

# Alterações citogenéticas e moleculares em leucemia mieloide aguda: revisão e descrição de casos

Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies

Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso<sup>1</sup>, Carlos Henrique Ares Silveira da Motta<sup>2</sup>, Juliana Braga Furtado<sup>2</sup>, Nydia Strachman Bacal<sup>3</sup>, Paulo Augusto Achucarro Silveira<sup>1</sup>, Cynthia Bachir Moyses<sup>4</sup>, Roberta Sitnik<sup>4</sup>, João Renato Rebello Pinho<sup>4</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Estudar a frequência de mutações, que podem configurar bom ou mau prognóstico, bem como sua relação com estudo de cariótipo e imunofenotípico, em portadores de leucemias mieloides agudas. **Métodos:** Foram estudadas 30 amostras de portadores de leucemias mieloides agudas, que foram submetidas à pesquisa das mutações *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD* e *NPM1*. Todas as amostras foram submetidas a estudo imunofenotípico e 25 delas foram submetidas a estudo cariotípico. **Resultados:** Pudemos observar frequência de 33,3% de mutação *NPM1* e igual número em *FLT3-ITD*, frequência que se elevou para 50 e 40% quando se estudaram apenas os casos com cariótipo normal. Dos casos com cariótipo normal, 8% apresentaram o genótipo *NPM1+ / FLT3-*, migrando para o grupo de leucemia mieloide aguda de bom prognóstico. Não observamos o fenótipo típico das leucemias mieloides agudas com cariótipo normal e *NPM1* mutado (HLA-DR e CD34 negativos) nesta pequena casuística. **Conclusão:** O presente estudo foi capaz de identificar casos de bom prognóstico, enfatizando que há necessidade de se incorporar à rotina diagnóstica novos marcadores genéticos, para a correta estratificação prognóstica e orientação terapêutica das leucemia mieloide aguda.

**Descritores:** Leucemia mieloide aguda/genética; Citogenética; Marcadores genéticos; Aberrações cromossômicas

## ABSTRACT

**Objective:** To study the frequency of mutations that may lead to a good or bad prognosis, as well as their relation with the karyotype and immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia. **Methods:** Thirty samples of patients with acute myeloid leukemia

were studied, in which *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD* and *NPM1* mutations were investigated. All samples were submitted to immunophenotyping and 25 to karyotyping. **Results:** An occurrence of 33.3% *NPM1* mutation and an equal number of *FLT3-ITD* mutation were observed. When only the cases with normal karyotype were studied, this figures increased to 50 and 40%, respectively. Eight percent of cases with normal karyotype and genotype *NPM1+ / FLT3-* were included in the group of acute myeloid leukemia with good prognosis. The typical phenotype of acute myeloid leukemia with normal karyotype and mutated *NPM1* (HLA-DR and CD34 negative) was not observed in this small series. **Conclusion:** Good prognosis cases were identified in this series, emphasizing the need to include new genetic markers in the diagnostic routine for the correct classification of acute myeloid leukemia, to more properly estimate prognosis and determine treatment.

**Keywords:** Leukemia, myeloid, acute/genetics; Cytogenetics; Genetic makers; Chromosome aberrations

## INTRODUÇÃO

As leucemias mieloides agudas (LMAs) são um grupo heterogêneo de doenças neoplásicas com grande variabilidade no curso clínico e resposta a terapêutica, assim como em sua base genética e molecular (mais de 300 translocações cromossômicas e mutações gênicas já foram descritas). Acredita-se que mais de um evento mutagênico seja necessário para a gênese da doença, envolvendo mecanismos de proliferação celular (mutações de classe I, como exemplos *BCR-ABL*, *FLT3*,

Trabalho realizado no Laboratório de Técnicas Especiais (LATE) do Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>1</sup>Hematologia, Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Citogenética e Biologia Molecular, Laboratório de Técnicas Especiais (LATE), Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup>Setor de Citometria de Fluxo, Departamento de Patologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Técnicas Especiais (LATE), Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE - São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso – Laboratório de Técnicas Especiais do Hospital Israelita Albert Einstein – Avenida Albert Einstein, 627/701 – Morumbi – CEP 05651-901 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 2151-5555 – Fax: (11) 2151-2122 – e-mail: elviradv@einstein.br

Data de submissão: 11/1/2011 - Data de aceite: 10/5/2011

Conflitos de interesse: nenhum.

*RAS*, *c-Kit*, *PTPN11*, *NF1*, *TEL-PDGRβ*) e bloqueio da diferenciação (mutações de classe II, como exemplos *CBFβ-MYH11*, *AML1-ETO*, *TEL-AML1*, *PML-RARA*, *MLL*, *NUP98-HOXA9*, *PU.1*, *C/CEPα*, *AML1*, *AML-AMP19*, *CEBPA*, *NPM1*)<sup>(1,2)</sup>.

Associada ao fator idade, as alterações citogenéticas e moleculares presentes ao diagnóstico são as principais variáveis relacionadas ao prognóstico na LMA. Até cinco anos atrás, as anormalidades citogenéticas definiam três grupos de risco para portadores de LMA com idade inferior a 60 anos. Aproximadamente 25% dos pacientes pertenciam ao grupo de risco favorável, apresentando t(15;17), t(8;21) e inv(16); 25 a 30% ao de risco desfavorável, envolvendo rearranjos gênicos *MLL*, t(6;9), t(9;22), monossomia/deleções dos cromossomos 5 e 7, inv(3)(q21q26) e cariótipos complexos. Finalmente, 50 a 60% dos pacientes eram portadores de risco intermediário, envolvendo t(9;11), +8, -Y e cariótipo normal, este último correspondendo a até 50% dos casos<sup>(3-5)</sup>. A estimativa de sobrevida de 5 anos para portadores de subtipos citogenéticos de risco bom, intermediário e desfavorável foi estimada em 55, 38 e 11% em casuística compreendendo 609 pacientes com LMA e idade inferior a 60 anos<sup>(4)</sup>.

Pacientes mais idosos apresentam classicamente maior porcentagem de anormalidades citogenéticas de mau prognóstico (até 51%) e menor porcentagem de bom prognóstico (cerca de 4%)<sup>(6)</sup>. A partir dos 60 anos, nota-se um nítido decaimento nas curvas de sobrevida para o mesmo subtipo citogenético, à exceção da leucemia promielocítica aguda (LPA), conforme trabalho compreendendo 1.225 portadores de LMAs<sup>(5)</sup>. Também Farag et al. mostraram que para a população acima de 60 anos e tratados com esquemas quimioterápicos clássicos, apenas 6% estavam vivos após 5 anos<sup>(7,8)</sup>.

Nos últimos anos, uma série de anormalidades genéticas foram descobertas nas LMAs com cariótipo normal, particularmente mutações nos genes *NPM1* (nucleofosmina), *FLT3* (*fms-related tyrosine kinase 3*); *CEBPA* (*CCAAT/enhancer binding protein α*); *MLL* *PTD* (*myeloid-lymphoid* ou *mixed-lineage leukemia*), *NRAS*- (*neuroblastoma RAS viral oncogene*), *BAALC* (*brain and acute leukemia gene*), *ERG* (*v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene-like*), entre outros<sup>(9)</sup>. Aproximadamente 45% dos casos de LMA possuem cariótipo normal, sendo que, dentre estes, as mutações dos genes *NPM1* e *FLT3* são as mais prevalentes, correspondendo, respectivamente, a 45 a 55% e a 35 a 45% dos casos<sup>(10)</sup>.

O gene *FLT3*, localizado no cromossomo 13q12, codifica um receptor com atividade tirosina-quinase relacionado à ativação de vias de sinalização celular responsáveis pela proliferação celular, sendo este normalmente muito expresso em estágios iniciais de células precursoras

mieloides. Mutações do tipo *FLT3-ITD* consistem em inserções em tandem de comprimento variável na região que codifica o domínio justamembrana do receptor. Já a mutação *FLT3-TKD* é do tipo pontual e afeta o domínio tirosina-quinase. Ambas as mutações resultam em constante atividade tirosina-quinase. A primeira mutação possui frequência de 35 a 45% dos casos de LMA com cariótipo normal, já a segunda apresenta frequência inferior a 5%<sup>(10)</sup>.

O gene *NPM1*, localizado no cromossomo 5q35, codifica uma fosfoproteína nucleolar que realiza o transporte entre o núcleo e o citoplasma, e está envolvida diretamente na regulação e estabilidade de proteínas nucleares. A mais frequente mutação consiste na duplicação de quatro pares de bases no éxon 12 (85% dos casos), mas também podem ocorrer outros tipos de inserção de quatro pares de bases na mesma região. Essa mutação causa a localização aberrante da proteína *NPM1* no citoplasma<sup>(11)</sup>.

Trabalhos têm demonstrado que as LMAs com cariótipo normal e mutação nos genes *NPM1* e *CEBPA*, ou em ambos, possuem prognósticos favoráveis, enquanto que mutações no gene *FLT3* possuem prognóstico desfavorável. Já os casos em que ocorrem mutações simultâneas nos genes *FLT3* e *NPM1* possuem prognóstico intermediário<sup>(12)</sup>.

Baseando-se nesses conhecimentos, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, classificou a LMA em vários grupos, incluindo as LMAs com anormalidades genéticas recorrentes, que abrangem nove subtipos, sendo dois deles entidades ainda provisórias (Quadro 1)<sup>(13,14)</sup>.

**Quadro 1.** Classificação da Organização Mundial da Saúde, 2008, para as leucemias mieloides agudas

LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22)- <i>RUNX1T1-RUNX1</i>
LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)- <i>CBFβ-MYH11</i>
Leucemia promielocítica aguda com t(15;17)(q22;q21)- <i>PML-RARA</i>
LMA com t(9;11)(p22;q23)- <i>MLL3-MLL</i>
LMA com t(6;9)(p23;q34)- <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.3) <i>RPN1-EVI1</i>
LMA (megacarioblástica) com t(1;22)(p13;q13)- <i>RBM15-MKL1</i>
LMA com mutação <i>NPM1</i> - entidade provisória
LMA com mutação <i>CEBPA</i> - entidade provisória
LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas à terapêutica
LMA não especificadas
Sarcoma mieloide
Proliferações mieloides relacionadas à síndrome de Down
Neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica

LMA: leucemia mieloide aguda.

Assim, novos grupos de risco genético têm sido definidos recentemente para LMA, conforme mostra o quadro 2.

**Quadro 2.** Classificação da leucemia mieloide aguda em 2010, de acordo com subtipo citogenético e molecular<sup>(14)</sup>

Favorável	t(15;17)(q22;q21)- <i>PML-RARA</i> - t(8;21)(q22;q22)- <i>RUNX1T1-RUNX1</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)- <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado e sem <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal)
Intermediário I	<i>CEBPA</i> mutado (cariótipo normal) <i>NPM1</i> mutado e com <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal) <i>NPM1</i> selvagem e com <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal) <i>NPM1</i> selvagem e sem <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal)
Intermediário II	t(9;11)(p22;q23)- <i>MLL3-MLL</i> Anormalidades citogenéticas não favoráveis ou desfavoráveis
Desfavorável	inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.3) - <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34)- <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23)- rearranjo <i>MLL</i> -5/5q-, -7/7q- Cariótipo complexo

Outras anormalidades genéticas não computadas no quadro 2 também parecem predizer sobrevida. Mutações no gene *c-Kit* parecem se associar à pior prognóstico nas LMAs com t(8;21) ou inv(16), também denominadas LMAs CBF (*core binding factor*)<sup>(2,15)</sup>. Também cariótipo monossomal definido como o cariótipo com duas ou mais monossomias autossômicas ou uma monossomia autossômica associada à anormalidade estrutural tem sido associado ao pior grupo de risco<sup>(16,17)</sup>.

A citometria de fluxo multiparamétrica é essencial na caracterização das neoplasias mieloides e analisa grande volume de células em curto período de tempo, caracterizando vários antígenos por célula. A identificação de antígenos de diferenciação leucocitária, na membrana e intracitoplasmática, possibilita detectar fenótipos mistos, aberrantes e acompanhar doença residual mínima. A expressão de certos antígenos, como CD7, CD11b, CD14, CD56 e CD34 pode estar associada a prognósticos adversos. Fenótipos aberrantes são encontrados em pelo menos 75% das LMAs<sup>(13)</sup>. A imunofenotipagem mostra características peculiares na LMA com *NPM1* mutado, ou seja: expressão antigênica de CD13, CD33 e MPO concomitante com expressões de antígenos monocíticos CD14 e CD11b, e ausência de expressão de CD34<sup>(13)</sup>.

## OBJETIVO

Estudar a frequência de mutações, que podem configurar bom ou mau prognóstico, bem como sua relação com estudo de cariótipo e imunofenotípico, em portadores de LMA.

## MÉTODOS

O Laboratório de Técnicas Especiais do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) recebe amostras de portadores de LMA para realização de estudos imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares, procedentes de diversos centros de tratamento. A partir de 2009, após a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, 30 amostras de medula óssea procedentes de pacientes com LMA recém-diagnosticada ou em recaída foram submetidas à pesquisa das mutações *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD* e *NPM1*. Todas as amostras foram submetidas a estudo imunofenotípico e 25 delas a estudo cariotípico.

O estudo imunofenotípico foi realizado utilizando células marcadas com anticorpos monoclonais para painel proliferativo (CD2, CD4, CD7, CD10, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD34, CD56, CD64, CD71, CD117, HLA-DR, glicoforina A, CD3 c, MPOc, TdT e CD79a). Após o preparo com cloreto de amônia (tampão hemolítico), foi realizada análise em citômetro de fluxo (Epics XL-MCL ou FC-500 – Beckman Coulter).

O estudo citogenético foi realizado em culturas de 24 e 48 horas, sem agentes estimulantes, submetidas a bandamento G e descritas conforme nomenclatura internacional (ISCN 2009).

Para análise das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1*, o DNA das amostras foi extraído pelo kit QIAmp DNA Blood Mini Kit (Quiagen), purificado (EXOSAP) e submetidos a PCR para amplificação, utilizando *primers* específicos e marcados para as mutações *FLT3-ITD* (éxon 14/15) e *NPM1*. Eletroforese capilar foi utilizada para análise do *FLT3-ITD* e *NPM1* por tamanho de fragmento. Para a pesquisa das mutações *FLT3-TKD*, foi realizada nova reação de PCR com *primers* específicos para a realização de Nested-PCR, seguido de sequenciamento. A análise da mutação *FLT3-ITD* e *NPM1* foi realizada no *software* GeneMapper, e os sequenciamentos no SeqScape.

## RESULTADOS

O quadro 3 mostra a descrição dos achados imunofenotípicos, moleculares e cariotípicos.

No total de casos estudados, observamos a presença de mutação no gene *NPM1* em 10 das 30 amostras (33,3%), sendo a mesma frequência para a mutação *FLT3-ITD*. A coexistência de ambas ocorreu em seis casos. Nenhuma amostra se mostrou positiva para mutação *FLT3-TKD*.

Das 25 amostras que tiveram seus cariótipos analisados, 10 apresentaram-no normal (40%). Quando analisamos apenas os cariótipos normais, 50% possuíam



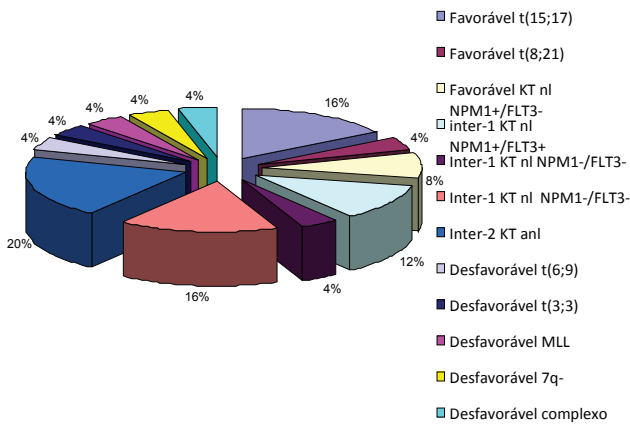


mutação no gene *NPM1* e 40% a mutação *FLT3-ITD*. A presença concomitante de ambas foi diagnosticada em 30% desses casos.

Dentre as 15 amostras diagnosticadas com cariótipo anormal, 4 delas apresentaram cariótipos com a t(15;17) e 1 com variante t(8;21), consideradas de bom prognóstico. Cinco amostras apresentaram cariótipos de prognóstico desfavorável, sendo estes de t(3;3), t(6;9), del(7)(q21), rearranjo 11q23 e um complexo. Ainda foram registrados mais cinco casos considerados de prognóstico intermediário, como del(16)(q22), add(2)(q37), del(3)(p21), trissomia do 5 e t(6;19).

Três casos com cariótipo anormal também apresentaram alterações moleculares, sendo dois casos com t(15;17) e mutação *FLT3-ITD* e um de trissomia do 5 com *FLT3-ITD* e *NPM1* mutado.

Segundo nosso estudo, dos 25 casos com estudo cariotípico, 28% dos casos foram classificados como de prognóstico favorável, sendo, dentre estes, 8% com cariótipo normal e *NPM1* mutado e 20% com cariótipo anormal (16% t(15;17) e 4% t(8;21)). 32% foram classificados como intermediário-1, todos estes com cariótipo normal e 12% *NPM1* mutado e *FLT3-ITD*, 4% *FLT3-ITD* e 16% selvagem para ambas mutações. Os demais casos, todos com cariótipo anormal, foram estratificados como intermediário-2 (20%) e desfavoráveis (20%) (Figura 1).



**Figura 1.** Frequência dos prognósticos segundo a classificação das leucemias mieloides agudas de acordo com os subtipos citogenéticos e moleculares

O estudo imunofenotípico mostrou que 18 casos (60%) apresentavam expressão de antígenos de linhagem não mieloide: CD7 em 10 casos, CD56 em 5 casos e CD11b em 7 casos, sendo que 4 casos apresentaram concomitância de CD7 e CD11b. A expressão do CD56 foi detectada em 16,6% dos casos de LMA e em 20% dos casos com mutação de *FLT3*.

Os estudos imunofenotípicos dos 4 casos com mutação do *NPM1* e *FLT3* selvagem (2 com cariótipo nor-

mal e 2 sem estudo cariotípico) mostraram, em 2 deles, ausência de expressão de CD34. Dos 6 casos com genótipo *NPM1* mutado e *FLT3-ITD* (3 com cariótipo normal, 1 com cariótipo anormal e 2 sem estudo cariotípico), 4 deles apresentaram ausência de expressão de CD34. Apenas 1 dos 4 casos de genótipo *FLT3-ITD* e *NPM1* selvagem (1 com cariótipo normal, 2 com t(15;17) e 1 sem estudo cariotípico) mostrou ausência da expressão de CD34.

**DISCUSSÃO**

Apesar de termos estudado um pequeno número de amostras de portadores de LMA, a frequência observada de mutações em *FLT3* e *NPM1* foi semelhante àquelas relatadas na literatura, tanto para todos os subtipos de LMA, como para as LMAs com cariótipo normal.

Em trabalho utilizando casuística nacional, foi observado o total de 43,7% de mutações em *NPM1* no subtipo de LMA com cariótipo normal, frequência semelhante à observada por nós<sup>(18)</sup>. A presença de mutação *FLT3-ITD* de 33,3% foi um pouco superior a relatada por Lucena-Araujo (23,6%), sendo essa mutação observada nos vários subtipos de LMA, incluindo na LPA, dados também concordantes com a literatura internacional e nacional<sup>(18,19)</sup>.

Não foi detectada mutação do tipo TKD, o que corrobora o achado menos prevalente dessa mutação em casuísticas brasileiras quando comparadas às americanas e europeias<sup>(18-20)</sup>.

Em relação ao estudo imunofenotípico, a pequena casuística prejudicou a comprovação de dados citados na literatura, como a menor frequência de expressão de CD56 no subtipo com *FLT3* mutado, e a ausência da expressão de CD34 e HLA-DR nas LMAs com *NPM1* mutado. Neste estudo, a frequência da expressão de CD56 foi semelhante à observada na LMA com mutação *FLT3* e também um dos portadores de LMA *NPM1* +/*FLT3*- apresentou células blásticas com expressão de CD34 e HLA-DR.

Pelo exposto, pode-se inferir que a rotina diagnóstica deve incorporar novos marcadores genéticos para a correta estratificação prognóstica e orientação terapêutica das LMAs.

**CONCLUSÃO**

A frequência observada das mutações em *FLT3* e *NPM1* nessa casuística foi semelhante àquelas da literatura, sendo capaz de identificar um subgrupo de casos com cariótipo normal *NPM1* +/*FLT3*-, reconhecido atualmente como de bom prognóstico.

## AGRADECIMENTOS

Equipe técnica de Biologia Molecular: Diogo P Marquezoni, Gregório TF Tastoli, Juliana NM Rodrigues, Letícia Oyakawa, Ozires PS Ramos, Roberta Sitnik, Roberta C Petroni, Rubia AF Santana, Vanessa FD Castro.

Equipe técnica da Citogenética: Andréa BM Castro, Cláudia IEC Fabris, Cristina A Ratis, Daniel A Oliveira, Daniela Borri, Priscila F Fernandes, Renata C Elias, Renata K Kishimoto, Silvia HA Figueira.

Equipe técnica da Citometria: Ana Carolina Apelle, Rodolfo P Correia, Ruth H Kanayama, Sonia T Nozawa.

## REFERÊNCIAS

1. Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol.* 2005;128(1):18-34.
2. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia.* 2008;22(5):915-31.
3. Mrózek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:169-77.
4. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, 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.* 2000;96(13):4075-83.
5. Schoch C, Kern W, Schnittger S, Büchner T, Hiddemann W, Haferlach T. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica.* 2004;89(9):1082-90.
6. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2006;107(9):3481-5.
7. Cancer and Leukemia Group B 8461, Farag SS, Archer KJ, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Vardiman JW, Pettenati MJ, Baer MR, Qumsiyeh MB, Koduru PR, Ning Y, Mayer RJ, Stone RM, Larsson RA, Bloomfield CD. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood.* 2006;108(1):63-73.8. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood.* 2007;109(2):431-48.
8. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood.* 2007;109(2):431-48.
9. Gully ML, Shea TC, Fedoriw Y. Genetic tests to evaluate prognosis and predict therapeutic response in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn.* 2010;12(1):3-16.
10. Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2010;22(6):646-55.Review.
11. Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia.* 2009;23(10):1731-43.
12. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358(18):1909-18.
13. Vardiman JW, Bruning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A, et al. Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC, 2008. p. 18-30.
14. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453-74.
15. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman JW, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol.* 2006;24(24):3904-11.
16. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol.* 2008;26(29):4791-7.
17. Foran JM. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: Perspective from the Clinic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:47-55.
18. Lucena-Araujo AR, Souza DL, Morato de Oliveira F, Benicio MT, Figueiredo-Pontes LL, Santana-Lemos BA, et al Results of FLT3 mutation screening and correlations with immunophenotyping in 169 Brazilian patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2010;89(2):225-8.
19. Emerenciano M, Menezes J, Vasquez ML, Zalberg I, Thuler LC, Pombo-de-Oliveira MS; Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. Clinical relevance of FLT3 gene abnormalities in Brazilian patients with infant leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(12):2291-7.
20. De Lourdes Chauffaille M, Borri D, Proto-Siqueira R, Moreira ES, Alberto FL. Acute promyelocytic leukemia with t(15;17): frequency of additional clonal chromosome abnormalities and FLT3 mutations. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(12):2387-9.