



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós Graduação**

**Instituto Nacional de Câncer
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia**

**Perfil clínico e genômico de adultos com Leucemia Mieloide Aguda
submetidos à Transplante alogênico de Células tronco Hematopoiéticas**

JORDANA SANTOS RAMIRES ARAGÃO

Orientadora: Dra. Ilana Zalcborg Renault
Coorientadora: Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

Rio de Janeiro

2021



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós Graduação

Instituto Nacional de Câncer
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

**Perfil clínico e genômico de adultos com Leucemia Mieloide Aguda
submetidos à Transplante alogênico de Células tronco Hematopoiéticas**

JORDANA SANTOS RAMIRES ARAGÃO

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu*
em Oncologia do Instituto
Nacional do Câncer como parte
dos requisitos necessários para
a obtenção do título de Mestre
em Oncologia

Orientadoras: Dra. Ilana Zalcborg Renault
Coorientadora: Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

Rio de Janeiro

2021

A659p Aragão, Jordana Santos Ramires
Perfil clínico e genômico de adultos com Leucemia Mieloide Aguda submetidos à Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoiéticas. / Jordana Santos Ramires Aragão. – Rio de Janeiro, 2021. 99 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2021.

Orientador: Dra. Ilana Zalberg Renault
Coorientador: Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

I. Leucemia Mieloide Aguda. 2. Células-Tronco Hematopoiéticas. 3. Transplante Alogênico. 4. Genes.
I. Renault, Ilana Zalberg (Orient.). II. (CoOrient.). Monte-Mór, Bárbara da Costa Reis
III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99419



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós Graduação

Instituto Nacional de Câncer
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

**Perfil clínico e genômico de adultos com Leucemia Mieloide Aguda
submetidos à Transplante alogênico de Células tronco Hematopoiéticas**

JORDANA SANTOS RAMIRES ARAGÃO

Orientadora: Dra. Ilana Zalcborg Renault

Coorientadora: Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

Rio de Janeiro, 25 de Fevereiro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Membro: Maria do Socorro Pombo de Oliveira
Instituto Nacional do Câncer - RJ

Membro: Dra. Renata Binato Gomes
Instituto Nacional do Câncer - RJ

Membro: Dr. Rodrigo Doyle Portugal
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro - RJ

Suplente interno: Dr. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay
Instituto Nacional do Câncer - RJ

Suplente externo: Dr. Israel Bendit
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – SP

Dedicatória
Para Fábio, meu primeiro amor.
Para Esther, meu maior amor.
Para Deus, nosso abrigo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ilana Zalberg, minha orientadora, por expandir meus conceitos, pela ciência e pela arte que me ensinou.

À Dra. Bárbara Monte-Mor, minha coorientadora, pela precisão e atenção aos detalhes.

À Dra. Kadma Carriço, que possibilitou o primeiro passo desse projeto.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular do CEMO/INCA, em especial à Luciana Gutiyama e Telminha, por todo auxílio, acolhimento e ensinamentos que me proporcionaram.

À Dra. Maria Fernanda Milanezi, pela disponibilização dos testes e infraestrutura do laboratório GeneOne e à Dra. Mariana Gama, pela parceria na realização dos sequenciamentos.

Ao Dr. Leonardo Javier, pela inestimável cooperação estatística e à Dra. Andreza Feitosa, pela contribuição na parte final deste trabalho. À Rafaela Naressi, por todo suporte com as formatações.

Aos colegas hematologistas do serviço de hematologia e do CEMO/INCA, e principalmente aos pacientes, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Às amigas e parceiras Luciana e Patrícia, pelo incentivo.

Aos meus pais Joel e Dora, minha irmã Daiana e minha família, pelo apoio.

Ao meu amado marido Fábio, pelo suporte incansável, pelo amor e dedicação sem os quais nada seria possível. À minha pequena Esther por me preencher de alegria.

Ao meu DEUS, por tudo.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós Graduação

Instituto Nacional de Câncer
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

RESUMO

Mais do que uma doença clonal constituída de células precursoras hematopoiéticas imaturas e proliferativas, a Leucemia mieloide aguda (LMA) é um câncer que tem origem em aberrações genéticas recorrentes. O *background* genômico é sabidamente o principal determinante da complexidade e heterogeneidade características dessa doença. Fatores prognósticos tradicionais parecem insuficientes para predição precisa do risco de recidiva e morte após o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (alo-TCTH). Estudos mostram impacto prognóstico da persistência de mutações em determinados genes, mensurada por painéis NGS antes do transplante. No presente estudo, analisamos os resultados do acompanhamento em longo prazo de pacientes com LMA submetidos à alo-TCTH no CEMO/INCA, entre 2010 e 2017 e determinamos os fatores de risco clínicos e moleculares associados com o desfecho pós-transplante. Em uma coorte total de 63 adultos foi realizada a caracterização genômica de 39 pacientes com amostras de DNA armazenadas antes do início do condicionamento do alo-TCTH, utilizando um painel NGS de 30 genes envolvidos em neoplasia mielóides. Com mediana de seguimento de 6 anos, a sobrevida global em 5 anos foi de 41,4% (IC 95 30,6-56,1%) e a incidência acumulada de recidiva de 27% (IC 95 18-40,5%). A mediana de idade foi 46 anos (18-65). A principal causa de óbito foi a recidiva da LMA (47%). Foram encontradas 49 mutações patogênicas, em 25 pacientes (64%). Mutações em *DNMT3A* foram as mais frequentes, seguidas por *RUNX1*, *TET2* e *WT1*. A maioria das mutações encontradas foram do tipo missense (70%). A variável clínica de maior impacto negativo na sobrevida global e na incidência cumulativa de recidiva foi o status da doença, aliado à presença de doença residual mensurável por citometria de fluxo, ao transplante. Na análise multivariada a detecção de 1 ou mais mutações impactou negativamente a probabilidade de recidiva e as mutações de maior impacto foram em *TP53*, *FLT3-ITD* e *NRAS/KRAS* (HR 2,88 p 0,002). Mutações em *DNMT3A*, *TET2* ou *ASXL1* não se associaram à recidiva. A avaliação molecular com painel NGS atualmente acessível pode contribuir para avaliação prognóstica de pacientes com LMA que serão submetidos a tratamento com transplante alogênico.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós Graduação

Instituto Nacional de Câncer
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

ABSTRACT

More than a clonal disease consisting of immature and proliferative hematopoietic precursor cells, acute myeloid leukemia (AML) is a cancer that originates from recurrent genetic aberrations. The genetic background is known to be the main explanation for the complexity and heterogeneity of this disease. Traditional prognostic factors seem insufficient to accurately predict the risk of recurrence and death after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT). Studies show a prognostic impact of the persistence of mutations in certain genes, as measured by NGS panels before transplantation. In this study we analyzed the results of long-term follow-up of AML patients undergoing allo-SCT at CEMO / INCA, between 2010 and 2017 and determined clinical and molecular risk factors that predispose disease relapse post-allo-SCT. In a total cohort of 63 adults, the genomic profile of 39 patients was carried out with DNA samples stored before the start of allo-SCT conditioning, using an NGS panel of 30 genes. With a median follow-up of 6 years, the 5-year overall survival rate was 41.4% (95% CI 30.6-56.1%) and the cumulative incidence of relapse was 27% (95% CI 18-40, 5%). The median age was 46 years (18-65). The main cause of death was AML relapse (47%). Forty-nine pathogenic mutations were found in 25 patients (64%). Mutations in *DNMT3A* were the most frequent, followed by *RUNX1*, *TET2* and *WT1*. Most of the mutations found were missense type (70%). The clinical variable with the greatest negative impact on overall survival and on the cumulative incidence of relapse was the pre-transplant disease status, combined with detection of measurable residual disease by flow cytometry. In the multivariate analysis, the detection of 1 or more mutations negatively impacted the probability of relapse and the most impactful mutations were in TP53, FLT3-ITD and NRAS / KRAS (HR 2.88 p 0.002). Mutations in DNMT3A, TET2 or ASXL1 were not associated with relapse. Molecular evaluation with a currently accessible NGS panel can contribute to the prognostic evaluation of patients with AML who will undergo an allo-SCT.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Leucemia Mieloide Aguda.....	1
1.1.1. Diagnóstico e Classificação.....	2
1.1.2. Fatores Prognósticos.....	4
1.1.2.1. Estratificação de Risco: Citogenética.....	5
1.1.3. Panorama Genômico da LMA.....	8
1.1.3.1. Genes frequentemente mutados e padrões de comutação...8	
1.1.3.2. Classificação Genômica da LMA.....	10
1.1.3.3. Hierarquia Genética (Evolução Clonal).....	12
1.1.4. Tratamento.....	15
1.1.4.1. Transplante Alo. de Células Tronco Hematopoiéticas.....	16
1.1.5. Avaliação de Resposta ao Tratamento.....	18
1.1.5.1. Papel da Doença Residual Mensurável.....	18
1.1.5.2. Detecção de mutações persistentes por NGS.....	20
1.1.5.2.1. Doença Residual Mínima Genética.....	23
1.1.5.2.2. Hematopoiese Clonal.....	25
2. Justificativa e Objetivos	26
2.1. Justificativa.....	26
2.2. Objetivo Geral.....	26
2.3. Objetivos Específicos.....	27
3. Material e Métodos	27
3.1. Delineamento do estudo.....	27
3.2. População de estudo.....	27
3.2.1. Critérios de Elegibilidade.....	27
3.2.2. Critérios de Exclusão.....	28
3.3. Seleção da Coorte de estudo.....	28
3.4. Parâmetros clínicos e laboratoriais.....	29
3.5. Amostras.....	32
3.6. Sequenciamento dos genes de interesse com painel NGS.....	32
3.7. Desfechos de interesse.....	36
3.8. Análise Estatística.....	36
3.9. Aspectos éticos.....	37

4. Resultados	37
4.1. Casuística.....	37
4.2. Achados clínicos e laboratoriais.....	38
4.3. Caracterização Genômica por Painel NGS com 30 Genes.....	43
4.4. Correlação Clínico-Molecular com Desfechos.....	53
4.4.1. Sobrevida Global.....	54
4.4.2. Mortalidade não relacionada à recidiva.....	58
4.4.3. Recidiva.....	59
4.5. Estudo de casos com análises longitudinais.....	63
4.5.1. Caso 11.....	63
4.5.2. Caso 35.....	65
4.5.3. Caso 40.....	67
5. Discussão	69
6. Conclusão	79
7. Referências	81
8. Anexos	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Classificação da OMS - LMA e neoplasias precursoras relacionadas

Tabela 1.2. ELN 2017. Estratificação de Risco citogenético/genético

Tabela 1.3. Categorias funcionais de genes comumente mutados na LMA (TCGA)

Tabela 1.4. Anormalidades genéticas relacionadas a LMA *versus* relacionadas a hematopoiese clonal

Tabela 1.5. Significado da persistência de anormalidades genéticas pós terapia comuns na LMA.

Tabela 3.1. Definição de critérios de resposta conforme a ELN 2017

Tabela 3.2. Composição do painel NGS (genes e éxons incluídos)

Tabela 3.3. Terminologia proposta para mutações persistentes em LMA pós terapia

Tabela 4.1. Características clínicas, laboratoriais e demográficas dos pacientes

Tabela 4.2. Características relacionadas ao transplante alogênico

Tabela 4.3. Listagem de todas as variantes com informações da localização no DNA codificante, consequência na modificação da proteína, e número de identificação nas bases de dados COSMIC e dbSNP, quando existente

Tabela 4.4. Critérios utilizados para discriminação de variantes novas, catalogadas segundo a alteração no DNA codificante, a consequência proteica prevista e as informações das plataformas de predição de alteração deletéria

Tabela 4.5. Resultados da análise univariada para as características clínicas e a sobrevida global

Tabela 4.6. Análise multivariada para sobrevida global com dados do perfil clínico

Tabela 4.7. Análise univariada da mortalidade não relacionada à recidiva

Tabela 4.8. Análise multivariada para Morte não relacionada à recidiva

Tabela 4.9. Univariada das características do perfil clínico com impacto em recidiva

Tabela 4.10. Análise multivariada para recidiva com características clínicas

Tabela 4.11. Análise univariada do risco de recidiva, por gene mutado, na coorte com NGS (n=39)

Tabela 4.12. Análise multivariada com fatores clínicos e a presença de mais de 1 mutação detectável por paciente

Tabela 4.13. Análise multivariada com modelo dos genes de maior impacto nesta coorte

Tabela 4.14,. Análise multivariada com o modelo dos genes DTA (DNMT3A, TET2 e ASXL1) nas amostras com estado de doença RC no momento da coleta

Tabela 4.15. Dados das amostras sequenciadas por NGS, do Caso 11

Tabela 4.16. Dados das amostras sequenciadas por NGS, do Caso 35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Classes genômicas da LMA de acordo com Papaemmanuil e Gerstung et al.

Figura 1.2. Arquitetura clonal, padrões de recidiva e existência de células-tronco pré-leucêmicas

Figura 1.3. Níveis de detecção de várias metodologias de DRM comparadas à remissão completa clínica tradicional

Figura 3.1. Diagrama de pacientes e amostras

Figura 4.1. Desenho representativo da coorte total, coorte genômica e casos longitudinais.

Figura 4.2. Distribuição das amostras por status da doença no momento da coleta

Figura 4.3. Distribuição das variantes encontradas, por gene e por tipo de mutação

Figura 4.4. Fração Alélica das mutações detectadas

Figura 4.5. Padrão de comutação por paciente

Figura 4.6. Distribuição comparativa das mutações por gene, com número de mutações entre as amostras de pacientes com doença em remissão (azul) e com doença ativa (rosa)

Figura 4.7. Número de mutações versus status da doença

Figura 4.8. Curvas de Kaplan-Meier

Figura 4.9. Distribuição percentual das causas de óbito total

Figura 4.10. Causas de óbito por período

Figura 4.11. Sobrevida livre de recidiva entre os diferentes grupos de estado de doença ao transplante

Figura 4.12. Box plot com a representação da mediana e variação do tempo nos diferentes subgrupos de estado de doença ao transplante

Figura 4.13. Caso 11

Figura 4.14. Caso 35

Figura 4.15. Caso 40

LISTA DE ABREVIATURAS

alo-TCTH: transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas

CFM: citometria de fluxo multiparamétrica

CHIP: hematopoiese clonal de significado indeterminado

CTH: células tronco hematopoiéticas

ddPCR: droplet digital PCR

DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro

DRM: doença residual mínima ou mensurável

DTA: *DNMT3A*, *TET2* e *ASXL*

Dx: diagnóstico

ELN: European Leukemia Net

FAB: The French American British Association

FC: citometria de fluxo

FISH: hibridização fluorescente in situ

GnomAD: The Genome Aggregation Database

HC: hematopoiese clonal

HGVS: Human Genome Variation Society

ITD: internal tandem duplication

LMA: leucemia mielóide aguda

MAC: condicionamento mieloablativo

MO: medula óssea

NGS: Next-Generation Sequencing

OMS: Organização Mundial da Saúde

Pc: paciente

PCR: reação em cadeia da polimerase

PD: progressão da doença

PS: performance status

RC: remissão completa

REC: recidiva

REC1: primeira recidiva

REC2+: segunda recidiva ou posterior

SCU: sangue de cordão umbilical

SG: sarcoma granulocítico

SMD: mielodisplasia

SNV: variações de nucleotídeo único

SOE: sem outra especificação

SP: sangue periférico

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TKD: domínio da tirosina quinase

TRM: mortalidade relacionada ao tratamento ou não relacionada à recidiva

VAF: fração alélica da variante

VOD: doença venooclusiva hepática

WES: sequenciamento de exoma completo

WGS: sequenciamento de genoma completo

1. Introdução

1.1. Leucemia Mieloide Aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença clonal da linhagem hematopoiética mieloide, caracterizada pela infiltração da medula óssea, do sangue periférico e/ou de outros órgãos e tecidos por células imaturas, proliferativas, geneticamente alteradas, chamadas blastos mieloides. (DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015; ARBER et al., 2016; SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, THIELE J, [s.d.]) O resultado é a interrupção da hematopoiese normal, sendo a apresentação clínica dominada por sinais e sintomas de falência medular. É uma doença agressiva, associada à alta mortalidade, decorrente não só da toxicidade relacionada ao tratamento, mas principalmente da resistência ao mesmo. (DÖHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015; DÖHNER et al., 2017; ESTEY, 2018, p. 2021, 2020; SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, THIELE J, [s.d.]

Na última década, estudos genômicos com uso de técnicas modernas de sequenciamento em larga escala promoveram um grande avanço no conhecimento biológico da LMA e permitiram desvendar que a grande variabilidade clínica e de resposta terapêutica está intimamente relacionada à grande heterogeneidade e complexidade do *background* genético. (GRIMWADE; HILLS, 2009; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al., 2013; GRIMWADE; IVEY; HUNTLY, 2016; PAPAEMMANUIL et al., 2016, BULLINGER; DÖHNER; DÖHNER, 2017;) Alterações citogenéticas e genéticas recorrentes detectadas ao diagnóstico, têm sido utilizadas para a estratificação de risco pré-tratamento, permitindo identificar subgrupos de pacientes com prognóstico favorável, desfavorável e intermediário quando tratados com quimioterapia convencional.(DÖHNER et al., 2017)

O transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (alo-TCTH), apesar do elevado risco de toxicidade relacionado ao procedimento, oferece a melhor oportunidade de remissão duradoura para pacientes com LMA de alto risco. No entanto, a principal causa de falha terapêutica ainda é a recorrência da doença.(CORNELISSEN et al., 2012)

Fatores prognósticos tradicionais como idade, comorbidades, status de remissão morfológica e estratificação de risco da doença pré-tratamento parecem insuficientes para prever precisamente o risco de recidiva e morte após o alo-TCTH. Métodos laboratoriais de mensuração de doença residual sub

microscópica, sobretudo através de técnicas moleculares e de citometria de fluxo multiparamétrica, vêm sendo cada vez mais estudados como marcador prognóstico avaliável após a terapia inicial mas antes do alo-TCTH. O principal objetivo é identificar com mais acurácia pacientes mais propensos a recidivar após o alo-TCTH, e dessa forma propiciar a oportunidade de selecionar melhor aqueles que se beneficiam do procedimento, e de guiar intervenções terapêuticas baseadas nesse risco, como seleção do condicionamento e estratégias de manejo pós transplante. (BUCKLEY; APPELBAUM; WALTER, 2013; THOL et al., 2018; HAMILTON et al., 2019; HOURIGAN et al., 2019;)

Nesse sentido, a análise, por NGS, do perfil de mutações persistentes nos pacientes com LMA antes do alo-TCTH pode ser muito informativa, auxiliando no planejamento terapêutico. Contudo, os custos, a falta de padronização de técnicas e da interpretação dos achados ainda são obstáculos grandes para ampla utilização clínica desta ferramenta.

1.1.1. Diagnóstico e Classificação

Ao longo dos anos, a classificação da LMA progrediu de um esquema baseado essencialmente em aspectos morfológicos, como a antiga classificação FAB criada na década de 70, para um esquema mais informativo, que incorpora não apenas os aspectos morfológicos, mas também aspectos imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares, como a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Publicada inicialmente em 2001, a classificação da OMS na sua última atualização, de 2016, categoriza a LMA em diferentes entidades clínico-patológicas, conforme a tabela 1.1. (ARBER et al., 2016) A OMS define como critério diagnóstico para LMA a presença de pelo menos 20% de blastos mielóides na medula óssea ou no sangue periférico. A exceção a esse critério se faz nos casos com translocações citogenéticas recorrentes de prognóstico favorável. Na presença das translocações citogenéticas $t(15;17)$, $t(8;21)$, $inv(16)$, ou $t(16;16)$ o diagnóstico de LMA pode ser estabelecido independentemente do percentual de blastos. (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, THIELE J, [s.d.]) O sarcoma granulocítico (SG) ou cloroma é o nome dado ao acúmulo de blastos mielóides em tecidos fora da medula óssea. O SG pode preceder em até 1 ano, ocorrer concomitantemente ou surgir após o diagnóstico estabelecido de LMA. O manejo destes casos deve ser o mesmo da LMA.(DÖHNER et al., 2017)

Tabela 1.1. Classificação da OMS - LMA e neoplasias precursoras relacionadas

Leucemia mieloide aguda e neoplasias relacionadas
Neoplasia mielóide com mutação germinativa
LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA com t(8;21) (q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LPA com <i>PML-RARA</i>
LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL73-KMT2A</i>
LMA com t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
Entidade provisória: LMA com <i>BCR-ABL1</i>
LMA com <i>NPM1</i> mutado
LMA com mutação bialélica do <i>CEBPA</i>
Entidade provisória: LMA com <i>RUNX1</i> mutado
LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia*
Neoplasia mielóide relacionada ao tratamento
LMA sem outra especificação (SOE)
LMA com mínima diferenciação
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia Mielomonocítica Aguda
Leucemia Monoblástica/Monocítica Aguda
Leucemia eritróide pura
Leucemia Megacarioblástica Aguda
Leucemia Basofílica Aguda
Panmielose Aguda com mielofibrose
Sarcoma Mieloide (tumor mieloide extramedular; sarcoma granulocítico)
Proliferação Mieloide relacionada a Síndrome de Down
Mielopoiese anormal Transitória
Leucemia Mieloide associada à Síndrome de Down

*alterações cromossômicas não balanceadas como del(17) ou del(17q), del(5) ou del(5q), inv(17q) ou t(17p), del(13) ou del(13q), del(11q), del(12p) ou t(12p), del(9q), indic(X)(q13) e balanceadas como t(11;16)(q23;p13.3), t(3;21)(q26.2;q22.1),

t(1;3)(p36.3;q21.1), t(2;11)(p21;q23), t(5;12)(q33;p12), t(5;7)(q33;p13),
t(5;10)(q33;q21), t(3;5)(q25;q34);

FONTE: (ARBER et al., 2016)

Adicionalmente, nesta atualização, uma categoria nova de neoplasias mieloides com mutação germinativa foi reconhecida.(DÖHNER et al., 2017) Nela estão contemplados casos de mielodisplasia (SMD) e LMA em que mutações germinativas ocorrem em ausência de disfunção plaquetária ou orgânica prévia (*CEBPA* e *DDX41*); com disfunção plaquetária preexistente (*RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6*) ou com disfunção de outro órgão (*GATA2*, Síndrome de Noonan, Síndrome de Down, falência medular da anemia de Fanconi, disfunção de telômeros como a disceratose congênita).

1.1.2. Fatores prognósticos

Existem diversos fatores prognósticos conhecidos na LMA, capazes de influenciar o risco de resistência terapêutica ou toxicidade relacionada ao tratamento. Esses fatores podem estar presentes já ao diagnóstico e contribuir para a estratificação de risco pré tratamento, ou podem ser reconhecidos após o início do tratamento. Quanto aos fatores de risco pré-tratamento, podemos subdividi-los em fatores associados ao paciente e fatores associados à doença.

Os principais fatores prognósticos associados ao paciente são a idade, o performance status (PS) e a presença de comorbidades. A idade se correlaciona diretamente com desfechos desfavoráveis pois pode ser associada tanto a fatores de baixa tolerância ao tratamento intensivo com intuito curativo, quanto à presença de alterações genéticas e citogenéticas que conferem alto risco biológico à doença.(JULIUSSON et al., 2009) A idade avançada, porém, é um fator de prognóstico independente para desfechos ruins. Escalas de pontuação baseadas em nesses fatores clínicos já foram validadas para uso em pacientes com LMA, tanto na quimioterapia de indução inicial quanto no pré-transplante e mostram correlação direta com a sobrevida pós tratamento.(SORROR et al., 2017)

Outros fatores que podem influenciar o desfecho pós-tratamento em LMA são a falta de rede de apoio familiar para o tratamento, que influencia negativamente e o tratamento em instituições de referência com grande volume de atendimento a pacientes com leucemia aguda, que influencia positivamente.(HO et al., 2018; ØSTGÅRD et al., 2018)

Os fatores prognósticos clínicos associados à doença são: história prévia de doença hematológica (ex. mielodisplasia, doença mieloproliferativa), exposição prévia à quimioterapia ou radioterapia, hiperleucocitose ao diagnóstico (> 40.000/mm³). Todos os anteriores são implicados na maior resistência ao tratamento, por se correlacionarem também com marcadores genéticos de prognóstico desfavorável. (DÖHNER et al., 2017; HEUSER et al., 2020)^{4,23}

Em última análise, muitos dos fatores clínicos identificados como marcadores de mau prognóstico na LMA são expressões fenotípicas das alterações genéticas que dão origem à doença. E deste modo, os principais fatores que determinam o prognóstico e são a base para a estratificação de risco para a escolha do tratamento na LMA são as alterações citogenéticas e genéticas.

Quanto aos fatores utilizados para avaliação prognóstica após tratamento e que se correlacionam com maior risco de recidiva, estão aqueles que medem a sensibilidade da doença ao tratamento. A falha em atingir remissão após quimioterapia de indução de remissão, ou seja, doença primariamente refratária, se correlaciona com prognóstico reservado. O principal fator preditor de recidiva após o início do tratamento é a detecção de doença residual (DRM). Anteriormente chamada de Doença Residual Mínima, e atualmente chamada de Doença Residual Mensurável,(SCHUURHUIS et al., 2018) a DRM já foi estudada por diferentes metodologias, em diferentes *time points*, após diferentes estratégias terapêuticas e invariavelmente se correlaciona independentemente com aumento do risco de recidiva, menor sobrevida livre de recidiva e menor sobrevida global, como será aprofundado mais adiante.(BUCCISANO et al., 2012; BUCKLEY; APPELBAUM; WALTER, 2013; HOURIGAN; KARP, 2013; KAYSER et al., 2015; JONGEN-LAVRENCIC et al., 2018a; SCHUURHUIS et al., 2018; WALTER, 2018)

1.1.2.1. Estratificação de Risco: Citogenética

O papel das alterações citogenéticas na LMA já é bem estabelecido e há mais de duas décadas vem sendo utilizado para classificação, estratificação de risco prognóstico, e tomada de decisão terapêutica.(MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004; GRIMWADE, 2007; GRIMWADE; HILLS, 2009;)

A estratificação de risco baseada na citogenética convencional divide os pacientes naqueles com prognóstico favorável, intermediário ou adverso.(MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004; GRIMWADE, 2007; GRIMWADE; HILLS, 2009) Pacientes com perfil citogenético associado a risco favorável apresentam desfechos

relativamente bons com regimes de consolidação contendo apenas quimioterapia convencional. No entanto, aqueles com perfil de risco citogenético desfavorável requerem um alo-TCTH em primeira remissão completa para aumentar a chance de cura. (SLOVAK et al., 2000; BYRD et al., 2002; DÖHNER et al., 2010)

Na estratificação de risco com base nas alterações citogenéticas o valor prognóstico de alterações citogenéticas mais raras ainda não foi definido, devido ao pequeno número de pacientes e a não homogeneização do tratamento entre os estudos. O cariótipo complexo é definido pela presença de 3 ou mais alterações cromossômicas na ausência de t(8;21), inv(16) ou t(16;16) e t(15;17). Na LMA com cariótipo complexo a perda da região cromossômica 17p e/ou a presença da mutação no gene *TP53* são frequentes ocorrendo em aproximadamente dois terços dos casos. Recentemente, uma nova categoria genética associada a risco desfavorável foi proposta, o cariótipo monossômico. (BREEMS et al., 2008)

Embora o cariótipo da célula leucêmica seja ainda considerado o fator prognóstico mais relevante para a resposta à terapia de indução e para a sobrevida, quase 50% dos casos de LMA não apresentam alterações cromossômicas estruturais detectáveis ao diagnóstico. Assim, a LMA de cariótipo normal corresponde a maior parte do subgrupo de risco citogenético intermediário, sendo este o grupo de risco prognóstico de espectro mais variável.

As primeiras alterações moleculares reconhecidas com impacto prognóstico relevante foram descritas no grupo de pacientes com LMA de cariótipo normal, as mutações nos genes *NPM1*, *CEBPA* e *FLT3*. Estas foram introduzidas pela primeira vez no algoritmo prognóstico da European Leukemia Net (ELN), na sua primeira versão, em 2010.²⁰ As mutações no gene *FLT3*, que codifica um receptor de tirosina quinase envolvido na hematopoiese e as mutações do gene *NPM1* são as alterações moleculares mais frequentes em pacientes com LMA. (PAPAEMMANUIL et al., 2016)

Dois tipos de mutação que resultam em ganho de função gênica podem ocorrer no gene *FLT3*. A mutação do tipo duplicação interna em tandem (ITD - *internal tandem duplication*) nos éxons 13 e 14 e a mutação no domínio da tirosina quinase (TKD - *tyrosine kinase domain*) no éxon 20. A mutação *FLT3-ITD* acontece em 30% dos casos de LMA e é mais comum do que a mutação em *FLT3-TKD*, que ocorre em cerca de 10% dos pacientes. (PATEL et al., 2012; PAPAEMMANUIL et al., 2016)

Tabela 1.2. ELN 2017. Estratificação de Risco citogenético/genético

CATEGORIA DE RISCO	ALTERAÇÃO GENÉTICA
Favorável	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	<i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD_{low}</i>
	<i>CEBPA</i> mutação Bialélica
Intermediário	<i>NPM1</i> mutado e <i>FLT3-ITD_{high}</i>
	<i>NPM1</i> selvagem sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD_{low}</i>
	(sem outras lesões genéticas de risco adverso)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
Adverso	Alterações citogenéticas não classificadas como favorável ou adverso
	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranjado
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> ou del(5q); 17/abn(17p)
	Cariótipo complexo, cariótipo monossômico
	<i>NPM1</i> selvagem e <i>FLT3-ITD_{high}</i>
<i>RUNX1</i> mutado	
<i>ASXL1</i> mutado	
<i>TP53</i> mutado	

ITD (duplicação in tandem) definida em função da razão da taxa alélica (alelo mutante/alelo selvagem) pode ser low <0,5 ou high >0.5

Fonte:(DÖHNER et al., 2017)

Em 2017, o painel internacional de experts da ELN publicou atualizações nas recomendações de manejo da LMA incluindo mutações gênicas na estratificação prognóstica.(PAPAEMMANUIL et al., 2016; BULLINGER; DÖHNER; DÖHNER, 2017; DÖHNER et al., 2017) Três categorias de risco foram definidas (favorável, intermediário e adverso), com estimativas de sobrevida em longo prazo bem distintas (tabela 1.2). Em pacientes jovens, aptos a receber terapia intensa com intuito curativo, essa informação auxilia principalmente na seleção do tipo de terapia

a ser oferecida após a indução de remissão, primordialmente, se o paciente deve receber um alo-TCTH ou não.

1.1.3. Panorama Genômico da LMA

1.1.3.1. Genes frequentemente mutados e padrões de comutação

A Leucemia Mieloide Aguda foi uma das primeiras patologias malignas a ser extensivamente estudada com novas tecnologias de microarray e sequenciamento em larga escala. O primeiro genoma de uma LMA, de cariótipo normal, foi publicado em 2008.³⁵ Estudos subsequentes possibilitaram a identificação de numerosas mutações somáticas recorrentes com impacto biológico, prognóstico e em alguns casos, terapêutico. Estes estudos também demonstraram que a LMA é uma doença com arquitetura clonal complexa e dinâmica, existindo múltiplas mutações somáticas iniciadoras que afetam genes de diferentes categorias funcionais, além de clones competitivos coexistindo e evolução clonal da doença ao longo do tempo.(BULLINGER; DÖHNER; DÖHNER, 2017)

O projeto The Cancer Genome Atlas (TCGA) analisou 50 genomas e 150 exomas de pacientes adultos com LMA de novo, usando técnicas de sequenciamento de genoma completo (Whole Genome Sequencing - WGS), sequenciamento de exoma completo (Whole Exome Sequencing - WES), sequenciamento de RNA e micro-RNA, além de análise do padrão de metilação do DNA. Nesse trabalho, um catálogo de mutações recorrentes na LMA com aproximadamente 260 genes mutados em duas ou mais amostras de LMA foi gerado. Desses, 23 genes foram os mais acometidos, com frequência de mutação $\geq 1\%$. Dentre os 23 genes, muitos já haviam sido previamente implicados no processo de leucemogênese. A partir desses dados, um padrão não-aleatório de co-ocorrência e exclusividade mútua das mutações foi observado. Os genes mutados foram classificados em 9 categorias distintas, de acordo com sua função biológica (tabela 1.3).(CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al., 2013) A organização dessas categorias funcionais revelou relações biológicas importantes. Por exemplo: algumas mutações frequentes em LMA (*DNMT3A*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1/2* e *RUNX1*) são mutuamente excludentes com genes de fusão (*PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11*), fortalecendo o conceito e o agrupamento de casos de acordo com os genes de fusão que são as alterações diretoras associadas ao estabelecimento do fenótipo leucêmico. Outro padrão de

mutações com exclusão mútua incluem os genes da coesina, do spliceossoma, proteínas sinalizadoras e proteínas modificadoras de histonas, sugerindo que uma mutação em uma dessas vias é geralmente suficiente para o estabelecimento do fenótipo de LMA. Das 200 amostras, 199 apresentavam pelo menos uma mutação. Outro achado relevante foi de que na maioria das amostras havia evidência de pelo menos um clone fundador e um ou mais subclones provenientes do clone fundador.

Tabela 1.3. Categorias funcionais de genes comumente mutados na LMA (TCGA)

Categoria Funcional	Genes	Papel na Leucemogênese	Incidência na Coorte TCGA (%)
Sinalização	<i>FLT3, KIT, PTPN11</i> , Família <i>RAS</i> (<i>NRAS</i> , <i>KRAS</i>)	Conferem vantagem proliferativa através de vias de sinalização: <i>RAS/RAF</i> , <i>JAK/STAT</i> e <i>PI3K/AKT</i> .	59
Metilação DNA	<i>DNMT3A, TET2, IDH1</i> , <i>IDH2</i>	Desregulação do padrão de metilação do DNA leva a desregulação de genes relevantes. Mutações em <i>IDH</i> também causam impacto na metilação via <i>TET2</i> .	44
Fatores de Transcrição (genes de fusão ou mutação)	Fusão: t(8;21), inv (16)/t(16;16) Mutação: <i>RUNX1</i> , <i>CEBPA</i>	Desregulação transcricional e parada de maturação hematopoética	18 22
Modificadores de Cromatina	<i>ASXL1, EZH2, KMT2A</i>	Desregulação da modificação da cromatina (metilação de histonas, prejuízo nas metil transferases pelas fusões de <i>KMT2A</i>) levam a desregulação transcricional	30
Nucleofosmina (<i>NPM1</i>)	<i>NPM1</i>	Mutação da <i>NPM1</i> resulta na localização citoplasmática aberrante dessa proteína	27
Supressores Tumorais	<i>TP53, WT1, PHF6</i>	Desregulação transcricional e parada de degradação através de <i>MDM2</i> e <i>PTEN</i>	16
Complexo spliceossoma	<i>SRSF2, SF3B1, U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>	Função spliceossoma prejudicada e desregulação da edição do RNA resulta em padrões de <i>splicing</i> aberrantes.	14
Complexo coesina	<i>STAG2, RAD21</i>	Segregação cromossômica prejudicada impacta na regulação da transcrição	13

FONTE: (BULLINGER; DÖHNER; DÖHNER, 2017)

1.1.3.2. Classificação genômica da LMA

O avanço no conhecimento genômico tem sido incorporado na última década na estratificação de risco pré tratamento dos pacientes com LMA.

O desafio de entender como a diversidade genética pode definir a fisiopatologia da LMA e contribuir para a prática clínica, motivou a proposta de uma classificação genômica da LMA.

Um dos trabalhos de maior relevância no estudo do panorama genômico da LMA, foi publicado por Papaemmanuil e colaboradores na *New England Journal of Medicine* em 2016. No estudo, publicado em 2016, 1540 pacientes foram ressequenciados com painel NGS para 111 genes previamente relacionados com LMA e outras neoplasias mieloides.(PAPAEMMANUIL et al., 2016) Em análise realizada combinando as informações genéticas com os dados clínicos e citogenéticos, os autores conseguiram categorizar 11 subgrupos genômicos não sobrepostos, cada um com fenótipos e desfechos clínicos distintos. Além das classes já conhecidas e contempladas na classificação da OMS de 2016, como LMA com rearranjos balanceados e LMA com *NPM1* mutado, três novas classes mais heterogêneas foram descritas (Figura 1.1).

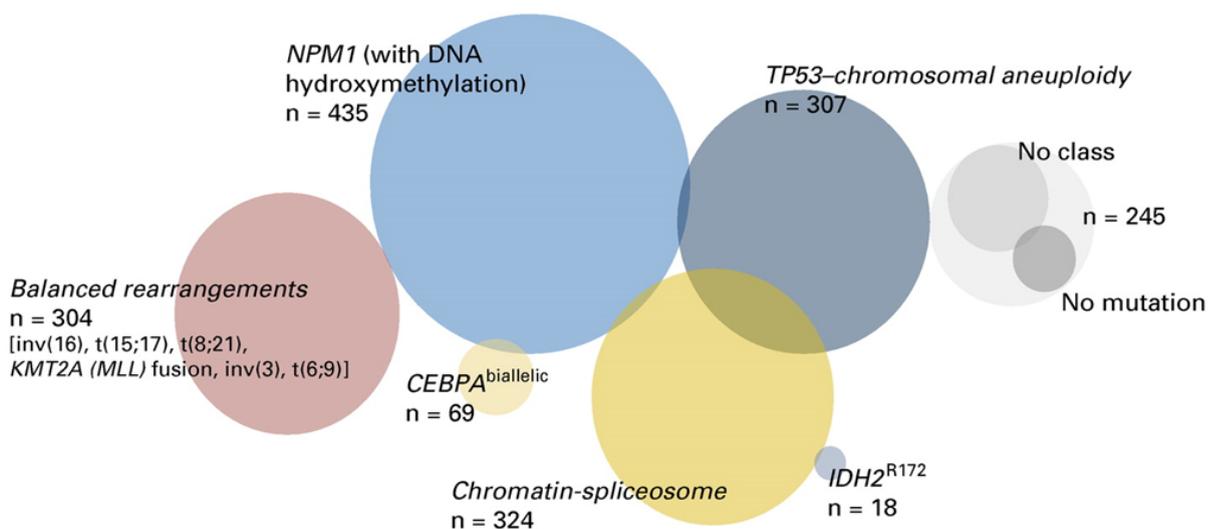


Figura 1.1. Classes genômicas da LMA de acordo com Papaemmanuil e Gerstung et al. A figura mostra como 1.332 (86%) de 1.540 pacientes com leucemia mieloide aguda foram classificados com sobreposição mínima entre as categorias (os seis grupos genômicos caracterizados por rearranjos de genes [translocações e / ou inversões] são exibidos como um grupo).

FONTE:(BULLINGER; DÖHNER; DÖHNER, 2017)

As primeiras seis classes consistiam em rearranjos cromossômicos balanceados: inv(16), t(15;17), t(8;21), inv(3), t(6;9) e fusões do MLL. Cada uma

representando um subgrupo pequeno (<5% da coorte do estudo) e individualizado.(PAPAEMMANUIL et al., 2016; BULLINGER; DÖHNER; DÖHNER, 2017)

A maior classe, representando 27% da coorte, foi a LMA com *NPM1* mutado. Nesta, 73% dos pacientes também eram portadores de mutações em outros genes envolvidos na metilação do DNA (*DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2^{R140}* e *TET2*) e 40% *FLT3-ITD*. Apesar de ser um evento relativamente tardio na leucemogênese, a mutação no gene *NPM1* emergiu como uma categoria distinta, na qual os desfechos clínicos foram estritamente comandados pelo padrão de comutações.

A segunda maior classe, constituída por 18% da coorte de estudo, foi o grupo cromatina-spliceossoma, definida por mutações em genes reguladores da edição (*splicing*) do RNA (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* e *ZRSR2*), genes modificadores da cromatina (*ASXL1*, *STAG2*, *BCOR*, *KMT2A^{PTD}*, *EZH2* e *PHF6*) ou genes de transcrição (*RUNX1*). Esse padrão genômico é similar ao de pacientes com síndrome mielodisplásica de alto risco, indicando que essa categoria genômica identifica neoplasias mieloides de alto risco que podem cruzar as barreiras convencionais do diagnóstico. Os pacientes dessa classe eram mais idosos, exibiam contagens leucocitárias menores, frequentemente apresentavam histórico de mielodisplasia ou outras neoplasias mieloides e evoluíam com desfechos desfavoráveis. Todas essas são características clínico-patológicas muito associadas com LMA secundária. Essa é umas das 3 classes adicionais àquelas contempladas pelas categorias da OMS 2016.

A segunda classe não contemplada na classificação da OMS 2016 é a de mutações em *TP53*, aneuploidias cromossômicas ou ambas, representando 13% da coorte. Essa não é uma classe definida por uma anormalidade genômica única, mas por aneuploidias específicas como -5/5q-, -7/7q-, -17/17p-, -12/12p-, que frequentemente co-ocorrem entre si e com mutações em *TP53*. Os pacientes deste subgrupo eram significativamente mais idosos, frequentemente tinham LMA secundária e desfechos desfavoráveis.

A terceira classe genômica proposta e não contemplada pela OMS 2016 foi a LMA com *IDH2^{R172}*, uma classe muito pequena (1% da coorte), porém com exclusão mútua em relação a mutações de *NPM1* e outras mutações definidoras de classes.

A classe LMA com mutação em *CEBPA* bialélica foi definida como pacientes com mutações afetando a região amino-terminal de um alelo e a região carboxila-terminal do outro alelo, geralmente sem outras co-mutações de pior

prognóstico associadas, como por exemplo *FLT3-ITD*. (PAPAEMMANUIL et al., 2016)

Nesta coorte, 11% dos pacientes apresentavam mutações genéticas não definidoras de classes (geralmente *FLT3-ITD* e *DNMT3A*) e 4% não apresentavam nenhuma mutação iniciadora. Foram consideradas mutações iniciadoras todas aquelas mutações sabidamente patogênicas ou provavelmente patogênicas relacionadas à LMA. Das 1540 amostras testadas, 96% apresentavam pelo menos 1 mutação iniciadora e 86% apresentavam 2 ou mais mutações. Devido a amostragem numerosa, muitas interações entre genes puderam ser estudadas e muitos dados importantes desse trabalho corroboraram os conceitos de: vias funcionais comumente desreguladas, padrões de co-ocorrência e exclusão mútua de algumas mutações, presença de clones e subclones e padrões comuns de evolução clonal, onde o desenvolvimento da LMA segue a aquisição temporal de mutações específicas e ordenadas hierarquicamente.

O tamanho do estudo e o modelo de análise multivariada para explorar a contribuição relativa das variáveis genômicas e clínicas para a sobrevida global permitiu a criação de uma base de dados com potencial de predição individualizada de desfecho. O algoritmo construído a partir da base de dados mostrou que o preditor mais importante para a sobrevida global dos pacientes estudados foram os dados genômicos, que quando considerados no algoritmo aplicado permitiu contextualizar 2/3 das variações encontradas. As características clínicas: idade, sexo, PS, esplenomegalia, leucometria, percentual de blastos, entre outras, contribuíram para explicar o outro terço das variações encontradas. (PAPAEMMANUIL et al., 2016)

1.1.3.3. Hierarquia Genética (Evolução Clonal)

A LMA é uma doença geneticamente heterogênea e complexa. Cada paciente tem uma doença geneticamente única. No entanto, genes recorrentemente mutados e padrões de evolução clonal são reconhecidos. Estudos com tecnologia de sequenciamento em larga escala documentam indiretamente a aquisição de mutações em etapas sequenciais no processo de leucemogênese. Diferentes proporções das mutações concomitantes dentro da amostra do diagnóstico, podem ser estimadas pela fração alélica da variante (VAF), onde a proporção de leituras que contém o alelo mutado é comparada com o somatório das leituras dos alelos mutados e alelos selvagens. Através das proporções das VAFs das mutações é

possível inferir a arquitetura clonal da LMA. Uma VAF alta, próxima à 0,5, sugere que quase 100% das células do tumor carregam um alelo com aquela determinada alteração, se considerarmos que a maioria das mutações ocorrem em heterozigose. Dessa forma, espera-se que eventos precoces no desenvolvimento da leucemia apresentem VAFs altas, enquanto mutações presentes apenas numa minoria das células tenham sido adquiridas em estágios mais tardios do processo. Diversos estudos mostram padrões de aquisição inicial de mutações em genes envolvidos no controle epigenético (*DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *IDH1/IDH2*). Esses são os mesmos genes frequentemente mutados em pessoas idosas saudáveis, que conferem risco aumentado para o desenvolvimento de doença cardiovascular e neoplasias hematológicas, processo conhecido como hematopoiese clonal de significado indeterminado (CHIP). Nos pacientes com LMA, mutações nesses genes são tipicamente encontradas com VAF alta, no clone fundador e quase nunca são encontrados isoladamente, sugerindo que apesar de facilitar expansão clonal, não são suficientes para causar a leucemia, podendo estar presentes em células pré-leucêmicas. Mutações em genes de sinalização e tirosinas quinases (*FLT3*, *RAS*) geralmente ocorrem mais tardiamente. Mutações em *NPM1* usualmente são um evento secundário, porém definidor de doença, encontrado no clone iniciador da LMA. (GRIMWADE; IVEY; HUNTLY, 2016; PAPAEMMANUIL et al., 2016; MARTIGNOLES; DELHOMMEAU; HIRSCH, 2018;)

A Figura 1.2 é um modelo do acima exposto em LMA. A transformação na LMA é um processo de múltiplas etapas caracterizado pela aquisição sequencial de mutações somáticas que afetam genes de diferentes categorias. A figura mostra a arquitetura clonal complexa e evolução da doença ao longo do tempo. Padrões de mutações parecem seguir trajetórias específicas e temporalmente ordenadas. Nesse modelo o clone dominante no momento do diagnóstico é um clone *DNMT3A* mutado, *NPM1* mutada, *FLT3* mutado e, a determinação da fração alélica VAF permite revisitar a hierarquia de aquisição das mutações.

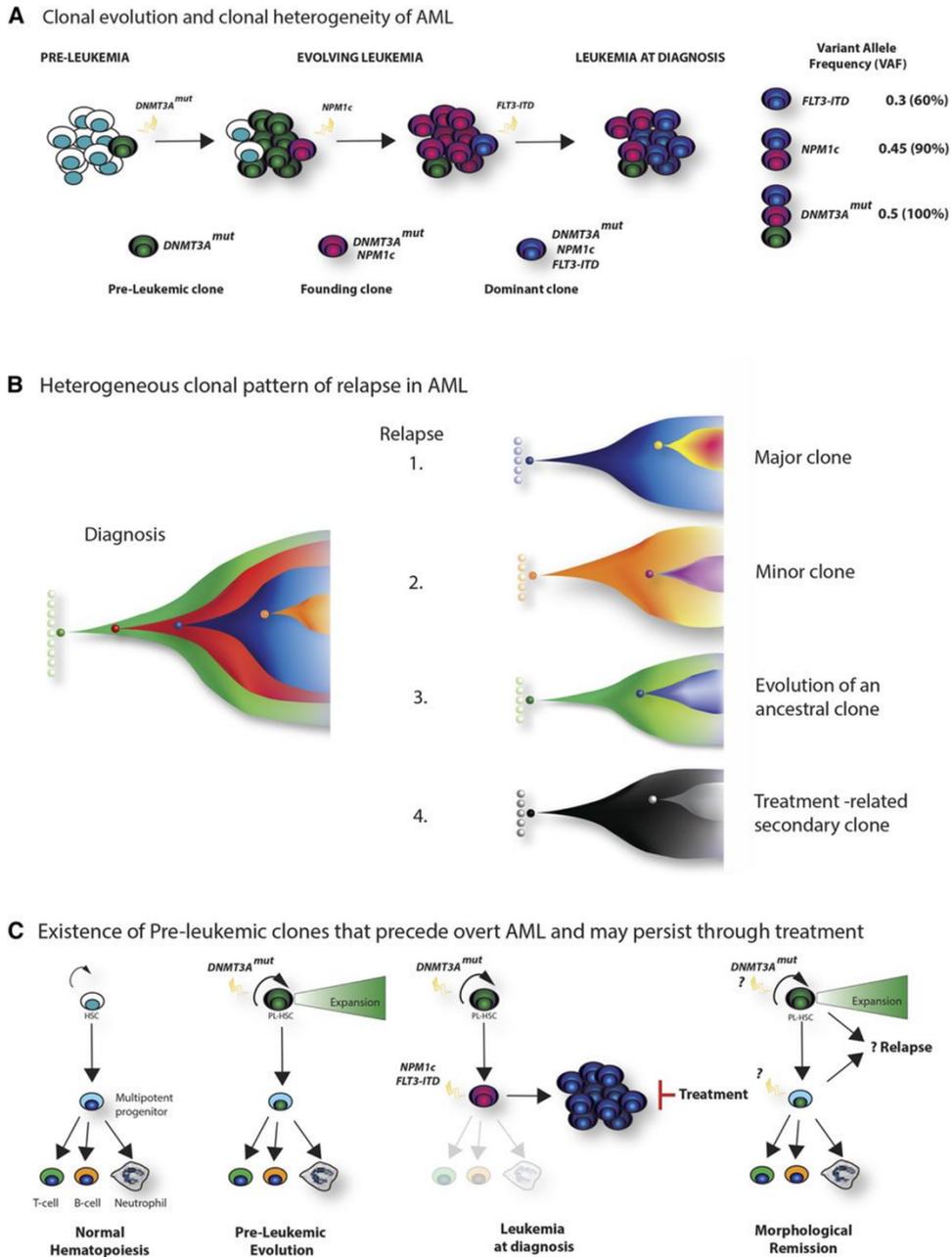


Figura 1.2. Arquitetura clonal, padrões de recidiva e existência de células-tronco pré-leucêmicas. (A) Evolução clonal hipotética. A mutação de *DNMT3A* é o evento mais precoce. Posteriormente, *NPM1* ocorre como a mutação definidora no clone fundador, com posterior aquisição de mutação *FLT3-ITD* em um clone hiperproliferativo, que se torna dominante no diagnóstico. A quantificação da frequência alélica variante (VAF) de cada mutação (por VAF, à direita) permite uma demonstração da aquisição temporal de mutações e da hierarquia clonal do tumor. (B) Padrão clonal heterogêneo de recidiva na LMA. Padrões potenciais de recidiva são mostrados: 1, do clone dominante no diagnóstico; 2, de um subclone presente no diagnóstico; 3, de um clone ancestralmente relacionado; 4, "recaída aparente",

em que o novo tumor não está clonalmente relacionado à leucemia inicial. (C) Existência de clones pré-leucêmicos que precedem a LMA podem persistir durante o tratamento. Células-tronco pré-leucêmicas abrigam mutações associadas à LMA, como *DNMT3A*, *TET2* e *IDH2*, que permitem a diferenciação multipotente, mas também facilitam a expansão clonal do progenitor. Após a aquisição de mais mutações (*NPM1c* e *FLT3-ITD*), a doença manifesta se desenvolve. O tratamento não erradica as células-tronco pré-leucêmicas. Evidências sugerem que essas células formam o reservatório para recidiva e resistência ao tratamento. *FONTE:* Adaptado de (GRIMWADE; IVEY; HUNTLY, 2016)

Estudos com amostras sequenciais do mesmo paciente mostram diferentes padrões mutacionais na recaída, que pode ocorrer a partir da expansão clonal de clones majoritários ou minoritários presentes ao diagnóstico, ou pelo surgimento de clones novos que compartilham relação ancestral com o clone do diagnóstico inicial. Esses estudos discriminam algumas mutações que, quando persistentes após o tratamento, podem estar relacionadas ao clone leucêmico e, portanto, são consideradas como doença residual mensurável (DRM). Em contraste, outras mutações são interpretadas como não relacionadas à leucemia, possivelmente identificadas em células pré-leucêmicas, e são consideradas como hematopoese clonal de significado incerto (CHIP). O valor prognóstico da detecção de alterações genéticas após o tratamento será abordado mais adiante. (DING et al., 2012; WONG et al., 2015; MARTIGNOLES; DELHOMMEAU; HIRSCH, 2018)

1.1.4. Tratamento

Desde a década de 70, quando foi publicado o artigo do esquema clássico de quimioterapia convencional mais utilizado na prática clínica em pacientes com LMA, o chamado protocolo 7+3 (7 dias de infusão contínua de doses baixas de citarabina, associado a 3 dias de antraciclinas), até 2017, pouco progresso terapêutico havia sido alcançado na LMA. Como o esquema é muito tóxico, com alta taxa de morte relacionada ao tratamento em pacientes idosos ou com comorbidades, as decisões terapêuticas iniciais diante de um paciente recém diagnosticados com LMA pairavam essencialmente da decisão dicotômica de realizar a indução de remissão com quimioterapia intensa ou não, pelo risco de toxicidade relacionada ao tratamento. Porém, por falta de terapias alternativas eficazes, os desfechos eram igualmente

desfavoráveis, com expectativas de sobrevida menores do que 5 meses nos paciente inelegíveis à quimioterapia de indução.

Com a translação do amplo conhecimento da patogênese genômica da LMA para o estudo de novas drogas, novas terapias foram aprovadas pela agência reguladora dos Estados Unidos. Tratamento inovadores, com pequenas moléculas de administração oral como inibidores de *BCL2*, tratamentos alvo dirigidos, com inibidores de *FLT3* e inibidores de *IDH1/IDH2*, imunoterapias, dentre outros, atualmente fazem parte do arsenal terapêutico da LMA. No Brasil, desde 2017, foram aprovados pela ANVISA o venetoclax, a midostaurina e o gilteritinibe.

Ainda nos tempos atuais, apesar da terapia de indução de remissão possibilitar a obtenção de um estado de remissão completa morfológica de doença, a maioria dos pacientes (aproximadamente 80% dos pacientes jovens, abaixo de 60 anos), a principal causa de falha terapêutica continua sendo a recidiva da LMA. Consequentemente, a principal decisão quanto ao manejo da consolidação dos pacientes em remissão completa morfológica continua sendo a realização de um alo-TCTH, pelo potencial dessa terapia de atingir maior chance de remissão em longo prazo do que a consolidação com quimioterapia convencional, sobretudo nos pacientes de risco prognóstico desfavorável e intermediário.

1.1.4.1. Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoiéticas

O alo-TCTH é considerado a forma mais comum de imunoterapia utilizada na prática clínica.(LOKE et al., 2020) No mundo todo, a indicação mais comum para este procedimento é a LMA. O efeito do enxerto contra a leucemia, aliado ao efeito anti leucêmico do regime de condicionamento contribuem para que seja considerada a única terapia potencialmente curativa para pacientes com LMA de alto risco. Os avanços na classificação genômica, juntamente com o progresso na quantificação da doença residual mensurável, aumentaram a capacidade de se identificarem os pacientes que necessitam do alo-TCTH para fins curativos, bem como aqueles que podem ser poupados da toxicidade de um aloenxerto. Apesar desse progresso, a recorrência da doença ainda é a principal causa de falha do transplante, seguida da mortalidade relacionada ao tratamento (TRM). (LOKE et al., 2020) Estratégias para mitigar o risco de recaída, tais como terapias farmacológicas de manutenção alvo ou não alvo dirigidas e terapias celulares profiláticas ou preemptivas no pós-transplante vêm sendo muito estudadas.

A decisão de realizar um alo-TCTH em primeira remissão completa depende de um balanço entre o risco de mortalidade relacionada ao transplante (TRM), e o benefício da redução do risco de recidiva que o procedimento proporciona. Para pesar esses riscos, a decisão se baseia na idade e comorbidades do paciente, no tipo de doador disponível e da modalidade do condicionamento a ser utilizado (mieloablativo x intensidade reduzida) e nos fatores prognósticos pré- e pós-tratamento (citogenética, genética, DRM). De acordo com o painel de experts da ELN, pacientes do grupo de risco favorável não se beneficiam do alo-TCTH em primeira remissão completa. O alo-TCTH é recomendado quando a chance de recidiva sem o procedimento é estimada em 35-40%. Quanto maior o risco de recidiva mais o risco da TRM é aceito. Dessa forma, o painel recomenda a consolidação com alo-TCTH na primeira remissão completa dos pacientes classificados como risco desfavorável e nos de risco intermediário com um doador disponível. Essa recomendação se baseia em estudos em pacientes com idade inferior a 60 anos, nos quais vantagem de sobrevida global e livre de recidiva foi comprovada para pacientes de risco citogenético intermediário e desfavorável com doador versus sem doador. Em contraste, pacientes do grupo de risco favorável apresentaram as mesmas chances de sobrevida com ou sem alo-TCTH, pois todo e qualquer benefício relativo a menor recidiva pelo efeito enxerto contra leucemia foi contrabalanceado pela maior mortalidade relacionada ao procedimento do grupo transplantado. (DÖHNER et al., 2017)

Além das indicações em primeira remissão, todos os pacientes que alcançam remissão após recidiva também tem indicação de realizar o alo-TCTH. Nos pacientes com doença primariamente refratária, o alo-TCTH é a única opção de terapia curativa.

Nos últimos anos, um número cada vez maior de alo-TCTH vem sendo realizado para pacientes com LMA, devido 1) a melhoria na identificação dos pacientes com indicação de transplante em primeira remissão completa, através da melhor estratificação de risco citogenético/molecular e à estratégias de mensuração de DRM; 2) ao advento de novas fontes de células tronco além de irmão totalmente compatível ou doador não aparentado, como o sangue de cordão umbilical e principalmente, os doadores haploidênticos, de forma que atualmente praticamente todos os pacientes elegíveis para um alo-TCTH tem um potencial doador; 3) a redução da toxicidade do alo-TCTH com regimes de condicionamento de intensidade reduzida, permitindo ofertar essa modalidade de tratamento para

pacientes maiores de 60 anos que tenham boas condições clínicas. (LOKE et al., 2020)

Os principais fatores determinantes para o risco de TRM após o alo-TCTH para LMA são a idade e o PS do paciente, o grau de disparidade HLA entre doador e receptor e a intensidade do regime de condicionamento. O sistema de pontuação HCT-CI, derivado de uma avaliação ponderada de 17 comorbidades, demonstrou prever a TRM e foi validado na LMA.(GILES et al., 2007; SORROR et al., 2014) Quanto ao risco de recidiva, o principal fator prognóstico é o status da doença ao transplante, aferido pela DRM. Uma série de estudos retrospectivos mostrou que os níveis de DRM pré-transplante mensurados por diferentes técnicas (citometria de fluxo multiparamétrica - CFM, RT-PCR, NGS) se associam com a chance de recidiva pós procedimento. (BUCKLEY; APPELBAUM; WALTER, 2013; BUCKLEY et al., 2017; LOKE et al., 2020)

1.1.5. Avaliação de Resposta ao Tratamento

1.1.5.1. Papel da doença residual mensurável

Desde, pelo menos 1969, se reconhece que uma remissão completa clínica é um passo inicial, importante, necessário, mas insuficiente no caminho para o controle da LMA no longo prazo.(HART et al., 1969; HOURIGAN; KARP, 2013) A remissão completa (RC) é definida, ainda nos dias de hoje, pela presença de <5% de blastos na medula óssea, ausência de blastos com bastonete de Auer e de doença extramedular, conjuntamente com a recuperação das contagens do sangue periférico de neutrófilos acima de $1000/\text{mm}^3$ e de plaquetas acima de $100.000/\text{mm}^3$. Entretanto, com base nas estimativas da celularidade normal da medula, esse ponto de corte não permite detectar a presença de um volume tumoral de até 1×10^{10} blastos leucêmicos, em teoria, uma carga leucêmica compatível com a vida (Figura 1.3). (HOURIGAN; KARP, 2013) Técnicas mais sensíveis conseguem detectar volumes menores de células tumorais residuais após a terapia, ao que chamamos doença residual mensurável (DRM).

Portanto, não é surpreendente que pacientes com LMA em RC morfológica sejam positivos para DRM. A recidiva continua sendo a principal causa de falha do tratamento entre os pacientes que alcançam RC morfológica. (HOURIGAN; KARP, 2013)

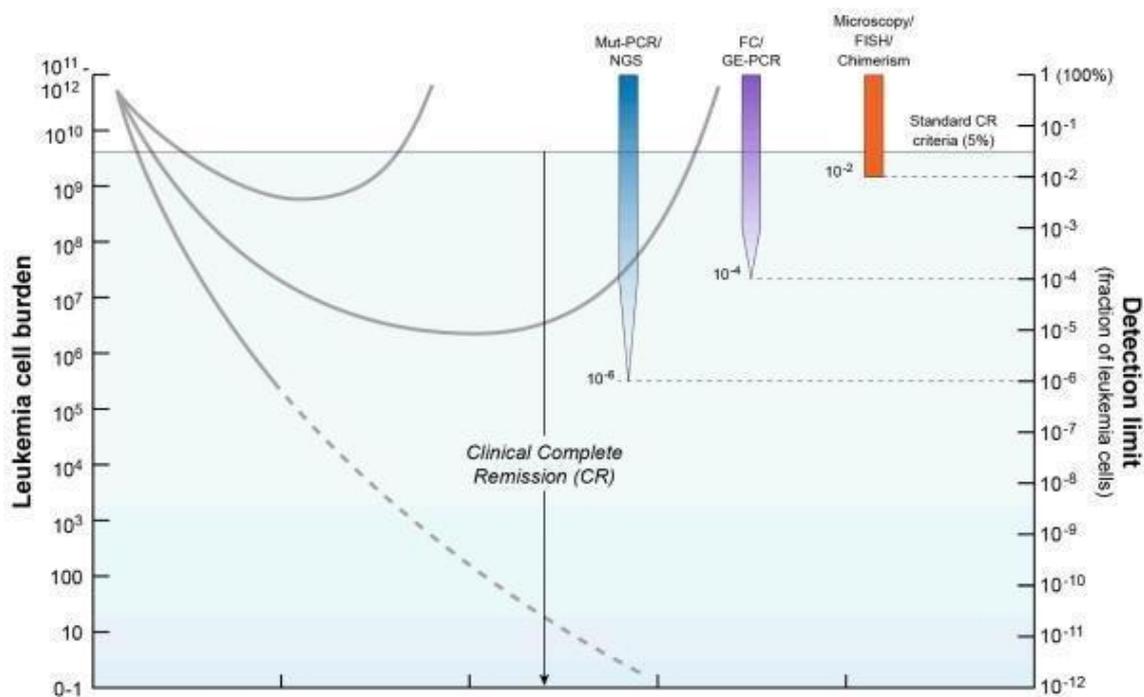


Figura 1.3. Níveis de detecção de várias metodologias de DRM comparadas à remissão completa clínica tradicional. O estado clínico de CR representa uma ampla gama de potencial carga de doença. Morfológica - 1 célula anormal em 100. FC e PCR para genes superexpressos (ex., *WT1*) – 1 célula anormal em 10.000. PCR para transcritos de fusão e mutações específicas (*NPM1mut*) por PCR ou NGS – 1 célula anormal em 1.000.000. Abreviatura: AMLs, leucemias mieloides agudas; CR, remissão completa; FC, citometria de fluxo; FISH, hibridização fluorescente in situ; MRD, doença residual mínima; NGS, sequenciamento de última geração.

FONTE: Adaptado de (HOURIGAN; KARP, 2013)

Diversas plataformas foram desenvolvidas para identificar doença residual mensurável, incluindo: citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) para numerar populações de células mielóides com anormalidades imunofenotípicas; reação em cadeia da polimerase (PCR) para quantificar genes de fusão ou outras alterações moleculares, mutações, associadas à leucemia; hibridização in situ por fluorescência (FISH) para detectar alterações citogenéticas de nível cromossômico específicas do clone maligno e, no contexto de monitoramento pós-alo-TCTH, análise de quimerismo por PCR ou FISH, consideradas técnicas de baixa sensibilidade (menor do que 10^{-3}). Novas tecnologias, incluindo PCR digital e NGS estão emergindo. Cada metodologia difere na proporção de pacientes para os quais podem ser aplicadas e na sensibilidade para detectar a DRM. Entre essas modalidades, as abordagens baseadas em CFM com ampla aplicabilidade, quase 90% dos pacientes com LMA e

o RT-qPCR, aplicável para 40-60% dos pacientes jovens com LMA que apresentam marcador molecular (*PML-RARA*, *CBFb-MYH11*, *RUNX1-RNX1T1*, *NPM1^{mut}*), são cada vez mais empregadas na prática clínica por sua alta sensibilidade (de até 10^{-5} – 10^{-6}).

Em 2017, o painel da ELN propôs uma nova categoria de resposta: a remissão completa com DRM negativa (RC DRM-), incorporando o conceito de que pacientes com DRM positiva (RC DRM+) têm maior risco de recaída e morte do que os pacientes em RC DRM-, e sugerindo que esse tipo de resposta pode ser utilizado em estudos clínicos como um desfecho mais precoce, por ser um marcador indireto de sobrevida global e sobrevida livre de doença.(DÖHNER et al., 2017) O painel recomenda que o tipo e a sensibilidade do método utilizado deva ser reportado e que as análises sejam feitas em laboratórios experientes. Em 2018, foi publicado pela ELN o primeiro consenso sobre a aplicabilidade da doença residual mensurável na prática clínica da LMA, com recomendações sobre métodos, marcadores e interpretações de resultados.(SCHUURHUIS et al., 2018)

As técnicas de detecção de DRM podem ser complementares. Em um estudo com 482 pacientes, Jongen-Lavrencic *et al* investigaram a presença de DRM por CFM e NGS (painel com 54 genes) em pacientes em RC após 2 ciclos de quimioterapia de indução de remissão. Os autores demonstraram que os dois métodos tiveram valor prognóstico independente e aditivos em relação a taxas de recidiva e sobrevida. A detecção de DRM por ambos se associou com uma probabilidade de recidiva excessiva, de aproximadamente 75%. A ausência de detecção nos 2 métodos se correlacionou com baixa probabilidade de recidiva, de aproximadamente 25%. Enquanto a detecção por um ou por outro método se associou com risco intermediário, de aproximadamente 50%. (JONGEN-LAVRENCIC et al., 2018a)

1.1.5.2. Detecção de Mutações persistentes por NGS

O uso do NGS para avaliação de DRM, em teoria, pode ser aplicável virtualmente a todas as aberrações genéticas associadas à LMA. A sensibilidade da técnica é variável, os NGS considerados “padrão”, ou seja, sem o uso da tecnologia de código de barras na pré-amplificação é limitado por taxas intrínsecas de erro de sequenciamento, atingindo sensibilidade média de cerca de 10^{-2} . Ainda assim, muitos estudos mostram que a detecção de mutações associadas a LMA, mesmo

em níveis menos sensíveis como 10^{-2} , alcançado pela maioria das plataformas NGS em uso, prediz fortemente desfechos em pacientes em RC morfológica. (JONGEN-LAVRENCIC et al., 2018a; MORITA et al., 2018; HASSERJIAN et al., 2020)

O desafio central na interpretação de um resultado de NGS no contexto de pacientes com LMA em remissão morfológica, é distinguir verdadeiros marcadores de doença residual, presentes no clone leucêmico, de mutações presentes em clones precursores da LMA, ou seja, em células precursoras da leucemia, capazes de promover a expansão clonal mas insuficientes para iniciar o fenótipo leucêmico, ou ainda, de clones independentes que emergem após a terapia. (IVEY et al., 2016; MORITA et al., 2018; WONG et al., 2018; LEVINE; VALK, 2019) Em um trabalho publicado por Hasserjian et al, na Blood em 2020, os autores organizam as principais características que distinguem as mutações possivelmente representativas de doença residual daquelas possivelmente relacionadas à hematopoiese clonal (HC) (tabela 1.4).

Tabela 1.4. Anormalidades genéticas relacionadas a LMA versus relacionadas a hematopoiese clonal.

Anormalidades genéticas relacionadas a LMA	Anormalidades genéticas relacionadas a HC
Ocorrem, geralmente, tardiamente na hierarquia clonal. Pode ser o único evento genético encontrado.	Ocorrem precocemente na hierarquia clonal. Geralmente com VAF mais alta do que as alterações relacionadas a LMA.
Redução na VAF, ou desaparecimento, associado com a redução do percentual de blastos após a terapia.	Geralmente persistem na RC em VAF semelhante à VAF pré terapia.
Reaparecimento da alteração genética na doença recidivada.	Persistência na doença recidivada.
Presença na RC é associada com aumento do risco de recidiva.	Presença na RC não é associada com aumento de recidiva.
Eliminada após alo-TCTH bem sucedido.	Eliminada após alo-TCTH bem sucedido.

Características utilizadas pelos autores para distinção entre mutações relacionadas à LMA das relacionadas à hematopoiese clonal. Abreviações: alo-TCTH: transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas. HC: Hematopoiese clonal. LMA: Leucemia mieloide aguda. RC: remissão completa. VAF: fração alélica da variante.

FONTE: (HASSERJIAN et al., 2020)

Tabela 1.5. Significado da persistência de anormalidades genéticas pós terapia comuns na LMA

Alteração Genética	Tipo	Técnicas de Detecção	Depuradas após terapia eficaz	Persistência associada à desfecho Desfavorável
<i>RUNX1-RUNX1T1, CBFb-MYH11, PML-RAR</i>	Relacionado a LMA	qPCR	Sim	Sim
<i>NPM1</i>	Relacionado a LMA	qPCR	Sim	Sim
<i>KMT2A</i> rearranjo, <i>DEK-NUP214, BCR-ABL1</i>	Relacionado a LMA	qPCR	Desconhecido	Desconhecido
<i>NRAS/KRAS</i>	Relacionado a LMA	NGS	Sim	Sim
<i>FLT3-ITD/FLT3TKD</i>	Relacionado a LMA	NGS PCR	Sim*	Desconhecido
<i>KIT</i>	Relacionado a LMA	NGS PCR	Sim	Sim
<i>PTPN11</i>	Relacionado a LMA	NGS	Sim	Sim
<i>GATA2</i>	Provavelmente Relacionado LMA	NGS	Sim	Desconhecido
<i>CEBPA</i>	Provavelmente Relacionado LMA	NGS	Sim	Desconhecido
<i>WT1</i>	Provavelmente Relacionado LMA	NGS	Sim	Desconhecido
<i>RUNX1</i>	HC (potencialmente relacionado LMA)	NGS ddPCR	Variável	Sim
<i>IDH1/IDH2</i>	HC (potencialmente relacionado LMA)	NGS	Variável	Sim
<i>DNMT3A</i>	HC	NGS	Geralmente Não	Não
<i>ASXL1</i>	HC	NGS	Variável	Não
<i>TET2</i>	HC	NGS	Geralmente Não	Não
<i>SRSF2</i>	HC	NGS	Variável	Não
<i>BCOR</i>	HC	NGS	Variável	Não
<i>TP53</i>	HC	NGS	Variável	Sim

*pode ser perdida na recaída ou adquirida em LMA inicialmente *FLT3* selvagem.

Tabela 1.5. Proposta de interpretação da detecção de mutações persistentes pós terapia por gene, por técnica, pela depuração após terapia e por desfecho. Abreviaturas: LMA: leucemia mieloide aguda. HC: hematopoiese clonal. ddPCR: droplet digital PCR. NGS: next generation sequencing.

FONTE: (HASSERJIAN et al., 2020). Referências:(HOURIGAN; KARP, 2013; KLCO et al., 2015; WONG et al., 2015; IVEY et al., 2016; HIRSCH et al., 2017; JONGEN-LAVRENCIC et al., 2018a;

MORITA et al., 2018; SCHUURHUIS et al., 2018; THOL et al., 2018;ZHOU; CHEN, 2018; PRESS et al., 2019)

O conceito de HC utilizado neste estudo é o de populações de células detectadas no SP ou MO, que se originam de progenitores hematopoiéticos somaticamente mutados. A HC frequentemente acompanha o estado natural de envelhecimento e pode representar um estado precursor de neoplasias hematológicas. A presença de HC em indivíduos saudáveis é denominada CHIP, estado que se associa a um risco maior de desenvolvimento de neoplasias mieloides, a uma taxa de 0,5-1% ao ano e à um maior risco de morbimortalidade cardiovascular.(GENOVESE et al., 2014; JAISWAL et al., 2014; ABELSON et al., 2018; SHLUSH, 2018) Com base nos trabalhos descritos até então na literatura, os autores propõem a interpretação do significado de mutações persistentes comumente encontradas em pacientes com LMA após terapia, assim como uma terminologia para padronizar a nomenclatura nesse contexto (Tabela 1.5).

1.1.5.2.1. Doença Residual Mínima Genética

Alterações genéticas subjacentes à patogênese da LMA (mutações *drivers*) que ocorrem com maior frequência mais tardiamente na ontogenia da LMA ou aquelas que definem um subtipo genético de LMA são intimamente relacionadas com a carga leucêmica e já mostraram relevância como marcadores de DRM.(YIN et al., 2012; WILLEKENS et al., 2016) Em contraste, mutações que ocorrem precocemente na ontogenia da LMA e que acometem com frequência genes de regulação epigenética também associados à hematopoiese clonal ou em uma fase pré-leucêmica como a mielodisplasia, podem não se associar a um risco aumentado de recidiva quando detectadas no cenário pós tratamento.(WELCH et al., 2012; XIE et al., 2014; KLCO et al., 2015; LINDSLEY et al., 2015; WONG et al., 2016; SHLUSH et al., 2017; JONGEN-LAVRENCIC et al., 2018a). Além disso, outras mutações, que podem ocorrer precocemente ou tardiamente no processo de leucemogênese, têm impacto incerto quando encontradas em pacientes em RC.

Os genes de fusão *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFb-MYH11* e *PML-RARA* são altamente específicos para LMA e a presença de DRM molecular avaliada por RT-qPCR para esses marcadores é altamente preditiva de recidiva. Nesses casos, a ausência de DRM ao final do tratamento é associada com sobrevida em longo

prazo excelente, embora níveis muito baixos de transcritos de *PML-RARA* e *CBFb-MYH11* possam persistir numa minoria dos casos. (HASSERJIAN et al., 2020)

Mutações no gene *NPM1* definem um subgrupo genético de LMA e raramente são encontradas em neoplasias mieloides que precedem a leucemia, como a SMD. Células com *NPM1* mutado (*NPM1^{mut}*) desaparecem rapidamente após administração de quimioterapia de indução, e são usualmente indetectáveis em pacientes que atingem RC duradoura. Em contraste reaparecem em quase todos os pacientes que recaem. (MORITA et al., 2018) Em um estudo, o uso preemptivo de azacitidina em pacientes com DRM genética positiva para translocações de risco ou *NPM1^{mut}* se associou com sobrevida livre de recidiva semelhante a do grupo RC DRM-. Um outro estudo mostrou que pacientes em remissão morfológica com RC DRM+ se beneficiam de alo-TCTH com condicionamento mieloablativo, ao invés de condicionamento de intensidade reduzida. (HOURIGAN et al., 2019) Esses dados sugerem que a presença de DRM genética pode ser não apenas prognóstica mas também direcionar intervenções terapêuticas específicas.

Os genes da via de sinalização do *RAS*, como *FLT3*, *NRAS* e *KRAS* são subjacentes ao aumento da proliferação em neoplasias mieloides. Mutações ativadoras nesses genes se associam com hiperleucocitose e alto percentual de blastos. A maioria dos estudos mostra que esses eventos (incluindo *FLT3-ITD* e *TKD*) são relativamente tardios na evolução da LMA e não persistem em pacientes em remissão. Outras mutações que geralmente são depuradas após quimioterapia intensiva são: *KIT*, *PTPN11*, *WT1*, assim como *CEBPA* e *GATA2* (essas 2 últimas quando somáticas, não germinativas). A detecção de mutações em *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11* ou *KIT* na remissão completa é associada com alto risco de recidiva e menor sobrevida livre de recidiva, sendo classificadas como alterações genéticas associadas à LMA. (HASSERJIAN et al., 2020)

Translocações envolvendo o gene *KMT2A* e o gene de fusão *DEK-NUP214* (t(6;9)) também podem ser classificadas como alterações genéticas associadas à LMA e quando detectadas, classificadas como doença residual.

Outras mutações têm implicações prognósticas indefinidas. Mutações em *IDH1/2* podem persistir na RC. (KLCO et al., 2015; MORITA et al., 2018) Mutações em *RUNX1* ocorrem frequentemente em pacientes com mielodisplasia que precede a leucemia e podem persistir após quimioterapia sendo o seu valor como marcador de doença residual ainda indefinido. No entanto, a presença de mutação em *RUNX1* na RC já foi associada à menor sobrevida. (KOHLMANN et al., 2014) Portanto,

algumas mutações persistentes após tratamento podem ser consideradas como potencialmente, mas não definitivamente associadas à LMA.

Diversos estudos mostram que a detecção de DRM genética positiva, mensurável através de técnicas de NGS na avaliação pré transplante de pacientes com LMA é um fator prognóstico independente com impacto negativo significativo nos desfechos após transplante, se correlacionado com maior incidência cumulativa de recidiva, menor sobrevida livre de progressão, e menor sobrevida global. (BUCCISANO et al., 2012; LUSKIN et al., 2016; PRESS et al., 2019; THOL et al., 2018; HAMILTON et al., 2019; HOURIGAN et al., 2019)

1.1.5.2.2. Hematopoiese Clonal

Ao contrário das aberrações genéticas relacionadas à DRM em LMA, mutações em *DNMT3A*, *TET2*, e *ASXL1*, chamadas de “DTA”, ocorrem precocemente na ontogenia da LMA e sozinhas não são suficientes para causar o fenótipo leucêmico. (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al., 2013; SHLUSH, 2018; WELCH et al., 2012) Usualmente, persistem ou até expandem após quimioterapia intensiva convencional, porém, geralmente são eliminadas após alo-enxerto com quimerismo completo do doador. Evidências sugerem que as mutações “DTA” não devam ser consideradas como marcadores de DRM verdadeira e provavelmente representem hematopoiese clonal similar à CHIP encontrada no processo de envelhecimento, em pacientes sem história prévia de neoplasia hematológica e sem citopenias. (GENOVESE et al., 2014; JAISWAL et al., 2014; ABELSON et al., 2018; SHLUSH, 2018)

Mutações em *SRSF2* e *BCOR* também persistem na maioria dos pacientes com LMA que atingem RC e sua presença é de significado clínico incerto.

Mutações em *TP53* podem surgir precocemente ou tardiamente no desenvolvimento da LMA, mas geralmente não são eliminadas nem reduzidas com quimioterapia de indução e ainda podem emergir após a terapia em um clone não relacionado com a LMA inicial.(JONGEN-LAVRENCIC et al., 2018b; PRESS et al., 2019; HASSERJIAN et al., 2020;)

Em pacientes submetidos à alo-TCTH, a hematopoiese clonal após o transplante pode se originar das células precursoras hematopoiéticas de origem do doador. (ENGEL et al., 2019)

2. Justificativa e Objetivos

2.1. Justificativa

A LMA é uma neoplasia que nos últimos anos tem se beneficiado grandemente do amplo conhecimento genômico da doença. A contribuição dos estudos de sequenciamento genético em larga escala se deu tanto com relação ao entendimento da fisiopatologia, classificação e estratificação de risco quanto pelo desenvolvimento de novas terapias alvo-específicas. Mesmo com todo o avanço no conhecimento molecular, a correlação entre marcadores moleculares e a predição de desfechos clínicos, sobretudo após o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas, ainda precisa ser melhor compreendida. No Brasil, dados de caracterização clínica e genômica de pacientes com LMA são escassos, a despeito desta ser a principal indicação para a realização de alo-TCTH no nosso país e no mundo. O Centro de Transplante de Medula Óssea do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - CEMO/INCA é um dos centros mais importantes de referência para a realização de transplante alogênico de medula óssea no âmbito do SUS, onde o conhecimento gerado pelo presente trabalho poderá contribuir para melhorias na assistência ofertada aos pacientes com LMA que necessitam de um transplante alogênico.

2.2. Objetivo Geral

Correlacionar o perfil clínico assim como o estado mutacional de genes associados à patogênese da LMA com os desfechos em longo prazo de pacientes com LMA submetidos a alo-TCTH.

2.3. Objetivos Específicos

- A) Descrever as características clínicas de uma coorte de pacientes com LMA submetidos a alo-TCTH no CEMO/INCA e compará-las com as características de coortes internacionais.
- B) Avaliar a frequência de mutações genéticas nesta coorte no momento da avaliação pré transplante, com um painel NGS de 30 genes, de diversas categorias funcionais, frequentemente associados a neoplasias mieloides e LMA.
- C) Caracterizar o perfil genômico dos pacientes de acordo com as mutações encontradas.

- D) Correlacionar os desfechos clínicos após alo-TCTH com o status mutacional pré transplante. Os desfechos clínicos que serão avaliados são: Sobrevida global, Sobrevida livre de recaída, Incidência cumulativa de recaída e Mortalidade não relacionada à recaída.
- E) Determinar o impacto das mutações encontradas em amostras pré alo-TCTH, em termos de número e tipo de mutações, nos desfechos de recaída e morte após alo-TCTH.
- F) Analisar o padrão de evolução clonal em alguns casos selecionados de pacientes com mutações genéticas detectadas antes do alo-TCTH e que tenham disponibilidade de outras amostras sequenciais em diferentes momentos do tratamento para avaliação longitudinal.

3. Material e Métodos

3.1. Delineamento do Estudo

Trata-se de estudo de coorte retrospectivo, observacional e analítico.

3.2. População de Estudo

Todos os pacientes portadores de LMA, adultos, que foram submetidos à transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas no Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no período de janeiro de 2010 até dezembro de 2017 e que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão expostos a seguir.

3.2.1 Critérios de Elegibilidade

Os critérios de inclusão para os pacientes no estudo foram:

- I. Ter o diagnóstico de leucemia mieloide aguda, conforme a definição da OMS de 2016 (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, THIELE J, [s.d.]
- II. Ter idade maior ou igual a 18 anos à época da realização do transplante.
- III. Ter amostra armazenada de material genético extraído do sangue periférico ou da medula óssea antes do transplante.

3.2.2. Critérios de Exclusão

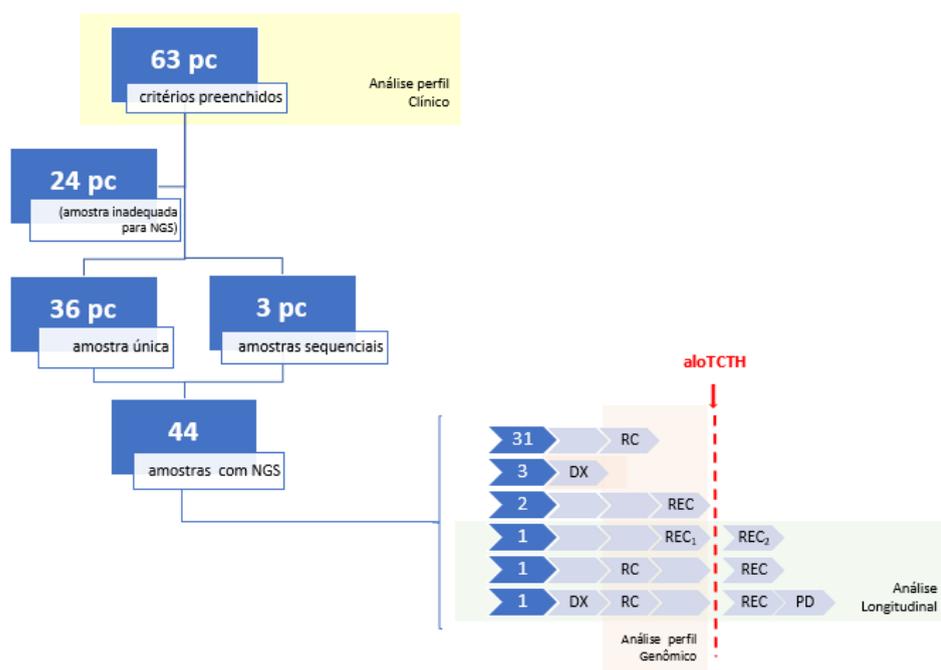
Os critérios de exclusão utilizados foram:

- I. Ser portador do subtipo Leucemia Promielocítica Aguda.
- II. Ser portador de Leucemia de células dendríticas plasmocitóides blásticas.
- III. Recusa de assinatura do Termo de Consentimento Livre e esclarecido.

3.3. Seleção da Coorte de Estudo

A seleção dos casos se deu por meio de busca em registro da base de dados do CEMO e do Laboratório de biologia molecular INCA. Ao todo, 63 pacientes preencheram todos os critérios de inclusão e exclusão do estudo, tiveram dados clínicos e laboratoriais coletados e foram incluídos nas análises do perfil clínico da coorte. No entanto, 24 pacientes apresentavam amostras biológicas com quantificação de DNA baixa ou apresentaram falha na etapa de formação da biblioteca do NGS e dessa forma, não tiveram o sequenciamento realizado. Os outros 39 pacientes seguiram para a fase de sequenciamento genético de forma bem sucedida e tiveram os dados genômicos analisados, inicialmente em 1 única amostra de DNA coletada e armazenada antes do início do condicionamento do transplante. Posteriormente, 3 pacientes foram selecionados para realização do NGS em amostras sequenciais, para avaliação longitudinal específica desses 3 casos. No total, 44 amostras foram sequenciadas. O diagrama de pacientes e amostras (Figura 3.1) discrimina o momento do tratamento temporalmente relacionado ao transplante (se antes ou depois do alo-TCTH) em que foram coletadas as amostras e o status da doença no momento da coleta. Foram incluídos, nas análises do perfil genômico, resultados do NGS de 39 amostras referentes à 39 pacientes, sendo (i) trinta e três coletadas com o paciente em remissão completa (RC); (ii) Três coletadas ao diagnóstico da LMA e (iii) Três coletadas no momento da recidiva pré-transplante. Em três destes pacientes, selecionamos outras amostras sequenciais para a realização do sequenciamento e análise longitudinal do caso: um paciente com uma amostra em RC pré-transplante e uma amostra da recidiva pós-transplante; outro paciente com uma amostra da recidiva pré-transplante e uma amostra de recidiva pós-transplante; o terceiro paciente com uma amostra do diagnóstico, uma amostra em RC (após 1ª linha de tratamento e antes do transplante), uma amostra da recidiva pós-transplante e uma amostra da progressão final da doença. A figura 3.1 representa graficamente os pacientes que constituíram as análises de perfil clínico, perfil genômico e os casos com análises longitudinais.

Figura 3.1. Diagrama de pacientes e amostras



Legenda da figura: pc = pacientes. NGS = next Generation sequencing. Dx = diagnóstico. RC = remissão completa. REC = recaída. REC1 = primeira recidiva. REC2 = segunda recidiva. PD = progressão de doença. alogTCTH = transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas.

3.4. Parâmetros Clínicos e Laboratoriais

Os dados clínicos e laboratoriais do diagnóstico, acompanhamento, tratamento e transplante foram obtidos por revisão de prontuário físico e eletrônico do INCA e dos registros dos laboratórios do CEMO/INCA.

Foram coletadas informações sobre: gênero, idade ao transplante, tempo entre o diagnóstico da LMA e o transplante, tipo de transplante (aparentado, não-aparentado ou haploidêntico), idade e sexo do doador, positividade da sorologia IgG para citomegalovírus no doador e receptor, celularidade do enxerto com número de células nucleadas totais e número de células CD34 positivas por quilo de peso do receptor, valor de ferritina na avaliação pré transplante, resultados de mielograma e imunofenotipagem da medula óssea na avaliação pré transplante, desfechos clínicos após o transplante (doença do enxerto contra o hospedeiro, recaída, óbito, causa do óbito e tempo de seguimento), dados do diagnóstico inicial, como: cariótipo por banda G, avaliações moleculares do diagnóstico, tipo de tratamento inicial e status de doença ao transplante (1ª remissão completa, 2ª remissão completa, RC

posterior ou doença ativa). As variáveis relacionadas ao transplante alogênico foram selecionadas para coleta de dados com base na reconhecida interação com desfechos pós transplante relatadas na literatura médica.

A classificação do subtipo de LMA no presente estudo foi estabelecido de acordo com a classificação da OMS 2016 (SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, THIELE J, [s.d.]), em (I) LMA com anormalidade genéticas recorrentes; (II) LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia, em casos de diagnóstico prévio de mielodisplasia, grau de displasia em múltiplas linhagens na ausência de alterações em *CEBPA* e *NPM1*, ou pela presença de alterações citogenéticas típicas da mielodisplasia; (III) LMA relacionada a terapia, em pacientes previamente submetidos a quimioterapia ou radioterapia para tratamento de câncer prévio; e (IV) LMA sem outra especificação (SOE), com classificação morfológica baseada no grau de maturação dos blastos de acordo com classificação FAB, conforme tabela 1.1.

Foi utilizada ainda a seguinte nomenclatura para a variável tipo de LMA: (i) LMA de novo, quando não havia história prévia de diagnóstico de mielodisplasia ou doença mieloproliferativa e nem história de uso prévio de tratamento quimio ou radioterápico. (ii) LMA secundária, nos casos categorizados pela classificação da OMS como LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia ou como LMA relacionada à terapia.

A classificação do estado da doença no pré-transplante foi realizada com base nas definições de resposta da *European Leukemia Net* (DÖHNER et al., 2017), conforme tabela 3.1., a seguir. Pacientes em remissão completa ou remissão completa com recuperação hematológica incompleta, foram coletivamente referidos como remissão completa (RC) no presente estudo.

Tabela 3.1. Definição de critérios de resposta conforme a ELN 2017.

Resposta	Definição
RC DRM-	RC com negatividade para marcador molecular detectado por Rt-qPCR ou não mensurável por CFM.
Remissão completa (RC)	Blastos na medula óssea (MO) <5%; ausência de blastos circulantes e de blastos com bastonetes de Auer; ausência de doença extramedular. Contagem de neutrófilos absoluta $\geq 1000/\text{mm}^3$; contagem de plaquetas $\geq 100.000/\text{mm}^3$.
RC com recuperação hematológica Incompleta	Todos os critérios de RC exceto por neutropenia residual ($< 1000/\text{mm}^3$ ou plaquetopenia $< 100.000/\text{mm}^3$).

FONTE: Adaptado de (DÖHNER et al., 2017)

Legenda: RC - remissão completa; DRM– doença residual mensurável negativa; CFM – citometria de fluxo multiparamétrica.

Os dados de citometria de fluxo foram utilizados para a variável doença residual mensurável pré-transplante, sempre quando estivesse disponível o resultado de uma análise da medula óssea, no período de até 30 dias antes do alo-TCTH. Quanto aos parâmetros da citometria de fluxo utilizados para a caracterização desta variável, de 2010 a 2016, a rotina para realização da citometria de fluxo na instituição, utilizava um painel com 3 cores apenas. A presença de blastos mielóides com aberrâncias (abordagem baseada na técnica “diferente do normal”) ou com imunofenótipo compatível com o diagnóstico inicial (abordagem baseada na técnica “imunofenótipo associado à leucemia”), em percentual menor do que 5% das células nucleadas avaliáveis foi considerada como DRM positiva. Doença mensurável acima de 5% em pacientes previamente tratados foi considerada como recidiva. A ausência de detecção de blastos mielóides com fenótipo aberrante concomitante à ausência de blastos mielóides com imunofenótipo semelhante ao diagnóstico foi considerada como DRM não mensurável, dentro dos limites de sensibilidade da técnica (na ocasião estabelecida em aproximadamente 10^{-3} a 10^{-4}). A partir de 2016, a citometria de fluxo de rotina da instituição passou a ser feita com 8 cores simultaneamente, o que permitiu a análise de maior número de células e a obtenção de maior sensibilidade, sendo a sensibilidade da análise considerada de aproximadamente 10^{-5} .

3.5. Amostras

As amostras de material biológico utilizadas no presente estudo foram obtidas do sangue periférico ou medula óssea dos pacientes, antes do início do condicionamento do transplante alogênico, após lise hipotônica das hemácias com o reagente *Red Cell Lysis Buffer* (Sigma) e armazenamento para extração de DNA como parte da rotina de caracterização dos receptores de transplante alogênico. A extração de DNA foi realizada usando a plataforma automatizada Maxwell® 16 (Promega), com sistema baseado na purificação de DNA por esferas imunomagnéticas. A mediana de tempo entre a coleta da amostra e o D0 (dia da infusão das células tronco hematopoiéticas) foi de 57 dias. A avaliação dos tratamentos de segunda linha previamente ao transplante não pode ser realizada por falta de dados na maioria dos casos.

3.6. Sequenciamento dos Genes de Interesse com Painel NGS

As amostras foram referidas para o Núcleo de operações GeneOne onde após a avaliação quantitativa e obtenção do valor médio da quantidade de DNA mensurado por meio de um espectrofotômetro, NanoDrop, e de um fluorímetro Qubit (Invitrogen), se seguiu o sequenciamento massivo e paralelo de sítios específicos em um painel de ressequenciamento para detecção de mutações diretoras em 30 genes subjacentes a patogênese das neoplasias mieloides [*ABL1*, *ASXL1*, *BRAF*, *CALR*, *CBL*, *CEBPA*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *EZH2*, *FLT3*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *NPM1*, *NRAS*, *PTPN11*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *WT1* and *ZRSR2*] (tabela 3.2).

Tabela 3.2. Composição do painel NGS (genes e éxons incluídos)

Genes	Exons	Genes	Exons
<i>ABL1</i>	4-9	<i>KIT</i>	2, 8-11, 13, 17, 18
<i>ASXL1</i>	9, 11, 12	<i>KRAS</i>	2, 3
<i>BRAF</i>	11, 15	<i>MPL</i>	10
<i>CALR</i>	9	<i>NPM1</i>	10, 11
<i>CBL</i>	8, 9	<i>NRAS</i>	2, 3
<i>CEBPA</i>	Gene completo	<i>PTPN11</i>	3, 7-13
<i>CSF3R</i>	Gene completo	<i>RUNX1</i>	Gene completo
<i>DNMT3A</i>	Gene completo	<i>SETBP1</i>	4
<i>ETV6</i>	Gene completo	<i>SF3B1</i>	10-16
<i>EZH2</i>	Gene completo	<i>SRSF2</i>	1
<i>FLT3</i>	13-15, 20	<i>TET2</i>	Gene completo
<i>HRAS</i>	2, 3	<i>TP53</i>	Gene completo
<i>IDH1</i>	4	<i>U2AF1</i>	2, 6
<i>IDH2</i>	4	<i>WT1</i>	6-10

JAK2	Gene completo	ZRSR2	Gene completo
-------------	---------------	--------------	---------------

O NGS foi realizado em quarenta e quatro amostras de 39 pacientes conforme diagrama da Tabela 4.11. Em 24 pacientes, a realização do sequenciamento por NGS não foi possível devido à concentração de DNA insuficiente ou por falha de sequenciamento, por essa razão foram excluídos das análises genômicas, mas incluídos nas análises de perfil clínico. Em 3 pacientes, foi possível a realização do sequenciamento em mais de uma amostra. Destes, 2 tinham amostras do pré-transplante e da recidiva após o transplante. Em 1 paciente, amostras seriadas do diagnóstico, da remissão completa após terapia inicial e pré realização do transplante, da recidiva e da progressão da LMA após o transplante foram sequenciadas e analisadas longitudinalmente.

São detectadas pelo painel NGS variações de nucleotídeo único (SNV) e pequenas deleções e inserções (*indels*). A composição do painel NGS pode ser vista na tabela 3.2.

O fluxo de trabalho para o painel NGS incluiu preparação da biblioteca; sequenciamento; anotação e classificação das variantes; análise dos resultados. A biblioteca foi preparada com solução mieloide (Sophia Genetics) e o sequenciamento foi realizado em MiniSeq (Illumina) com leituras de extremidades pareadas de 150 bp. A análise dos dados foi realizada no software Sophia DDM alinhadas de acordo ao genoma de referência GRCh37/hg19 com uso de um algoritmo específico para chamada e anotação de variantes. A cobertura das regiões alvo foi de 100% a 1000X. As diretrizes de nomenclatura da *Human Genome Variation Society* (HGVS) foram utilizadas para anotação das variantes. (DUNNEN et al., 2016) Anotações incluíram: alteração na sequência de nucleotídeos (c.); alteração na sequência de amino - ácidos (p.); coordenadas genômicas da variante: localizações genômicas de variantes denotadas pelo número do cromossomo seguido pela localização do nucleotídeo da variante; fração do alelo variante (VAF) mostrada como % de leituras variantes; tipo de transcrito de referência (o número de acesso da transcrição e o número da versão (por exemplo, BRAF, NM_004333.4), e rs (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), quando disponível. As variantes foram classificadas utilizando-se um sistema de 5 categorias, como patogênicas, provavelmente patogênicas, de significância incerta, provavelmente benignas ou benignas. (LI et al., 2017) Quando classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, as variantes foram chamadas de mutações. Mutações foram anotadas em relação a posição e tipo em *missense* (troca de uma única base não sinônima);

nonsense (quando a alteração levou a inserção de um códon de parada); *frameshift* (quando a adição ou deleção de um número de bases diferente de 3 ou múltiplos de 3 foi inserido ou deletado alterando a pauta de leitura do DNA); *splicing* (quando acometeu regiões canônicas -2,-1 _+1,+2 dos sítios aceptores ou doadores). Variantes sinônimas foram descartadas.

A avaliação de uma variante e discriminação entre polimorfismo e mutação foi realizada utilizando-se a frequência populacional da variante de acordo com as bases de dados populacionais GnomAD (The Genome Aggregation Database) e Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>), literatura e ferramentas de previsão in silico. As bases de dados utilizadas para interpretação das variantes genéticas foram o catálogo de mutações somáticas COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), e ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) (LANDRUM et al., 2018; “LOVD - An Open Source DNA variation database system”, [s.d.]; TATE et al., 2019). Dentre as fontes de literatura consultadas são elencadas: a entrez -PubMed, Google scholar, Google e como uma fonte de dados adicional para classificação de variantes, consultamos a base de dados Mastermind. (“Mastermind Genomic Search Engine (<https://www.genomenon.com/mastermind>)”, [s.d.]) Mutações do tipo *frameshift*; *nonsense* e em regiões canônicas dos sítios de *splicing* foram consideradas patogênicas sempre quando o número de leituras ultrapassou o limiar de quantificação do NGS (VAF>1%). Ferramentas in silico de predição de patogenicidade foram utilizadas para classificação de variantes missense (PolyPhen2, SIFT, MutationTaster, AlignGVGD) e para predição de alteração dos sítios de splicing (MaxEntScan, NNSplice, GeneSplicer). Uma previsão consistente com efeito deletério in silico (Patogênica >0.99; Provavelmente Patogênica 0,95 – 0,99) e descrição prévia de origem somática no COSMIC, foram parâmetros para classificação de uma variante como mutação potencialmente prejudicial.

Para apoiar a evidência de patogenicidade para uma variante nova e de significado clínico incerto, o software AlaMut [Alamut Visual - 19 de fevereiro de 2020] foi usado. Este software integra diferentes ferramentas de predição in silico e bases de dados populacionais como por exemplo a probabilidade de dano à sequência de proteína com base nos graus de distância evolutiva entre 2 aminoácidos, medida pelo Align-GVGD e a probabilidade de criação de um sítio de splicing com o uso das ferramentas SpliceSiteFinder, NNSplice e MaxEnt. Além disso, para estimar o impacto de novas variantes ou de significância incerta na estrutura da proteína, também especificamos três categorias de evidência (dados de

frequência da população, dados do tipo e localização da variante), conforme recomendado por Harrison 2019. (HARRISON; BIESECKER; REHM, 2019)

Tabela 3.3. Terminologia proposta para mutações persistentes em LMA pós terapia

Termo	Definição
Doença Residual Mensurável Genética (gDRM)	Anormalidades genéticas relacionadas à LMA detectáveis após tratamento.
Hematopoiese Clonal (CH)	Anormalidade genéticas somáticas não relacionadas à LMA detectáveis após tratamento, que podem ou não ter sido detectáveis na amostra do diagnóstico original da LMA
CHIP derivado do doador	Hematopoiese clonal de origem das células do doador de CTH, detectada após alo-TCTH para LMA.
Neoplasia Mielóide Residual (NMR)	Evidência clínica e morfológica de SMD, NMP, ou SMD/NMP em RC da LMA, com evidência de clonalidade compartilhada com alterações genéticas somáticas da LMA de origem.
Nova neoplasia mielóide clonalmente não relacionada à LMA	SMD, NMP, SMD/NMP com anormalidades genéticas inteiramente diferentes da LMA prévia, consideradas como neoplasia mielóide relacionada à terapia.
Neoplasia Mielóide derivada do doador	SMD, NMP, SMD/NMP de origem das células do doador de CTH, que se desenvolve após alo-TCTH para LMA.
Mutação Germinativa	Mutação germinativa, presente tanto em amostras pré quanto pós terapia. Deve-se especificar se é de origem das células do doador no contexto pós alo-TCTH.
LMA recidivada/refratária	≥ 5% blastos na MO após a RC com pelo menos 1 anormalidade genética somática relacionada a LMA e/ou a HC compartilhada com a LMA original.
LMA nova clonalmente não relacionada	≥ 20% blastos mielóides no SP ou na MO após RC, na ausência de qualquer alteração genética somática compartilhada com a LMA original. Representando LMA relacionada a terapia.
LMA derivada do doador	≥ 20% blastos mielóides no SP ou na MO originadas das células do doador de CTH, que se desenvolve após o alo-TCTH para LMA.

FONTE: traduzido de (HASSERJIAN et al., 2020).

Ressalta-se que a análise por NGS realizada neste trabalho foi aplicada a pacientes pré-alo-TCTH, ou seja, pacientes previamente tratados. As mutações detectadas foram classificadas em 2 subtipos: anormalidades genéticas relacionadas à LMA, e mutações do tipo hematopoiese clonal como sinonímia, na tabela, o termo anormalidades genéticas não relacionadas à LMA. A terminologia utilizada foi proposta por Hasserjian e colegas e publicada na Blood em 2020. A tabela 3.3 descreve a terminologia utilizada.

3.7. Desfechos de Interesse

Os principais desfechos analisados no presente estudo foram óbito e recidiva, aplicados para o cálculo da sobrevida global, incidência cumulativa de sobrevida, sobrevida livre de recidiva e mortalidade não relacionada à recidiva.

O tempo para sobrevida global foi calculado da data do D0 (dia da infusão de células tronco hematopoiéticas) do transplante até a data do óbito ou do último seguimento.

O tempo para sobrevida livre de recidiva foi calculado da data do D0 do transplante até a data da documentação da recidiva por hemograma, mielograma ou biópsia, em caso de recidiva extramedular.

3.8. Análise Estatística

Características de base da população estratificadas por disponibilidade de exame molecular foram apresentadas em forma de número e percentual (para variáveis categóricas), mediana e intervalo ou média e desvio-padrão (variáveis contínuas, conforme apropriado). Essas variáveis foram comparadas pelo teste do chi-quadrado ou teste exato de Fisher, pelo teste de Mann-Whitey ou pelo teste t de Student, respectivamente.

Comparações entre variáveis contínuas com três ou mais categorias foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis.

A sobrevida global e a sobrevida livre de recidiva foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste do logrank. As incidências acumuladas (recidiva e mortalidade não-relacionada à recidiva) foram estimadas e comparadas pelo método de Gray.

As análises multivariadas foram realizadas por modelos de Cox. Os pressupostos do modelos de Cox foram checados através de análise dos resíduos (Schoenfeld para não-proporcionalidade de riscos e Martingale para linearidade). Consideramos estatisticamente significativo, um p-valor menor que 0,05, bicaudal. As análises foram realizadas no programa R, versão 4.0.2.

3.9. Aspectos Éticos

Ao todo, 63 pacientes preencheram todos os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Os pacientes que se encontravam vivos, concordaram com a participação no estudo, assinando o TCLE. Para os pacientes que se enquadravam no item IV.8 da resolução CNS 46612, não foi possível a obtenção do TCLE, sendo justificado ao

CEP a ausência do termo, garantindo a manutenção do sigilo e confidencialidade dos pacientes incluídos nesta pesquisa. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa do INCA, sob o número de registro CAAE 79692717.3.0000.5274 e parecer número 2.443.323.

4. Resultados

4.1. Casuística

Todas as amostras de MO ou S.P dos pacientes incluídos neste estudo foram obtidas antes do início do condicionamento do alo-TCTH. Estas foram as amostras que contribuíram para as análises de perfil genômico. Em 3 pacientes, selecionados após os resultados iniciais, além das amostras pré condicionamento amostras do diagnóstico e do pós alo-TCTH foram sequenciadas para análise de evolução clonal longitudinal . Um número maior de análises seriadas não pode ser realizado por limitação do número de testes NGS disponíveis.

Um total de 63 pacientes referidos ao Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO-INCA), no período entre 2010 e 2017, preencheram os critérios de inclusão desse trabalho e foram selecionados para estudo. A figura 4.1 apresenta os pacientes conforme o tipo de análise realizada para a obtenção de desfecho clínico, padrão genômico e análise genômica longitudinal de amostras seriadas. Vinte e quatro pacientes foram excluídos da análise por NGS devido à qualidade da amostra biológica (material insuficiente para preparação da biblioteca).

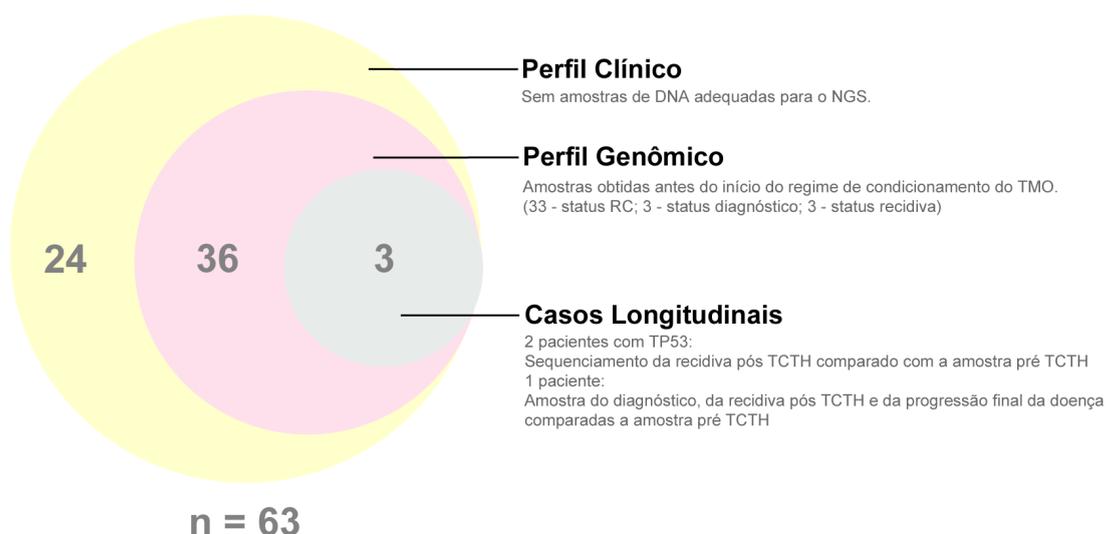


Figura 4.1. Desenho representativo da coorte total, coorte genômica e casos longitudinais.

Os dados clínicos, laboratoriais, demográficos e relativos ao alo-TCTH dos 63 pacientes são apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2.

4.2. Achados Clínicos e Laboratoriais

A Tabela 4.1. mostra a distribuição das principais características clínicas e demográficas dos 63 pacientes da coorte. A maioria da coorte (n=45, 71%) era constituída de pacientes inicialmente tratados em outras instituições e referidos ao CEMO-INCA apenas para a realização do transplante alogênico e, portanto, muitos dos dados iniciais relativos à doença, se encontravam indisponíveis como evidenciado na tabela 4.1.

A mediana de idade foi de 46 anos (18-65), com prevalência discreta de pacientes do sexo feminino (56%). Baseado no critério da OMS para a classificação da LMA os casos foram classificados como LMA de novo (n=35, 56%) e LMA secundária (n=22, 36%), nesse grupo apenas um paciente com LMA secundária a tratamento sendo o restante dos pacientes portadores de LMA secundária à mielodisplasia (n=21). Desses, a maioria (62%) apresentavam diagnóstico prévio de síndrome mielodisplásica (9/21) ou alterações citogenéticas descritas pela OMS como suficientes para o diagnóstico de LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia (4/21).

Quanto ao risco citogenético aferido ao diagnóstico, pacientes foram estratificados em três grupos de prognóstico favorável, intermediário e adverso de acordo com a presença, tipo ou ausência de alterações citogenéticas. Seis pacientes (10%) apresentavam translocações recorrentes de prognóstico favorável [t(8;21) ou inv(16)], nenhum destes foi transplantado em primeira remissão completa. Metade dos pacientes (n=32) apresentavam risco citogenético intermediário. Desses, aproximadamente 70% (22/32) apresentavam cariótipo normal, 12% (4/32) trissomia do 8, e o restante alterações citogenéticas não recorrentes e, portanto, não classificáveis em relação ao risco favorável ou desfavorável pela OMS. Nove pacientes (14%) foram classificados no grupo de risco citogenético desfavorável devido à apresentação de cariótipo complexo (n=1), cariótipo complexo e monossômico (n=2), cariótipo monossômico (n=4), t(3;3) (n=1) ou rearranjo raro envolvendo o gene *KMT2A* (n=1).

Nenhum dos pacientes da coorte realizou pesquisa molecular para *CEBPA*, *RUNX1*, *TP53* ou *ASXL1* ao diagnóstico. Em virtude da ausência de dados com relação a estas alterações genéticas, muitos pacientes não puderam ser

categorizados de acordo com a classificação da OMS 2016 tão pouco foram submetidos à estratificação de risco da ELN 2017. Os pacientes que puderam ser classificados, o foram, com base nos dados de citogenética convencional e/ou pesquisa molecular para *BCR-ABL*, *CBFb-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *NPM1* e *FLT3-ITD* quando disponíveis. Devido à indisponibilidade de dados em mais de 2/3 dos pacientes, os dados relativos à classificação FAB, OMS e ELN2017 não foram apresentados da tabela 4.1.

A mediana de tempo entre a data do diagnóstico e o D0 do alo-TCTH foi de 407 dias (intervalo interquartil: 216, 644 dias) e a avaliação do estado da doença no pré- transplante mostrou que 41% (26/63) dos pacientes realizaram o procedimento em primeira remissão completa (RC1), 38% (24/63) em segunda ou terceira remissão completa (RC2+) e 21% (13/63) com a doença ativa. Apenas uma paciente (caso 4 - tabela suplementar 1), inicialmente indicada para realização do transplante por mielodisplasia, evoluiu para LMA 13 dias antes da realização do mesmo e não realizou nenhuma terapia prévia ao transplante. Todos os 62 pacientes restantes receberam uma ou mais linhas de tratamento com quimioterapia convencional antes do transplante, sendo, para todos, o primeiro transplante realizado.

Dos pacientes que se encontravam em RC na avaliação pré transplante (n=50), 68% tinham resultado da citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) da medula óssea disponível e foram classificados, quanto à doença residual mensurável (DRM), em DRM+, 24%(15/63) ou DRM- 30% (19/63).

Outro dado da avaliação laboratorial pré-transplante coletado foi o nível sérico de ferritina, utilizado de rotina como indicador de deficiência ou sobrecarga de ferro, mostrando mediana de 1553.5 (12 – 10492.0) e intervalo interquartil de 1058.2 e 2582.2. Previamente relatado com implicância no risco de doença hepática venooclusiva. (MARADEI et al., 2009)

Todos os pacientes com avaliação na escala de performance ECOG documentada em prontuário apresentavam pontuação 0 ou 1.

Tabela 4.1. Características clínicas, laboratoriais e demográficas dos pacientes

Característica	Perfil Clínico		Perfil Genômico	p
	n total=63 (100%)	n=24 (100%)	n=39 (100%)	
Idade ao transplante (anos)				0,18
Mediana (intervalo)	46 (18-65)	42 (23-49)	47(34-53)	
Sexo				0,04
Masculino	29 (46%)	15 (62,5%)	14 (35,9%)	
Feminino	34 (54%)	9 (37,5%)	25 (64,1%)	
Diagnóstico				0,73
De novo	35 (56%)	13 (54,2%)	22 (56,4%)	
Secundária	22 (35 %)	9 (37,5%)	14 (35,9%)	
Indisponível	6 (9 %)	2 (8,3%)	3 (7,7%)	
LMA Secundária (N= 22)				
Terapia prévia (QT ou RXT)	1 (4%)	-	-	-
SMD prévia	9 (41%)			
Citogenética (OMS 2016)	4 (18%)			
Morfologia	8 (36%)			
Risco Citogenético ao Dx				0,007
Baixo	6 (10%)	4 (16,7%)	2 (5,1%)	
Intermediário	32 (51%)	6 (25%)	26 (66,7%)	
Alto	9 (14%)	6 (25%)	3 (7,7%)	
Indisponível	16 (25%)	8 (33,3%)	8 (20,5%)	
Tempo entre Dx-aloTCTH (dias)				0,63
Mediana (Intervalo)	407 (13-2597)	454 (215-748)	399 (253-547)	
Estado da doença alo-TCTH				0,78
RC1	36(41%)	9 (37,5%)	17 (43,6%)	
RC2+	24 (38%)	9 (37,5%)	15 (38,5%)	
Doença Ativa	13 (21%)	6 (25%)	7 (17,9%)	
DRM CFM(n=50, em RC)				0,11
Negativa	19 (38%)	4 (16,7%)	15 (38,5%)	
Positiva	15 (30%)	8 (33,3%)	13 (33,3%)	
Indisponível	16 (32%)	12 (50%)	11 (28,2%)	
Ferritina ng/mL				0,9
Mediana (Intervalo)	1553 (12-10492)	1436 (1104,2632)	1827 (1017, 2562)	
PS alo-TCTH				
0 – 2	42 (66%)	-	-	-
3 - 4	-			
Indisponível	21 (33%)			

A Tabela 4.2 mostra a distribuição das principais características relacionadas ao transplante dos 63 pacientes da coorte.

Setenta e um por cento da coorte recebeu um transplante alogênico aparentado de irmão compatível HLA 6/6 (HLA A, B e DR). Os transplantes com doador não aparentado representaram 18% dos casos, sendo 11% sem mismatch, 4% com mismatch HLA em 1 de 10 alelos avaliados (HLA A, B, C, DR e DQ), e 3% com informação indisponível. Seis pacientes (10%) receberam alo-TCTH de doador haploidêntico.

A principal fonte de células tronco hematopoiéticas (CTH) utilizada foi medula óssea (MO), em 72% (n=45) dos casos. Sangue periférico (SP) e sangue de cordão umbilical (SCU) foram utilizados como fonte de CTH em 25% (n=16) e 3% (n=2), dos casos, respectivamente. A quantidade de células CD34 infundidas teve mediana de $1,6 (0,43-6,07) \times 10^6/\text{Kg}$ de peso do receptor (média=2, desvio padrão de 1,6).

Quanto às características do doador, a idade mediana foi de 41 anos (29-50), o percentual de doadoras do sexo feminino que doaram CTH para receptores do sexo masculino foi de 22% (n=14), apenas 4 casos de doador com sorologia para citomegalovírus (CMV) negativo doando para receptores com sorologia CMV negativa foram relatados.

Os principais regimes de condicionamento utilizados foram: bussulfano com ciclofosfamida (n=37, 59%), bussulfano com fludarabina \pm TBI (n=14, 22%), Ciclofosfamida com TBI (n=7, 11%). O condicionamento foi classificado em mieloablativo (MAC) em 48 (76%) pacientes ou de intensidade reduzida em 15 (24%). A grande maioria dos pacientes (n=50, 79%) recebeu profilaxia contra doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) com associação de metotrexato e ciclosporina. A profilaxia de DECH nos transplantes haploidênticos (n=6, 10%) foi realizada com ciclofosfamida pós, nos dias D+3 e D+4, associada com micofenolato mofetil e ciclosporina ou tacrolimus.

A mediana de tempo para atingir a contagem absoluta de neutrófilos acima de $500/\text{mm}^3$, denominada na tabela 4.2 como recuperação neutrofílica foi de 18 dias (12-25). Três pacientes faleceram antes de atingir a recuperação neutrofílica, com 8 dias, 21 dias e 36 dias após a infusão de CTH, respectivamente.

Trinta e oito pacientes (60%) apresentaram DECH aguda documentada, que em 76% (n=29) dos casos foi avaliada como graus I ou II. Onze pacientes faleceram antes de completar 100 dias da infusão de CTH e foram excluídos da avaliação de DECH crônica. Dos pacientes avaliados, metade apresentou documentação de DECH crônica (n=26, 41%), sendo em 11 pacientes avaliada como limitada e em 12 como extensa.

Tabela 4.2. Características relacionadas ao transplante alogênico

Características		Perfil Clínico		Perfil Genômico	p
		n total =63 (100%)	n=24	n=33	
Doador/Compatibilidade HLA					0,35
	Aparentado	45(71%)	17 (70,8%)	28 (71,8%)	
	Não aparentado sem MM	7 (11%)	3 (12,5%)	7 (17,9%)	
	Não aparentado com MM	3 (4%)	2 (8,3%)	4 (10,3%)	
	Haploidêntico	6 (10%)	2 (8,3%)	0	
	NAP (indisponível)	2 (3%)			
Fonte de CTH	SP	16 (25%)	9 (37,5%)	8 (20,5%)	0,03
	MO	45 (72%)	3 (12,5%)	31 (79,5%)	
	SCU	2 (3%)	2 (8,3%)	0	
Número CD34 x10⁶/Kg receptor		1,6 (0,43-6,07)	1,7 (1,3)	2,1 (1,7)	0,38
Mediana (Intervalo)			média (dp)	média (dp)	
Idade Doador	Mediana (Intervalo)	41 (29 – 50)	38 (25, 50)	41 (35, 49)	0,24
Sexo Doador/Receptor	Fem/Masc	14 (22%)	-	-	-
	Outros	49 (78%)			
Incompatibilidade ABO	Sim	23 (37%)	13 (54,2%)	27 (69,2%)	0,2
	Não	40 (63%)	11 (45,8%)	12 (30,8%)	
CMV					0,05
	Doador- /Receptor+	4 (6%)	1 (4,2%)	4 (10,3%)	
	Outros	59 (84%)	23 (95,8%)	35 (89,7%)	
Condicionamento	MAC	48 (76%)	19 (79,2%)	28 (71,8%)	0,85
	RIC	15 (24%)	5 (20,8%)	10 (25,6%)	
Tempo recuperação neutrofílica (dias)			-	-	-
Mediana (Intervalo)		18 (12-25)			
DECH Aguda	Sim	38 (60%)	7 (29,2%)	10 (25,6%)	0,9
	Não	17 (27%)	14 (58,3%)	24 (61,5%)	
	Indisponível	8 (18%)	3 (12,5%)	5 (12,8%)	
Grau DECH Aguda	I/II (n=38)	29 (76%)	-	-	-
	III/IV	17 (27%)			
	Indisponível	3 (8%)			
DECH Crônica	Sim	26 (41%)	9 (37,5%)	17 (43,6%)	0,84
	Não	26 (41%)	11 (45,8%)	15 (38,5)	
	Indisponível	11 (18%)	4 (16,7%)	7 (17,9%)	
Grau DECH Crônica	Limitada	11 (42%)	-	-	-
	Extensa	12 (46%)			
	Indisponível	2 (12%)			

4.3. Caracterização Genômica por Painel NGS com 30 Genes

Trinta e nove dos 63 pacientes da coorte apresentavam pelo menos 1 amostra de DNA armazenado, coletada em algum momento antes do início da fase de condicionamento pré-transplante e com material suficiente para realização

adequada do sequenciamento genético por NGS. A mediana de tempo entre a obtenção da amostra e o D0 do alo-TCTH foi de 57 dias (intervalo: 7-693 dias).

Trinta e três amostras foram obtidas em pacientes submetidos a 1 ou 2 linhas de tratamento prévias (excluindo um transplante), com o paciente em remissão completa, com < 5% blastos na amostra. A mediana de tempo das amostras em RC e o D0 do alo-TCTH foi de 56 dias (intervalo interquartil: 23, 100). Três amostras foram obtidas ao diagnóstico da LMA e 3 amostras foram obtidas com doença ativa, no momento de uma recidiva pré alo-TCTH. Não foi possível avaliar a realização ou não de tratamentos nem o tipo de tratamento realizado no período decorrido entre a obtenção da amostra e o alo-TCTH. Mas, em 15 dos 33 pacientes com amostras obtidas na remissão completa (45%), o status da doença avaliado ao transplante permaneceu como primeira remissão completa.

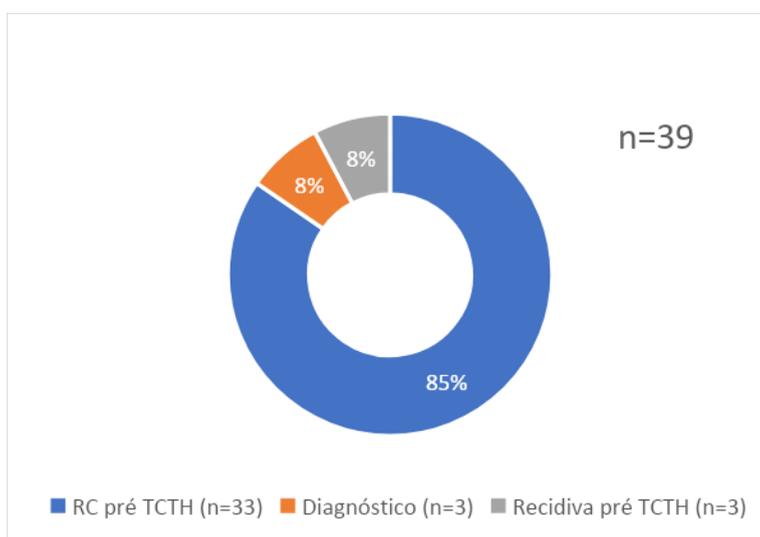


Figura 4.2. Distribuição das amostras por status da doença no momento da coleta

Um painel NGS alvo-específico foi utilizado como abordagem laboratorial para a avaliação do estado mutacional de 30 marcadores gênicos associados à patogênese das neoplasias mieloides. Foram realizadas 11 corridas de sequenciamento independentes, gerando, em média por corrida: (I) 40.000.000 de leituras totais; (II) fragmentos com tamanho médio de 150 pb; (III) um mínimo de 80% das leituras nas regiões alvo do painel. A qualidade do sequenciamento foi considerada ótima quando: (I) Q30 > 80% , ou seja, admitindo-se 1 erro a cada 1000 bases sequenciadas; (II) a média de cobertura por amostra >2000 vezes; (III) heterogeneidade de cobertura <1% (IV) 100% das regiões alvo cobertas pelos menos 1000 vezes. Os arquivos FASTQ de cada corrida foram utilizados como *input* na plataforma da *Sophia Genetics* para alinhamento, e chamada de variantes.

Foram considerados artefatos do sequenciamento, as variantes: (I) presentes nas extremidades das leituras (II) presentes apenas nas fitas Forward ou Reverse e (III) contidas em regiões homo poliméricas após inspeção visual pelo IGV integrada a chamada de variantes da plataforma de análise utilizada (*Sophia Genetics*).

Ao todo, foram encontradas 49 variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas, aqui referidas como mutações. Quando foi avaliada a frequência, segundo os diferentes genes acometidos, as mutações nos genes de regulação epigenética foram as mais frequentes. Aproximadamente um quarto das mutações (n= 11/49) ocorreram nos genes *DNMT3A*, *ASXL1* e *TET2*. Mutações em *DNMT3A* e *TET2* normalmente persistem após a terapia, enquanto mutações no gene *ASXL1* apresentam comportamento mais variável podendo persistir ou desaparecer após terapia. A persistência de mutações em *DNMT3A*, *TET2* e *ASXL1* (DAT) em pacientes com LMA em RC pós terapia, como é o caso desse estudo, não está necessariamente associada a desfecho adverso. (HASSERJIAN et al., 2020)

As mutações em *DNMT3A* (12%) foram as mais frequentes seguidas por *RUNX1* (10%), *TET2* (8%) e *WT1*(8%). Nenhuma mutação em *NPM1* foi identificada. Três mutações em *FLT3* foram detectadas. Quanto ao subtipo de mutação, foi observado que 70% eram do tipo *missense*, 16% *frameshift*, 10% localizadas em sítio de *splicing*, 2% *nonsense* e 2% *FLT3-ITD*. A figura 4.3 apresenta a frequência e a anotação do tipo de mutação. As anotações detalhadas em relação a posição, ao tipo, a fração alélica da variante (VAF) de cada paciente encontram-se na tabela 4.3.

Os painéis NGS estimam a carga de mutação usando a fração do alelo variante (VAF), que é a fração do total de alelos (alelos mutados + alelos selvagens) com uma mutação específica. O valor da VAF de diferentes mutações corresponde a genes com mutações persistentes pré-transplantes. O valor da VAF foi bastante variável quando consideradas para análise somente as VAFs superiores ao limite de quantificação da técnica (>1.0). A dispersão das frações alélicas dessas mutações, por gene, está discriminada na Figura 4.4.

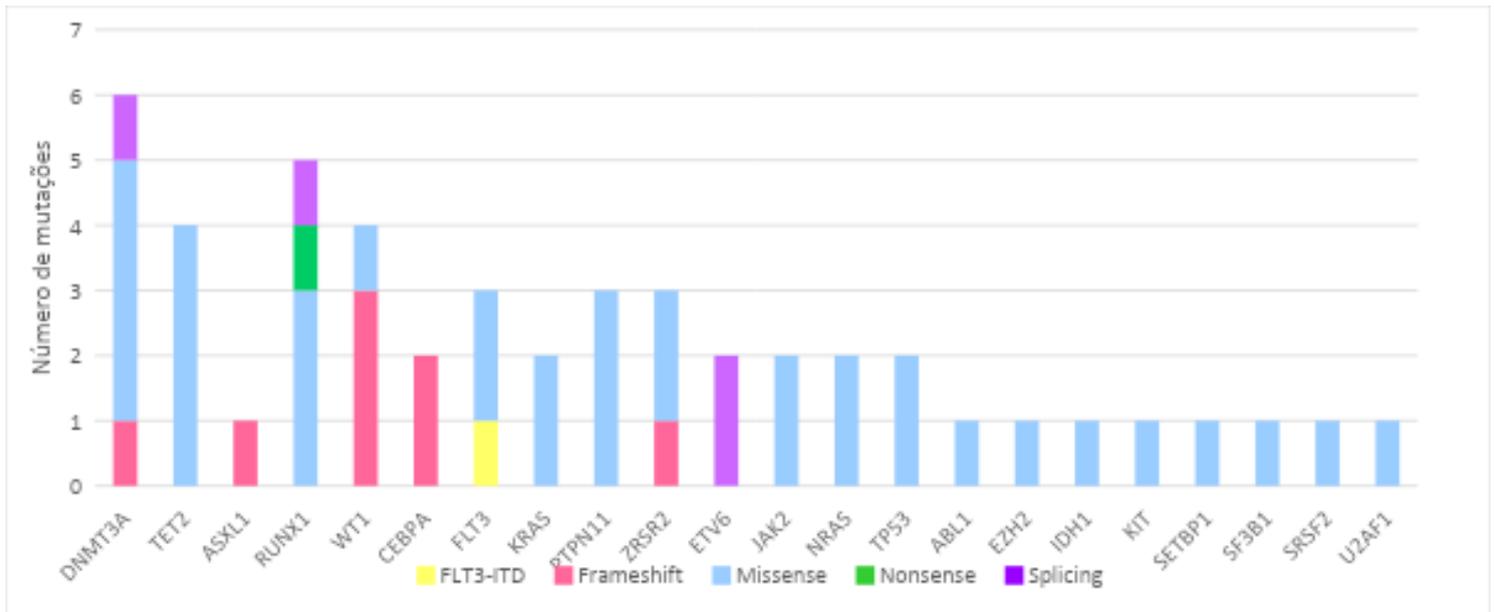


Figura 4.3. Distribuição das variantes encontradas, por gene e por tipo de mutação.

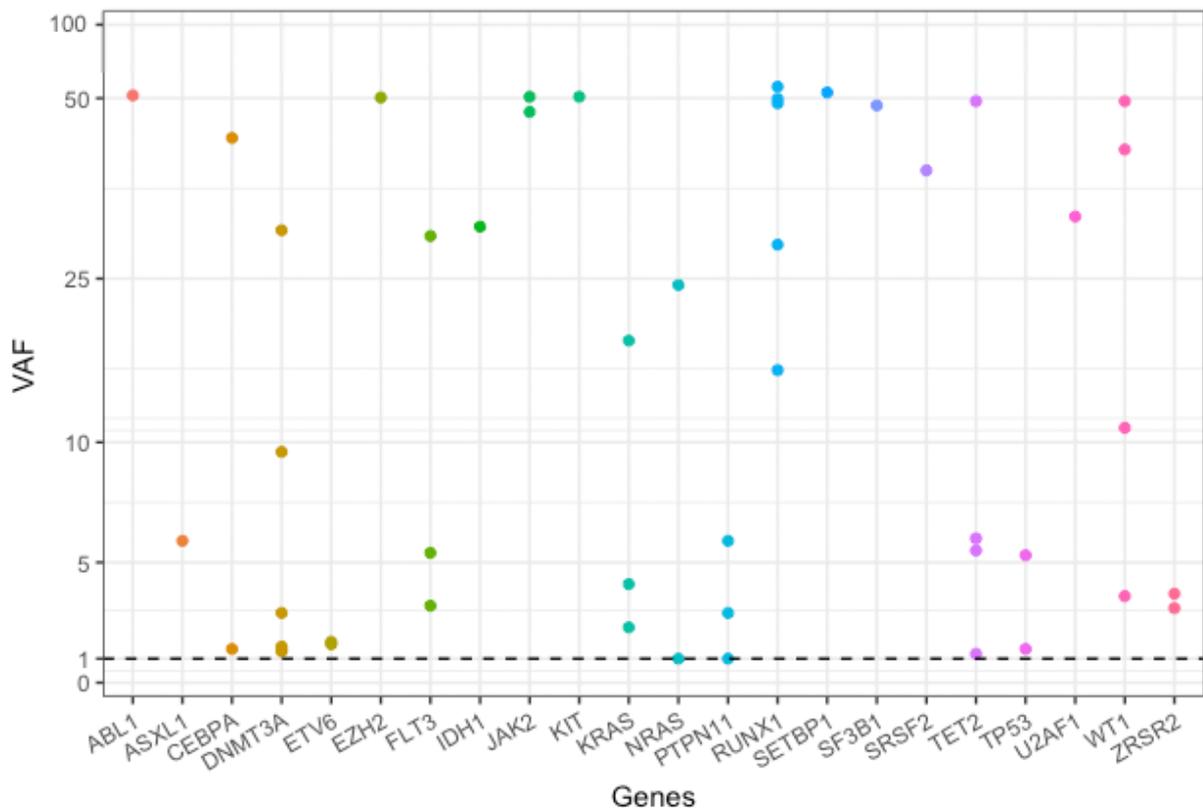


Figura 4.4. Fração Alélica das mutações detectadas.

Os dados de distribuição das mutações com padrão de comutação por paciente, são apresentados na tabela 4.3. As variantes foram classificadas pelo tipo de mutação em *missense*, *nonsense*, *frameshift* ou mutação em sítio de *splicing*. Os

genes pesquisados foram agrupados por categorias funcionais em genes envolvidos: na metilação do DNA (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH* e *IDH2*); em vias de sinalização intracelular (*FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *ABL1*, *CSF3R*, *JAK2*, *MPL*, *CBL* e *KIT*); modificadores da cromatina (*ASXL1* e *EZH2*); fatores de transcrição (*CEBPA*, *RUNX1* e *ETV6*); supressores tumorais (*TP53* e *WT1*); mecanismo de edição do RNA-spliceossoma (*SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2* e *U2AF1*); e Nucleofosmina 1 (*NPM1*). O risco citogenético do paciente ao diagnóstico é discriminado na parte superior da figura.

Figura 4.5. Padrão de comutação por paciente. Cada coluna representa 1 paciente dos 39 que tiveram o sequenciamento por NGS realizado em 1 amostra pré aloTCTH. Na primeira linha está apresentado o risco citogenético ao diagnóstico, conforme a legenda: verde (favorável), laranja (intermediário), vermelho (desfavorável) e em cinza os desconhecidos. Cada gene mutado está representado por um quadradinho colorido, e as cores diferentes, representam tipos de mutações diferentes, conforme a legenda. Ao final da tabela, está apresentado o número total de genes mutados por paciente. No caso do paciente 4, o mesmo apresentava 2 mutações diferentes em *KRAS* e em *NRAS*, além de 1 mutação em *PTPN11* e *SF3B1*, de forma que o número total de genes plotados é de 4, porém o número total de mutações é igual a 6. Da mesma forma, o paciente 33 apresentava 2 mutações missense diferentes no gene *FLT3*. A nomenclatura do tipo de mutação foi mantida, sem tradução, em língua inglesa.

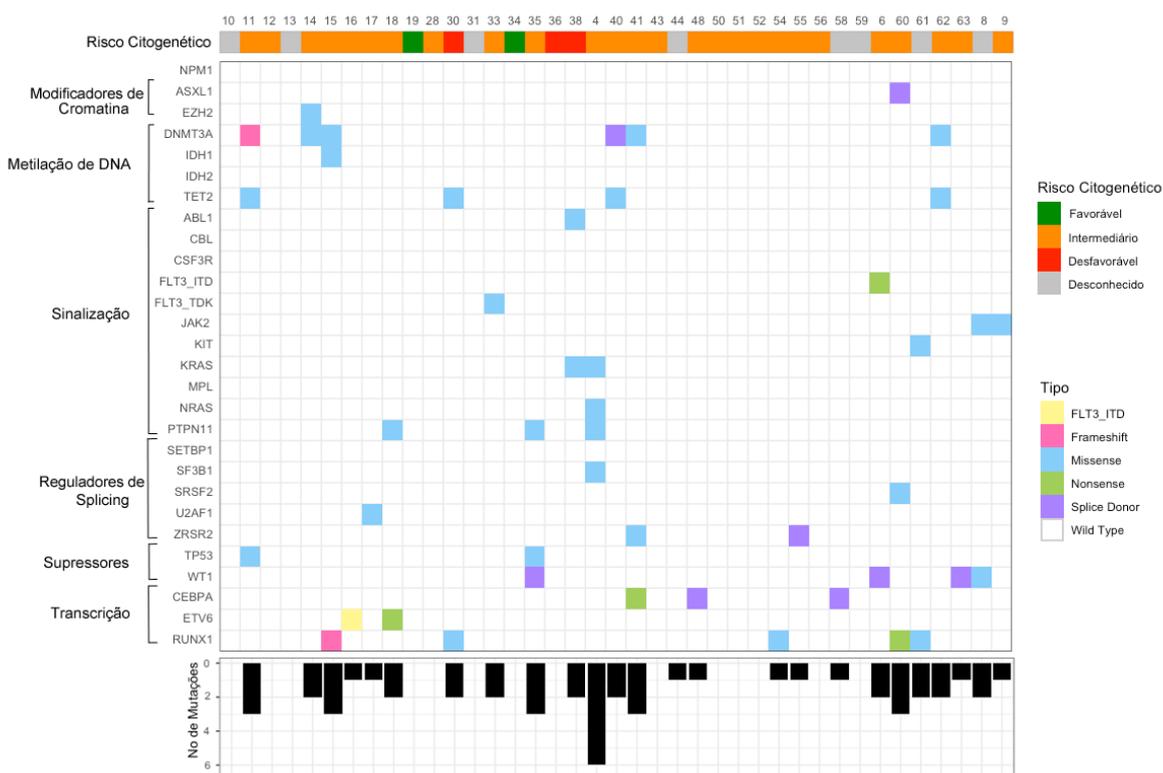
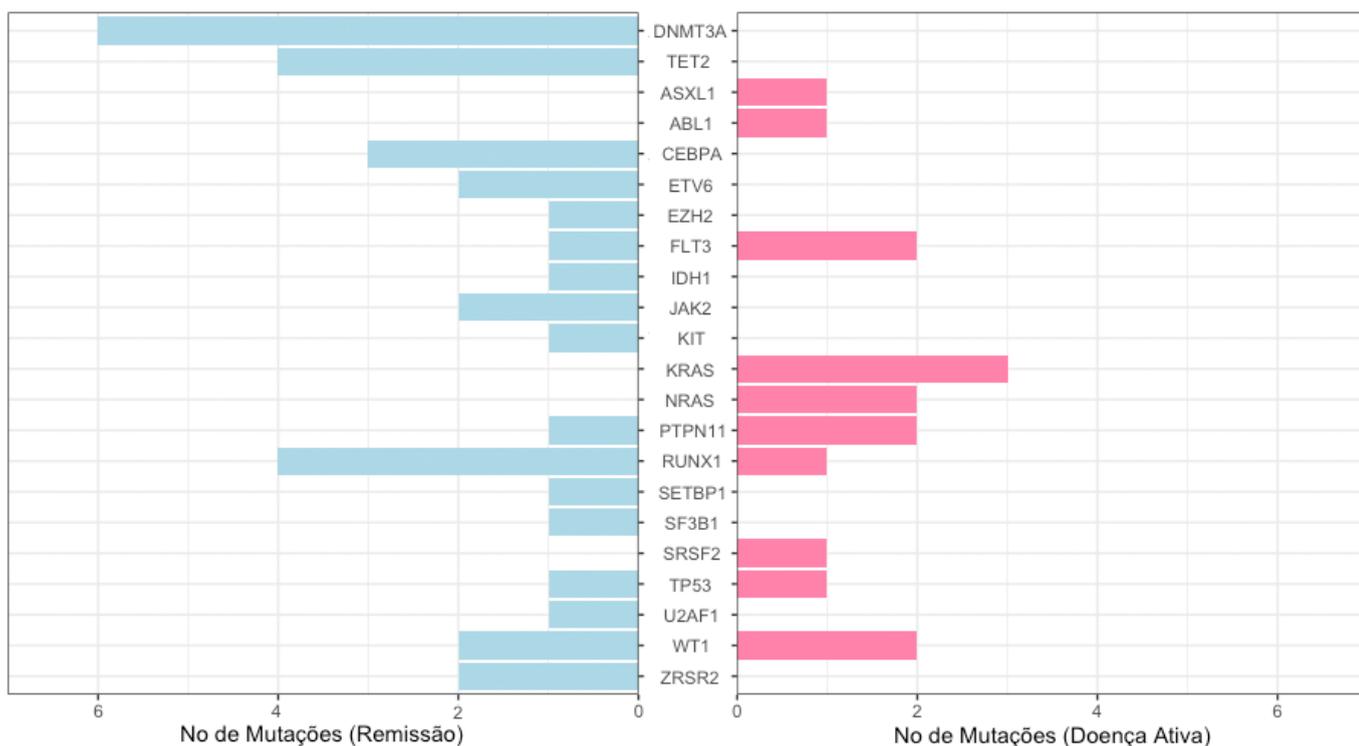


Figura 4.6. Distribuição comparativa das mutações por gene, com número de



mutações entre as amostras de pacientes com doença em remissão (azul) e com

n pacientes/amostras (total) = 33
 n pacientes com mutações = 19
 n mutações = 33
 mediana de mutações/paciente = 1 (0-3)

n pacientes/amostras (total) = 6
 n pacientes com mutações = 6
 n mutações = 16
 mediana de mutações/paciente = 2,5 (1-6)

doença ativa (rosa)

A análise comparativa do número de mutações encontradas por gene das amostras de pacientes que se encontravam em RC morfológica *versus* daquelas em que os pacientes se encontravam com doença ativa, é apresentada na figura 4.6. Na figura 4.7 está apresentada a análise comparativa do número de mutações encontradas por pacientes, também estratificada pelo estado da doença no momento da coleta da amostra (RC, Recidiva, Diagnóstico). Apesar do grupo ser pequeno, pode-se observar que os pacientes que tiveram a amostra coletada com a doença em atividade (ao diagnóstico ou na recidiva) apresentavam mais mutações; o número de mutações por paciente foi maior quando comparado aos pacientes com amostra coletada em RC; o padrão de genes acometidos por mutações também foi diferente.

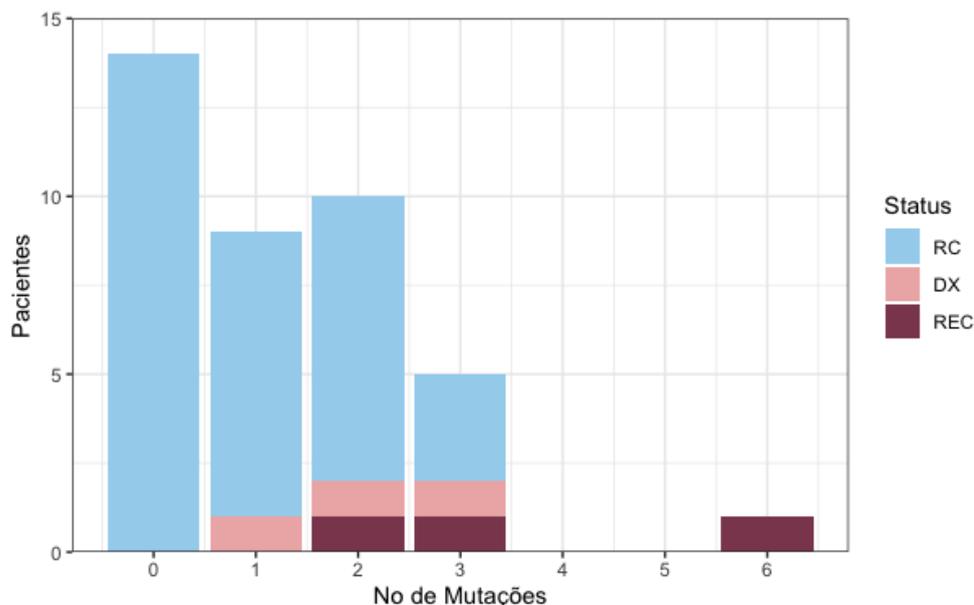


Figura 4.7. Número de mutações por paciente estratificado pelo estado da doença no momento da amostra. Abreviaturas: RC: remissão completa. Dx: Diagnóstico. REC: recidiva.

Além do perfil mutacional o número de mutações por pacientes (n=39) segundo status da doença no momento da coleta da amostra foi analisado. Ao comparar a frequência de mutações em pacientes em RC versus aqueles em que as amostras foram avaliadas ao diagnóstico ou na recidiva observou-se que dentre os casos em RC pre alo-TCTH mutações são menos frequentes (33/39, 84%) do que as amostras do diagnóstico (3/39, 8%) e da recidiva (3/39, 8%). Figura 4.7.

A tabela 4.3 lista todas as variantes encontradas e consideradas, para fins de análise descritiva e estatística, como patogênicas ou possivelmente patogênicas. Em destaque estão as variantes novas não encontradas na literatura ou em bases de dados somáticas (COSMIC) ou germinativas (CLINVAR). Essas foram analisadas com mais detalhes em função da frequência populacional e ferramentas in silico como discutido na metodologia. A descrição e as ferramentas utilizadas para a classificação das novas variantes, em sua maioria missense, é apresentada na Tabela 4.4. Da mesma forma, os dados clínicos, laboratoriais e genômicos completos de cada um dos 39 pacientes analisados por NGS (tabela suplementar 1).

Tabela 4.3. Listagem de todas as variantes com informações da localização no DNA codificante, consequência na modificação da proteína, e número de identificação nas bases de dados COSMIC e dbSNP, quando existente

ID do Paciente	Gene	Transcrito/Variante	Proteína	VAF	Tipo	Consequência	rs	Cosmic
4	<i>SF3B1</i>	NM_012433/3:c.2098A>G	p.(Lys700Glu)	49	SNV	Missense	rs559063155	-
4	<i>NRAS</i>	NM_002524/4:c.38G>A	p.(Gly13Asp)	24.1	SNV	Missense	rs121434596	-
4	<i>NRAS</i>	NM_002524/4:c.35G>A	p.(Gly12Asp)	24.1	SNV	Missense	rs121913237	-
4	<i>KRAS</i>	NM_004985:c.34G>T	p.(Gly12Cys)	4.1	SNV	Missense	rs121913530	-
4	<i>KRAS</i>	NM_004985:c.35G>T	p.(Gly12Val)	2.3	SNV	Missense	rs121913529	-
4	<i>PTPN11</i>	NM_002834/4:c.181G>T	p.(Asp61Tyr) D61Y	1	SNV	Missense	rs397507510	COSM13011
6	<i>WT1</i>	NM_001198551/1:c.504del	p.(Ser169Argfs*68)	3.6	Deleção	Frameshift	-	-
6	<i>FLT3</i>	NM_004119:c.1793_1794insGCTCAGA GAATATGA	p.(Glu598_tyr599ins LeuARgGLuTyrGlu)	3.2	Dup. In Tandem	<i>FLT3/ITD</i>	-	-
8	<i>WT1</i>	NM_001198551/1:c.412T>C	p.(Cys138Arg) / (C350R)	49.6	SNV	Missense	rs142059681	COSM21416
8	<i>JAK2</i>	NM_004972/3:c.1544A>T	p.(Asn515Ile)	48.1	SNV	Missense	-	-
9	<i>JAK2</i>	NM_004972/3:c.701G>A	p.(Arg234His)	50.2	SNV	Missense	-	COSM3907516
11	<i>TET2</i>	NM_001127208/2:c.4106C>T	p.(Ser1369Leu)	5.5	SNV	Missense	-	COSM447197
11	<i>TP53</i>	NM_000546/5:c.536A>G	p.(His179Arg)	5.3	SNV	Missense	rs1057519991	COSM10889
11	<i>DNMT3A</i>	NM_022552:c.1851+1G>A	p.(?)	1.4	SNV	Splicing	rs928051436	-
14	<i>EZH2</i>	NM_004456/4:c.553G>C	p.(Asp185His)	50.1	SNV	Missense	rs2302427	COSM 3762469
14	<i>DNMT3A</i>	NM_022552:c.1945G>A	p.(Val649Met)	1.5	SNV	Missense	-	-
15	<i>IDH1</i>	NM_0058963:c.394C>G	p.(Arg132Gly (R132G))	32.2	SNV	Missense	rs121913499	-
15	<i>DNMT3A</i>	NM_022552/4:c.2645G>A	p.(Arg882Cys (R882H))	31.7	SNV	Missense	rs147001633	-
15	<i>RUNX1</i>	NM_001754/4:c.958C>T	p.(Arg320*)	29.7	SNV	Nonsense	-	-
16	<i>ETV6</i>	NM_001987/4:c.163+4_163+7del	p.(?)	1.7	Del	Splicing	-	-
17	<i>U2AF1</i>	NM_006758/2:c.101C>T	p.(Ser34Phe (S34F))	33.6	SNV	Missense	rs371769427	COSM166866
18	<i>PTPN11</i>	NM_002834/4:c.226G>A	p.(Glu76Lys (E76K))	2.9	SNV	Missense	-	COSM13000
18	<i>ETV6</i>	NM_001987/4:c.1153-1_1165del	p.(?)	1.6	Indel	Splicing	-	-
30	<i>RUNX1</i>	NM_001754/4:c.167T>C	p.(Leu56Ser)	49.3	SNV	Missense	rs111527738	COSM24756

ID do Paciente	Gene	Transcrito/Variante	Proteína	VAF	Tipo	Consequência	rs	Cosmic
30	TET2	NM_001127208/2:c.4043A>G	p.(Gln1348Arg)	6	SNV	Missense	-	COSM6498492
33	FLT3	NM_004119/2:c.2503G>T	p.(Asp835Tyr)	30.9	FLT3TKD (D835Y)	FLT3TKD (D835Y)	rs121913488	COSM783
33	FLT3	NM_004119/2:c.2504A>T	p.(Asp835Val)	5.4	FLT3TKD	FLT3TKD	rs121909646	COSM784
35	WT1	NM_024426/4:c.1129_1135dup	p.(Val379Aspfs*8)	10.6	Inserção (Duplicação)	Frameshift	-	COSM27297
35	PTPN11	NM_002834/4:c.214G>A	p.Ala72Thr	5.9	SNV	Missense	rs121918453	-
35	TP53	NM_000546/5:c.646G>A	p.Val216Met	1.4	SNV	Missense	rs730882025	COSM10667
38	ABL1	NM_005157/5:c.589G>A	p.Glu197Lys	50.4	SNV	Missense	-	-
38	KRAS	NM_004985/4:c.64C>A	p.Gln22Lys	16.4	SNV	Missense	rs121913236	COSM543
40	TET2	NM_017628/4:c.2599T>C	p.Tyr867His (Y867H)	49.6	SNV	Missense	rs144386291	COSM327337
40	DNMT3A	NM_022552/4:c.1339_1348del	p.Ala447Hisfs*201	2.9	Deleção	Frameshift	-	-
41	ZRSR2	NM_005089/3:c.646A>T	p.Arg216Trp	3.7	SNV	Missense	-	-
41	DNMT3A	NM_022552/4:c.884T>A	p.Leu295Gln	1.3	SNV	Missense	-	-
44	SETBP1	NM_015559/2:c.1058_1059delinsTC	p.Asp353Val	50.8	SNV	Missense	-	-
48	CEBPA	NM_004364/4:c.367_368del	p.GlySerfs*46	1.4	Deleção	Frameshift	-	-
54	RUNX1	NM_001754/4:c.319C>T	p.Arg107Cys	12.3	SNV	Missense	-	COSM24736
55	ZRSR2	NM_005089/3:c.115_116del	p.Asp39Leufs*15	3.1	Deleção	Frameshift	-	-
58	CEBPA	NM_04364/4:c.411_412ins145	p.Tyr138Profs*80	44.5	Inserção	Frameshift	-	-
60	RUNX1	NM_001754/4:c.967+2_967+5del	p.?	51.6	Indel	Splicing	RCV001215896.1	COSM25150
60	SRSF2	NM_003016/4:c.281_283dup	p.Arg94dup	40	Inserção (Duplicação)	Missense	-	-
60	ASXL1	NM_015338/5:c.3073_3074del	p.Lys1025Glyrfs*8	5.9	Deleção	Frameshift	-	-
61	KIT	NM_000222/2:c.1588G>A	p.Val530Ile	50.2	SNV	Missense	rs72550822	COSM1155
61	RUNX1	NM_001754/4:c.167T>C	p.Ley56Ser	49.9	SNV	Missense	rs111527738	COSM24756
62	DNMT3A	NM_022552/4:c.2644C>T	p.Arg882Cys (R882C)	9.6	SNV	Missense	rs377577594	COSM53042
62	TET2	NM_017628/4:c.2599T>C	p.Tyr867His	1.2	SNV	Missense	rs144386291	COSM327337
63	WT1	NM_024426/4:c.1141_1144dup	p.Ala382Valfs*4	42.9	Inserção (Duplicação)	Frameshift	-	COSM21392

Tabela 4.4. Critérios utilizados para discriminação de variantes novas, catalogadas segundo a alteração no DNA codificante, a consequência proteica prevista e as informações das plataformas de predição de alteração deletéria.

ID	NOVA VARIANTE			PLATAFORMA DE AVALIAÇÃO - SNV			PLATAFORMA DE AVALIAÇÃO - SPLICING			INFORMAÇÃO ADICIONAL				
	Gene	Transcrito/Variante	Proteína	Mutation Taster	phyloP(-14 ; 6,4)	Polyphen	SIFT	SpliceSite Finder	MaxEnt	NNSPLICE	Grantha m dist (5;215)	Align GVDG	gnomAD	Alamute
60	ASXL1	NM_015338/5:c.3073_3074del	p.Lys1025Glyrfs*8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	CEBPA	NM_004364/4:c.367_368del	p.GlySerfs*46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	CEBPA	NM_04364/4:c.411_412ins145	p.Tyr138Profs*80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	DNMT3A	NM_022552:c.1851+1G>A	p.(?)	-	-	-	-	-100%	-100%	-100%	-	g	0.0016%	Localizada do sítio de splice doador do intron 15. A consequência não é previsível, mas uma perda do exon 15 é muito provável.
14	DNMT3A	NM_022552:c.1945G>A	p.(Val649Met)	Disease Causing (1)	Highly Conserved (5,77)	Highly Conserved	Deleterius	0%	0%	-16.50%	21	C0	-	
40	DNMT3A	NM_022552/4:c.1339_1348del	p.Ala447Hisfs*201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	DNMT3A	NM_022552/4:c.884T>A	p.Leu295Gln	Disease Causing (1)	Highly Conserved (4,48)	Highly Conserved	Deleterius	-	-	-	113	C65	-	
16	ETV6	NM_001987/4:c.163+4_163+7del	p.(?)	-	-	-	-	-40.90%	-100%	-100%	-	-	-	A consequência não é previsível mas uma perda do exon 2 é possível.
18	ETV6	NM_001987/4:c.1153-1_1165del	p.(?)	-	-	-	-	-100%	0	-100%	-	-	-	Altera o sítio de splice acceptor do exon 7. A consequência não é previsível, mas uma perda so exon 7 é muito provável.
8	JAK2	NM_004972/3:c.1544A>T	p.(Asn515Ile)	Disease Causing (1)	4.32	-	Deleterius	-	-	-	149	C0	-	Afeta o exon 12 , no domínio tirosina kinase
60	RUNX1	NM_001754/4:c.967+2_967+5del	p.?	-	-	-	-	-23.90%	-100%	-100%	-	-	-	A consequência não é previsível mas uma perda do exon 3 é muito provável.

ID	NOVA VARIANTE		PLATAFORMA DE AVALIAÇÃO - SNV				PLATAFORMA DE AVALIAÇÃO - SPLICING				INFORMAÇÃO ADICIONAL		
	Gene	Transcrito/Variante	Proteína	Mutation Taster	phyloP(-14; 6,4)	Polyphen	SIFT	SpliceSite Finder	MaxEnt	NNSPLICE	Grantha m dist (5;215)	Align GVG D	gnomAD
44	SETBP1	NM_015559/2:c.1058_1059delinsTC	p.Asp353Val	-	-	Highly Conserved	Deleterius	-	-	-	152	C35	-
6	WT1	NM_001198551/1:c.504del	p.(Ser169Argfs*68)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	WT1	NM_024426/4:c.1141_1144dup	p.Ala382Valfs*4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	ZRSR2	NM_005089/3:c.646A>T	p.Arg216Trp	Disease Causing (1)	Weakly Conserved (1,09)	Highly Conserved	Deleterius	-	-	-	111	C65	-
55	ZRSR2	NM_005089/3:c.115_116del	p.Asp39Leufs*15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.4. Correlação Clínico-Molecular com Desfechos

Com uma mediana de seguimento de 6 anos (2,2 – 10,0), a sobrevida global da coorte em 5 anos foi de 41,4% (IC95 30,6 – 56,1%). A incidência acumulada de recidiva em 5 anos foi de 27,0% (IC95 18,0-40,5%) e a mortalidade não-relacionada à recidiva de 31,2% (IC 21,4-45,6%), levando à uma sobrevida livre de recidiva de 41,8% (IC95 31,0-56,4%).

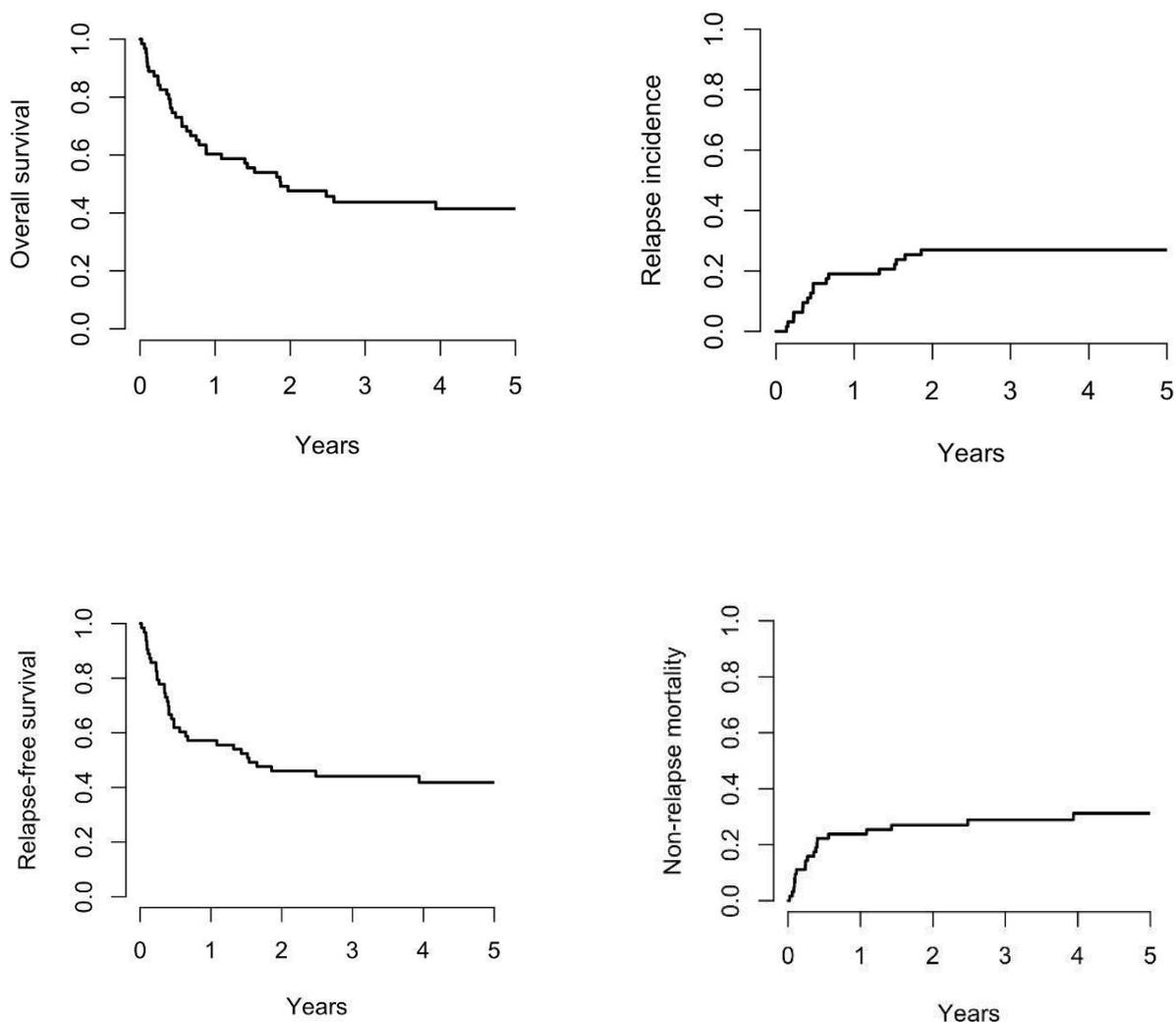


Figura 4.8. Curvas de Kaplan-Meier A) Sobrevida global em 5 anos. B) Incidência acumulada de recidiva. C) Sobrevida livre de recidiva em 5 anos. D) Mortalidade não relacionada à recidiva. Abreviaturas: Overall survival (do inglês sobrevida global), Relapse Incidence (do inglês, incidência acumulada de recidiva), Relapse free survival (do inglês, sobrevida livre de recidiva), Non-relapse mortality (do inglês, mortalidade não relacionada à recidiva), years (do inglês, anos).

4.4.1. Sobrevida Global

Ao todo, 36 pacientes faleceram no período de acompanhamento de janeiro de 2010 a janeiro de 2020. A principal causa de óbito foi LMA recidivada/refratária em 47% (n=17) dos casos, seguida por infecção (n=10, 28%), DECH (n=3, 8%), hemorragia (n=2, 5%), doença venooclusiva hepática - VOD (n=1, 3%), dentre outras (colecistite aguda n=1, 3% e causas desconhecidas n=2, 5%). A distribuição das causas de óbito está representada na figura 4.8.A. Na figura 4.8.B, as causas de óbitos foram discriminadas por período de ocorrência após o transplante e mostra que 30% (n=11) do óbitos totais ocorreram no período compreendido entre o D0 e o D+100 (<100 dias) após alo-TCTH, enquanto 70% (n=25) ocorreram após o D+100 (>100 dias). No período <100 dias, a principal causa de óbito foi infecção em 45% (n=5) dos casos, seguida por hemorragia (n=2, 18%), LMA R/R (n=1, 9%), DECH (n=1, 9%) e outros (n=1, 9%). A causa de óbito classificada como "outros" foi uma colecistite aguda alitiásica complicada. No período >100 dias, 64% (n=16) dos óbitos se deveram à LMA R/R, 20% (n=5) à infecção, 8% (n=2) à DECH e 8% (n=2) à causas desconhecidas.

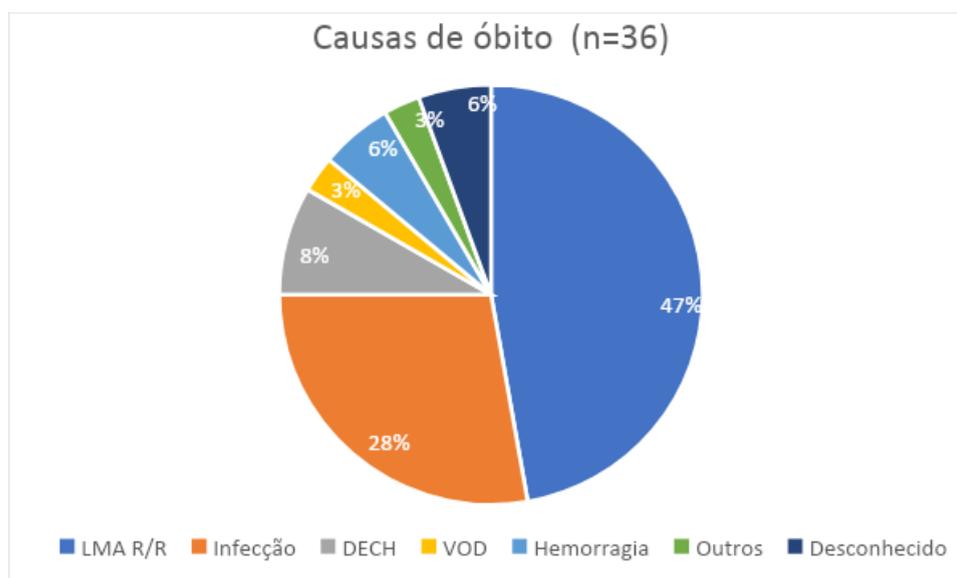


Figura 4.9. Distribuição percentual das causas de óbito total.

Abreviações: LMA R/R: LMA recidivada/refratária. VOD: doença venooclusiva hepática (do inglês veno-occlusive disease).

Na análise univariada para sobrevida global, foram testadas todas as características relativas aos pacientes e ao transplante apresentadas nas tabelas 4.1 e 4.2. Na tabela 4.5, estão apresentadas as variáveis que demonstraram impacto no risco de morte com p valor abaixo de 0,1 além de todas as variáveis potenciais

confundidoras com HR <0,61 ou >1,65, valores que representam valores de β -0,5 e + 0,5, respectivamente.

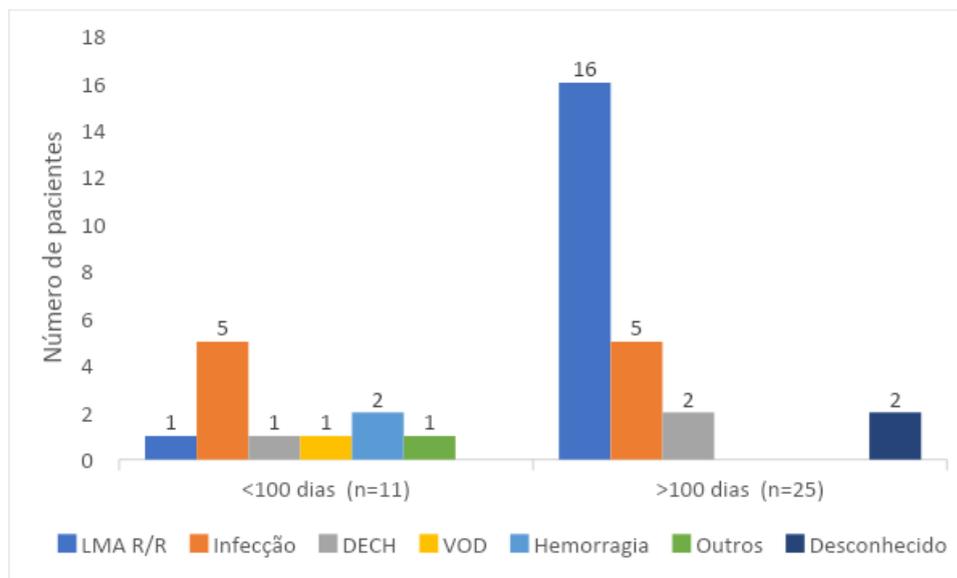


Figura 4.10. Causas de óbito por período.

Abreviaturas: <100 dias, compreende o período do D0 ao D+100. >100 dias: compreende o período após o D+100. LMA R/R: LMA recidivada/refratária. VOD: doença venooclusiva.

As variáveis tempo entre o diagnóstico e alo-TCTH >365 dias e estado da doença na avaliação pré-transplante de doença ativa ou RC DRM+ aumentaram o risco de mortalidade global significativamente, mais de 2 vezes, com HR de 2,08 (IC 95% 1,04-4,18) e 2,32 (IC 1,02-5,25) respectivamente, com p semelhante, de 0,04. As variáveis idade (como variável contínua ou categorizada em > ou <60 anos), sexo, tipo de LMA, compatibilidade HLA, fonte de CTH, sexo do doador, idade do doador, compatibilidade ABO, número de células CD34, tipo de condicionamento e DECH aguda ou crônica, não se correlacionaram de forma estatisticamente significativa com maior risco de morte. O achado de HR “protetor” para DECH crônica provavelmente se deve ao viés de seleção, não tendo sido considerado nas análises.

Além destas análises, categorizamos as datas de realização do transplante em antes ou depois de 2015, para avaliar possível correlação entre os diferentes períodos com o risco de morte, porém não foi encontrada relação estatisticamente significativa.

Tabela 4.5. Resultados da análise univariada para as características clínicas e a sobrevida global

Variável	HR	IC 95%	p
Tempo Dx – alo-TCTH > 365 dias	2.08	1,04-4,18	0.04
Risco Citogenético			
Favorável	Ref	Ref	Ref
Intermediário	1.22	0,36-4,14	0,75
Desfavorável	1.90	0,05-7,15	0,34
Ferritina > 550	5,88	0,80-43.0	0.08
Doador/Compatibilidade HLA			
Aparentado	ref	ref	
NAP	1.74	0,75-4,07	0,20
Haploidentico	1,26	0,38-4,19	0,70
SCU	0,99	0,13-7,32	0,99
Doença Ativa x RC (RC1 ou RC2+)	2.45	0.96-6.25	0.06
RC DRM+ x DRM –	2.21	0.89-5.51	0.08
Doença ativa ou RC DRM+ x RC DRM –	2.32	1.02-5.25	0.04
DECH crônica	0,22	0,09 – 0,51	0,0004

A análise multivariada por modelo de Cox para sobrevida global encontra-se na tabela 4.6. Identificamos como fatores de risco as variáveis: tempo entre diagnóstico e alo-TCTH >365 dias com HR 2,70 (IC95 1,28-5,74, p 0,009), RC DRM+ ou doença ativa (comparada com RC DRM–) com HR 2,46 (IC95 1,07-5,66, p 0,03) e risco citogenético desfavorável ao diagnóstico com HR 4,2 (IC95 1,05-16,8, p 0,04).

Tabela 4.6. Análise multivariada para sobrevida global com dados do perfil clínico.

Variável	HR	IC 95%	p
RC DRM+ ou Doença ativa x RC DRM–	2,46	1,07-5,66	0,03
Tempo entre Diagnóstico e aloTCTH > 365 x <365 dias	2,70	1,28-5,74	0,009
Risco citogenético			
Favorável	Ref	Ref	Ref
Intermediário	2,10	0,60-7,46	0,24
Desfavorável	4,20	1,05-16,8	0,04

O estado da doença ativa ou de RC DRM+ foi avaliado também pelas curvas de Kaplan-Meier para avaliação da sobrevida livre de recidiva (SLR), mostradas na

figura 4.11A. Na figura 4.11B, as SLR dos subgrupos doença ativa e CR DRM+ foram agrupadas.

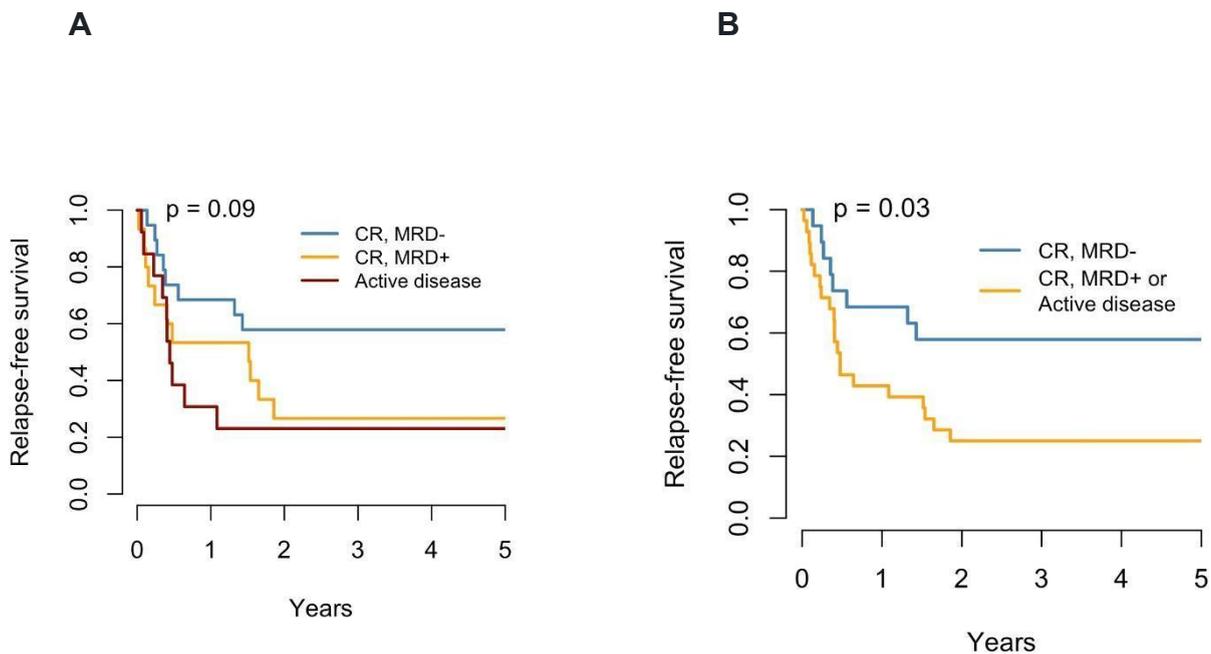


Figura 4.11. Sobrevida livre de recidiva entre os diferentes grupos de estado de doença ao transplante. CR, MRD⁻ (remissão completa com doença residual mensurável negativa por citometria de fluxo). CR, MRD⁺ (remissão completa com doença residual mensurável positiva por CF). Active disease (doença ativa).

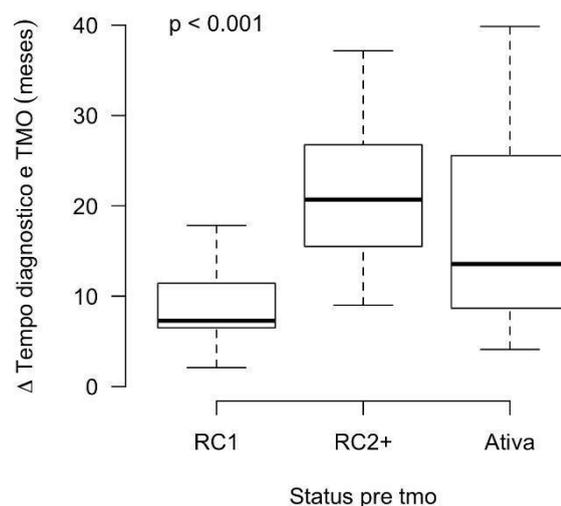


Figura 4.12. Box plot com a representação da mediana e variação do tempo Dx-alo-TCTH nos diferentes subgrupos de estado de doença ao transplante. Abreviaturas: RC1: primeira remissão completa. RC2+: segunda remissão completa ou posterior. Ativa: doença ativa.

A associação do tempo entre diagnóstico e alo-TCTH com o estado da doença pré-transplante (RC1, RC2+ ou doença ativa) foi analisada por meio do teste de Kruskal-Wallis, mostrando medianas de tempo diferentes e significativamente menores para os pacientes em RC1, conforme pode ser observado na figura 4.12.

4.4.2. Mortalidade não relacionada à recidiva

O número de óbitos não relacionados à recidiva nesta coorte foi de 19. A análise univariada entre as características clínicas e o risco de morte não relacionada à recidiva (TRM) é mostrada na tabela 4.7. Os principais parâmetros com significância estatística foram: tempo entre o diagnóstico da LMA e o alo-TCTH > 365 dias (HR 2,5, IC95 0,96-6,55, p 0,062), os tipos de doador não-aparentado (HR 4,14, IC95 1,6-10,74, p 0,003) e haploidêntico (HR 3,96 IC95 0,94-16,7, p 0,06), a incompatibilidade ABO e a presença de mismatch HLA.

Tabela 4.7. Análise univariada da mortalidade não relacionada à recidiva.

Variável	HR	IC 95%	p
Idade ao transplante	1.01	0.97-1.04	0.69
Sexo	0.98	0.41-2.33	0.96
Tempo Dx- aloTCTH >365 dias	2.50	0.96-6.55	0.06
LMA De novo x Secundária	0.81	0.34-1.95	0.64
Risco Citogenético Intermediário	1.96	0.25-15.63	0.53
Risco Citogenético Desfavorável	3.70	0.45-30.64	0.23
NAP	4.14	1.6-10.74	0.003
HAPLO	3.96	0.94-16.7	0.06
SCU	2.66	0.43-16.33	0.29
Condicionamento RIC x MAC	0.94	0.32-2.81	0.92
Ferritina >550	1.70	0.23-12.86	0.60
Idade Doador (cada acréscimo de 10 anos)	0.93	0.72-1.21	0.60
Fonte MO x SP ou SCU	0.59	0.24-1.44	0.25
Incompatibilidade ABO	3.42	1.37-8.51	0.008
HLA com MM	3.07	1.22-7.74	0.01
RC DRM+ x RC DRM-	0.92	0.26-3.22	0.89
Doença Ativa x RC (RC1 ou RC2+)	1.29	0.43-3.87	0.65
Número de células CD 34x 10 ⁶ /Kg receptor	1.01	0.82-1.26	0.90
GVHD agudo	0.78	0.27-2.24	0.64
GVHD crônico	1.59	0.61-4.12	0.34
Alo-TCTH depois >2015	0.64	0.21-1.96	0.43

Na análise multivariada da TRM, a presença de incompatibilidade ABO, o tipo de doador não aparentado, e o mismatch HLA (MM HLA) mostraram correlação significativa com a TRM. A incompatibilidade ABO com HR de 2,97 (IC95 1,27-6,91, p 0,01) e o transplante não aparentado com HR 3,77 (IC95 1,7-8,38, p 0,001). Os transplantes com MM HLA (n=11) foram na quase totalidade os transplantes com doador haploidêntico (n=6) ou de SCU (n=2), e aumentaram a TRM em 3,04 vezes (IC95 1,65-5,58) com p 0,0003.

Tabela 4.8. Análise multivariada para Morte não relacionada à recidiva.

Variável	HR	IC 95%	p
Incompatibilidade ABO	2,97	1,27-6,91	0,01
NAP (x ap)	3,77	1,70-8,38	0,001
Haplo (x ap)	1,23	0,29-5,28	0,78
SCU (x ap)	0,87	0,29-2,56	0,80
MM HLA	3,04	1,65-5,58	0,0003

4.4.3. Recidiva

Inicialmente foram avaliados apenas os parâmetros clínicos e do transplante em toda a coorte (n=63 pacientes). No período de acompanhamento, 17 pacientes evoluíram com recidiva e óbito pela doença. Na tabela 4.9, estão apresentadas as variáveis que demonstraram impacto no risco de recidiva com p abaixo de 0,1 além de todas as variáveis potenciais confundidoras com HR <0,61 ou >1,65 e com valores que representam um β de -0,5 e + 0,5. As variáveis idade, sexo, tipo de LMA, risco citogenético, compatibilidade HLA, fonte de CTH, sexo do doador, idade do doador, compatibilidade ABO, quantidade de CD34, tipo de condicionamento e DECH aguda ou crônica, não se correlacionaram de forma estatisticamente significativa com maior risco de recidiva.

Tabela 4.9. Univariada das características do perfil clínico com impacto em recidiva.

Variável	HR	IC 95%	P
Sexo	2.36	0.83-6.72	0.110
Fonte MO x SP ou SCU	3.39	0.77-14.82	0.110
RC DRM+ x RC DRM-	4.96	1.03-23.91	0.046
Doença Ativa x RC DRM-	4.46	0.86-23.01	0.075
RC DRM+ ou Dça Ativa x RC DRM-	4.74	1.06-21.2	0.042

A análise multivariada foi realizada com as variáveis clínicas de maior impacto medidas pelo HR. No modelo de Cox, a fonte de CTH de medula óssea aumentou risco de recidiva em 4,29 vezes (IC95 0,95-11,4), quando comparado à fonte SP, com p valor de 0,06. A presença de DRM+ por CFM mostrou impacto com HR de 4,8 e p 0,05. A presença de doença ativa ao transplante apresentou o maior impacto com p significativo, com HR de 7,62 (IC95 1,45-40,1) e p 0,02. .

Tabela 4.10. Análise multivariada para recidiva com características clínicas.

Variável	HR	IC 95%	P
RC DRM+ X RC DRM-	4,80	1,00-23,2	0,05
Doença ativa X RC	7,62	1,45-40,1	0,02
Fonte MO x SP	4,29	0,95-11,4	0,06

Para os 39 pacientes em que pudemos analisar o perfil genômico da doença em um momento pré-transplante, avaliamos o impacto das alterações genéticas no risco de recidiva. Pois, o impacto biológico esperado ocorre no aumento do risco da recidiva da doença. Por esse motivo, e por se tratar de uma coorte pequena, serão demonstrados apenas os resultados das análises da correlação entre os dados genômicos com o desfecho recidiva após alo-TCTH.

Tabela 4.11. Análise univariada do risco de recidiva, por gene mutado, na coorte com NGS (n=39).

	HR	95%CI	p
<i>ABL1</i>	3.7	0.47-29.2	0.21
<i>ASXL1</i>	1.7	0.22-13.0	0.61
<i>DNMT3A</i>	1.96	0.54-7.12	0.31
<i>ETV6</i>	2.32	0.3-17.94	0.42
<i>EZH2</i>	2.63	0.34-20.27	0.35
<i>FLT3_ITD</i>	7.09	0.83-60.6	0.074
<i>JAK2</i>	1.41	0.18-10.8	0.74
<i>KRAS</i>	6.58	1.38-31.2	0.018
<i>NRAS</i>	18.49	1.68-203.9	0.017
<i>PTPN11</i>	3.29	0.72-15.0	0.12
<i>RUNX1</i>	0.52	0.07-3.97	0.53
<i>SF3B1</i>	18.49	1.68-203.9	0.017
<i>TET2</i>	5.11	1.38-18.92	0.015
<i>TP53</i>	11.2	2.23-56.27	0.0034
<i>WT1</i>	1.84	0.41-8.34	0.43

Na análise univariada, as mutações genéticas que demonstraram maior aumento no risco de recidiva foram nos genes *FLT3-ITD*, *KRAS*, *NRAS*, *SF3B1*, *TET2* e *TP53*, com p significativo, ilustrado na tabela 4.11.

Três modelos de Cox foram realizados para as análises multivariadas unindo os dados clínicos e laboratoriais encontrados na coorte total (n=63) com os dados genômicos dos 39 pacientes com resultados do NGS.

O primeiro deles, inserindo a avaliação do impacto de se encontrar ou não a presença de mutações genéticas e analisando o número de mutações por paciente como uma variável contínua. Neste modelo, mesmo ajustando para o estado da doença ao transplante, a presença de uma mutação aumentou o risco de recidiva em 1,54 vezes (IC95 1-2,36 p 0,049). Cada mutação adicional, por paciente, aumentou o risco nesta mesma magnitude, pois a variável foi analisada como variável contínua.

Tabela 4.12. Análise multivariada com fatores clínicos e a presença de uma ou mais mutação por paciente.

Variável	HR	IC 95%	P
RC DRM +	3,17	0,61-16,4	0,170
Doença ativa	5,90	1,00-34,7	0,049
Fonte MO	2,03	0,43-9,47	0,370
Número de mutações *	1,54	1,00-2,36	0,049

*cada mutação adicional aumenta o risco em 1,54x, pois foi avaliado como variável contínua.

O segundo modelo testado (tabela 4.13), foi avaliando a presença ou ausência de mutações em genes encontrados na análise univariada como de maior impacto negativo na taxa de recidiva nesta coorte, ou seja, todos os que apresentaram HR elevado, com resultado de p valor menor do que 0,05 (*FLT3-ITD*, *NRAS*, *KRAS*, *TET2*, *SF3B1* e *TP53*). Neste modelo, ajustado pelo estado da doença ao transplante, a presença de DRM+ por citometria de fluxo e a presença de mutações em pelo menos um dos genes *FLT3-ITD*, *KRAS*, *NRAS* ou *TP53* mostraram aumento do risco de recidiva com significância estatística. A presença de mutação em um dos genes citados anteriormente mostrou uma interação importante com aumento da recidiva, com HR de 17,8 e p valor de 0,0025.

Tabela 4.13. Análise multivariada com modelo dos genes de maior impacto nesta coorte.

Variável	HR	IC 95%	p
RC DRM +	6,69	1,70-42,0	0,04
Doença ativa	4,13	0,67-25,3	0,13
Mutação em FLT3-ITD ou KRAS ou NRAS ou TP53	17,9	2,76-116	0,003

Por fim, o terceiro modelo de análise, considerando o grande número de amostras avaliadas com pacientes em remissão, foi a avaliação do impacto das mutações nos principais genes envolvidos em hematopoiese clonal, chamados conjuntamente de DTA (*DNMT3A*, *TET2* e *ASXL1*). Nesta análise, incluímos tanto a presença ou ausência da detecção de mutações em qualquer desses genes específicos quanto a presença de mais de uma mutação nesses genes por paciente. Nesse modelo, vemos que não há impacto significativo da presença de mutações DTA quando se ajusta para DRM por citometria de fluxo e doença ativa. Observamos um aumento no risco de recidiva na presença de 2 ou mais mutações nestes genes, com HR de 5,74 (IC 95 0,97-33,9) e p 0,05. A DRM por citometria de fluxo perde a significância estatística quando ajustada pelas outras variáveis. Esse modelo foi testado tanto os 39 pacientes com resultados moleculares quanto apenas nos 33 pacientes com estado de doença RC no momento da coleta da amostra. Os resultados foram semelhantes, sendo apresentado o resultado das amostras em RC, n=33.

Tabela 4.14,. Análise multivariada com o modelo dos genes DTA, nas amostras com estado de doença RC no momento da coleta.

Variável	HR	IC 95%	p
Doença ativa x RC (RC1 ou RC2+)	8,70	1,64-46,1	0,01
RC DRM+ x RC DRM-	2,41	0,41-14,0	0,33
Mutação em “DTA” (Sim x Não)	2,25	0,56-8,97	0,25
Mutação em “DTA” (> 1 mutação sim x não)	5,74	0,97-33,9	0,05

4.5. Estudo de Casos com Análises Longitudinais

Três casos foram selecionados para avaliação longitudinal de evolução clonal após a realização das análises de amostras pré-transplantes. Dois pacientes apresentavam mutações em *TP53* detectável na amostra pré transplante e dispunham de amostra de DNA do momento da recidiva pós transplante e foram escolhidos por este motivo.

O terceiro caso, foi selecionado para a análise longitudinal pela existência de amostras seriadas do diagnóstico até a recidiva e da posterior progressão de doença, também disponíveis eram os dados sobre o tratamento realizado. A seguir segue a descrição dos 3 casos selecionados para a análise longitudinal.

4.5.1. Caso 11

Trata-se de paciente do sexo masculino, de 58 anos, que foi diagnosticado com LMA em fevereiro de 2011. Não havia informação disponível quanto ao subtipo de LMA (De novo? Secundária?), porém foi observado cariótipo normal ao diagnóstico. Recebeu quimioterapia de indução de remissão com protocolo 7+3 e atingiu remissão completa da doença.

Em julho de 2012, 512 dias após o diagnóstico, foi submetido a transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas. O estado da doença foi avaliado no D-7, antes do início do condicionamento, quando o paciente se encontrava em primeira remissão completa com doença residual mínima negativa por citometria de fluxo.

O paciente recebeu um enxerto com CTH da medula óssea, de um doador aparentado, de 64 anos, do sexo masculino, sem disparidade HLA, ABO compatível. As sorologias para CMV do receptor e doador, eram positivas.

O regime de condicionamento utilizado, de intensidade reduzida, foi com Bussulfano e ciclofosfamida. A profilaxia da doença enxerto contra o hospedeiro (DECH) foi realizada com metotrexato e ciclosporina em doses habituais. O número de células CD34 positivas infundidas foi de $1,8 \times 10^6$ CD3/Kg. O tempo para a recuperação neutrofílica, com neutrófilos sustentados acima de 500mm^3 , ocorreu no D+19. O paciente não apresentou GVHD agudo nem crônico. O quimerismo, avaliado no D+30, era misto (<95% de células de origem do doador).

A recidiva da LMA ocorreu no D+49 e o óbito relacionado à doença ocorreu no D+68.

A tabela 4.15 abaixo mostra as características relacionadas às amostras sequenciadas deste mesmo paciente, em 2 momentos diferentes. Momento 1, na avaliação da medula óssea no D-7 do pré-transplante alogênico, antes do início do condicionamento, quando se encontrava em RC1 com DRM– por citometria de fluxo (sensibilidade 10^{-3} - 10^{-4}). Momento 2, na avaliação da MO na recidiva da LMA, no D+49 do transplante.

Tabela 4.15. Dados das amostras sequenciadas por NGS, do Caso 11.

Time point/ status	% Blastos (CF)	Mutações (n)	Genes	VAF (%)	Cariótipo
1 = RC (pré TCTH)	0	3	TET2 TP53 DNMT3A	5,5 5,3 1,4	46,XY
2 = Recidiva (pós TCTH)	75	2	TET2 TP53	77,9 80	45,XY,t(2;3)(p21;q29),-4, dic(9;17)(q10;q10),del(10)(p12),+ mar[15]/ 46,XY[10]

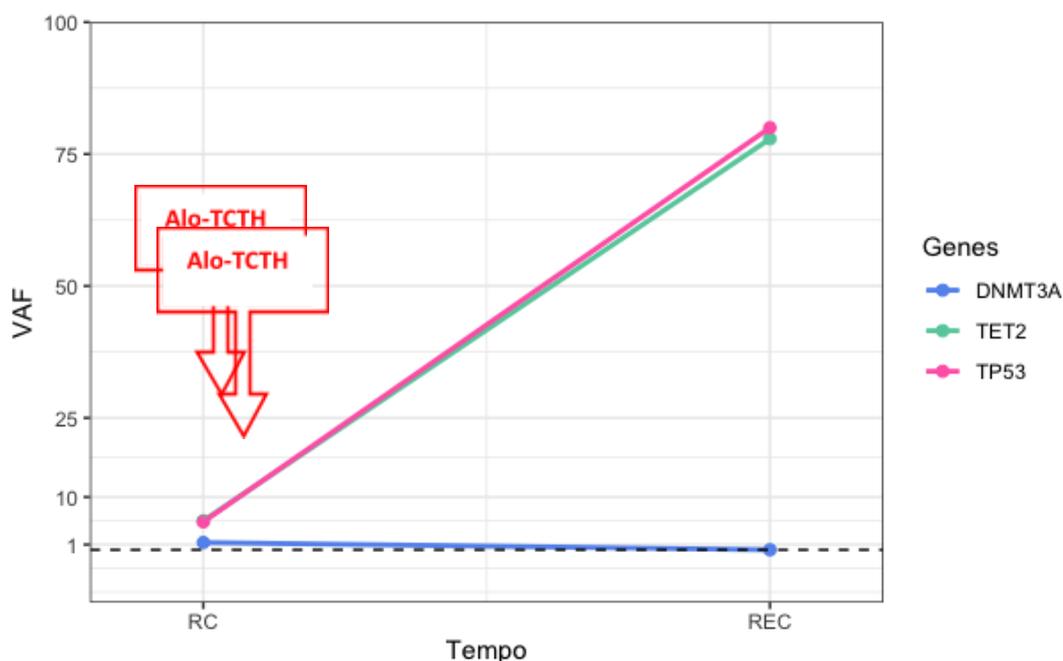


Fig 4.13. Caso 11. Evolução das mutações após o transplante alogênico. No momento da avaliação pré-transplante, apesar de se encontrar em primeira remissão completa com DRM– por CF, mutações em *TET2*, *TP53* e *DNMT3A* foram detectadas, com VAF de 5,5%, 5,3% e 1,4%, respectivamente. Na recidiva, 49 dias após o aloTCTH, o clone dominante apresentava as mesmas mutações em *TP53* e *TET2* com VAF de 80% e 77,9% respectivamente e a mutação em *DNMT3A* não foi detectada.

4.5.2. Caso 35

Uma paciente do sexo feminino, de 60 anos, foi diagnosticada com LMA secundária à mielodisplasia em julho/2014. A avaliação do cariótipo ao diagnóstico era normal. Recebeu quimioterapia de indução de remissão com protocolo 7+3 e atingiu remissão completa da doença.

Foi submetida a Transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas em janeiro de 2015. Duzentos e quatro dias após o diagnóstico. A avaliação do estado da doença, na medula óssea, 14 dias antes da infusão de CTH foi recidiva, com 10% de blastos detectados na MO por CFM .

A paciente recebeu um enxerto de sua irmã, de 44 anos, com compatibilidade HLA e ABO completas. As sorologias para CMV da receptora e doadora, eram positivas.

A fonte de células tronco hematopoiéticas utilizada foi medula óssea. O condicionamento de intensidade reduzida utilizado foi com Bussulfano e Fludarabina. A profilaxia de doença enxerto (DECH) foi realizada com metotrexato e ciclosporina em doses habituais. O número de células CD34 positivas infundidas foi de $1,52 \times 10^6/\text{Kg}$ do receptor. A recuperação neutrofilica sustentada, com neutrófilos acima de $500/\text{mm}^3$, ocorreu no D+23. A paciente apresentou DECH aguda de pele, grau leve. Não apresentou DECH crônica. O quimerismo no D+30 e no D+100 foi avaliado como misto (<95% de células de origem do doador).

A recidiva da LMA ocorreu no D+174 e o óbito relacionado à doença ocorreu no D+227.

A tabela 4.16 abaixo mostra as características relacionadas às amostras sequenciadas desta mesma paciente, em 2 momentos diferentes. Momento 1, na avaliação da medula óssea no D-14 pré-transplante alogênico, quando se encontrava em recidiva da doença após a terapia de primeira linha. Momento 2, na avaliação da MO no momento da recidiva, no D+174 do transplante.

Tabela 4.16. Dados das amostras sequenciadas por NGS, do Caso 35.

Time point/ status	% Blastos (CF)	Mutações (n)	Genes	VAF (%)	Cariótipo
1 = Doença ativa (pré alo-TCTH)	10	3	WT1 PTPN11 TP53	10,6 5,9 1,4	46,XX
2 = Recidiva (pós alo-TCTH)	18	2	WT1	41,2	-

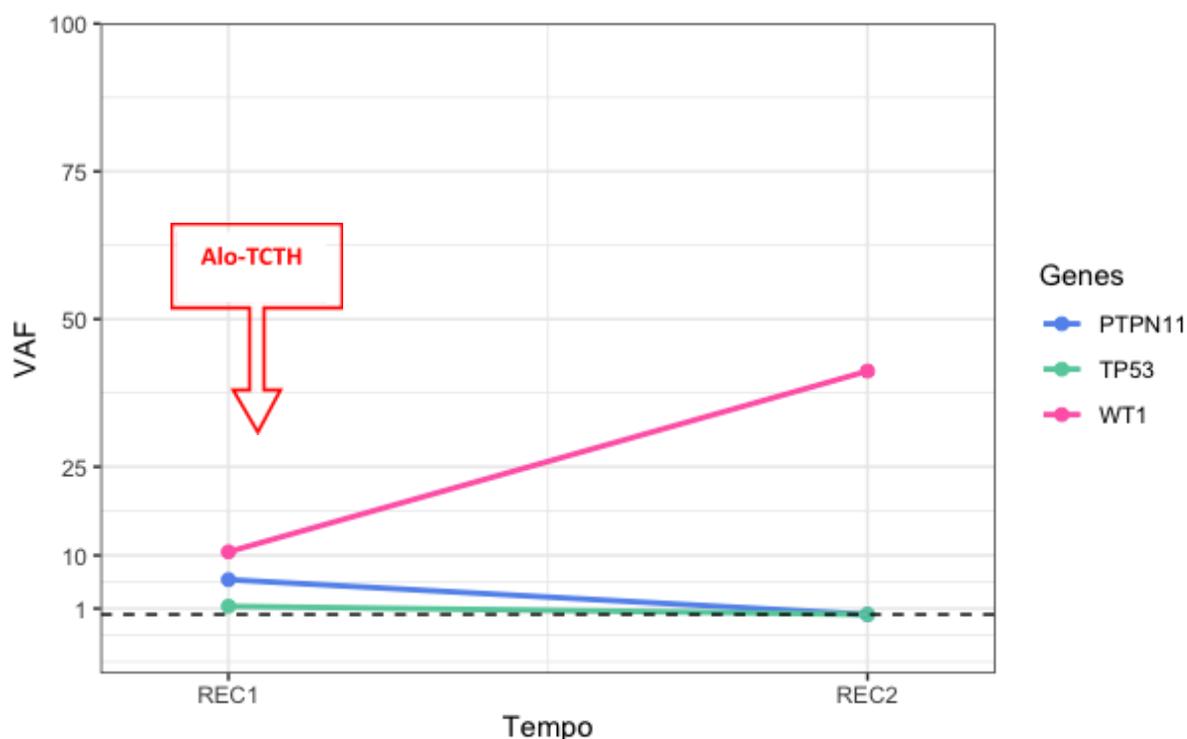


Figura 4.14. Caso 35. Evolução das mutações após o transplante alogênico. No momento da avaliação pré-transplante, a doença estava ativa, com 10% de blastos na MO. Foram detectadas mutações em *WT1*, *PTPN11* e *TP53* com VAF de 10,6%, 5,9% e 1,4% respectivamente. Na recidiva, 174 dias após o aloTCTH, o clone dominante apresentava mutação em *WT1* com VAF de 41,2% podendo indicar que aproximadamente todos os blastos doentes apresentavam essa mutação somática em 1 alelo, visto que o percentual de células do receptor detectada na análise de quimerismo era de 87% e sugere acometimento em heterozigose. As mutações em *PTPN11* e *TP53* não foram detectadas na amostra 2.

4.5.3. Caso 40 (Evolução Clonal do Diagnóstico à Recidiva pós Transplante)

Uma paciente do sexo feminino, de 48 anos, foi diagnosticada com LMA secundária à mielodisplasia (por alterações morfológicas sugestivas) em junho de 2017. O resultado do cariótipo ao diagnóstico era 46,XX. Foi submetida a quimioterapia de indução de remissão com protocolo 7+3 e atingiu remissão completa da doença.

A paciente recebeu um alo-TCTH 154 dias após o diagnóstico. O estado da doença no momento da avaliação clínica pré-transplante, foi documentado em prontuário como primeira remissão completa.

Realizou um transplante aparentado, sem disparidade HLA, de doadora aparentada, de 32 anos, sexo feminino, com incompatibilidade ABO maior. As sorologias para CMV da receptora e doadora, eram positivas.

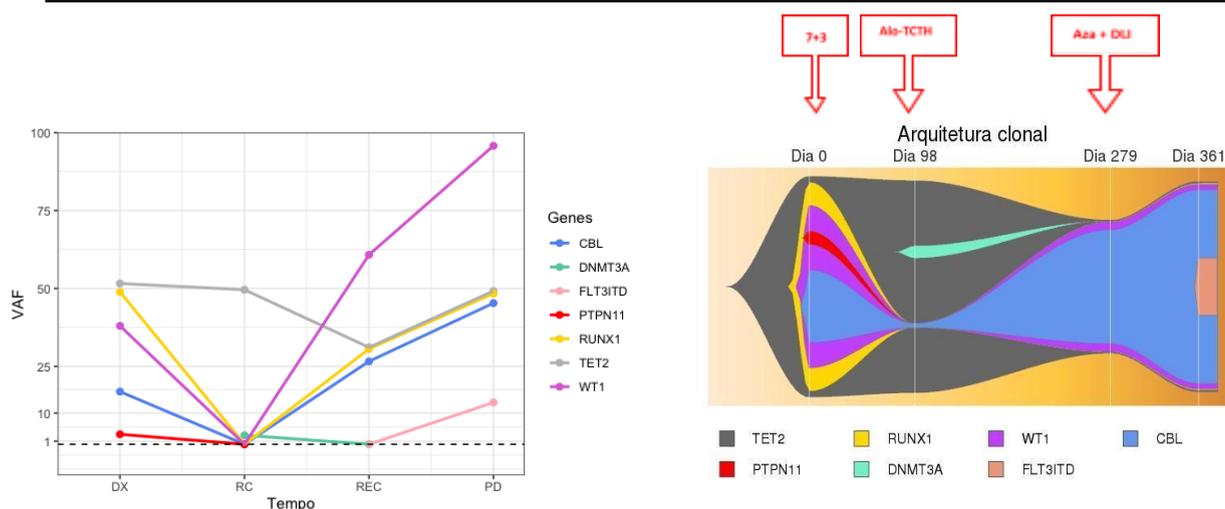
A fonte de células tronco hematopoiéticas utilizada foi medula óssea. O condicionamento utilizado foi mieloablativo, com Bussulfano e ciclofosfamida. A profilaxia de doença enxerto (DECH) foi realizada com uso de metotrexato e ciclosporina em doses habituais. O número de células CD34 positivas infundidas foi de $3,32 \times 10^6/\text{Kg}$. A recuperação neutrofílica com neutrófilos sustentados acima de $500/\text{mm}^3$ ocorreu no D+23. Não apresentou DECH aguda nem crônica. O quimerismo avaliado com VNTR no D+30, foi completo (100% de células do doador).

A recidiva da LMA ocorreu no D+125, com 6,1% de blastos detectáveis na citometria de fluxo da MO. Foi iniciado tratamento com azacitidina a cada 4 semanas por 5 ciclos e infusões de linfócitos do doador aproximadamente a cada 6 semanas, por 3 infusões. A paciente evoluiu com progressão da doença e o óbito ocorreu no D+322. .

A tabela 4.17 abaixo mostra as características relacionadas às amostras sequenciadas desta mesma paciente, em 4 momentos diferentes. Momento 1, ao diagnóstico. Momento 2, na primeira remissão completa após a terapia inicial, 56 dias antes do aloTCTH. Momento 3, na documentação da recidiva, 123 dias após o transplante. Momento 4 na progressão final da doença após terapia com azacitidina e DLI.

Tabela 4.17. Dados das amostras sequenciadas por NGS, do Caso 40.

Time point / Status	% Blastos (CF)	Mutações (n)	Genes	VAf (%)	Cariótipo
1 = Diagnóstico	90	5	<i>TET2</i>	51,6	46,XX i14
			<i>RUNX1</i>	48,9	
			<i>WT1</i>	16,9	
			<i>CBL</i>	3,2	
			<i>PTPN11</i>		
2 = RC1 (pré alo-TCTH)	0	2	<i>TET2</i>	49,6	-
			<i>DNMT3A</i>	2,9	
3 = REC (pós alo-TCTH)	6,1	3	<i>TET2</i>	31,1	46,XX
			<i>RUNX1</i>	30,6	
			<i>WT1</i>	60,8	
			<i>CBL</i>	26,6	
4 = PD (pós alo-TCTH)	81	5	<i>TET2</i>	49,2	-
			<i>RUNX1</i>	48,4	
			<i>WT1</i>	95,8	
			<i>CBL</i>	45,3	
			<i>FLT3</i>	13,4	



nessa ocasião. Na progressão final da doença, após tratamento com azacitidina e DLI, surge um subclone *FLT3-ITD*. B) Inferência quanto à arquitetura clonal, baseada nas frações alélicas (VAF) das mutações nos diferentes momentos de avaliação do tratamento. Os tratamentos realizados ao longo do tempo estão indicados.

5. Discussão

O aspecto mais relevante do presente estudo foi corroborar a influência prognóstica da detecção de mutações genéticas patogênicas na avaliação pré-transplante dos pacientes com LMA submetidos à alo-TCTH. Destacamos também que este achado foi significativo mesmo com a maioria dos pacientes tendo a amostra analisada sido coletada no momento da RC após terapia inicial e mesmo sem o conhecimento das mutações existentes ao diagnóstico.

No nosso trabalho, estudamos os resultados do acompanhamento em longo prazo de uma coorte de 63 adultos com LMA que receberam alo-TCTH no CEMO/INCA, no período entre janeiro de 2010 e dezembro de 2017. Nessa coorte, com uma mediana de seguimento de 6 anos (2,2 – 10,0) e uma mediana de idade de 46 anos, a sobrevida global em 5 anos foi de 41,4% (IC95 30,6 – 56,1%). A incidência acumulada de recidiva em 5 anos foi de 27,0% (IC95 18,0-40,5%) e a mortalidade não-relacionada à recidiva de 31,2% (IC 21,4-45,6%), levando à uma sobrevida livre de recidiva de 41,8% (IC95 31,0-56,4%). Esses resultados são semelhantes ao de coortes internacionais, ressaltando-se ainda que 21% dos pacientes foram transplantados com doença ativa.

Com relação aos fatores de risco tradicionalmente relacionados à pior desfecho pós-alo-TCTH, encontramos como principal fator associado à menor sobrevida global, o tempo entre o diagnóstico e o alo-TCTH maior que um ano, além do risco citogenético desfavorável e a presença de DRM+ por citometria de fluxo. Para a recidiva, os principais fatores prognósticos encontrados foram o status da doença ao transplante em atividade ou com DRM+ por CF e a fonte de MO. Para a mortalidade não relacionada à recidiva os fatores com maior significância estatística foram a presença de mismatch HLA, doador alternativos (NAP, Haplo e SCU) e a presença de incompatibilidade ABO. No nosso trabalho, não houve nenhum ponto de corte em que a idade tenha exercido influência negativa na SG ou na taxa de

recidiva, porém apenas 3 pacientes eram maiores de 60 anos de idade ao transplante.

A principal causa de óbito foi a LMA recidivada/refratária em 47% (n=17) dos casos, seguida por infecção (n=10, 28%), DECH (n=3, 8%), hemorragia (n=2, 5%) e VOD (n=1, 3%). A título de análise por período de tratamento, não houve diferença estatística entre pacientes tratados antes ou após 2015, mas foi observado uma maior mortalidade no ano de 2014, com óbitos relacionados à infecção. A inferência de que possa ter havido algum surto de infecção por microorganismo multirresistente ou por infecção fúngica invasiva relacionado ao ambiente, como fusariose, foi aventada.

Em 39 pacientes, realizamos retrospectivamente o sequenciamento genético por NGS de 30 genes frequentemente envolvidos em neoplasias mieloides, em uma amostra obtida antes do início do condicionamento do transplante. A mediana de tempo entre a amostra e o alo-TCTH foi de 57 dias (7-693 dias), 75% com menos de 100 dias, sendo o motivo de coleta da amostra a avaliação de doença para o transplante. No momento da obtenção da amostra, 85% (n=33) dos casos se encontravam em RC, 7% (n=3) em recidiva pré-transplante e para 7% dos casos a única amostra disponível era do diagnóstico inicial. Sessenta e quatro por cento dos pacientes apresentaram pelo menos uma mutação detectável (25/39) e 41% (16/39) mais do que uma. A frequência de mutações relativamente baixa para uma coorte de pacientes com LMA, se justifica pelo fato de que 85% (33/39) das amostras foram obtidas em RC. Por esta mesma razão, provavelmente se justifica a ausência de detecção de mutações em *NPM1* e uma frequência baixa de mutações em *FLT3*, que são os genes mais frequentemente mutados na LMA ao diagnóstico. (GRIMWADE; IVEY; HUNTLY, 2016; PAPAEMMANUIL et al., 2016; ABELSON et al., 2018)

O conceito de que o volume residual de doença se correlaciona com o risco de recidiva após um determinado tratamento já é bem estabelecido em diversas neoplasias hematológicas, inclusive na LMA. (KLCO et al., 2015; IVEY et al., 2016) Outro conceito bem estabelecido é a existência de um repertório de mutações somáticas presentes ao diagnóstico em pacientes com LMA cuja persistência após quimioterapia intensa convencional tem implicações prognósticas. (SCHLENK et al., 2008; PAPAEMMANUIL et al., 2016; DÖHNER et al., 2017) Com relação ao alo-TCTH na LMA, muitos estudos estabelecem o significado prognóstico negativo da RC DRM+ no momento do transplante. (WALTER et al., 2011) Diferentes técnicas

de mensuração já foram estudadas, como PCR quantitativo para genes de fusão (PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, CBFb-MYH11), PCR quantitativo para mutações em WT1 e NPM1, porém, esses marcadores englobam apenas em torno de 50% dos casos de LMA. A citometria de fluxo multiparamétrica é a metodologia mais amplamente aplicável para os pacientes com LMA não promielocítica. (SCHMID et al., 2015; LUSSANA et al., 2019). Adicionalmente, a utilidade clínica da detecção de mutações oncogênicas por NGS em pacientes com LMA submetidos à alo-TCTH, vem sendo estudada nos últimos anos.

Luskin e colegas (LUSKIN et al., 2016) estudaram a aplicabilidade do NGS em 112 pacientes adultos com LMA submetidos a alo-TCTH. Neste estudo, um painel NGS para 26 genes foi utilizado para caracterizar retrospectivamente o perfil genômico em amostras biológicas de doença ativa, obtidas dos pacientes ao diagnóstico (85% dos casos), primeira recidiva (12% dos casos) ou no momento da doença persistente após terapia de indução (4% dos casos). Oitenta e seis por cento dos pacientes apresentavam pelo menos uma mutação detectada e os genes mais comumente mutados foram *NPM1*(32%), *FLT3-ITD*(29%), *DNMT3A* (26%), *TET2* (12%), *NRAS* (12%) e *IDH1* (12%). Mutações em *TP53*, *WT1* e *FLT3-ITD* foram associadas a aumento do risco de recaída.(LUSKIN et al., 2016) Similarmente, Hamilton e colegas(HAMILTON et al., 2019), realizaram a caracterização por NGS de 112 pacientes com LMA ou SMD de alto risco, em amostras obtidas antes do transplante, em um momento em que o paciente apresentava doença ativa. Neste estudo, os genes mais frequentemente mutados foram *TET2* (14,7%), *FLT3* (12,9%), *DNMT3A* (12,1%) e *RUNX1* (7,8%). Nenhuma mutação individual nesse estudo foi um fator independente associado à recidiva da LMA.

Diferente dos dois trabalhos relatados anteriormente, em que o NGS foi realizado no momento da doença ativa, Thol et al (THOL et al., 2018) estudaram uma coorte de 116 pacientes com LMA submetidos a alo-TCTH em remissão completa, sendo 95% em primeira RC e 5% em segunda RC. Neste estudo, as amostras do diagnóstico dos pacientes foram sequenciadas e em 108 pacientes foram encontradas pelo menos 1 mutação genética rastreável. Esses 108 pacientes tiveram uma segunda amostra de DNA sequenciada no momento da RC morfológica pré-alo-TCTH (mediana de 24 dias (5-71 dias) pré-alo-TCTH) com uma técnica de NGS ultrasensível. Quarenta e três (45%) dos 96 pacientes avaliáveis (pacientes com marcador e com VAF menor do que 5% no momento da RC) apresentaram

DRM por NGS positiva, com VAF média de 0,33% (variação 0,016-4,91%). Pacientes com DRM+ por NGS tiveram uma incidência acumulada de recidiva significativamente maior (HR 5,58, IC95 2,47-12,6, $p < 0,001$), enquanto a mortalidade não relacionada à recidiva não foi estatisticamente diferente. Outro estudo, com amostras pareadas, por Press e colegas (PRESS et al., 2019), mostrou o impacto da DRM+ por NGS na maior incidência acumulada de recidiva e menor sobrevida livre de recidiva. Neste estudo, 42 pacientes com LMA foram avaliados por NGS para 42 genes, ao diagnóstico e dentro de 30 dias antes do alo-TCTH. Vinte e sete dos 31 pacientes que se encontravam em RC tiveram DRM+ por NGS. Esses pacientes compartilhavam várias características tradicionalmente associadas com alto risco, como idade mais avançada, LMA secundária, falha em atingir RC1 e categoria de risco ELN 2017 adverso. Além desses dois trabalhos, um terceiro estudo, muito recente, sugeriu que além de prognóstica, a presença de DRM+ por NGS pode ser preditiva para uso preferencial de condicionamento mieloablativo, ao invés de regimes de intensidade reduzida. Hourigan e colegas (HOURIGAN et al., 2019) estudaram 190 pacientes tratados em um estudo clínico, fase III, com LMA em RC, randomizados para alo-TCTH com condicionamentos MAC *versus* RIC. Nos pacientes com DRM+ por NGS o alo-TCTH RIC foi associado com maior risco de recidiva e menor sobrevida livre de recidiva.

Conforme as referências anteriormente apresentadas, tanto mutações presentes no diagnóstico, como a detecção de mutações persistentes na RC, podem se correlacionar com desfechos desfavoráveis pós-allo-TCTH. No presente estudo, mesmo com a limitação do número de pacientes, com a falta de homogeneidade do momento de coleta da amostra, e com a ausência de perfil molecular do clone inicial para rastreamento das mutações existentes no momento da RC, foi possível encontrar uma associação estatisticamente significativa entre a presença de uma mutação patogênica em um dos genes *FLT3-ITD*, *KRAS*, *NRAS*, *TP53* e a incidência acumulada de recidiva. De acordo com Hasserjian e colaboradores, enquanto seria esperado que alterações nos genes *CEBPA*, *FLT3A*, *WT1*, *KRAS*, *PTPN11* fossem removidas por terapia pré-transplante não se esperaria que mutações nos genes *DNMT3A*, *TET2* e *ASXL1* fossem removidas. A consequência esperada de uma terapia de sucesso pré transplante para a eliminação de mutações nos genes *ETV6* e *ZRSR2* é variável ou desconhecida. Provavelmente, os genes com maior impacto na recidiva da nossa coorte, possivelmente representavam DRM+ genética, pois são genes relacionados à LMA.

Observamos também, como esperado, que amostras obtidas de pacientes com doença ativa (diagnóstico ou recidiva) apresentavam mais frequentemente mutações patogênicas, assim como um número maior de mutações por paciente, quando comparadas às amostras obtidas em RC. Cem por cento (6/6) dos pacientes com doença ativa apresentaram mutações detectáveis ao NGS, contra 75% (25/33) dos pacientes em RC. Nos pacientes com doença ativa, a média de mutações por paciente foi de 2,7 (16 mutações/6 pacientes) enquanto nos pacientes em RC foi de 1,0 (34 mutações em 33 pacientes). Nas amostras com doença ativa, 62,5% das mutações encontradas ocorreram em genes envolvidos em vias de sinalização, como *KRAS*, *NRAS*, *FLT3*, *PTPN11* e *ABL1*, enquanto nas amostras em remissão completa o predomínio de mutações, 29,5%, foi nos genes envolvidos na metilação do DNA, *DNMT3A* e *TET2*. Esses são genes sabidamente relacionados a CHIP e também à hematopoiese clonal em pacientes com LMA previamente tratados. Nesse contexto, podem ou não estar associadas à LMA original. Como é discutido no artigo de Hasserjian e Steensma *et al* (HASSERJIAN et al., 2020), apesar do avanço tecnológico nas técnicas moleculares permitir a detecção de translocações e mutações associadas à LMA com alta sensibilidade, a determinação de doença residual é complicada pelo fato de que muitos pacientes previamente tratados apresentam hematopoiese clonal persistente, o que pode ou não estar relacionado à presença residual da LMA. A hematopoiese clonal detectada em pacientes com LMA em RC inclui doença residual verdadeira, mielodisplasia ou clones que são ancestrais à LMA ou ainda clones independentes ou emergentes de potencial leucemogênico incerto. Em pacientes submetidos à alo-TCTH, clones identificados após o transplante podem ter origem em células do doador e em alguns casos, originar neoplasias mieloides novas, clonalmente não relacionadas à LMA inicial. Os autores apresentam uma proposta para terminologia e interpretação da persistência de anormalidades genéticas em pacientes em remissão completa após-terapia, onde a detecção de anormalidades persistentes ou recorrentes após tratamento, presentes na LMA inicial, em genes sabidamente relacionados à recidiva da LMA, como os genes de fusão, *NPM1*, rearranjos de *KMT2A*, *NRAS/KRAS*, *FLT3*, *KIT* e *PTPN11* denota doença residual mensurável genética. Já a presença de mutações persistentes após terapia em genes não relacionados à LMA original, em um paciente sem alterações morfológicas de neoplasia mielóide seria chamada de hematopoiese clonal. Os autores ressaltam que as implicações da HC no contexto da LMA pós tratamento podem ser diferentes da CHIP detectada em pacientes sem

história prévia de LMA. Apesar das mutações em DTA, como alterações isoladas, não serem associadas com risco aumentado de retorno da doença, esse risco já foi sugerido previamente, na presença de 2 ou mais mutações do tipo HC. (HIRSCH et al, 2017) A HC nestes pacientes também pode promover um plano de fundo para emergência de recidivas geneticamente diferentes, mas clonalmente e ancestralmente relacionadas. Os genes citados no referido trabalho como mais envolvidos em HC são *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *SRSF2*, *BCOR* e *TP53*. O papel de mutações em outros genes, como *IDH1/IDH2*, *RUNX1* é mais incerto. Os autores ressaltam que o NGS pode ter sensibilidade variável e portanto, a detecção de mutações genéticas relacionadas à LMA por NGS pode representar evidência de doença residual mensurável genética, mas a ausência de detecção pode ser insuficiente para confirmar um estado de DRM negativa. Por outro lado, o desaparecimento de mutações que geralmente ocorrem tardiamente na hierarquia clonal da LMA, com *FLT3-ITD* e em genes de vias de sinalização como *KRAS/NRAS* podem representar o desaparecimento de um subclone e não do clone fundador da leucemia.

Corroborando os resultados desses estudos (KLCO et al., 2015; JONGEN-LAVRENCIC et al., 2018b), encontramos as mutações em DTA como as mais frequentes em pacientes em RC, e a presença dessas mutações não mostrou correlação estatística significativa com o desfecho recidiva.^{12,26} No entanto, nesta coorte, a presença de mais de uma mutação em um desses genes, mostrou significância estatística limítrofe (p valor = 0,05) com impacto negativo importante (HR 5,7) no risco de recidiva pós-alo-TCTH. Este achado já foi relatado anteriormente em estudo de DRM genética por NGS paciente específico, ultra sensível, aliado à PCR digital, em que a persistência de 2 ou mais lesões iniciais após quimioterapia de indução se associou com maior risco de recidiva e morte. (HIRSCH et al., 2017)

Frações alélicas próximas a 50% foram observadas nos genes *EZH2*, *ABL1*, *DNMT3A*, *JAK2*, *KIT*, *RUNX*, *SETBP1*, *SF3B1*, *TET2* e *WT1*. VAFs próximas a 50% são encontradas com frequência em alterações germinativas, mutações ou polimorfismos. Nos casos em que as mutações encontradas eram do tipo missense e não localizadas em região *hotspot*, especial atenção foi dada para a classificação das variantes. Em contraste, VAFs de até 3,0%, foram observadas nos genes *DNMT3A*, *CEBPA*, *ETV6*, *FLT3A*, *KRAS*, *PTPN11*, *WT1* e *ZRSR2*.

No presente estudo, devido ao pequeno número de eventos recidiva (13 de 39 pacientes), e principalmente pelas amostras sequenciadas não terem sido coletadas necessariamente no mesmo momento da avaliação do status de doença pré transplante por citometria de fluxo, não foi possível avaliar o possível efeito aditivo da DRM por citometria de fluxo e da DRM por NGS, conforme relatado por Jongen-Lavrencic et al, publicado na NEJM em 2018. No entanto, observamos que tanto a DRM por CF quanto a presença de mutações de alto risco se correlacionaram estatisticamente com um maior risco de recidiva, conforme é demonstrado nas tabelas multivariadas 4,10, 4.12, 4.13 e 4.14. Neste trabalho, encontramos que para cada mutação genética adicional, o risco de recidiva aumenta em 1,5 vezes.

Do ponto de vista clínico, não existem dados brasileiros que apresentem o perfil clínico ou genômico como o nosso estudo. Também não temos conhecimento da comprovação dos fatores de risco clínico identificados no presente trabalho, em coortes de pacientes brasileiros. Nossa coorte é homogênea, de instituição única, em que a maioria dos pacientes recebeu um transplante de doador aparentado, sem mismatch (n=45, 71%), com fonte de MO (n=46, 72%), e portanto, possivelmente é uma coorte menos sujeita à viés relacionado à condutas, rotinas de tratamento, uso de recursos e cuidados diferentes.

Em contrapartida, as limitações deste trabalho estão relacionadas ao número pequeno de pacientes, à observação retrospectiva e ao pequeno número de eventos. Aspectos clínicos importantes como classificação da ELN 2017, classificação da WHO 2016 e o índice prognóstico HCT-CI não puderam ser avaliados por indisponibilidade de dados. Na nossa coorte, a mediana de tempo entre o diagnóstico da LMA e o D0 do alo-TCTH foi de 407 dias (13-2597), o que é considerado um tempo longo e permite inferir a possibilidade de viés de seleção de pacientes com prognóstico biológico menos agressivo e possivelmente um número menor de mutações de prognóstico adverso.

De maneira complementar, neste trabalho foi possível realizar o sequenciamento genético por NGS de amostras sequenciais de um pequeno subgrupo de 3 pacientes, para caracterização longitudinal da evolução clonal desses casos. Os 2 primeiros pacientes foram selecionados pelo achado de mutações em *TP53* com VAF consideradas baixas (caso 11, 5,3% - caso 35, 11,4%) no momento da avaliação pré-transplante. Nos 2 casos, as mutações encontradas foram do tipo missense, uma no éxon 5 e outra no éxon 6 e ambos apresentaram cariótipo normal

ao diagnóstico. Interessante foi o achado de que apesar dos desfechos desfavoráveis semelhantes, com recidiva e óbito da LMA precoces, dentro do primeiro ano após o alo-TCTH, a análise da evolução clonal com sequenciamento da amostra da recidiva após alo-TCTH mostrou hierarquias genéticas bem diferentes nos 2 casos.

Sabe-se que o gene *TP53* é um supressor tumoral, localizado no braço curto do cromossomo 17. A proteína p53 é fundamental para manter a estabilidade genômica em resposta à injúrias no DNA, sendo responsável por ativar programas de reparo do DNA e parada do ciclo celular. Mais da metade das neoplasias malignas em humanos têm mutações em *TP53*.(LI et al, 2018) As mutações em *TP53* majoritariamente envolvem o domínio de ligação ao DNA, codificado pelos exons 5 a 8. Quase 80% das mutações em *TP53* são do tipo substituição missense. Nos pacientes com LMA, mutações em *TP53* são predominantemente observadas em pacientes de alto risco com LMA secundária à tratamento ou com cariótipo complexo.(KADIA et al, 2016) A frequência reportada de mutações de *TP53* em LMA varia de 5 a 10% em LMA de novo a mais de 20%, em pacientes de alto risco. Muitos estudos demonstram a associação dessas mutações com baixa resposta à quimioterapia, com maior risco de recidiva e morte, independente da presença de cariótipo complexo, tendo essas 2 alterações valor aditivo em termos de risco prognóstico. As mutações em *TP53* também já foram associadas a prognóstico desfavorável pelo alto risco de falha terapêutica, mesmo após o alo-TCTH (MIDDEKE et al, 2016), que é considerado, ainda atualmente, como a única terapia potencialmente curativa para pacientes com LMA de alto risco. Por outro lado, mutações em *TP53* já foram encontradas em células tronco-hematopoiéticas de indivíduos saudáveis, em clones muito pequenos (VAF <0,7%). Uma das fisiopatologias demonstradas para a LMA relacionada à tratamento envolve aquisição somática dessa mutação em indivíduo previamente saudável como primeiro evento leucemogênico, com posterior expansão clonal dessas células após estresse genotóxico induzido pela quimioterapia, em vez de indução de mutação em *TP53* diretamente pelo agente quimioterápico. Além disso, mutações germinativas em *TP53* são características da síndrome de Li-Fraumeni, porém é rara a associação com a LMA. Outras mutações germinativas vêm sendo reconhecidas, sobretudo em pacientes com LMA relacionada à tratamento (LAL et al, 2017). Na estratificação de risco da ELN 2017, a mutação em *TP53* foi adicionada como um

marcador da categoria de risco desfavorável, na qual recomenda-se a realização de alo-TCTH em primeira remissão completa.

Em estudo recente, Prochazka *et al.* (KLCO *et al.*, 2015; JONGEN-LAVRENCIC *et al.*, 2018b;) avaliaram o impacto da presença de subclones *TP53* mutados com VAF menor do que 20% ao diagnóstico, em pacientes com LMA tratados intensivamente. Uma coorte de 1537 pacientes tratados em estudos clínicos subsequentes do grupo cooperativo alemão AMLSG (German-Austrian acute myeloid leukemia study group) foi avaliada por sequenciamento dirigido de *TP53*. Como resultado, os pacientes com subclones *TP53* mostraram significativamente menos cariótipo complexo e perdas cromossômicas. Todos os subgrupos de VAF, inclusive o subclonal < 20%, se correlacionaram com menor resposta terapêutica assim como pior SG e SLR. Mesmo ajustando para idade, leucometria, risco citogenético e tipo de leucemia, o prognóstico adverso do *TP53* mutado permaneceu significativo para todos os subgrupos de VAF.

Nenhum dos dois pacientes com *TP53* mutado da nossa coorte haviam recebido quimioterapia previamente ao diagnóstico de LMA e nenhum dos dois tinha o cariótipo alterado. O primeiro (caso 11) foi transplantado em RC1 com avaliação de DRM- por citometria de fluxo 7 dias antes do alo-TCTH. Este paciente não teve a LMA classificada como de novo ou secundária por indisponibilidade de dados. O segundo (caso 35) recebeu o alo-TCTH na primeira recidiva quando foram detectados 10% de blastos, 14 dias antes do transplante. Este paciente foi classificado como LMA relacionada à mielodisplasia por características morfológicas apenas (sem história prévia de mielodisplasia ou alterações citogenéticas ao diagnóstico).

O caso 11 encontrava-se com doença em remissão, sem blastos detectáveis pela CF no momento em que a amostra de avaliação pré TMO foi coletada. Nessa amostra, sequenciada por NGS, foi possível detectar a presença de mutação em *TP53* e *TET2* com VAF semelhantes de aproximadamente 5%. O sequenciamento da amostra da recidiva de doença após o transplante, que se deu precocemente, antes do D+100, mostrou que esse clone com *TET2* e *TP53* mutados foi o clone responsável pela recaída da doença. Nesse caso, a hipótese principal para a sequência de eventos na evolução clonal da LMA, diante da idade do paciente (58 anos) e evolução da VAF pré e pós-allo-TCTH, é que as mutações em *TP53* e *TET2* estariam relacionadas à HC em precursores hematopoiéticos pré-leucêmicos e que esse clone tenha sido selecionado após a terapia inicial e o condicionamento do

aloTCTH. No entanto, não temos a amostra do diagnóstico inicial nem amostra pré diagnóstico da LMA para corroborar a hipótese. Fica claro, no entanto, que a detecção dessas mutações no momento da avaliação pré-transplante, mesmo com VAF baixa, significavam a presença de doença residual mensurável molecular, e se correlacionaram diretamente com a falha terapêutica.

O segundo caso com *TP53* mutado (caso 35), encontrava-se em atividade de doença no momento da avaliação pré TMO, com >10% blastos detectáveis por citometria de fluxo. O NGS mostrou uma mutação patogênica em *TP53* com VAF 1,4%, além de mutação em *PTPN11* com VAF 5% e *WT1* com VAF 10%. A avaliação da arquitetura clonal através das VAF permite inferir que neste momento existia pelo menos um subclone além do clone majoritário *WT1* positivo. Na recidiva, que ocorreu menos de 6 meses após o alo-TCTH, o único clone detectado foi o *WT1*, o que permite inferir que os subclones presentes anteriormente podem ter sido eliminados após o condicionamento e imunoterapia do alo-TCTH. Neste caso, a presença do *TP53* mutado se correlacionou com o desfecho desfavorável de recaída e óbito precoces ainda que não tenha sido o responsável direto pela recidiva.

A análise longitudinal das amostras do caso 40 foram coletadas sequencialmente em todas as fases do tratamento, do diagnóstico até a progressão final após o alo-TCTH. Ao diagnóstico, detectamos a presença de cinco mutações diferentes. A arquitetura clonal inferida através das VAF permitiu diferenciar um clone majoritário constituído por *TET2* (51,2%) e *RUNX1* (48,9%) mutados, um subclone maior portador de mutação em *WT1* (38%) e pelo menos um subclone menor contendo mutação em *CBL* (16,9%) e *PTPN11* (3,2%). Na amostra coletada em RC após terapia com quimioterapia convencional inicial, não detectamos persistência residual do clone majoritário ao diagnóstico que apresentava mutação em *RUNX1*, mas detectamos a mutação em *TET2* (49,2) e um pequeno clone com mutação em *DNMT3A* (2,9%). Na amostra coletada no momento da recidiva da LMA após o alo-TCTH, o clone *WT1* volta a surgir, apresentando VAF maior que 50%, um indício da ocorrência de perda de heterozigiosidade ou por deleção de parte ou todo o cromossoma 11, não detectada na citogenética convencional ou por duplicação alélica do gene mutado. Na progressão final da doença, após tratamento com azacitidina e infusões de linfócitos do doador, surge um subclone *FLT3-ITD*, um gene de sinalização que codifica uma tirosina quinase responsável por proliferação celular, frequentemente encontrado como uma aberração tardia na ontogenia da LMA. A mutação em *TET2* se mantém com VAF de aproximadamente 50% em

todas as análises, exceto na recidiva inicial quando havia presença de células do doador ainda em grande quantidade, demonstradas pelo quimerismo de 60% nessa ocasião. A presença dessa mutação com VAF sugestiva de heterozigose pode significar uma hematopoiese clonal iniciada em um clone pré-leucêmico que serviu de *background* para o surgimento da LMA inicial e por isso presente em uma VAF tão alta desde o início. Neste caso, na avaliação pré-transplante, poderíamos considerar que o paciente apenas apresentava mutações “DTA”, no caso em *TET2* e *DNMT3A* (que não tinha relação com o clone original), e poderíamos concluir que, se tivéssemos o resultado disponível naquele momento, essas mutações poderiam se tratar apenas de hematopoiese clonal, semelhante à CHIP descrita em pacientes saudáveis, no entanto, conhecendo a evolução do caso, vemos que a mutação estava presente no clone do diagnóstico e no clone da recidiva em VAF semelhante. E o questionamento quanto ao significado dessa persistência seria (I) a mutação é relacionada com a LMA? (II) é correlacionada à hematopoiese clonal? (III) trata-se de mutação germinativa não conhecida? Na investigação dessa alteração os algoritmos preditivos de patogenicidade corroboraram a classificação desta variante como provavelmente patogênica. Não havia disponibilidade de material de swab oral ou de outros tecidos para testar esta terceira hipótese. Alguns estudos grandes previamente citados não conseguiram correlacionar a persistência de mutações em DTA em pacientes pós tratamento, com desfechos pós-tratamento para LMA. No entanto, neste caso, a mutação em *TET2* estava envolvida todo o tempo com a doença, desde o clone original.

6. Conclusão

O perfil clínico e genômico de uma coorte brasileira de pacientes com LMA e acompanhamento em longo prazo após alo-TCTH foi apresentado.

As características clínicas e demográficas dos pacientes e dos transplantes foram descritas. As principais causas de óbito foram discriminadas, assim como as taxas de sobrevida global, sobrevida livre de doença, incidência cumulativa de recidiva e mortalidade não relacionada à recidiva. Esses dados podem contribuir para a compreensão dos resultados de pacientes tratados no Brasil, manejo de recursos, visto que a LMA corresponde à 37% das indicações de transplante por doença maligna no Brasil.

Foram identificados os fatores de risco clínico relacionados à sobrevida global, incidência acumulada de recidiva e mortalidade não relacionada à recidiva, que constatarem a oportunidade para melhorias no tratamento dos pacientes com LMA que necessitam de alo-TCTH no Brasil, sobretudo no âmbito do SUS. Tendo em vista que o tempo entre o diagnóstico e a realização do alo-TCTH se mostrou importante fator relacionado à sobrevida global, faz-se importante conhecer as principais limitações para a realização do procedimento no momento mais adequado e efetivo. Foi encontrada, uma correlação já conhecida da disparidade HLA com a morte não relacionada à recidiva e os transplantes com doadores com MM foram, na quase totalidade dos casos, os transplantes de doadores alternativos haploidênticos e de SCU. A correlação dos transplantes alternativos com desfechos nos centros de transplante brasileiros deveria ser melhor investigada.

Também foi demonstrada a relevância da caracterização da doença, pelo risco citogenético ao diagnóstico, pelo status da doença ao transplante e pela presença de DRM+ por citometria de fluxo ao transplante, no prognóstico relacionado à recidiva, ratificando a importância da disponibilidade desses exames específicos sobretudo no âmbito do SUS.

Foi descrito pela primeira vez o perfil genômico de uma coorte brasileira de pacientes com LMA submetidos a alo-TCTH.

Foi confirmado o impacto prognóstico da detecção de mutações genéticas em *TP53*, *FLT3-ITD*, *NRAS*, *KRAS* na recidiva pós-allo-TCTH. A presença de mais de uma mutação em genes relacionados à hematopoiese clonal apresentou um risco maior de recidiva (HR 1,75) com significância estatística limítrofe e também deverá ser melhor investigada. A detecção de qualquer mutação acarretou um risco adicional de 1,5 vezes na taxa de recidiva. Avaliamos a evolução clonal em 3 casos selecionados com amostras sequenciais ao longo do período de tratamento, sendo ilustrada a dificuldade na interpretação dos resultados do NGS em diferentes momentos.

O presente estudo sugere que a avaliação genética com painel NGS pode contribuir para avaliação prognóstica de pacientes com LMA que serão submetidos à tratamento com alo-TCTH, porém é necessário o aprimoramento e padronização de técnicas e interpretação dos resultados para o uso amplo do método na prática clínica.

7. Referências

ABELSON, S. et al. **Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals.** *Nature*, v. 559, n. 7714, p. 400–404, jul. 2018.

ARBER, D. A. et al. **The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** *Blood*, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.

BREEMS, D. A. et al. **Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype.** *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 26, n. 29, p. 4791–4797, 10 out. 2008.

BUCCISANO, F. et al. **Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia.** *Blood*, v. 119, n. 2, p. 332–341, 12 jan. 2012.

BUCKLEY, S. A. et al. **Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis.** *Haematologica*, v. 102, n. 5, p. 865–873, maio 2017.

BUCKLEY, S. A.; APPELBAUM, F. R.; WALTER, R. B. **Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease at the time of transplantation in acute leukemia.** *Bone Marrow Transplantation*, v. 48, n. 5, p. 630–641, maio 2013.

BULLINGER, L.; DÖHNER, K.; DÖHNER, H. **Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways.** *Journal of Clinical Oncology*, v. 35, n. 9, p. 934–946, 13 fev. 2017.

BYRD, J. C. et al. **Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461):** Presented in part at the 43rd annual meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 10, 2001, and published in abstract form. *Blood*, v. 100, n. 13, p. 4325–4336, 15 dez. 2002.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. **Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia.** *The New*

England Journal of Medicine, v. 368, n. 22, p. 2059–2074, 30 2013.

CORNELISSEN, J. J. et al. **The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach.** Nature Reviews. Clinical Oncology, v. 9, n. 10, p. 579–590, out. 2012.

DING, L. et al. **Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukemia revealed by whole genome sequencing.** Nature, v. 481, n. 7382, p. 506–510, 11 jan. 2012.

DÖHNER, H. et al. **Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.** Blood, v. 115, n. 3, p. 453–474, 21 jan. 2010.

DÖHNER, H. et al. **Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel.** Blood, v. 129, n. 4, p. 424–447, 26 jan. 2017.

DÖHNER, H.; WEISDORF, D. J.; BLOOMFIELD, C. D. **Acute Myeloid Leukemia.** New England Journal of Medicine, v. 373, n. 12, p. 1136–1152, 17 set. 2015.

DUNNEN, J. T. DEN et al. **HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update.** Human Mutation, v. 37, n. 6, p. 564–569, 2016.

ENGEL, N. et al. **European experience and risk factor analysis of donor cell derived leukaemias/MDS following haematopoietic cell transplantation.** Leukemia, v. 33, n.2, p. 508–517, fev. 2019.

ESTEY, E. H. **Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management.** American Journal of Hematology, v. 93, n. 10, p. 1267–1291, 2018.

ESTEY, E. H. **Acute myeloid leukemia: 2021 update on risk-stratification and management.** American Journal of Hematology, v. 95, n. 11, p. 1368–1398, 2020.

GENOVESE, G. et al. **Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence.** The New England Journal of Medicine, v. 371, n. 26, p. 2477–2487, 25 dez. 2014.

GILES, F. J. et al. **The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia.** British Journal of Haematology, v.136, n. 4, p. 624–627, 2007.

GRIMWADE, D. **Impact of Cytogenetics on Clinical Outcome in AML.** In: KARP, J. E.(Ed.). . Acute Myelogenous Leukemia. Contemporary Hematology. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. p. 177–192.

GRIMWADE, D.; HILLS, R. K. **Independent prognostic factors for AML outcome.** Hematology, v. 2009, n. 1, p. 385–395, 1 jan. 2009.

GRIMWADE, D.; IVEY, A.; HUNTLY, B. J. P. **Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance.** Blood, v. 127, n. 1, p. 29–41, 7 jan. 2016.

HAMILTON, B. K. et al. **Mutation clonal burden and allogeneic hematopoietic cell transplantation outcomes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.** Bone Marrow Transplantation, v. 54, n. 8, p. 1281–1286, ago. 2019.

HARRISON, S. M.; BIESECKER, L. G.; REHM, H. L. **Overview of specifications to the ACMG/AMP variant interpretation guidelines.** Current protocols in human genetics, v. 103, n. 1, p. e93, set. 2019.

HART, J. S. et al. **The mechanism of induction of complete remission in acute myeloblastic leukemia in man.** Cancer Research, v. 29, n. 12, p. 2300–2307, dez. 1969.

HASSERJIAN, R. P. et al. **Clonal hematopoiesis and measurable residual disease assessment in acute myeloid leukemia.** Blood, v. 135, n. 20, p. 1729–1738, 14 maio 2020.

HEUSER, M. et al. **Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology, 17 mar. 2020.

HIRSCH, P. et al. **Precision and prognostic value of clone-specific minimal residual disease in acute myeloid leukemia.** Haematologica, v. 102, n. 7, p. 1227–1237, 1 jul. 2017.

HO, G. et al. **Decreased early mortality associated with the treatment of acute myeloid leukemia at National Cancer Institute-designated cancer centers in California.** Cancer, v. 124, n. 9, p. 1938–1945, 1 maio 2018.

HOURIGAN, C. S. et al. **Impact of Conditioning Intensity of Allogeneic Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With Genomic Evidence of Residual Disease.** Journal of Clinical Oncology, 20 dez. 2019.

HOURIGAN, C. S.; KARP, J. E. **Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia**. Nature reviews. Clinical oncology, v. 10, n. 8, p. 460–471, ago. 2013.

IVEY, A. et al. **Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML**. New England Journal of Medicine, v. 374, n. 5, p. 422–433, 4 fev. 2016.

JAISWAL, S. et al. **Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes**. The New England Journal of Medicine, v. 371, n. 26, p. 2488–2498, 25 dez. 2014.

JAN, M. M. et al. **TP53 mutation in patients with high-risk acute myeloid leukaemia treated with allogeneic haematopoietic stem cell transplantation**. British Journal of Haematology, v. 172(6), p. 914-922, 2016.

JONGEN-LAVRENCIC, M. et al. **Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia**. The New England Journal of Medicine, p. 11, 2018a.

JONGEN-LAVRENCIC, M. et al. **Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia**. New England Journal of Medicine, v. 378, n. 13, p. 1189–1199, 29 mar. 2018b.

JULIUSSON, G. et al. **Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry**. Blood, v. 113, n.18, p. 4179–4187, 30 abr. 2009.

KADIA, T. M. et al. **TP53 mutations in newly diagnosed Acute Myeloid Leukemia –Clinico-molecular characteristics, response to therapy, and outcomes**. Cancer, v. 122(22), p. 3484-3491, 2016.

KAYSER, S. et al. **Minimal residual disease–directed therapy in acute myeloid leukemia**. Blood, v. 125, n. 15, p. 2331–2335, 9 abr. 2015.

KLCO, J. M. et al. **Association Between Mutation Clearance After Induction Therapy and Outcomes in Acute Myeloid Leukemia**. JAMA, v. 314, n. 8, p. 811, 25 ago. 2015.

KOHLMANN, A. et al. **Monitoring of residual disease by next-generation deep sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease**. Leukemia, v. 28, n. 1, p. 129–137, jan. 2014.

LAL, R. et al. **Somatic TP53 mutations characterize preleukemic stem cells in**

acute myeloid leukemia. Blood, v. 129(18), p. 2587-2591, 2017.

LANDRUM, M. J. et al. **ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence.** Nucleic Acids Research, v. 46, n. Database issue, p. D1062 D1067, 4 jan. 2018.

LEVINE, R. L.; VALK, P. J. M. **Next-generation sequencing in the diagnosis and minimal residual disease assessment of acute myeloid leukemia.** Haematologica, v.104, n. 5, p. 868–871, maio 2019.

LI, M. M. et al. **Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer.** The Journal of Molecular Diagnostics : JMD, v. 19, n. 1, p. 4–23, jan. 2017.

LI, V. et al. **TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database.** Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, v. 145, p. 625-636, 2019.

LINDSLEY, R. C. et al. **Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations.** Blood, v. 125, n. 9, p. 1367–1376, 26 fev. 2015.

LOKE, J. et al. **The role of allogeneic stem cell transplantation in the management of acute myeloid leukaemia: a triumph of hope and experience.** British Journal of Haematology, v. 188, n. 1, p. 129–146, 2020.

LOVD - An Open Source DNA variation database system. Disponível em: <<https://www.lovd.nl/>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

LUSKIN, M. R. et al. **Clinical Utility of Next-Generation Sequencing for Oncogenic Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation.** Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, v. 22, n. 11, p. 1961-1967, nov. 2016.

LUSSANA, F. et al. **Molecular Detection of Minimal Residual Disease before Allogeneic Stem Cell Transplantation Predicts a High Incidence of Early Relapse in Adult Patients with NPM1 Positive Acute Myeloid Leukemia.** Cancers, v. 11, n. 10, 28 set. 2019.

MARADEI, SC. et al. **Serum ferritin as risk factor for sinusoidal obstruction syndrome of the liver in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation.** Blood, v. 114, n. 6, p. 1270-1275, 6 aug. 2009.

MARTIGNOLES, J.-A.; DELHOMMEAU, F.; HIRSCH, P. **Genetic Hierarchy of Acute Myeloid Leukemia: From Clonal Hematopoiesis to Molecular Residual Disease.** International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 12, p. 3850, dez. 2018.

Mastermind Genomic Search Engine (<https://www.genomenon.com/mastermind>). [s.d.].

MORITA, K. et al. **Clearance of Somatic Mutations at Remission and the Risk of Relapse in Acute Myeloid Leukemia.** Journal of Clinical Oncology, v. 36, n. 18, p. 1788–1797, 20 jun. 2018.

MRÓZEK, K.; HEEREMA, N. A.; BLOOMFIELD, C. D. **Cytogenetics in acute leukemia.** Blood Reviews, v. 18, n. 2, p. 115–136, jun. 2004.

ØSTGÅRD, L. S. G. et al. **Associations between cohabitation status, treatment, and outcome in AML patients: a national population-based study.** Blood, v. 131, n. 24, p. 2730–2733, 14 jun. 2018.

PAPAEMMANUIL, E. et al. **Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia.** New England Journal of Medicine, v. 374, n. 23, p. 2209–2221, 8 jun. 2016.

PATEL, J. P. et al. **Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia.** New England Journal of Medicine, v. 366, n. 12, p. 1079–1089, 22 mar. 2012.

PRESS, R. D. et al. **Next-generation sequencing-defined minimal residual disease before stem cell transplantation predicts acute myeloid leukemia relapse.** American Journal of Hematology, v. 94, n. 8, p. 902–912, 2019.

SCHLENK, R. F. et al. **Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.** The New England Journal of Medicine, v. 358, n. 18, p.1909–1918, 1 maio 2008.

SCHMID, C. et al. **Outcome of patients with distinct molecular genotypes and cytogenetically normal AML after allogeneic transplantation.** Blood, v. 126, n.

17, p.2062–2069, 22 out. 2015.

SCHUURHUIS, G. J. et al. **Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party.** Blood, v. 131, n. 12, p. 1275–1291, 22 2018.

SHLUSH, L. I. et al. **Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells.** Nature, v. 547, n. 7661, p. 104–108, jul. 2017.

SHLUSH, L. I. **Age-related clonal hematopoiesis.** Blood, v. 131, n. 5, p. 496–504, 1 fev. 2018.

SLOVAK, M. L. et al. **Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study.** Blood, v. 96, n. 13, p. 4075–4083, 15 dez. 2000.

SORROR, M. L. et al. **Comorbidity-Age Index: A Clinical Measure of Biologic Age Before Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation.** Journal of Clinical Oncology, v. 32, n. 29, p. 3249–3256, 25 ago. 2014.

SORROR, M. L. et al. **Development and Validation of a Novel Acute Myeloid Leukemia–Composite Model to Estimate Risks of Mortality.** JAMA Oncology, v. 3, n.12, p. 1675, 1 dez. 2017.

SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, STEIN H, THIELE J. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** [s.l.: s.n.]. v. Revised Fourth Edition

TATE, J. G. et al. **COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer.** Nucleic Acids Research, v. 47, n. D1, p. D941–D947, 8 jan. 2019.

THOL, F. et al. **Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML.** Blood, v. 132, n. 16, p. 1703–1713, 18 out. 2018.

WALTER, R. B. et al. **Impact of pretransplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia.** Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 29, n. 9, p. 1190–1197, 20 mar. 2011.

WALTER, R. B. **Minimal Residual Disease Testing After Induction**

Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia: Moving Beyond Prognostication

Journal of Clinical Oncology, v. 36, n. 15, p. 1463–1465, 6 abr. 2018.

WELCH, J. S. et al. **The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia.** Cell, v. 150, n. 2, p. 264–278, 20 jul. 2012.

WILLEKENS, C. et al. **Prospective long-term minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leukemia: results of the French CBF-2006 trial.** Haematologica, v. 101, n. 3, p. 328–335, mar. 2016.

WONG, H. Y. et al. **Molecular Measurable Residual Disease Testing of Blood During AML Cytotoxic Therapy for Early Prediction of Clinical Response.** Frontiers in Oncology, v. 8, p. 669, 2018.

WONG, T. N. et al. **Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy related acute myeloid leukaemia.** Nature, v. 518, n. 7540, p. 552–555, 26 fev. 2015.

WONG, T. N. et al. **Rapid expansion of preexisting nonleukemic hematopoietic clones frequently follows induction therapy for de novo AML.** Blood, v. 127, n. 7, p.893–897, 18 fev. 2016.

XIE, M. et al. **Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies.** Nature Medicine, v. 20, n. 12, p. 1472–1478, dez. 2014.

YIN, J. A. L. et al. **Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial.** Blood, v. 120, n. 14, p. 2826–2835, 4 out. 2012.

ZHOU, F.; CHEN, B. **Acute myeloid leukemia carrying ETV6 mutations: biologic and clinical features.** Hematology, v. 23, n. 9, p. 608–612, 21 out. 2018.

8. Anexos

Tabela Suplementar 1 (coorte genômica). Variáveis clínicas dos pacientes, da doença, do alo-TCTH e das amostras por paciente.

Para melhor visualização, a tabela pode ser acessada pelo link:

https://drive.google.com/file/d/1bgeKlgusadPCw7t1rU9_4SqLIBGBHi32/view?usp=sharing

Paciente			LMA				Avaliação Pré-TCTH					
ID	Idade	Sexo	LMA Tipo	Risco Citog	SM D Previa	Cariótipo	QT IR	RE C pré TCTH	DR M pré TCTH	Stat us pré TCTH	PS	Ferritina
4	42	Fem	2ª smd	Int	s	46 XX	n		n/a	Ativa		12
6	58	Fem	De novo	Int	n	46 XX	s	s	n/a	Ativa		1827
8	50	Fem	2ª smd		s		s	n	+	RC1	0	809
9	30	Fem	De novo	Int	n		s	s	+	RC2 +	0	1521
10	53	Fem	De novo		n		s	s	-	RC2 +	0	2117
11	60	Masc	desc	Int	n	46 XY	s	n	-	RC1		3518
12	27	Masc	De novo	Int	n	46 XY	s	s	-	RC2 +	0	2590
13	40	Fem	De novo		n		s	s	-	RC2 +	0	3772
14	65	Masc	De novo	Int	n	46 XY	s	s	+	RC2 +	1	2430
15	57	Fem	2ª smd	Int	n	46 XX	s	s	n/a	RC2 +	0	1092
16	22	Fem	De novo	Int	n		s	n	+	RC1	0	710
17	43	Masc	2ª smd	Int	s	46 XY DEL(9)	s	s	+	Ativa		2535
18	25	Masc	De novo	Int	n	46 XY	s	s	n/a	Ativa	0	2703
19	45	Fem	De novo	Fav	n	46 XX INV 16 +22	s	s	+	RC2 +	0	2485
28	46	Fem	De novo	Int	n	46 XX	s	s	+	Ativa	0	2030

Paciente			LMA				Avaliação Pré-TCTH					
ID	Idade	Sexo	LMA Tipo	Risco Citog	SM D Previa	Cariótipo	QT IR	RE C pré TCTH	DR M pré TCTH	Stat us pré TCTH	PS	Ferritina
30	51	Fem	2ª smd	Desf	s	46 XX del11 t(2;22)	s	n	+	RC1	0	1241
31	32	Fem	De novo		n		s	s	+	RC2+		1240
33	46	Fem	De novo	Int	n	46 XX +8	s	s	n/a	RC2+	1	3093
34	47	Masc	2ª smd	Fav	n	45 X -Y t(8;21)	s	s	n/a	Ativa	1	987
35	61	Fem	2ª smd	Int	n	46 XX	s	s	n/a	Ativa		5713
36	65	Fem	De novo	Desf	n	46 XX t(4;9) del 6	s	n	n/a	RC1	1	1917
38	26	Masc	2ª smd	Desf	n	44 XY -11q -13q	s	n	-	RC1	1	2047
40	49	Fem	2ª smd	Int	n	46 XX i(14)	s	n	n/a	RC1		2283
41	47	Fem	De novo	Int	n	46XX	s	s	n/a	RC2+		1297
43	58	Fem	2ª smd	Int	n	46XX	s	n	-	RC1	0	286
44	37	Masc	De novo		n		s	n	+	RC1	0	1552
48	47	Fem	2ª smd	Int	s	46XX	s	n	-	RC1	0	1047
50	27	Masc	2ª smd	Int	n	46XY	s	n	-	RC1	0	442
51	48	Fem	De novo	Int	n	46XX	s	n	+	RC1		759
52	25	Masc	desc	Int	n	46 XY +8	s	n	-	RC1	0	323
54	28	Masc	De novo	Int	n	46XY	s	n	-	RC1		925
55	53	Masc	2ª smd	Int	n	46XY +8	s	n	n/a	RC1	0	1938
56	47	Masc	De novo	Int	n	46XY	s	s	-	RC2 +		3310
58	26	Masc	De novo		n		s	s	+	RC2 +	0	966

Paciente			LMA				Avaliação Pré-TCTH					
ID	Idade	Sexo	LMA Tipo	Risco Citog	SM D Previa	Cariótipo	QT IR	RE C pré TCTH	DR M pré TCTH	Stat us pré TCTH	PS	Ferritina
59	39	Fem	desc				s	s	-	RC2 +		2662
60	50	Fem	De novo	Int	n	46 XX	s	s	-	RC2 +		6086
61	58	Fem	2ª smd				s	s	-	RC2 +		1771
62	41	Fem	De novo	Int	n	46 XX	s	n	+	RC1	1	2592
63	56	Fem	De novo	Int	n	46 XX	s	n	-	RC1	1	1228

Transplante																
ID	Δ Dx-TCTH (d)	TCTH tipo	Doador Sexo	Doador Idade	M M HLA	Fonte	ABO	Cond	Pro toc	Pro filaxia DE CH	CD 34	Pe ga Ne ut(d)	DE CH a	DE CH a grau	DE CH c	DE CH c grau

4	13	AP	Masc	34	n	SP	Co mp	MA C	BU CY	CS AM TX	1.26	20	s	I/II	n/a	
6	125	AP	Masc	57	n	SP	Co mp	MA C	BU CY	CS AM TX	0.43	18	s	I/II	n/a	
8	379	AP	Fem	41	n	SP	Co mp	MA C	BU CY	CS AM TX	1.48		n/a		n/a	
9	586	AP	Fem	37	n	SP	Co mp	MA C	BU CY	CS AM TX	1.28	14	n/a		s	ext
10	421	AP	Fem	43	n	SP	Co mp	MA C	BU CY	CS AM TX	1.15	22	s	III/V	n	
11	512	AP	Masc	64	n	SP	Co mp	MA C	BU CY	CS AM TX	0.13	19	n		n	
12	547	NA P	Fem	22	n	MO	Inc o	MA C	CY TBI AT G	CS AM TX	2	19	n/a		n/a	
13	448	AP	Masc	41	n	MO	Inc o	MA C	BU CY	CS AM TX	4	13	n		n	
14	952	NA P	Masc	34	n	MO	Co mp	MA C	BU CY AT G	CS AM TX	8.59	16	n		n	
15	826	NA P		desc	desc	SP	Inco	MA C	BU CY AT G	CS AM TX	2.75	21	n/a		n/a	
16	298	AP	Masc	26	n	SP	Inco	MA C	BU CY	CS AM TX	0.84	22	s	I/II	n	
17	399	AP	Masc	40	n	SP	Co mp	desc			2.7	20	s	I/II	s	lim
18	2597	Hap	Masc	46	s	MO	Inco	RIC	FLU TBI	PT CY FK MM F	4.11		n/a		n/a	
19	398	Hap	Masc	22	s	SP	Co mp	MA C	BU FLU TBI	PT CY CS AM MF	3.77		n		n	
28	1213	AP	Fem	49	n	SP	Co mp	MA C	BU CY	CS AM TX	1.63	21	s	I/II	s	ext

Transplante

ID	Δ Dx-TC TH (d)	TC TH tipo	Doador Sexo	Doador Idade	M MHLA	Fonte	ABO	Cond	Protop	Profilaxia DECH	CD 34	Pega Neut(d)	DECHA	DECHA grau	DECHc	DECHc grau
30	372	AP	Fem	49	desc	SP	Comp	MAC	BU CY	CS AM TX	1.02	14	s	I/II	s	lim
31	555	AP	Fem	36	n	SP	Comp	MAC	BU CY	CS AM TX	4.17	20	s	I/II	s	lim
33	327	AP	Fem	50	n	SP	Comp	MAC	BU CY	CS AM TX	0.8	16	n		n	
34	414	AP	Fem	61	n	MO	Comp	MAC	BU CY	CS AM TX	5.58	17	n		n	
35	204	AP	Fem	44	n	SP	Comp	RIC	BU FL U	CS AM TX	0.34	23	s	I/II	n	
36	257	AP	Masc	68	n	SP	Inc o	RIC	BU FL U	CS AM TX	2.38	15	s	I/II	s	ext
38	177	AP	Fem	16	n	SP	Inc o	MAC	BU CY	CS AM TX	0.8	22	s	I/II	s	lim
40	154	AP	Fem	32	n	SP	Inc o	MAC	BU CY	CS AM TX	0.73	23	n		n	
41	803	AP	Masc	36	n	SP	Comp	MAC	BU CY	MTX + CS A	2.76	13	s	III/V	s	ext
43	470	AP	Masc	60	n	SP	Comp	MAC	BUC Y	MTX + CSA		19	n		n	
44	162	AP	Fem	53	n	SP	Comp	MAC	BuCy	MTX + CSA	2.06	15	s	I/II	s	ext
48	543	NAP	Masc	41	n	SP	Inco	MAC	BuCy	ATG + CSA + MTX	1.12	14	s		n	
50	289	AP	Masc	41	n	SP	Inco	MAC	BuCy	MTX + CSA	2.24	14	s	I/II	s	lim
51	209	AP	Fem	40	n	SP	Comp	MAC	BuCy	MTX + CSA	3.38	17	s	I/II	s	ext
52		AP	Masc	29	n	SP	Comp	MAC	BuCy	MTX + CSA	0.41	14	s	I/II	s	ext

Transplante

ID	Δ Dx-TC TH (d)	TC TH tipo	Doador Sexo	Doador Idade	M M HLA	Fo nte	AB O	Co nd	Pro toc	Pro fila xia DE CH	CD 34	Pe ga Ne ut(d)	DE CH a	DE CH a gra u	DE CH c	DE CH c gra u
54	407	Hap	Masc	56	s	SP	Co mp	RIC	Flu Mel TBI	CT X + MM F + CS A	3.4	18	s	I/II	s	
55	253	AP	Fem	45	n	SP	Co mp	RIC	BuFlu	MT X + CS A	2.72	17	n		s	lim
56	428	NA P	Masc	46	s	MO	Co mp	MA C	CY TBI AT G	FK AT G	1.86	18	s	I/II	n/a	
58	274	NA P	Masc	28	n	MO	Co mp	RIC	BU FL UA TG	CS AM TX	2.66	13	s	I/II	n	
59		AP	Fem	36	n	SP	Co mp	MA C	BU CY	CS AM TX	1.09	16	s	I/II	n	
60	688	AP	Fem	59	n	MO	Inc o	RIC	BU FL U		1.09	17	s	I/II	s	
61	1975	NA P	Masc	35	n	SP	Co mp	RIC	BU FL UA TG		1.32	14	n		n	
62	207	Hap	Masc	35	s	SP	Co mp	RIC	FL UC YT BI	PT CY FK MM F	0.61	17	s	I/II	n	
63	198	AP	Fem	57	n	SP	Inc o	RIC	BU FL U	CS AM TX	0.77	18	s	III/V	n	

Desfechos					Amostras				
ID	Rec Pós TCTH	Δ TCT H -REC(m)	Óbito (Causa)	SG (m)	Amostra Fonte	Δ Amostra -TCT H(d)	Amostra Status	Amostra %Blas t	Mut (N)
4	s	2.7	R/R	22.0	SP	13	3	12	6
6	s	5.4	R/R	9.5	SP	38	1	0	2
8	n		Infec	0.3	MO	44	1	0.03	2
9	s	18.3	R/R	18.4	MO	16	1	1.05	1
10	n		Infec	2.9	MO	34	1	0	0
11	s	1.6	R/R	2.2	MO	7	1	0	3
12	n		Infec	17.3	MO	23	1	0	0
13	n		Infec	3.2	MO	52	1	0	0
14	s	22.4	R/R	22.5	MO	16	1	1.5	2
15	n		Infec	1.0	SP	64	1	0	3
16	s	1.9	R/R	5.7	SP	23	1	0	1
17	n		desc	13.1	SP	9	1	0	1
18	n		VOD	0.7	SP	65	1	0	2
19	n		Hem	1.2	SP	78	1	0	0
28	s	7.8	R/R	9.0	SP	240	1	0	0
30	s	5.8	R/R	16.9	MO	58	1	0.2	2
31	s	18.6	R/R	22.6	MO	20	1	1	0
33	n		Hem	1.1	MO	135	3	32	2
34	s	4.2	R/R	8.1	MO	115	1	0	0

Desfechos					Amostras				
ID	Rec Pós TCTH	Δ TCT H -REC(m)	Óbito (Causa)	SG (m)	Amostra Fonte	Δ Amostra -TCT H(d)	Amostra Status	Amostra %Blas t	Mut (N)
35	s	5.8	R/R	7.5	MO	15	3	10	3
36	n		desc	30.0	SP	146	1	0	0
38	s	16.0	R/R	31.2	SP	176	2	88	2
40	s	4.1	R/R	10.6	SP	56	1	0	2
41	n		vivo	110.4	SP	90	1	0	3
43	n		vivo	101.4	MO	36	1	0	0

44	n		vivo	96.6	MO	8	1	0	1
48	n		Infec	6.7	SP	255	1	0	1
50	n		vivo	69.4	SP	116	1	0	0
51	n		vivo	71.5	SP	65	1	0	0
52	n		vivo	57.0	SP	162	1	0	0
54	n		vivo	43.7	SP	41	1	0	1
55	n		vivo	36.8	SP	29	1	0	1
56	n		DECH	4.6	SP	111	1	0	0
58	n		vivo	28.5	SP	132	1	0	1
59	n		vivo	26.3	MO	57	1		0
60	n		vivo	26.2	MO	693	2	91	3
61	n		vivo	28.5	SP	86	1	0	2
62	n		vivo	29.0	MO	9	1	0.07	2
63	n		Infec	4.3	MO	198	2	30	1

