,8	125,2	20,5	553,9	89,6	0			
3	3	1		569,8	0	0	128	0	155,9			0	0	
4	4	0	2		0	0	812,5	86,8	622,8	0	0			
5	3	1		438	0	0	43	0	168,7			0	0	3979,5
6	2	0	2	135,4	0	312	0	192,2	121,8	0	0	20,8	48,4	
7	0	0	1	84,8	0	0	40,3	99,2	68,4	0	0	39,9	192,3	
8	3	1		275,2	0	0	93,2	0	189			0	0	
9	1	0	1	98,4	113,9	0	146,8	343,2	51,9	0	0			0
10	0	0	1	115,1	0	0	0	126,9	0	0	0			162,3
11	1	0	1	461,7	151	0	415	230,6	297	0	0			
12	3	1		908,5	0	0	844,5	0	1610,6			0	0	
13	0	0	1	92,7	329,8	0	148,7	402,2	72,2	0	0	0	353,3	0
14	4	0	2	557,1	0	38,4	247,2	179,8	322,6	76,4	0	195,3	0	
15	2	0	2	51,6	0	0	25,3	0	173	0	0	0	0	
16	1	0	1	98,6	0	27,3	95,1	0	447,2	30,1	0	50	108,3	
17	2	0	2	460,2	0	48,4	344	91	268,5	188,8	0	121,2	92,4	
18	2	0	2	153,9	61,3	0	27	116,7	207,8	0	0			332
19	2	0	2	149,5	0	0	204	72,6	410,4	0	0	35,2	425,8	
20	1	0	1	69,1	26,9	0	181,2	101,3	891,3	0	0	88,4	71	
21	3	1		298,2	30	0	485,2	100,8	381,1	39,8	0	0	35,4	861,6
22	2	0	2	193,7	31,8	162,5	79,9	30,1	257,8	0	0		66,9	287,8
23	0	0	1	25,5	16,2	147	63,1	64	123	22,4	0	0	104,1	

cont. Tabela 3: Características fenotípicas dos pacientes com LMA.

n° Caso	FAB	M3 x não M3	com mat x sem mat	IMF CD45	IMF CD19	IMF CD7	IMF CD13	IMF HLA- DR	IMF CD33	IMF CD11b	IMF CD14	IMF CD15	IMF CD34	IMF MPO
24	4	0	2	62,9	0	0	36,1	32,2	21		0	0	0	
25	2	0	2	435,9	0	263,2	138,1	677,5	293,4	52,4	32,5			
26	4	0	2	707,7	19,5	93,1	87,5	82,4		248,2	38,6	0	88,7	
27	7	0	2	153,4	0					86,6				
28	3	1		790,5	0	0	0	0	42,3				42,2	
29	1	0	1	15,4	0	100,2	70,5	122,4	17,8		0	0	343,4	
30	5	0	1	1705,9	0	0	192	220,1	241,9		422,8	27,5	0	
31	5	0	1	271,5	0	0	0	58,8	43,3	419,3	0	37	27,5	
32	3	1		333,2			446,4	0	427,1			0	0	
33	3	1		654,4	0	0	105,7	0	46,1	0	0	0	0	
34	5	0	1	611,4	0	0	678	58,3	828,3	225,2	333,2	82,4	67	
35	4	0	2	52,6	27,2	0	136,6	59,2	146,5					
36	1	0	1	176,5	32,8	0	387,4	68,7	380	47,7	0	73	298,3	
37	2	0	2	162,6	37	53,4	105,4	147,7	413,9	93,5	127,4			
38	2	0	2	97,2	0	0	162,1	28,6	100,9	28,3	0			
39	3	1		120,8	26,4	0	257,1	0	380			0	63,5	
40	4	0	2	163,1	0	0	212,8	109,6	255,2	88	0	489,9	36,1	
41	4	0	2	213,1	64,3	28,2	109,2	161,6	296,2	56,5	201,6	93,8	132,3	112,6
42	5	0	1	369,4	0	0	72	246,3	186,6	81	50,4	122,4	0	
43	1	0	1	485	0	51,7	47,8	64,4	29,5			293,4	33,2	
44	2	0	2	555,5	0	0	125,3	0	195,6			320	0	
45	2	0	2	49,5	0	113,1	74,5	0	210,9					
46	6	0	2	123,9	85,1	41,6	101,8	87,3	135,7					

cont. Tabela 3: Características fenotípicas dos pacientes com LMA.

n° Caso	FAB	M3 x não M3	com mat x sem mat	IMF CD45	IMF CD19	IMF CD7	IMF CD13	IMF HLA- DR	IMF CD33	IMF CD11b	IMF CD14	IMF CD15	IMF CD34	IMF MPO
47	5	0	1	1233,9	39,1	0	139,8	98,5	281,6	63,9	130,9			
48	3	1		888,9	0	0	63,5	0	107,7			0	0	
49	1	0	1	152,7	0	72,9	62,1	69,9	26,5	29,2	0			200,5
50	3	1		422,4	0	0	145,8	0	273,8			0	0	
51	1	0	1	70,2	0	0	308,9	28,1	126,6	0	0			
52	1	0	1	104,5	0	0	0	0	40			0	0	74,8
53	0	0	1	216,8	0	29,2	93,7	98,2	570,5					
54	2	0	2	403,7	34,4	0	228,3	41,6	1151,6	177,4	0			
55	5	0	1	680	0	0	149,8	256,1	384,3	189,2	72,7			
56	0	0	1	318,1	0	0	0	54,2	1357,8	218,2	91,8			
57	4	0	2	324,4	0	0	485,5	134,1	296,9	105	0			
58	2	0	2	1502,9	17	0	85,1	146,9	358,4	155	444,9			
59	3	1		658,1	0	0	140,4	0	323,6	0	0		0	
60	2	0	2	151,8	0	0	838,8	113,8	51,5	0	0			
61	1	0	1	42,3	0	0	44,3	0	590,3			0	219,7	
62	2	0	2	343,3	0	0	50,2	210,8	243,4	25,8	0			
63	4	0	2	112,5	0	0	0	0	86,1	24,2	0	0	0	
64	1	0	1	77,6	0	0	26	0	47,6	20,4	0	0	15,8	
65	4	0	2	657,1	0	37,7	299,1	1089	415,1	60,9	0			
66	1	0	1	97,7	0	0	32,7	230,6	17,4	0	0		62,9	75,8
67	5	0	1	2711,2	0	0	142,7	186	40,9	96,6	237,3		14,3	
68	4	0	2	1759	0	0	110,2	176,5	38,7	96,2	71,4		198,2	
69	0	0	1	187	0	0	162,2	293,6	116				242,6	

cont. Tabela 3: Características fenotípicas dos pacientes com LMA.

n° Caso	FAB	M3 x não M3	com mat x sem mat	IMF CD45	IMF CD19	IMF CD7	IMF CD13	IMF HLA- DR	IMF CD33	IMF CD11b	IMF CD14	IMF CD15	IMF CD34	IMF MPO
70	1	0	1	314,3	0	0	48	186,4	173,6	0	0		208,3	
71	3	1		473,8	0	0	98,2	0	153,4	0	0		0	
72	2	0	2	810,2	0	0	151,3	442,8	295,1	318,5	46,2		256,9	
73	5	0	1	2265,1	0	0	145,2	202,6	141,3	185,4	65		0	
74	0	0	1	149,2	0	188,4	32,9	386,9	47	27,1	0		387,1	0
75	3	1		632,4	0	37,3	0	0	59,8	0	0		0	2190,9
76	1	0	1	160,3	0	0	147,1	392,6	156,6	0	0		251,3	
77	2	0	2	672,9	0	32,7	117,4	568,2	497,7	94,8	0		0	
78	2	0	2	574,6	37,1	0	201,4	457,1	98	64,5	53,1		205,6	436,8
79	1	0	1	998,6	0	0	197,1	54	33,6	0	0		23,6	
80	2	0	2	130,3	0	62,6	22,7	368,1	270	0	0		567,5	420,2
81	2	0	2	219	0	71,3	42	450,6	209,4	0	0		62,7	263,4
82	1	0	1	186,6	0	0	42,9	153,7	117,9	38,8	0		134,1	
83	2	0	2	329,8	0	0	49	588,1	53,3	177	29,4		119	
84	3	1		623,9	0	0	117,3	25,9	18,4	20,1	31		0	1690,9
85	1	0	1	107,3	0	0	62,7	399,3	38,7	0	0		279	293
86	4	0	2	203,5	0	0	414,9	0	232,9	0	0		0	
87	2	0	2	346,7	25,7	0	44,3	295,8	21,2	132,8	113,2		389,2	1812,9
88	1	0	1	92,1	0	0	65	88,1	359,7	0	0		365,5	
89	4	0	2	259,3	0	0	36,8	339,1	126,6	92,4	0		0	
90	1	0	1	374,7	18	0	77,6	56	39,1	0	0		66,1	
91	1	0	1	537	0	0	75,9	641,8	320,9	134,6	0		19,4	
92	3	1		688,6	0	0	156,9	0	215,7	0	0		0	

cont. Tabela 3: Características fenotípicas dos pacientes com LMA.

n° Caso	FAB	M3 x não M3	com mat x sem mat	IMF CD45	IMF CD19	IMF CD7	IMF CD13	IMF HLA- DR	IMF CD33	IMF CD11b	IMF CD14	IMF CD15	IMF CD34	IMF MPO
93	4	0	2	2271,2	0	52,7	520,9	485,8	576,4	383,4	388,9		0	
94	0	0	1	136,2	0	213,9	120,2	149	37	0	0		435,4	
95	4	0	2	118,3	0	0	623,1	834,6	93,4	97,3	0		249,6	
96	2	0	2	904,8	0	0	787,9	1236,5	616,9	462,5	118,9		286,1	
97	2	0	2	434,9	0	0	49,5	0	36,9	81,2	26,8		510,8	405,4
98	1	0	1	442	0	42,7	106,2	637,5	286,1	25,9	0	0	208,1	
99	1	0	1	261,8	0	0	124,9	536,8	491,3	263,9	152,9	157,1	92,6	
100	3	1		144,4	0	0	55,2	0	92,9	0	0	0	0	
101	3	1		148,6	0	0	25,5	0	19,7	0	0	0	0	
102	0	0	1	172,9	0	0	37,1	189,9	80,2	0	0	0	220,9	
103	2	0	2	298,7	0	0	65	473,5	59,1	202,1	89,5	323,4	370,2	
104	4	0	2	377,8	0	0	316,8	64,1	158,6	110,8	35,8	89,3	0	
105	3	1		146,7	0	0	48,4	141,2	0	42,5	0	0	50,4	2148,3
106	4	0	2	267,5	0	0	220,3	495,1	156,6	84,4	305,7	65,1	59	

Tabela 4: Características morfométricas dos pacientes com LMA.

n° Caso	Area	FF8	SDGrayLev	MEAngSecMon	MELocHomog	MEEntropy	MEContrast	MEDiagMom	MECluProem	FDMinK	R245MinK
1	24219,57813	1,005221	8,082932	0,007747	0,547647	7,759208	3,655221	17,374884	267642,9688	2,118184	0,998389
2	17806,08203	0,999326	6,37876	0,012982	0,59353	7,045391	2,537276	12,570899	134094,375	2,096806	0,999161
3											
4	25046,42773	1,000953	7,060833	0,009942	0,574645	7,389639	2,88361	14,396827	165797,0938	2,107337	0,998799
5	21346,92383	0,971539	7,550319	0,01052	0,579997	7,372894	3,002806	14,989248	246257,7813	2,102701	0,999028
6	17892,16602	1,082402	6,69913	0,010749	0,569459	7,316741	3,282407	14,866697	111532,1484	2,117803	0,99902
7	15383,02246	1,110435	9,712288	0,008986	0,550437	7,744856	5,645468	21,940039	1068159,125	2,121056	0,998627
8	28529,41797	0,85001	8,455836	0,007723	0,568485	7,719689	2,872802	15,498988	315214,0938	2,115552	0,998621
9	15728,83789	1,102221	11,665826	0,006774	0,535341	8,153585	6,656629	25,451801	1708998,25	2,12621	0,998255
10	15084,72363	1,077463	12,238278	0,006692	0,52645	8,205292	7,964992	27,499668	2014635	2,129889	0,998308
11	24379,53906	1,032515	12,428065	0,004564	0,506902	8,57963	6,209254	27,133211	1925516	2,144125	0,997382
12	19617,60156	1,100317	9,597807	0,012624	0,573481	7,376885	4,833831	20,290674	1194352,625	2,10715	0,9991
13	15517,28027	1,143432	13,843675	0,003514	0,481546	8,919011	7,965034	30,572718	1892691,75	2,152877	0,996751
14	19105,9043	1,012912	9,420756	0,00904	0,561572	7,690819	3,960104	18,639458	737150,6875	2,10971	0,998773
15											
16	20432,17578	1,079424	9,192199	0,007456	0,554406	7,870117	4,247096	19,891212	553332,625	2,123987	0,998113
17	19303,09766	1,085732	11,155007	0,005877	0,523825	8,274665	5,6739	24,403606	1191735,375	2,12967	0,99789
18	24876,62695	1,054957	9,54494	0,008096	0,548563	7,821917	4,544987	20,79261	1079534,625	2,112546	0,9986
19	18742,40039	1,100711	9,135262	0,009098	0,566331	7,663855	3,756336	18,528954	647834,75	2,109848	0,998923
20	22304,07227	1,042303	10,374205	0,006433	0,546222	8,083539	4,33056	21,168772	828616,375	2,118468	0,998404
21	19480,17188	1,120025	6,47204	0,014135	0,588	7,010493	2,887482	14,000609	220546,2656	2,104344	0,9991
22	18708,28516	1,080834	10,27233	0,006484	0,539994	8,091072	4,797079	21,591513	720909,625	2,127498	0,99817
23	18747,7168	1,118878	10,452538	0,007706	0,543779	7,945399	5,085526	22,165144	1015852	2,111474	0,998321

cont. Tabela 4: Características morfométricas dos pacientes com LMA.

n° Caso	Area	FF8	SDGrayLev	MEAngSecMon	MELocHomog	MEEntropy	MEContrast	MEDiagMom	MECluProem	FDMink	R245Mink
24	20049,80664	1,137131	7,402092	0,011305	0,574401	7,318298	3,471772	16,078899	345324,4688	2,107594	0,998981
25	17585,51563	1,114286	9,991632	0,006155	0,532695	8,123149	4,669262	21,032393	632433,5	2,124089	0,997881
26											
27											
28											
29											
30	20629,5625	1,083043	7,061119	0,012668	0,588625	7,122772	2,975447	14,520021	359945,875	2,098578	0,999129
31	18490	1,143674	7,582629	0,012399	0,577394	7,208658	3,431795	15,965155	497032,6563	2,103207	0,999053
32											
33	18767,56445	1,114636	7,678122	0,011109	0,582233	7,322371	3,159896	15,630049	448276,5313	2,09667	0,999007
34											
35	22899,25781	1,113003	9,365157	0,008862	0,568498	7,698143	3,886819	19,035019	876712	2,104242	0,99868
36	28203,87305	1,112566	13,577716	0,004548	0,509878	8,615582	6,271308	28,625629	3148368,5	2,128406	0,997979
37	21810	1,089044	7,821536	0,0087	0,557058	7,607652	3,547471	17,176023	337503,5938	2,113155	0,998647
38	22087,40625	1,124504	9,306808	0,007507	0,545082	7,872551	4,546787	20,579332	647870,8125	2,119919	0,998691
39	20321,83203	1,113899	8,783686	0,008659	0,560158	7,683612	3,927193	18,44005	600212,0625	2,109361	0,998725
40	22769,11328	1,057909	10,101699	0,006773	0,529608	8,066243	4,98043	22,227219	913736,0625	2,132512	0,9982
41	23543,63867	1,048901	9,082745	0,00802	0,537245	7,841681	4,590797	20,487389	645734,625	2,124909	0,998223
42	23177,00977	1,044194	8,914974	0,007617	0,556888	7,80961	3,539053	17,760942	442241,0625	2,110088	0,998526
43	22215,26758	1,086438	9,576683	0,006093	0,515443	8,167713	5,411659	22,966518	639895,875	2,149037	0,997929
44											
45	19459,83203	1,090454	9,417941	0,007683	0,541608	7,893758	4,967334	21,156475	614828	2,125614	0,998233
46	25446,62305	1,077428	7,403924	0,010271	0,569609	7,407999	3,196433	15,761131	312636,6875	2,111574	0,998921

cont. Tabela 4: Características morfométricas dos pacientes com LMA.

n° Caso	Area	FF8	SDGrayLev	MEAngSecMon	MELocHomog	MEEntropy	MEContrast	MEDiagMom	MECluProem	FDmink	R245Mink
47	21369,75195	1,076402	8,087581	0,008843	0,562444	7,591744	3,858971	17,673576	407661,5625	2,117666	0,998583
48	25633,92383	0,966907	8,980386	0,008177	0,555699	7,76589	4,027535	18,942471	697980,25	2,12446	0,99844
49	18453,18555	1,079246	8,779466	0,006888	0,525419	7,969575	5,052547	21,135876	446061,25	2,147348	0,997845
50	19605,5957	1,047041	7,370529	0,011286	0,580177	7,296563	3,270345	15,537535	342433,9063	2,107783	0,998986
51	22365,5	1,083037	9,62326	0,006232	0,527345	8,118636	4,742006	21,674084	579513,4375	2,141983	0,997828
52	20422,12109	1,084577	9,536812	0,00736	0,563332	7,887245	3,850878	19,242489	569265,25	2,117819	0,998367
53	21977,79492	1,049412	9,194657	0,008063	0,559681	7,813704	4,042298	19,247566	736591,1875	2,117574	0,998418
54	24032,8457	1,087138	8,937733	0,007558	0,54507	7,860404	3,986962	18,887259	559267,6875	2,130394	0,998052
55	18674,5918	1,101617	8,387718	0,008058	0,547598	7,735923	4,006306	18,121437	392872,125	2,126452	0,998211
56	26332,86914	1,043559	10,319378	0,005872	0,529981	8,210512	4,810779	22,700819	777058,5625	2,132905	0,9977
57	23405,04883	1,067642	9,737811	0,007361	0,553128	7,920889	4,171216	20,264975	888553	2,117521	0,998428
58	22234,26172	1,057602	8,504547	0,008535	0,562691	7,673516	3,719814	17,842077	433959,75	2,113405	0,99859
59	21650,02734	1,048363	8,925035	0,008013	0,552836	7,778861	3,938395	18,824236	529156,25	2,114339	0,99832
60	23220,9082	1,039216	10,052301	0,006855	0,545431	8,019265	4,394392	21,147968	911679,5	2,11872	0,99825
61	22827,40039	1,071565	11,092879	0,004927	0,513495	8,421347	5,437315	24,272522	939699,25	2,138308	0,997434
62	23733,26172	1,07439	9,170205	0,007468	0,554964	7,858438	3,875945	19,252075	560209,625	2,119764	0,998431
63	21894,62305	1,06558	12,546141	0,004455	0,518097	8,558654	5,437352	25,29834	1493165,25	2,132517	0,997768
64	20942,40039	1,103676	7,62405	0,010362	0,570584	7,407601	3,974953	17,285904	403903,7813	2,110542	0,998922
65	26732,0957	1,012037	9,037828	0,00766	0,55564	7,826279	3,637309	18,652851	563370,8125	2,119143	0,998738
66	21828,88477	1,057524	8,431812	0,008517	0,559461	7,676936	3,694664	17,89609	481000,9688	2,112559	0,998627
67	19798,89648	1,050658	8,237499	0,008621	0,564053	7,622846	3,291253	16,369995	329406,1875	2,115095	0,998683
68	23185,6875	1,016657	7,732694	0,009864	0,572423	7,457479	3,145612	15,876743	521951,4688	2,109491	0,998877
69	20951,57813	1,090333	9,251486	0,00734	0,550732	7,882077	4,095302	19,375328	543085,125	2,1208	0,998498

cont. Tabela 4: Características morfométricas dos pacientes com LMA.

n° Caso	Area	FF8	SDGrayLev	MEAngSecMon	MELocHomog	MEEntropy	MEContrast	MEDiagMom	MECluProem	FDMink	R245Mink
70	29019,16992	0,960546	9,706695	0,006157	0,540278	8,071667	3,885338	19,52603	528827,5625	2,124302	0,998135
71	21915,01953	0,951911	9,737882	0,006371	0,539152	8,063844	4,055999	19,732885	627226,375	2,129973	0,99802
72	26246,36914	0,979662	11,708846	0,004789	0,513416	8,484171	5,382745	24,671724	1177955,75	2,140374	0,997449
73	25823,27539	1,012611	11,213501	0,004862	0,521365	8,405489	4,831409	23,064758	772041,5625	2,139894	0,998073
74	19429,40625	1,030491	8,612788	0,007893	0,545691	7,799121	4,346508	19,126896	395111,4063	2,119747	0,998164
75	25531,11133	0,89934	8,280286	0,008284	0,551296	7,718708	3,456524	17,046862	358651,6875	2,127288	0,998242
76	23087,68164	0,990736	11,031149	0,004886	0,51591	8,41266	4,831198	22,764572	858486,0625	2,142984	0,997678
77	27612,79492	0,960699	8,294834	0,00843	0,564697	7,657676	3,084416	15,997869	411661,875	2,111562	0,998679
78	30096,44727	0,92436	10,411597	0,006328	0,562378	8,034706	3,166028	18,026005	715760,4375	2,112509	0,998804
79	24709,45898	0,86569	7,733908	0,007463	0,555964	7,706917	3,132836	15,410921	175064,8438	2,119476	0,997776
80	24064,61914	0,942777	6,668486	0,011335	0,586224	7,228807	2,540451	13,080503	140002,2344	2,103863	0,999075
81	27876,82031	0,908937	8,66828	0,007536	0,551206	7,815291	3,425044	17,288286	436530,125	2,12276	0,998553
82	24479,64453	0,930853	9,178318	0,006641	0,539896	7,992898	3,952585	19,011951	425866,2813	2,130531	0,998169
83	27141,82422	0,88886	7,694783	0,008738	0,570648	7,556196	2,881739	14,976779	251912,3281	2,10706	0,998689
84	27831,01367	0,807606	8,50733	0,007196	0,549474	7,827453	3,385984	17,015732	310310,6563	2,122847	0,998397
85											
86	28474,38281	0,822692	10,705235	0,004832	0,508318	8,415353	4,844463	22,536255	756550,3125	2,146845	0,997318
87	24584,23438	0,995745	8,216625	0,008801	0,567556	7,624613	3,18978	16,464525	377921,25	2,111907	0,998725
88	28784,06445	0,941208	9,227715	0,006593	0,546918	7,979349	3,547094	18,023693	417120,1875	2,125021	0,99786
89	27097,32227	0,94269	9,385841	0,007171	0,575789	7,818231	2,854288	16,194992	426597,9688	2,10839	0,998892
90	27624,69141	0,954012	10,213416	0,006418	0,54394	8,089395	3,852361	20,139547	734169,75	2,132135	0,99851
91	28618,26367	1,015449	8,500854	0,008745	0,570405	7,638352	3,26219	17,105177	767625,5	2,111547	0,998739
92	25765,26563	0,980924	8,562107	0,007562	0,554275	7,784072	3,455917	17,407082	478181,9375	2,117949	0,998129

cont. Tabela 4: Características morfométricas dos pacientes com LMA.

n° Caso	Area	FF8	SDGrayLev	MEAngSecMon	MELocHomog	MEEntropy	MEContrast	MEDiagMom	MECluProem	FDMink	R245Mink
93	29596,61914	1,037226	9,546758	0,006796	0,54235	7,998066	4,155578	20,404726	648762,5	2,129442	0,998277
94	22317,69922	0,910247	9,27886	0,007538	0,570065	7,807398	2,974326	16,321346	497814,125	2,107229	0,998537
95	23856,26758	0,941258	7,514243	0,009007	0,570241	7,521671	2,906703	14,76861	208984,625	2,107789	0,998508
96	22381,57227	1,041441	10,907362	0,005442	0,525729	8,293576	4,899601	22,741096	894704,5	2,131191	0,997661
97	27312,85156	1,038192	12,947853	0,004093	0,505732	8,702888	5,853796	27,090069	1533544,625	2,144849	0,997284
98	23270,23242	1,06498	8,746715	0,009733	0,590385	7,493781	2,909927	15,416616	549803,25	2,09634	0,999352
99	26052,37305	0,93571	9,724123	0,005996	0,545357	8,064282	3,591777	18,481989	495935,25	2,122481	0,997583
100	26919,08203	0,878295	10,393575	0,005527	0,534999	8,213691	4,029858	20,306255	624278,9375	2,138463	0,998044
101	26519,73633	0,862339	9,725393	0,006237	0,534693	8,093378	4,104853	20,219875	617377,5625	2,134414	0,998282
102	23485,19922	1,070272	8,258501	0,009284	0,563752	7,591841	3,546913	17,357302	405410,8125	2,10722	0,998626
103	20807,28125	1,054671	7,701097	0,009905	0,56662	7,484365	3,3201	15,954331	267941,9063	2,112347	0,998893
104	20728,93945	1,066318	8,481586	0,008632	0,556932	7,682989	3,725103	17,787083	421249,2813	2,120213	0,998587
105	25944,02734	1,022447	6,219214	0,014332	0,607798	6,899849	2,289837	12,050587	197167,1875	2,087958	0,999407
106	23825,27344	1,113142	8,119428	0,00962	0,583041	7,509845	2,864399	15,509717	381171,125	2,108254	0,999039