

Instituto Politécnico de Coimbra



Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Instituto Politécnico
de Coimbra

FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE *SF3B1* EM SINDROMES MIELODISPLÁSICOS E LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

SARA ISABEL NUNES DOMINGUES

Coimbra

2013

Instituto Politécnico de Coimbra



Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Instituto Politécnico
de Coimbra

FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE *SF3B1* EM SINDROMES MIELODISPLÁSICOS E LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Letícia Ribeiro, Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e coorientação da Mestre Margarida Carreira Revez Pereira Coucelo, Técnica Superior de Saúde do Hospital Pediátrico -CHUC

Agradecimentos

À Doutora Letícia Ribeiro pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Serviço de Hematologia – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE. Agradeço pela orientação e dedicação na correção deste trabalho, bem como pelas sugestões dadas.

À Margarida Coucelo, minha co-orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação. Agradeço também pelos ensinamentos nas técnicas de biologia molecular, pela sua enorme disponibilidade e amizade.

À Dra. Cristina Menezes, ao Dr. Gonçalo Caetano, e à Dra. Tabita Maia pela colaboração na recolha da informação clínica e na obtenção de amostras dos doentes. Agradeço também a disponibilidade para esclarecimento de qualquer dúvida.

À Dra. Manuela Fortuna e Susana Santos por todos os ensinamentos de Citometria de Fluxo e técnica de FISH, por todo o apoio, incentivo e amizade.

A todas as pessoas do Departamento de Hematologia, que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, por toda a ajuda e amizade.

À minha família, em especial à minha mãe, namorado e amigos pela paciência, apoio incondicional e compreensão.

Júri

Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública Fernando José F Agostinho
d'A. Mendes,
Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutora Julia Almeida Parra,
Professora Associada da Universidade Salamanca

Doutora Maria Letícia Ribeiro,
Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Mestre Margarida Carreira Revez Pereira Coucelo,
Técnica Superior de Saúde do Hospital Pediátrico -CHUC

Resumo

Introdução: Recentemente foram identificadas mutações somáticas no gene que codifica a subunidade 1 do fator de *splicing* 3B – *SF3B1* em neoplasias hematológicas, nomeadamente em síndromes mielodisplásicas (SMD), SMD/neoplasias mieloproliferativas (SMD/NMP) e leucemia linfocítica crónica (LLC). **Objetivo:** Definir a prevalência de mutações no gene *SF3B1* (exões 14 e 15) num grupo de doentes com SMD e SMD/NMP, e com LLC.

Material e métodos: Foram estudadas 74 amostras de doentes com SMD e SMD/NMP: 1 citopenia refratária (CR), 8 anemia refratária (AR), 19 AR com sideroblastos em anel (SA) (ARSA), 13 citopenia refratária com displasia multilinha (CRDM), 2 CRDM com SA (CRDM-SA), 7 AR com excesso de blastos (AREB), 4 SMD com del(5q), 10 SMD não classificado (SMD-U), 7 ARSA com trombocitose (ARSA-T) e 3 Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC); e 80 com LLC, classificados de acordo com critérios da OMS 2008. O *screening* de mutações no exão 15 do gene *SF3B1* foi efetuado por High Resolution Melting (HRM). O estudo dos exões 14 e 15 foi efetuado por PCR e sequenciação direta.

Resultados: Foram detetadas mutações *missense* em heterozigotia em 39,2% (29/74) dos doentes; foram identificadas 8 mutações diferentes, já previamente descritas: K700E (18), K666N/Q/E (6), R625C (2), H662D (1), N626D (1) e Y623C (1). Os doentes com mutação *SF3B1* apresentavam: contagem de plaquetas mais elevada ($p=0,006$), maior percentagem de sideroblastos em anel ($p<0,001$), e percentagem de blastos na MO mais baixa ($p<0,001$) relativamente aos doentes sem mutação. A prevalência de mutações *SF3B1* nos doentes com SA foi de 100% nas ARSA (19) e CRDM-SA (2) e de 85,7% nas ARSA-T (6/7). Dos 7 doentes com ARSA-T, 5 (71,4%) tinham, concomitantemente, as mutações *JAK2V617F* e *SF3B1*. A presença da mutação *SF3B1* apresentou um valor preditivo positivo (VPP) de 100% (CI 95%, 87%-100%) para os SA ($\geq 15\%$). Oito doentes (11,6%) evoluíram para LMA (apenas 1 ARSA com mutação *SF3B1*) e 19 (27%) morreram (6 com mutação *SF3B1*). A análise univariada não revelou de relação entre a existência de mutação *SF3B1* e tempo de sobrevivência (OS: $p=0,73$).

Discussão: Observou-se que todos os doentes com mutação *SF3B1* têm percentagem de SA na MO $\geq 15\%$ ($p<0,0001$), com um VPP de 100% (CI 95%, 87%-100%). Neste estudo, a presença de mutação *SF3B1* não confere valor prognóstico favorável, ao contrário do sugerido por alguns autores.

Conclusão: Serão necessários mais estudos para elucidar o papel das mutações no gene *SF3B1* na patofisiologia dos SMD com SA e a sua utilidade no diagnóstico e eventual estratégia terapêutica.

Palavras-chave

SF3B1, SMD, SMD/NMP, LLC, Sideroblastos em Anel

Abstract

Introduction: Recently in hematological malignancies different groups identified somatic mutations in the gene encoding subunit 1 of the splicing factor 3B –*SF3B1*, particularly in myelodysplastic syndromes (MDS), MDS/ myeloproliferative neoplasias (SMD/MPN) and chronic lymphocytic leukemia (CLL).

Objective: Define the prevalence of *SF3B1* mutations (14 and 15 exons) in a group of patients with MDS and MDS/MPN and in a group of CLL patients.

Material and methods: We studied 74 samples from patients with MDS and MDS/MPN: 1 refractory cytopenia (RC), 8 refractory anemia (RA), 19 RA with ring sideroblasts (RS) (RARS), 13 refractory cytopenia with multiline dysplasia (RCMD), 2 RCMD with RS (RCMD-RS), 7 RA with excess blasts (RAEB), 4 MDS del5q, 10 MDS unclassifiable (MDS-U), 7 RARS with thrombocytosis (RARS-T), and 3 chronic myelomonocytic leukemia (CMML); and 80 CLL patients, classified according to the WHO 2008 criteria. Mutations in *SF3B1* exon 15 were screened by High Resolution Melting (HRM). Mutations in *SF3B1* exons 14 and 15 were identified by PCR and direct sequencing.

Results: Missense mutations were detected in heterozygosity in 39.2% (29/74) of patients; 8 different mutations, previously described, were identified: K700E (18), K666N/Q/E (6), R625C (2), H662D (1), N626D (1) and Y623C (1). Patients with *SF3B1* mutations present higher platelet counts ($p=0,006$), higher ring sideroblasts percent ($p<0,001$), and lower blasts percent in BM (bone marrow) ($p<0,001$) when compared to patients without mutation. The prevalence of *SF3B1* mutations in patients with RS was 100% in ARSA (19) and CRDM-SA (2), and 85,7% in RARS-T (6/7). Of the 7 patients with RARS-T, 5 (71,4%) had concomitant JAK2V617F and *SF3B1* mutations. The presence of the *SF3B1* mutation have a positive predictive value (PPV) of 100% (95% CI, 87%-100%) for the RS ($\geq 15\%$). 8 patients (11,6%) progressed to AML (only 1 mutation *SF3B1* ARSA) and 19 (27%) died (6 with *SF3B1* mutation). Univariate analysis did not reveal a relationship between the presence of *SF3B1* mutation and overall survival (OS: $p=0,73$).

Discussion: We found that all patients with *SF3B1* mutations have $\geq 15\%$ of RS in BM ($p<0,0001$), with a PPV of 100% (95% CI, 87%-100%). In this study, the presence of *SF3B1* mutation does not confer favorable prognostic value, unlike previously suggested by some authors.

Conclusion: Further studies will be needed to elucidate the role of *SF3B1* mutations in the pathophysiology of SMD, particularly in those characterized by RS, and its usefulness in the diagnosis and eventual therapeutic strategy.

Keywords

SF3B1, MDS, MDS/MPN, CLL, Ring Sideroblasts

ÍNDICE

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas	v
1. Introdução	1
1.1. Spliceossoma e mecanismo de <i>splicing</i>	1
1.1.1. Processo de montagem do spliceossoma	2
1.1.2. Mutações na maquinaria de <i>splicing</i>	3
1.1.2.1. SF3B1 – Splicing Factor 3 subunit b1	4
1.2. Síndromes Mielodisplásicas	5
1.2.2. Síndromes Mielodisplásicas com sideroblastos em anel	6
1.2.2.1. Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel	7
1.2.2.2. Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel associada a Trombocitose (ARSA-T)	8
1.2.3. Mutações associadas a Síndromes Mielodisplásicas	8
1.2.3.1. Mutações <i>SF3B1</i> em Síndromes Mielodisplásicas	9
1.3. Leucemia Linfocítica Crónica	10
1.3.1. Marcadores de prognóstico em LLC	10
1.3.2. Mutações no gene <i>SF3B1</i> em LLC	11
2. Objetivos	13
3. Material e Métodos	15
3.1. População estudada	15
3.2. Amostras	15
3.3. Estudos moleculares	16

3.3.1. Extração de DNA.....	16
3.3.2. Quantificação de DNA	16
3.3.3. <i>Screening</i> da mutações do exão 15 do gene <i>SF3B1</i> por HRM	16
3.3.4. Pesquisa de mutações nos exões 14 e 15 do gene <i>SF3B1</i> por sequenciação direta.....	18
3.3.4.1. Electroforese em gel de agarose	18
3.3.4.2. Purificação dos produtos de PCR e Sequenciação direta.....	19
3.4. Análise estatística	19
4. Resultados.....	21
4.1. Pesquisa da mutação <i>SF3B1</i> por HRM e sequenciação direta	21
4.2. Características clínicas dos doentes com SMD e SMD/NMP	22
4.3. Mutação no gene <i>SF3B1</i> em doentes com SMD e SMD/NMP	24
4.3.1. Associação da mutação <i>SF3B1</i> com dados clínicos e laboratoriais.....	25
4.3.2. Relação entre mutações <i>SF3B1</i> e Sideroblastos em anel.....	27
4.3.3. Avaliação do impacto da mutação <i>SF3B1</i> no prognóstico.....	27
4.4. Mutações no gene <i>SF3B1</i> em doentes com LLC	29
5. Discussão	31
6. Conclusão.....	35
7. Bibliografia	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do splicing do mRNA precursor (pre-mRNA) em mRNA (em cima); e das duas classes de intrões: tipo-U2 e tipo-U12 (em baixo).....	2
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de splicing do pré-mRNA, com montagem e desmontagem do spliceossoma.	3
Figura 3. Representação esquemática da proteína SF3B1 humana com os domínios estruturais primários destacados.	4
Figura 5. Etapas da reação de PCR no CFX96™ real-time PCR detection system para <i>screening</i> da mutação SF3B1 no exão 15.	17
Figura 9. Perfil de HRM de doentes sem mutação <i>SF3B1</i> (vermelho) e com mutação <i>SF3B1</i> (K700E) (verde). a) Curva de <i>Melt</i> Normalizada; b) Curva da diferença em relação ao padrão.	21
Figura 10. Mutações somáticas no gene <i>SF3B1</i> detetadas por sequenciação. a) Mutação K700E no exão 15 do gene <i>SF3B1</i> . b) Mutação K666N no exão 14 do gene <i>SF3B1</i>	22
Figura 6. Distribuição da mutação no gene <i>SF3B1</i> nos diferentes subtipos de SMD e SMD/NMP estudados.	24
Figura 7. Espectro de mutações no gene <i>SF3B1</i> identificadas em amostras de doentes com SMD e SMD/NMP, e respetivas frequências. O domínio N-terminal (NTD) está indicado e as caixas numeradas representam a repetições HEAT da proteína.....	25
Figura 8. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier (OS). a) Total de doentes agrupados em <i>SF3B1</i> mutado (n=29) (vermelho) e <i>SF3B1</i> sem mutação (n=44) (azul); b) Subtipos de SMD associados a baixo risco (CRDU-AR, ARSA, CRDM, CRDM-SA) agrupados em <i>SF3B1</i> mutado (n=29) (vermelho) e <i>SF3B1</i> sem mutação (n=35) (azul).....	28

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos SMD segundo critérios da OMS 2008.....	5
Tabela 2. Primers utilizados para sequenciação dos exões 14 e 15 do gene <i>SF3B1</i>	18
Tabela 3. Características clínicas e laboratoriais dos doentes estudados, agrupadas de acordo com os subtipos deSMD e SMD/NMP.	23
Tabela 4. Características clínicas e laboratoriais dos doentes com SMD e SMD/NMD, agrupados pela presença e ausência de mutação <i>SF3B1</i>	26
Tabela 5. Características clínicas e laboratoriais dos doentes com LLC com mutação <i>SF3B1</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB7	<i>ATP-binding cassette, subfamily B, member 7</i>
ALAS2	<i>Delta aminolevulinate synthase 2</i>
AREB	Anemia Refratária com Excesso de Blastos
ARSA	Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
ARSA-T	Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel com Trombocitose
ASXL1	<i>Additional sex combs like 1</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>
CBL	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CRDM	Citopenia Refratária com Displasia Multilinha
CRDU	Citopenia Refratária com Displasia Unilinha
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMT3A	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A</i>
dsDNA	<i>double strand DNA (cadeia dupla de DNA)</i>
ETV6	<i>Ets variant 6</i>
EZH2	<i>Histone-lysine N-methyltransferase</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GLRX5	<i>Glutaredoxin-5</i>
Hb	Hemoglobina
HEAT	<i>Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, and the yeast PI3-kinase</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
IDH1/2	<i>Isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1/2</i>
IGHV	Cadeia pesada da imunoglobulina

IPSS	<i>International prognostic scoring system</i>
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LMA	Leucemia Mieloblástica Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crónica
MO	Medula Óssea
MPL	<i>Oncogene Myeloproliferative Leukemia</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NMP	Neoplasia Mieloproliferativa
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OS	<i>Overall Survival</i> (tempo de sobrevivência)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRPF40B	<i>Pre-mRNA-processing factor 40 homolog B</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SA	Sideroblastos em anel
SF1	<i>Splicing Factor 1</i>
SF3a1	<i>Splicing Factor 3 subunit a1</i>
SF3B1	<i>Splicing Factor 3 subunit b1</i>
SLC25A38	<i>Solute carrier family 25, member 38</i>
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
SMD del(5q)	SMD associado a deleção 5q isolada
SMD/NMP	Síndromes Mielodisplásicas / Neoplasias Mieloproliferativas

SMD-SA	Síndromes Mielodisplásicas com sideroblastos em anel
SMD-U	SMD não classificado
snRNP	<i>small nuclear Ribonucleoproteins</i>
SRSF2	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 2</i>
ssDNA	<i>single strand DNA (cadeia simples de DNA)</i>
TET2	<i>Methylcytosine dioxygenase 2</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
U2AF	<i>U2 snRNP auxiliary factor</i>
U2AF35	<i>U2 snRNP auxiliary factor 35</i>
U2AF65	<i>U2 snRNP auxiliary factor 65</i>
WPSS	<i>World Health Organization-Prognostic Scoring System</i>
WT	<i>Wild-type</i>
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>
ZRSR2	<i>Zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Spliceossoma e mecanismo de *splicing*

O spliceossoma é um complexo multiproteico, que existe no núcleo das células e é responsável pelo mecanismo de *splicing*, ou, pela conversão do RNA mensageiro precursor (pré-mRNA) em RNA mensageiro (mRNA) (1,2). O *splicing* de RNA é um processo altamente regulado em que ocorre a excisão dos intrões (sequências não codificantes) do pré-mRNA, promovendo a união dos exões (sequências codificantes) de modo a formar o mRNA maduro (Figura 1) (3–5). O spliceossoma é constituído por mais de 150 proteínas e cinco *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNP) – U1, U2, U4, U5 e U6 – que formam o núcleo catalítico da reação de *splicing* (3,5,6). Cada snRNP é constituída por uma *small nuclear RNA* (snRNA) associada a múltiplas proteínas com funções específicas (7).

Durante o mecanismo de *splicing*, o spliceossoma sofre uma série de alterações dinâmicas na sua conformação e composição (1,6,8). A precisão da reação de *splicing* depende da formação de uma rede complexa de interações RNA-RNA, RNA-proteína e proteína-proteína que permitem o reconhecimento eficiente dos limites intrão-exão no pré-mRNA (9,10). Cada intrão possui locais específicos de reconhecimento: os locais de *splicing* 5' e 3' nas extremidades do intrão e a sequência ponto de ramificação (Branch point sequence – BPS), que são essenciais a uma ligação apropriada (9).

A maioria dos genomas eucariotas contém duas classes de intrões que diferem nas sequências de *splicing*: o tipo U2, que representa mais de 99% dos intrões nos humanos, e o tipo U12. A remoção destes dois tipos de intrões é catalisada por dois spliceossomas diferentes, o U2- e U12-dependente, (1,2,8) que diferem em 4 ou 5 snRNP, mas partilham a maioria das proteínas envolvidas no *splicing* (Figura 1) (11,12).

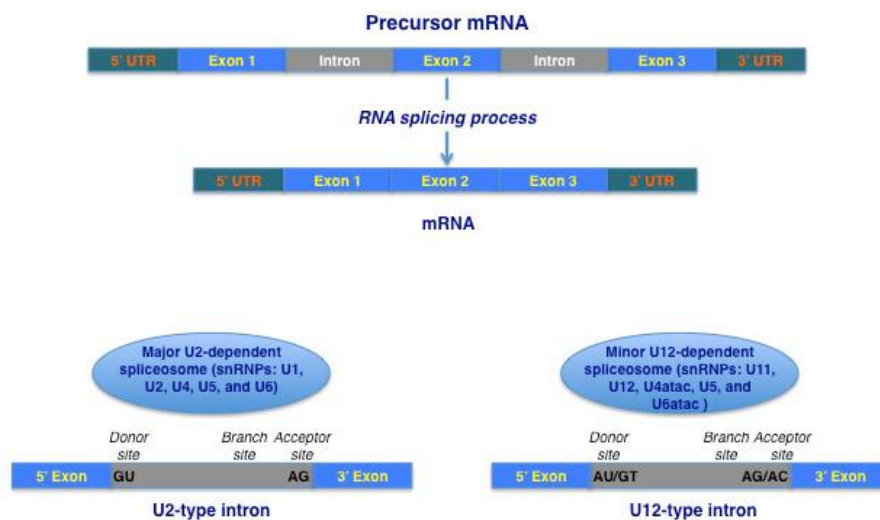


Figura 1. Representação esquemática do splicing do mRNA precursor (pre-mRNA) em mRNA (em cima); e das duas classes de intrões: tipo-U2 e tipo-U12 (em baixo). Adaptado de Cazzola *et al.*, 2012

Nos eucariotas superiores, a maioria dos genes sofre *splicing* alternativo gerando isoformas alternativas de mRNA a partir de uma única sequência de pré-mRNA. O processo de *splicing* alternativo é específico em cada tipo de célula e permite produzir diferentes proteínas a partir de um único gene, aumentando a complexidade do seu proteoma (1,11,12).

1.1.1. Processo de montagem do spliceossoma

Nas primeiras etapas de montagem do spliceossoma, a U1snRNP liga-se ao local de *splicing* na extremidade 5' do intrão no pré-mRNA para formar o complexo E, num processo independente de ATP. O fator de splicing-1 (SF1) liga-se à BPS e o fator auxiliar U2 (U2AF) liga-se à sequência de polipirimidina localizada entre a BPS e o local de *splicing* 3'. Num passo dependente de ATP, a U2snRNP liga-se à BPS para formar o complexo A, ocorrendo o primeiro processo de transesterificação. Em etapas posteriores, o complexo U4/U5/U6 tri-snRNP é recrutado para o spliceossoma formando o complexo B. Finalmente, ocorre alteração da conformação do complexo pela liberação das U1 e U4 snRNPs, formando-se um spliceossoma cataliticamente ativo (complexo C) (Figura 2) (3,6,8,13).

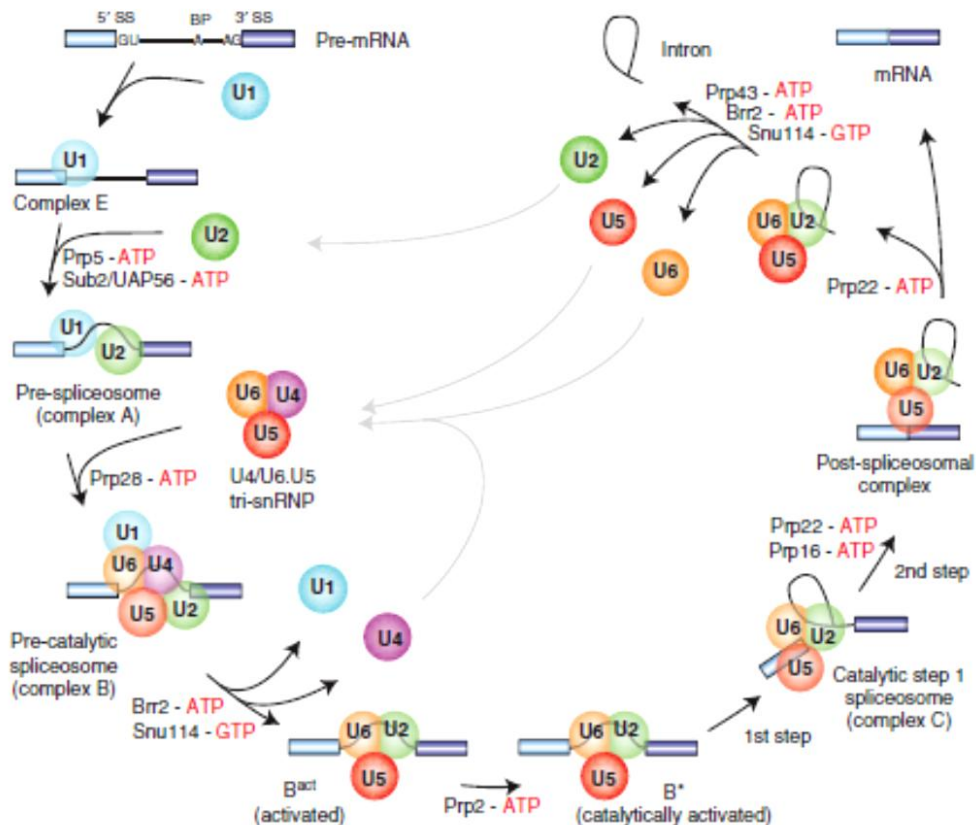


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de splicing do pré-mRNA, com montagem e desmontagem do spliceossoma. Os exões e intrões estão indicados por caixas e linhas, respetivamente, e as snRNP por círculos. Enzimas evolutivamente conservadas DExD/H RNA dependente, ATPases/ helicases atuam em etapas específicas do ciclo para catalisar rearranjos RNA-RNA e eventos de remodelação de RNP. Estas enzimas incluem Sub2 (UAP56 em humanos), Prp5, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22 e Prp43, ou o Snu114 GTPase, que atuam para facilitar as alterações conformacionais indicadas. Adaptado de Will & Lührman, 2011.

1.1.2. Mutações na maquinaria de *splicing*

O uso de tecnologias de sequenciação massiva permitiu identificar mutações em genes que codificam vários componentes chave da maquinaria de *splicing* do RNA. Mutações nos genes que codificam proteínas do spliceossoma podem resultar em alterações no *splicing* ou transcrição anormal de centenas de genes, incluindo a retenção do intrão,

remoção de exões, alteração do reconhecimento do local de *splicing* ou *splicing* alternativo alterado (14).

Recentemente, foram descritas mutações em neoplasias hematológicas nos genes *U2AF1*, *ZRSR2*, *SRSF2* e o *SF3B1*. Estas mutações afetam componentes do spliceossoma envolvidos em etapas iniciais do *splicing*, como as de reconhecimento do local de *splice* 3' no intrão alvo do pré-mRNA (*U2AF35* e *SRSF2*), ou componentes envolvidos no recrutamento da U2 snRNP para a BPS, próximo do local de *splice* 3' (7).

1.1.2.1. SF3B1 – Splicing Factor 3 subunit b1

A subunidade 1 do fator de *splicing* 3 (SF3B1) é uma proteína essencial do complexo U2snRNP e está envolvida na ligação da U2snRNP à BPS, próximo do local de *splicing* 3' do intrão. O gene que codifica a proteína SF3B1 está localizado no cromossoma 2q33.1 (11,15,16). Estruturalmente, a proteína SF3B1 tem duas zonas bem definidas: a região hidrofílica N-terminal que contém várias proteínas envolvidas em interações proteína-RNA e proteína-proteína, e na ligação a outros componentes do spliceossoma, e a região C-terminal, altamente conservada, que consiste em 22 repetições HEAT (Figura 3), onde recentemente foram encontradas alterações somáticas em Síndromes Mielodisplásicas e na Leucemia Linfocítica Crônica (17).

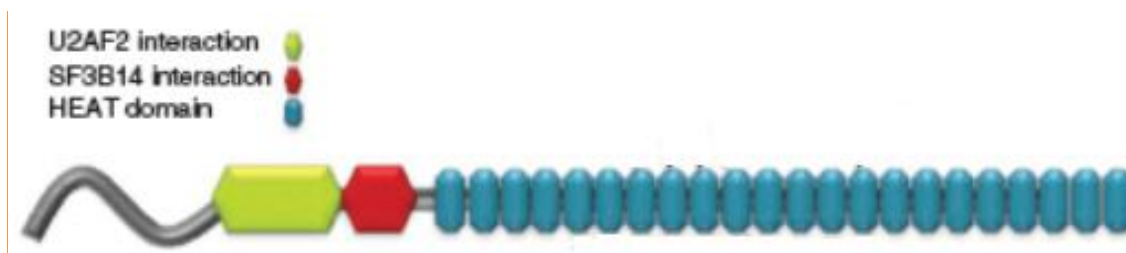


Figura 3. Representação esquemática da proteína SF3B1 humana com os domínios estruturais primários destacados. Adaptado de Quesada *et al.*, 2012

1.2. Síndromes Mielodisplásicas

Os síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de doenças clonais da *stem cell* hematopoiética (HSC), e caracterizam-se por uma hemopoiése ineficaz, displasia morfológica com proliferação e diferenciação anormal de uma ou mais linhagens celulares, citopenias no sangue periférico (SP) (anemia, neutropenia e/ou trombocitopenia) e progressiva falência da medula óssea (MO). Os SMD apresentam risco aumentado de progressão para leucemia mieloide aguda (LMA), ocorrendo aproximadamente em 30% dos casos (18–20).

Os critérios de classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008 para o diagnóstico de SMD (21), incluem a avaliação morfológica e a percentagem de blastos no SP e MO, a presença de sideroblastos em anel (SA) na MO, combinado com análise citogenética, e define 8 subtipos de SMD (tabela 1) (22).

Tabela 1. Classificação dos SMD segundo critérios da OMS 2008.

Subtipos SMD	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)	Sideroblastos em Anel (%)
CRDU (AR, NR, TR)	<1	<5	<15
ARSA	<1	<5	>15
CRDM	<1	<5	<15
CRDM-SA	<1	<5	>15
AREB-I	<5	5-9	<15
AREB-II	5-19	10-19	<15
SMD com del5q	<1	<5	<15
SDM-U	<1	<5	<15

CRDU: citopenia refratária com displasia unilinha, AR: anemia refratária. NR: neutropenia refratária. TR: trombocitopenia refratária. ARSA: anemia refratária com sideroblastos em anel. CRDM: citopenia refratária com displasia multilinha. CRDM-SA: citopenia refratária com displasia multilinha com sideroblastos em anel. AREB-I: anemia refratária com excesso de blastos-tipo I. AREB-II: anemia refratária com excesso de blastos-tipo II. SMD-U: SMD não classificado.

A classificação da OMS de 2008 define ainda um subgrupo de síndromes mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP), que se caracterizam pela presença simultânea de características mielodisplásicas (citopenias e displasia morfológica) e mieloproliferativas (leucocitose, trombocitose). Fazem parte desta classificação a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) e a anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose (ARSA-T) (22).

Os subtipos de SMD estão também categorizados pelo prognóstico. O sistema de prognóstico International prognostic scoring system (IPSS) baseia-se na presença de citopenias, percentagem de blastos na medula óssea e citogenética, o que permite classificar os doentes com SMD em quatro grupos de risco (baixo, intermédio-1, intermédio-2, e alto). (23) A OMS propôs uma nova classificação de prognóstico, World Health Organization-Prognostic Scoring System (WPSS), que inclui a dependência de transfusão, agrupando os doentes em cinco grupos de risco diferentes (muito baixo, baixo, intermédio, alto e muito alto (22,24)

1.2.2. Síndromes Mielodisplásicas com sideroblastos em anel

Mais de 25% dos doentes com SMD apresentam um grande número de sideroblastos em anel (SA) na MO (19). Os SA são precursores eritróides com depósitos de ferro na mitocôndria na região perinuclear e são observados em esfregaços de MO corados pela coloração de Perls. Os SA podem ser encontrados tanto em casos de anemias adquiridas (primárias e secundárias), como em casos de anemias congénitas (25,26). A presença de SA em condições adquiridas secundárias pode ocorrer, por exemplo, por excesso de álcool, toxicidade do chumbo, deficiência de piridoxina ou cobre, terapia com isoniazida. As anemias sideroblásticas hereditárias estão associadas a mutações da linha germinativa envolvendo genes como o *ALAS2*, o *SLC25A38*, o *GLRX5*, e o *ABCB7* (16).

Nos casos adquiridos primários: SMD e SMD/neoplasias mieloproliferativas (SMD/NMP), podem ser encontrados várias frequências de SA. A presença de $\geq 15\%$ de SA na MO, juntamente com critérios morfológicos estabelece o diagnóstico de SMD com SA (SMD-SA), que inclui a ARSA, CRDM-SA e ARSA-T(25).

As alterações no metabolismo do ferro na mitocôndria têm sido implicadas na patogénese dos SA nas anemias sideroblásticas adquiridas, contudo o mecanismo que conduz à formação dos SA permanece desconhecido (25,27,28).

1.2.2.1. Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel

A anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) é um subtipo de SMD relativamente benigno, com uma taxa de sobrevivência média de 9 anos e baixo risco de transformação leucémica (10-20%) (16,29). Numa fase inicial caracteriza-se por hiperplasia eritróide e uma eritropoiése ineficaz, com acumulação de ferro na forma de ferritina mitocondrial (FTMT) nos precursores eritróides (29). Normalmente é estável durante vários anos, mas pode ser seguida por uma fase de falência medular, com ou sem aparecimento de blastos (27).

Estudos efetuados em células CD34+ de doentes com ARSA apresentam um perfil de expressão genética alterado, que se caracteriza pelo aumento de expressão de genes associados à mitocôndria, em particular, genes envolvidos na síntese do heme (*ALAS2*) e uma diminuição da expressão do gene *ABCB7*, que codifica uma proteína envolvida no transporte de ferro para fora da mitocôndria. A diminuição da expressão do *ABCB7* está associado ao aumento da expressão do gene *FTMT* que codifica para a ferritina mitocondrial (27,28).

Um dos potenciais mecanismos para a formação de sideroblastos em anel poderá ser a diminuição da expressão do gene *ABCB7*, essencial na hematopoiese e na manutenção da homeostase do ferro mitocondrial. Nikpour *et al.* (2012) demonstraram que a diminuição da expressão do *ABCB7*, *in vitro*, está associada a uma diminuição do crescimento eritróide com acumulação de ferritina mitocondrial nos eritrócitos imaturos; este fenótipo foi revertido após normalização da expressão do *ABCB7* (12).

Foram descritas mutações no gene *ABCB7* nas anemias sideroblásticas ligadas ao cromossoma X, no entanto, em doentes com ARSA não estão descritas mutações neste gene (12).

1.2.2.2. Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel associada a Trombocitose (ARSA-T)

A ARSA-T é uma neoplasia mielóide com características mielodisplásicas e mieloproliferativas (SMD/NMP) caracterizada por anemia refratária associada a displasia eritróide, presença de sideroblastos em anel e trombocitose (plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$). A ARSA-T está frequentemente associada a mutações nos genes *JAK2*, *MPL* e *TET2* (16,25). Alguns autores sugerem que a ARSA-T pode ser consequência da aquisição de mutações, nas ARSA, nos genes *JAK2*, *MPL*, ou em outros ainda desconhecidos (30).

1.2.3. Mutações associadas a Síndromes Mielodisplásicas

Atualmente, têm sido associadas à patogénese dos SMD mutações genéticas que afetam diferentes classes de genes: transdutores de sinais (*CBL*), apoptóticos (*TP53*, *RAS*), envolvidos na regulação epigenética (*DNMT3*, *IDH1/2*, *TET2*) e genes modificadores de histonas (*EZH2*, *UTX*, *ASXL1*) (18–20).

Mutações nos genes *ASXL1*, *ETV6*, *EZH2*, *IDH1/2*, *JAK2*, *RUNX1*, *CBL*, *NRAS*, *KRAS*, *TP53* e *DNMT3A*, foram identificadas numa pequena proporção de doentes, particularmente naqueles que apresentam elevado risco de evolução leucémica (18,19). A mutação somática no gene *TET2* está presente em aproximadamente 25% dos doentes com SMD, e também em outras neoplasias mielóides. No entanto, estas mutações não explicam a patogénese dos SMD, dado que estão também presentes em outras neoplasias mielóides em frequências variáveis, e cerca de 20% dos SMD não apresentam alterações genéticas conhecidas (31).

Mais recentemente, por *Next-Generation Sequencing* (NGS) foram descritas mutações em genes que codificam para proteínas chave da maquinaria de *splicing* do RNA (*U2AF1*, *ZRSR2*, *SRSF2* e o *SF3B1*) em cerca de 85% das neoplasias mielóides com características mielodisplásicas. Estes dados sugerem que as alterações no *splicing* de mRNA podem ter um papel importante na patofisiologia dos SMD (7,31).

1.2.3.1. Mutações *SF3B1* em Síndromes Mielodisplásicas

Estudos recentes identificaram mutações somáticas adquiridas no gene *SF3B1* nas diversas categorias de SMD (20%-49%), mas predominantemente em doentes com presença de sideroblastos em anel: ARSA (64%-79%), CRDM-SA (37%-58%), e ARSA-T (67%; 72%) (16,18,19,25). No entanto, pouco se conhece sobre o mecanismo patofisiológico das mutações no gene *SF3B1* e as implicações nos SMD.

De modo a compreender a relação entre a presença de mutação no gene *SF3B1* e a presença de SA, foram efetuados estudos *in vitro* utilizando um inibidor farmacológico do SF3b, a *Meayamycin*. Este estudo mostrou que culturas de eritroblastos de indivíduos saudáveis tratadas com *Meayamycin* apresentavam deseritropoiese acentuada com numerosos SA em comparação com o grupo controlo (sem tratamento), o que evidenciou uma relação entre os defeitos no *SF3B1* e a formação de SA (32,33).

No estudo de Visconte *et al*, 2012, para confirmar o papel patogénico e o impacto no fenótipo da mutação no gene *SF3B1*, efetuaram estudos em ratinhos heterozigóticos para *Sf3b1* (*Sf3b1*^{+/-}) e *wild-type* C57BL/6. Os ratinhos *Sf3b1*^{+/-} desenvolveram apenas leucopenia moderada sem anemia, e apresentavam numerosos sideroblastos em anel na MO em comparação com os ratinhos *wild-type*. Estes dados sugerem que as alterações no *SF3B1* podem levar à formação de SA (32,33).

Recentemente, em estudos de doentes com ARSA e mutação *SF3B1* foi observada uma alteração na expressão do gene *ABCB7*, sugerindo que a diminuição na transcrição e *splicing* anormal do gene *ABCB7* pode ser um dos mecanismos que conduz à formação de SA e fenótipo de ARSA (Figura 4) (12).

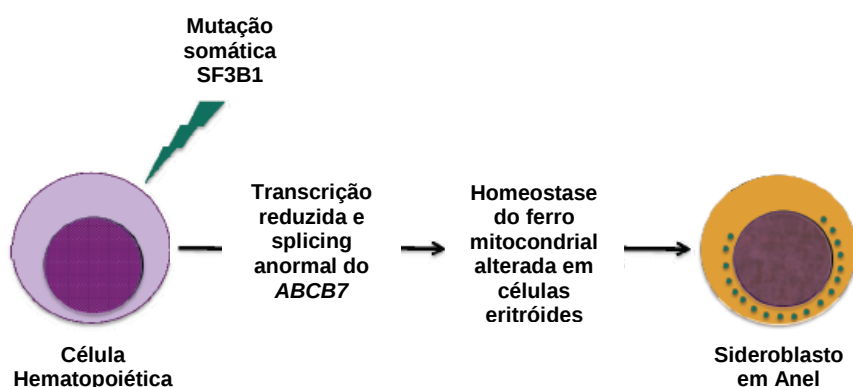


Figura 4. Representação esquemática da relação entre a presença da mutação *SF3B1* e a formação de sideroblastos em anel em doentes com ARSA. Adaptado de Cazzola *et al.*, 2012

1.3. Leucemia Linfocítica Crónica

A leucemia linfocítica crónica (LLC) é uma leucemia das células B maduras que afeta principalmente adultos acima dos 65 anos de idade. É a forma mais comum de neoplasia linfóide nos adultos, representando cerca de 11% de todas as neoplasias hematológicas e aproximadamente 24% de todas as leucemias (34,35). A LLC é uma doença incurável que se caracteriza por uma evolução clínica heterogénea (36). Enquanto alguns doentes apresentam um curso da doença indolente, em cerca de metade dos doentes a doença é progressiva e agressiva com elevada morbilidade e mortalidade (15,17).

A LLC caracteriza-se pela acumulação de linfócitos B monoclonais no sangue periférico, medula óssea e tecidos linfóides primários e secundários, com expressão de CD19, CD20 (expressão mais fraca comparando com os linfócitos B normais), CD5 e CD23 à superfície. As imunoglobulinas de superfície apresentam uma expressão fraca, e muitas vezes podem até ser indetetáveis. Para o diagnóstico de LLC devem estar presentes mais de $5 \times 10^9/L$ linfócitos B monoclonais CD5 positivos no sangue periférico (15,35).

1.3.1. Marcadores de prognóstico em LLC

A avaliação dos fatores de prognóstico, no momento do diagnóstico, é importante para a determinação da agressividade da doença e para decidir a estratégia de tratamento. Na LLC, os marcadores de prognóstico estabelecidos incluem o grau de hipermutação somática do gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (IGHV), expressão dos marcadores ZAP70 e CD38, e deteção de alterações citogenéticas: deleções nos cromossomas 11q, 13q, ou 17p e trissomia 12 (15,35,37).

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), é amplamente utilizada para o estudo das alterações citogenéticas na LLC. Das alterações citogenéticas avaliadas por FISH, incluídas nos painéis de estudo das LLC, a deleção do 13q14 está associada a prognóstico favorável, a trissomia 12 a prognóstico intermédio e a deleção do 11q- e 17p- a mau prognóstico. A frequência destas alterações em doentes com LLC é de 55% para deleção 13q14, 16% para a trissomia 12, 18% para a deleção 11q e 7% para a deleção 17p, havendo casos com mais que uma alteração citogenética (38).

A influência das alterações moleculares na patogénese das LLC ainda não está bem estabelecida (39). Contudo, nos últimos anos, devido ao uso da tecnologia NGS houve um grande avanço na descoberta de novas mutações em genes implicados nas LLC: *TP53*, *ATM*, *NOTCH1*, *XPO1*, *MYD88*, *KLHL6*, *SF3B1*, *FBXW7*, *ZMYM3*, *DDX3X*, e *MAPK1* (15,39).

1.3.2. Mutações no gene *SF3B1* em LLC

Em 2011, Wang *et al.* (2011), num estudo com 91 LLC, detetaram mutações no gene *SF3B1* em 15% dos doentes. Neste estudo, a mutação *SF3B1* estava associada à deleção 11q (8/22 doentes), ou a mutações no gene *ATM* (2 doentes). Rossi *et al.* (2011), num estudo com LLC refratárias ao tratamento com fludarabina, verificaram a presença da mutação em 17% (10/59) dos doentes refratários à fludarabina, e em 5% (17/301) do total de LLC ao diagnóstico. Posteriormente, num estudo de Quesada *et al.* (2012), o gene *SF3B1* estava mutado em 9,7% (27/279) dos doentes com LLC estudados. Em todos os estudos a mutação *SF3B1* mais frequente foi a substituição K700E (exão 15) (15,17,40).

Segundo estes autores, a mutação no gene *SF3B1* em doentes com LLC é preditiva da necessidade precoce de tratamento, independentemente de outros marcadores de prognóstico e está associada a formas agressivas de LLC, sendo pouco frequente ao diagnóstico (15,17,40).

A pesquisa de mutações *SF3B1* em linfomas não-Hodgkin demonstrou que entre as neoplasias de linfócitos B maduros esta mutação foi apenas detetada em LLC (17,40). Esta mutação não foi encontrada na linfocitose monoclonal B (40).

2. OBJETIVOS

Em doentes com neoplasias hematológicas foram, recentemente, descritas mutações nos genes que codificam diferentes componentes do spliceossoma.

O principal objetivo deste trabalho foi definir a prevalência de mutações no gene *SF3B1*, componente do complexo U2snRNP do spliceossoma, num grupo de doentes com SMD, SMD/NMP e LLC seguidos na consulta de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra, EPE.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- correlacionar a presença de mutações no gene *SF3B1* (exões 14 e 15) nos SMD e SMD/NMP com as características clínicas e evolução dos doentes. Os parâmetros clínicos e laboratoriais estudados incluem: idade, sexo, presença de mutação no gene *SF3B1*, hemoglobina, leucócitos, plaquetas, diagnóstico, percentagem de sideroblastos em anel, percentagem de blastos na MO, *follow-up*, tempo de sobrevida (overall survival – OS);

- nas LLC, correlacionar a presença de mutações no gene *SF3B1* com os parâmetros clínicos e laboratoriais: idade, sexo, estadió clínico da doença, presença de alterações citogenéticas, expressão de CD38 e ZAP70.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População estudada

64 doentes com Síndrome Mielodisplásico (SMD), 10 doentes com SMD/Neoplasia Mieloproliferativa (NMP) e 80 doentes com Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) seguidos na consulta de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra, EPE., foram incluídos no estudo depois de obtido o consentimento informado. Os doentes estudados foram diagnosticados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008 (21).

O grupo de doentes com SMD inclui 9 doentes com CRDU – anemia refractária (CRDU-AR), 19 anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), 13 citopenia refratária com displasia multilínea (CRDM), 2 CRDM com sideroblastos em anel (CRDM-SA), 7 anemia refractária com excesso de blastos (AREB-1/2), 4 SMD com deleção 5q, 10 SMD não classificado (SMD-U). O grupo de doentes com SMD/NMP inclui 7 ARSA com trombocitose (ARSA-T) e 3 doentes com Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC); 6 dos doentes com ARSA-T apresentavam mutação *JAK2V617F*.

Todos os doentes com LLC foram estratificados de acordo com a presença de alterações citogenéticas identificadas por FISH ao diagnóstico (Vysis LSI p53, LSI ATM, LSI D13S319, LSI 13, CEP 12 Multi-color Probe, Abbott): 32,9% del (13q14); 12,5% trissomia 12; 7,1% del11q; 2,9% del17p; 24,3% dos doentes apresentavam del (13q14) associada a outra (s) alteração (ões) citogenética (s); em 13 doentes (18,7%) não foram detetadas alterações citogenéticas e 10 doentes não foram estudados por FISH.

3.2. Amostras

Foram colhidas amostras de sangue periférico em EDTA. Os parâmetros hematológicos foram avaliados no contador automático Cell Dyn Sapphire (Abbott Diagnostic, USA). A contagem de sideroblastos em anel foi efetuada em esfregaços de MO corados pela coloração de *Perls*.

3.3. Estudos moleculares

3.3.1. Extração de DNA

O DNA genómico foi extraído a partir de 200 µL de sangue total utilizando o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QuiagenTM, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para obter DNA a partir de núcleos conservados em solução de Carnoy (metanol e ácido acético-3:1), os núcleos foram lavados 3 vezes com PBS e, o DNA genómico foi extraído utilizando o kit JETquick Blood & Cell Culture DNA Spin (Genomed), de acordo com o protocolo do fabricante.

A extração de DNA a partir de raiz de cabelo foi efetuada com o kit DNeasy Blood & Tissue (QuiagenTM, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3.2. Quantificação de DNA

O DNA das amostras a estudar por HRM (High Resolution Melting) foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop1000, Thermo Scientific), de modo a ajustar a concentração de DNA a 10 ng/µL.

3.3.3. Screening da mutações do exão 15 do gene *SF3B1* por HRM

A técnica de HRM baseia-se na análise do perfil de desnaturação da cadeia dupla de DNA (dsDNA). Esta técnica consiste numa reação de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com um corante específico que se intercala no dsDNA, seguida de uma etapa de desnaturação. Neste passo, com o aumento gradual da temperatura o dsDNA desnatura e fica em cadeia simples (ssDNA) com consequente libertação do corante e alteração de fluorescência captada pelo equipamento. A análise do perfil de desnaturação permite

identificar alterações na sequência de DNA em comparação com um perfil de desnaturação normal (41).

O *screening* de mutações no exão 15 do gene *SF3B1* foi efetuado por HRM no CFX96™ real-time PCR detection system (Biorad, CA, USA). Foi amplificado um fragmento de 261 par de bases (pb) utilizando os primers: SF3B1 exão 15F e 15R (Tabela 1) e como agente intercalante o EvaGreen (SsoFast EvaGreen Supermix, Biorad).

A amplificação do DNA genómico ocorreu num volume de reação de 10µL, contendo 4 µL de H₂O, 0,5µL de *primer* SF3B1 direto e reverso 10µM (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany), 5µL de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, CA, USA), e 1 µL de DNA genómico numa concentração de 10 ng/µL.

A reação de PCR ocorreu com uma ativação enzimática a 95°C, 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 95°C, 45 segundos; *annealing* a 54°C (exão 15), 45 segundos; e extensão a 72°C, 10 minutos. As condições de *melting* do DNA , incluíam a leitura de fluorescência num intervalo entre 65°C e 95°C, com um incremento de temperatura de 0.2°C a cada 10 segundos (figura 5).

Todas as amostras foram aplicadas em duplicado, incluindo um controlo positivo, negativo e um branco. A análise foi efetuada pelo *software* Precision Melt Analysis™. Sempre que se observou um perfil de desnaturação diferente do perfil normal prosseguiu-se com a sequenciação da amostra.

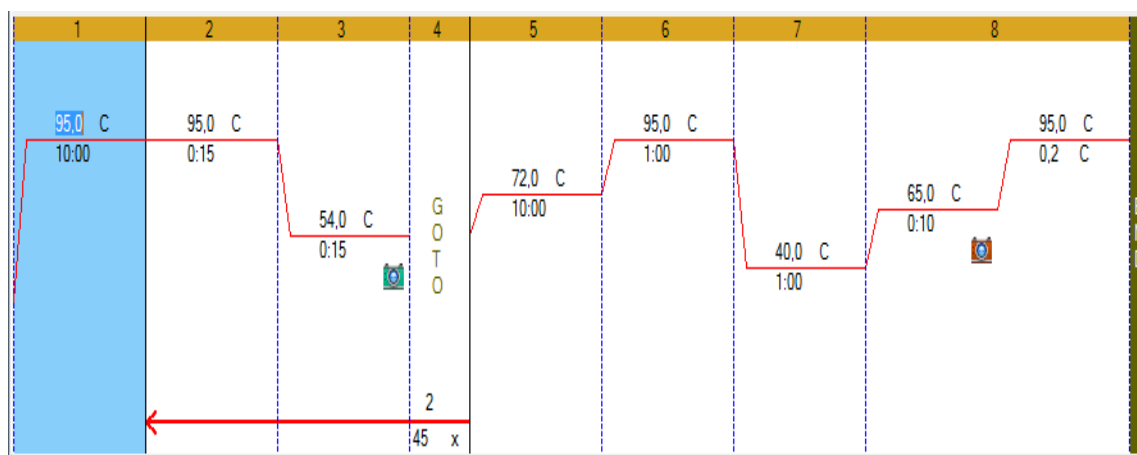


Figura 5. Etapas da reação de PCR no CFX96™ real-time PCR detection system para *screening* da mutação SF3B1 no exão 15.

3.3.4. Pesquisa de mutações nos exões 14 e 15 do gene *SF3B1* por sequenciação direta

A pesquisa de mutações nos exões 14 e 15 do gene *SF3B1* foi efetuada por PCR e sequenciação direta utilizando os *primers* indicados na tabela 2:

Tabela 2. Primers utilizados para sequenciação dos exões 14 e 15 do gene *SF3B1*.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Tamanho fragmento (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
SF3B1 ex.14F	CCAACTCATGACTGTCCTTTCTT	362	60°
SF3B1 ex.14R	GGGCAACATAGTAAGACCCTGT		
SF3B1 ex.15F	TTGGGGCATAGTTAAACCTG	261	54°
SF3B1 ex.15R	AATCAAAAGGTAATTGGTGGA		

A amplificação do DNA genômico ocorreu num volume de reação de 25µL, contendo 19 µL de H₂O, 2,5µL de tampão DNA Polimerase 10x (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0,5 µL de dNTP 10 µM (Invitrogen, Carlsbad, USA), 0,5µL de *primer* *SF3B1* direto e reverso 10µM (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany), 0,3 µL de Taq DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 2 µL de DNA genômico.

A reação de PCR foi efetuada no termociclador C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA) com uma ativação enzimática a 95°C, 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 95°C, 45 segundos, *annealing* a 60°C (exão 14) e 54°C (exão 15), 45 segundos, e extensão a 72°C, 5 minutos.

3.3.4.1. Electroforese em gel de agarose

A amplificação dos produtos de PCR foi confirmada por electroforese em gel de agarose 2% (Ultrapure™ agarose, Invitrogen) corado com Sybr® Safe DNA (Molecular Probes, Invitrogen). Os fragmentos de amplificação foram visualizados e fotografados através de um transiluminador de UV (Kodac EDAS 290; Vilber Lourmat – UV).

3.3.4.2. Purificação dos produtos de PCR e Sequenciação direta

Após verificação dos produtos amplificados a purificação dos produtos de PCR foi efetuada por método enzimático usando ExoSAP-it (USB, Cleveland, OH, USA). A reação de sequenciação foi efetuada com o Kit BigDye Cycle Sequencing v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos de sequenciação foram purificados em colunas DyeEx 2.0[®] Spin Kit (Qiagen[™], Hilden, Germany), e submetidos a sequenciação nucleotídica direta no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, US). Todas as sequências foram manualmente analisadas.

3.4. Análise estatística

As variáveis numéricas foram descritas por média e intervalo, e as variáveis categóricas por contagem e frequências relativas (percentagem). No estudo de variáveis contínuas foi utilizado o teste *t de student* para avaliar as diferenças nas médias entre os grupos com e sem a mutação no gene *SF3B1*. Para comparação de variáveis categóricas entre grupos foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2). O método Kaplan-Meier foi usado para análise do tempo de sobrevida (overall-survival – OS), à data do diagnóstico e à data da morte (evento) ou da última data de follow-up para os doentes vivos (censurados), dos grupos caracterizados pela presença e ausência da mutação.

Para a análise estatística foi usado o *software* SPSS Statistics versão 20.0 (SPSS Science, Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad, San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para *p*-value <0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Pesquisa da mutação *SF3B1* por HRM e sequenciação direta

A pesquisa de mutação nos exões 14 e 15 do gene *SF3B1* em doentes com SMD, SMD/NMP e LLC foi efetuada por *high-resolution melting* (HRM) e sequenciação direta.

A técnica de HRM foi otimizada para a pesquisa de mutações no exão 15 utilizando os mesmos *primers* da sequenciação. O mesmo não foi conseguido para o *screening* de mutações no exão 14 do gene *SF3B1*, provavelmente devido ao maior tamanho do fragmento (362pb) e à grande variedade de mutações encontradas no exão 14.

A presença da mutação *SF3B1* K700E foi detetada em 20 doentes, 18 SMD e SMD/NMP e 2 LLC, por HRM e estes resultados foram confirmados por sequenciação direta (Figuras 9 e 10a.). As mutações no exão 14 do gene *SF3B1* foram detetadas por sequenciação direta (Figura 10b.). Todas as mutações no *SF3B1* correspondem a substituições *missense* em heterozigotia

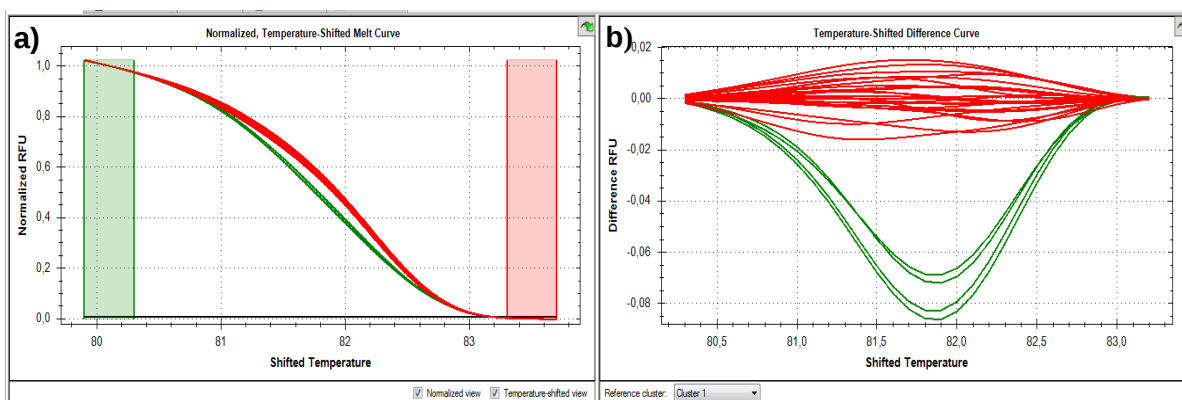


Figura 9. Perfil de HRM de doentes sem mutação *SF3B1* (vermelho) e com mutação *SF3B1* (K700E) (verde). a) Curva de *Melt* Normalizada; b) Curva da diferença em relação ao padrão.

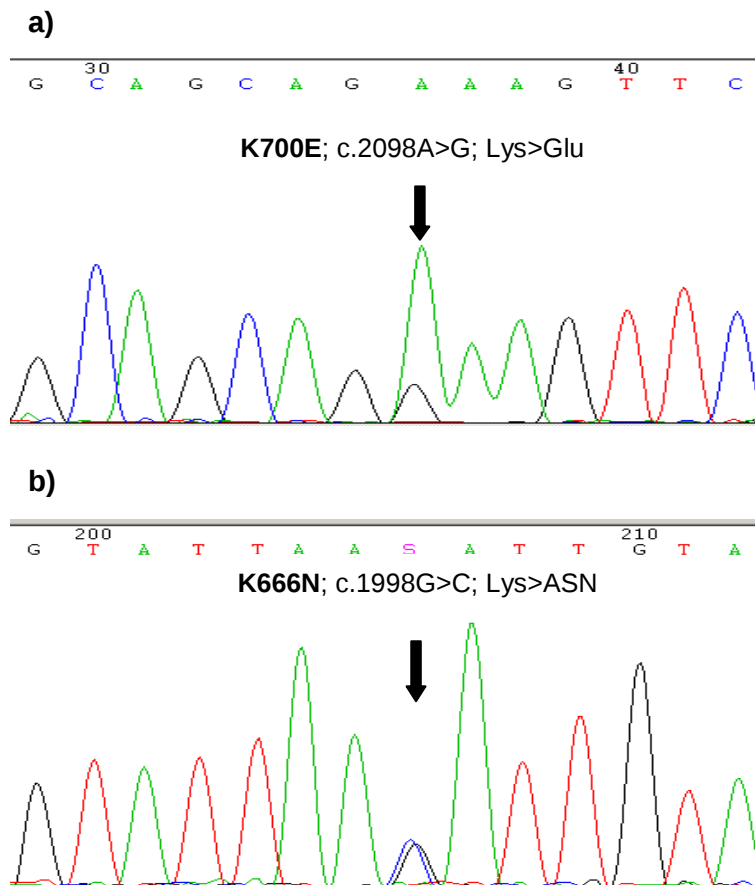


Figura 10. Mutações somáticas no gene *SF3B1* detetadas por sequencição. a) Mutação K700E no exão 15 do gene *SF3B1*. b) Mutação K666N no exão 14 do gene *SF3B1*.

A natureza somática da mutação no gene *SF3B1* foi confirmada pela ausência de mutações no DNA de raiz de cabelo, em 3 doentes com mutação no exão 14 ou 15 (2 doentes K666N; 1 paciente K700E).

4.2. Características clínicas dos doentes com SMD e SMD/NMP

Foram estudados 74 doentes com SMD e SMD/NMP, cujas características clínicas e laboratoriais, estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas e laboratoriais dos doentes estudados, agrupadas de acordo com os subtipos deSMD e SMD/NMP.

	<i>Idade (anos)</i>	<i>Sexo (M:F)</i>	<i>Follow-up (anos)</i>	<i>Progressão LMA, n (%)</i>	<i>Falecidos, n (%)</i>	<i>Hemoglobina (g/dL)</i>	<i>Leucócitos (x10⁹/L)</i>	<i>Plaquetas (x10⁹/L)</i>	<i>Sideroblastos em Anel (%)</i>	<i>Blastos MO (%)</i>
AR (n=8)	60 (30-81)	5:4	14 (0-27)	1(11,1)	2 (22,2)	11 (7,7-16,2)	5,5 (3,9-10,5)	219 (84-370)	0	0
ARSA (n=19)	72 (50-83)	9:10	6 (1-16)	1 (5,3)	4 (21)	10,6 (7,3-14,5)	6,4 (2,3-15,3)	263 (108-637)	48 (17-80)	0
CRDM (n=13)	67 (25-88)	7:6	8 (1-32)	1 (7,7)	3 (23,1)	11,7 (8-14,7)	3,3 (0,9-6)	123 (36-283)	1,6 (0-10)	0,3 (0-3)
CRDM- SA (n=2)	54 (44-64)	1:1	11 (5-18)	0	1 (50)	7 (6,6-7,4)	2,9 (2,7-3,2)	49 (44-55)	37,5 (30-45)	0
AREB-1/2 (n=7)	76 (70-86)	5:2	2 (0-7)	2 (28,6)	4 (57,1)	9,6 (7,2-13,9)	3,2 (1,6-5,2)	135 (16-419)	11,4 (0-80)	12 (6-18)
Del(5q) (n=4)	63 (42-75)	1:3	7 (1-20)	0	0	10,2 (8,5-12)	5,4 (3,9-6,6)	349 (22-694)	0	0
SMD-U (n=10)	70 (40-87)	4:6	7 (0-23)	3 (30)	3 (30)	11,3 (7,7-13,8)	5,8 (1,9-12,8)	126 (24-443)	0	0
ARSA-T (n=7)	79 (69-87)	6:1	3 (0-10)	0	1 (14,3)	10,5 (8,9-12,4)	9,7 (4,5-22,7)	701 (491-1096)	62 (0-20)	0
LMMC (n=3)	68 (61-73)	3:0	1 (1-2)	0	0	12,7 (10,7-14,4)	22,8 (12-35,8)	146 (52-217)	6,7 (0-20)	0

4.3. Mutação no gene *SF3B1* em doentes com SMD e SMD/NMP

Foram pesquisadas mutações no gene *SF3B1* nos exões 14 e 15 em todos os doentes com SMD e SMD/NMP.

Dos 74 doentes estudados, 39,2% (n=29) apresentavam mutação no gene *SF3B1*: 19/19 ARSA, 2/2 CRDM-SA, 2/10 SMD-U e 6/7 ARSA-T. Não foram encontradas mutações no gene *SF3B1* (exões 14 e 15) nos doentes com CRDU-AR (n=9), CRDM (n=13), AREB-1/2 (n=7), SMD com deleção 5q (n=4) e LMMC (n=3) (Figura 6).

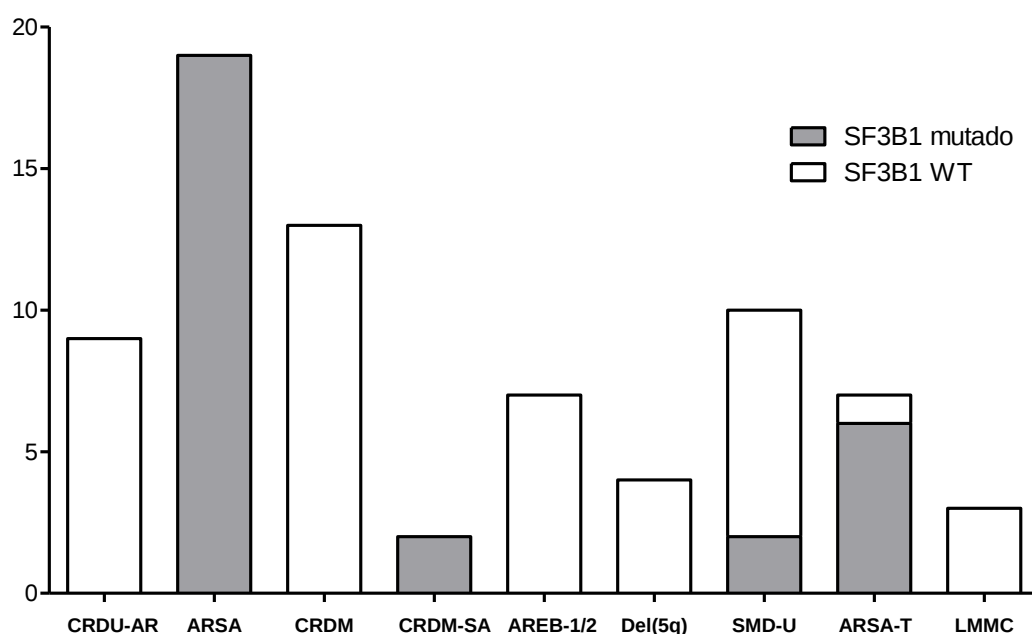


Figura 6. Distribuição da mutação no gene *SF3B1* nos diferentes subtipos de SMD e SMD/NMP estudados.

Foram identificadas oito mutações diferentes já previamente descritas, 7 no exão 14 e uma no exão 15 do gene *SF3B1*. Dos 29 doentes com mutação: 18 (62%) apresentavam a substituição K700E no exão 15; no exão 14 foram identificadas as mutações: K666N/Q/E (n=6), R625C (n=2), H662D (n=1), N626D (n=1) e Y623C (n=1). Estas mutações encontram-se nos domínios HEAT do fator de *splicing* *SF3B1* (figura 7).

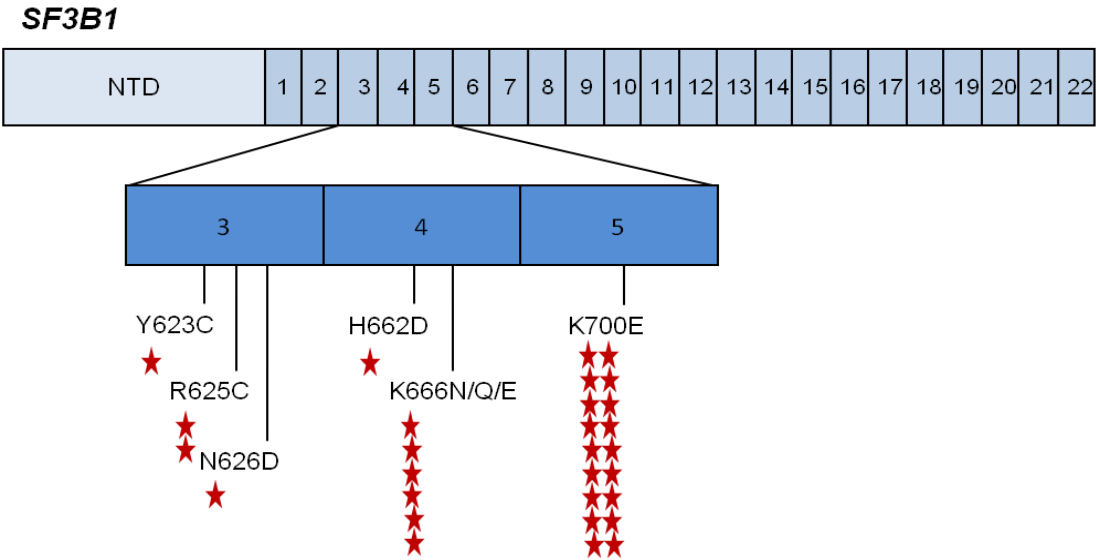


Figura 7. Espectro de mutações no gene *SF3B1* identificadas em amostras de doentes com SMD e SMD/NMP, e respetivas frequências. O domínio N-terminal (NTD) está indicado e as caixas numeradas representam a repetições HEAT da proteína.

4.3.1. Associação da mutação *SF3B1* com dados clínicos e laboratoriais

Na tabela 4 estão apresentados os dados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico dos doentes estudados, agrupados pela presença e ausência da mutação *SF3B1*.

Dos parâmetros clínico laboratoriais analisados observou-se que os doentes com mutação *SF3B1* apresentam valor de plaquetas mais elevado ($p=0,006$), maior percentagem de sideroblastos em anel (média: 51,8% vs 5,3%; $p<0,001$), e percentagem de blastos na MO mais baixa (média: 0% vs. 2,5%; $p<0,001$) relativamente aos doentes sem mutação. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na idade média ao diagnóstico, nos valores de hemoglobina, e no número de leucócitos. A percentagem de doentes com dependência de transfusão é maior nos doentes com mutação no gene *SF3B1*, em comparação com os doentes sem mutação (52,6% vs 37,9%; $p=0,53$), no entanto, sem significado estatístico.

Tabela 4. Características clínicas e laboratoriais dos doentes com SMD e SMD/NMD, agrupados pela presença e ausência de mutação *SF3B1*.

Característica/ WHO2008	Total doentes n=74	<i>SF3B1</i> mutado n=29	<i>SF3B1</i> s/mutação n=45	<i>P value</i>
Idade (anos)	69 (25-88)	73 (44-87)	67 (25-88)	0,08
Sexo (M:F)	41:33	16:13	25:20	0,85
Follow-up (anos)	6,8 (0-32)	5,3 (0-18)	7,9 (0-32)	0,14
Progressão LMA, n (%)	8 (10,8%)	1 (3,4%)	7 (15,6%)	
Falecidos, n (%)	18 (24,3%)	6 (20,7%)	12 (26,7%)	
SMD, n (%)	64 (86,5%)	23 (79,3%)	41 (91,1%)	
SMD/NMP, n (%)	10 (13,5%)	6 (20,7%)	4 (8,9%)	
Subtipos SMD				
<i>CRDU-AR</i> , n (%)	9 (12,2%)	0	9 (20%)	
<i>ARSA</i> , n (%)	19 (25,7%)	19 (65,5%)	0	
<i>CRDM</i> , n (%)	13 (17,6%)	0	13 (28,9%)	
<i>CRDM-SA</i> , n (%)	2 (2,7%)	2 (6,9%)	0	
<i>AREB-1/2</i> , n (%)	7 (9,4%)	0	7 (15,5%)	
<i>Del(5q)</i> , n (%)	4 (5,4%)	0	4 (8,9%)	
<i>SMD-U</i> , n (%)	10 (13,5%)	2 (6,9%)	8 (17,8%)	
SMD/NMP				
<i>ARSA-T</i> , n (%)	7 (9,4%)	6 (20,7%)	1 (2,2%)	
<i>LMMC</i> , n (%)	3 (4,1%)	0	3 (6,7%)	
Hemoglobina (g/dL)	10,8 (7,2-14,7)	10,3 (7,3-14,5)	11,1 (7,2-14,7)	0,12
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	6,2 (1,6-35,8)	6,37 (2,6-15,3)	6,1 (1,6-35,8)	0,85
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	236 (16-1096)	317 (44,2-864)	182 (16-1096)	0,006 ^a
Sideroblastos em Anel (%)	25,2% (0-90%)	51,8%	5,3%	<0,001*
Blastos MO (%)	1,3% (0-15%)	0%	2,5%	0,001*

a- p=0,04 quando excluídos os doentes com *ARSA-T*.

4.3.2. Relação entre mutações *SF3B1* e Sideroblastos em anel

A presença de sideroblastos em anel foi avaliada em 57 doentes com SMD; destes 52,6% (30/57) tinham $\geq 15\%$ de sideroblastos em anel na MO. Foi observada a presença da mutação *SF3B1* em 27 dos 30 doentes com $\geq 15\%$ de SA; apenas em 3 doentes não foi encontrada mutação no *SF3B1*: 1 ARSA-T, 1 LMMC e 1 AREB.

Dos 7 doentes com ARSA-T estudados, 6 apresentavam a mutação *JAK2V617F*; 5 ARSA-T tinham simultaneamente mutação *JAK2V617F* e no gene *SF3B1*.

Neste estudo, a presença de SA na MO ($\geq 15\%$) está associada, com significado estatístico, à presença da mutação no gene *SF3B1* ($p < 0,001$). A mutação *SF3B1* tem um valor preditivo positivo (VPP) de 100% (CI 95%, 87%-100%) para os subtipos de SMD que se caracterizam pela presença de SA; a ausência de SA na MO corresponde a um valor preditivo negativo (VPN) de 91,2% (CI 95%, 76,3%-98,1%).

4.3.3. Avaliação do impacto da mutação *SF3B1* no prognóstico

Dos doentes estudados, 8 (10,8%) evoluíram para LMA (2 AREB, 1 ARSA, 1 CRDM, 1 CRDU-AR, 3 SMD-U); apenas o doente com ARSA apresentava mutação *SF3B1*.

Dezoito doentes faleceram (24,3%): 4 AREB, 2 CRDU-AR, 3 CRDM, 1 CRDM-SA, 4 ARSA, 1 ARSA-T e 3 SMD-U, incluindo 7 doentes que evoluíram para LMA. Seis doentes (20,7%) tinham mutação *SF3B1* e SA (4 ARSA, 1 CRDM-SA, 1 ARSA-T).

O impacto da mutação *SF3B1* no prognóstico foi avaliado pela informação do *follow-up*. A média de *follow-up* foi de 5,3 (0-18) anos e 7,9 (0-32) anos para os doentes com e sem mutação *SF3B1*, respetivamente.

Por análise univariada, foi medida a curva de sobrevida (overall-survival – OS) à data do diagnóstico e à data do falecimento ou da última data de *follow-up* para os doentes vivos. A análise univariada incluindo todos os subtipos de SMD e SMD/NMP estudados revelou inexistência de relação entre a presença/ausência de mutação no gene *SF3B1* e a sobrevida (OS: $p=0,73$) (figura 8a). Considerando apenas os subtipos de SMD associados a baixo risco (CRDU-AR, ARSA, CRDM, CRDM-SA), a análise univariada não

revelou a existência de impacto na sobrevida dos doentes com mutação no gene *SF3B1* em relação aos doentes sem mutação ($p=0,92$) (Figura 8b).

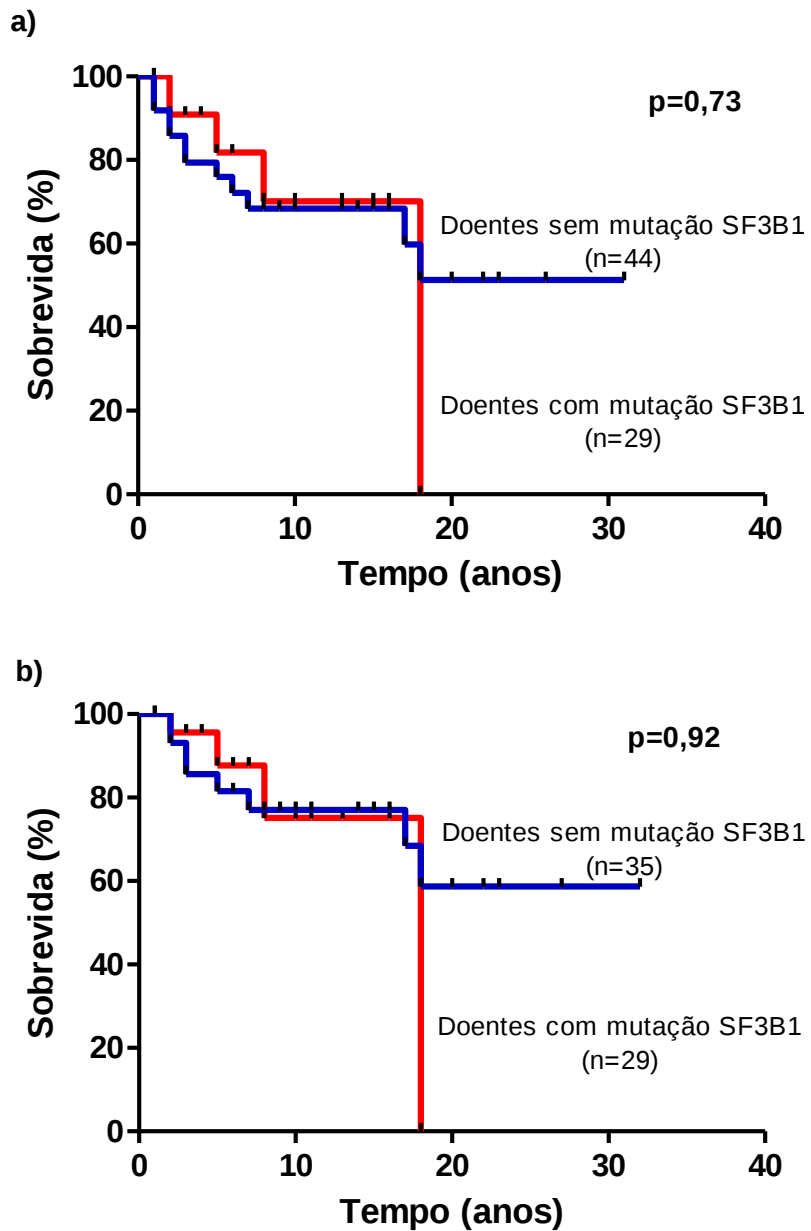


Figura 8. Curva de sobrevida Kaplan-Meier (OS). a) Total de doentes agrupados em *SF3B1* mutado (n=29) (vermelho) e *SF3B1* sem mutação (n=44) (azul); b) Subtipos de SMD associados a baixo risco (CRDU-AR, ARSA, CRDM, CRDM-SA) agrupados em *SF3B1* mutado (n=29) (vermelho) e *SF3B1* sem mutação (n=35) (azul)

4.4. Mutações no gene *SF3B1* em doentes com LLC

Foram estudadas 80 amostras de doentes diagnosticados com LLC, com idade média ao diagnóstico de 68 anos (35-89), e média de linfócitos no sangue periférico de $38,2 \times 10^9/L$. Por citometria de fluxo 30 doentes apresentavam marcadores associados a mau prognóstico – CD38+ e Zap-70+.

Dos doentes estudados apenas 2 (2,5%) apresentavam mutação no exão 15 do gene *SF3B1* – K700E. Destes, 1 não apresentava alterações citogenéticas (por FISH) e o outro apresentava del13q14 - associada a bom prognóstico; por citometria de fluxo nenhum apresentava expressão de marcadores associados a mau prognóstico (tabela 5). Nestes doentes a mutação K700E foi detetada após 28 e 50 meses de *follow-up*. Foram estudadas as amostras de diagnóstico destes doentes que revelaram a presença da mutação K700E à data do diagnóstico.

Tabela 5. Características clínicas e laboratoriais dos doentes com LLC com mutação *SF3B1*.

Doente	Sexo	Idade diagnóstico (anos)	Follow-up(meses)	Estadio clínico	SF3B1	FISH	Citometria Fluxo	
							CD38	ZAP-70
1	M	85	50	Ia	K700E	Normal	neg	neg
2	F	88	28	IVa	K700E	Del(13q14)	neg	neg

5. DISCUSSÃO

A expressão genética é um processo complexo que requer a excisão de intrões do pré-mRNA pelo spliceossoma, num mecanismo designado por *splicing* de RNA (33). Recentemente, em neoplasias hematológicas, foram identificadas mutações somáticas em componentes vitais da maquinaria de *splicing* de RNA, nomeadamente mutações nos genes *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *SF3a1*, *PRPF40B*, *U2AF65* e *SF1* (14,15,18,19,25,31,40,42). Mutações no gene *SF3B1* foram encontradas em casos de Síndromes Mielodisplásicas (SMD), SMD/ Neoplasias Mieloproliferativas (SMD/NMP) e na Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) (33).

Neste estudo foram incluídos 74 doentes com SMD e SMD/NMP e 80 doentes com LLC. Em todos os doentes foi efetuada a pesquisa de mutações nos exões 14 e 15 do gene *SF3B1*, que codificam para a região C-terminal do factor de *splicing* *SF3B1*, onde estão descritas as mutações mais frequentes associadas a SMD e LLC.

Dos doentes com SMD e SMD/NMP estudados, 39,2% (29/74) apresentavam mutações *missense* em heterozigotia no gene *SF3B1*. Observou-se a mutação *SF3B1* em 90% (27/30) dos doentes com SA superior ou igual a 15% na MO. Papaemmanuil *et al.* (2011) detetaram a mutação no gene *SF3B1* em 20% (72/324) dos doentes com SMD, e em 65% (53/82) dos doentes com SA. Malcovati *et al.* (2011) detetaram a mutação *SF3B1* em 28,1% (150/533) dos SMD e em 18,3% (16/83) dos SMD/NMP.

Na classificação dos SMD a ARSA é definida como entidade clínica com presença de $\geq 15\%$ de SA entre os precursores eritróides na MO, no entanto a utilização deste valor de *cut-off* ($\geq 15\%$) é arbitrário e sem bases biológicas. Os SA são precursores eritróides com uma sobrecarga anormal de ferritina na mitocôndria (33). É provável que mutações no gene *SF3B1* afetem o *splicing* de genes que codificam proteínas associadas ao metabolismo do ferro nos precursores eritróides, levando à formação de SA (14).

Neste estudo observou-se que 100% das ARSA e CRDM-SA e 85,7% das ARSA-T apresentavam mutações somáticas no gene *SF3B1*. Quando comparado com a literatura, a frequência de mutações *SF3B1* neste grupo de doentes é mais elevada. As frequências das mutações no gene *SF3B1* foram detetadas por outros autores num intervalo entre 64%-83% para as ARSA, e entre 57%-76% para as CRDM-SA (18,19,25,31). Estas

mutações foram também encontradas com frequência elevada nas ARSA-T: 66,7% (12/18); 72,2% (13/18); 83,3% (5/6) e 90,1% (10/11) (7,14,18,25).

Neste trabalho foram estudados 3 doentes com anemia sideroblástica congênita, não tendo sido encontradas mutações nos exões 14 e 15 do gene *SF3B1*. O mesmo foi observado por Visconte *et al.* (2012), num trabalho onde sequenciaram uma amostra de um doente com anemia sideroblástica congênita com inúmeros SA e não encontraram mutações em nenhum dos exões do gene *SF3B1*.

Neste estudo observou-se uma associação estatisticamente significativa entre mutações no gene *SF3B1* e a presença de sideroblastos em anel ($p < 0,0001$). A presença do gene *SF3B1* mutado tem um valor preditivo positivo para esta característica morfológica (SA) de 100% (CI 95%, 87%-100%), valor idêntico ao obtido no estudo de Malcovati *et al.* (2011) (97.7% (CI 95%, 93.5%-99.5%) (18).

Relativamente aos parâmetros hematológicos observou-se que os doentes com mutação *SF3B1* apresentavam contagem de plaquetas mais elevada ($p < 0,05$), percentagem de blastos na MO mais baixa ($p < 0,001$) e de sideroblastos em anel mais elevada ($p < 0,001$) que os doentes sem mutação. Observou-se que a percentagem de doentes dependentes de transfusão é maior nos doentes com mutação, em comparação com os doentes sem mutação, no entanto, sem significado estatístico (52,6% vs 37,9%, $p = 0,53$).

A ARSA-T é uma entidade pertencente ao grupo de SMD/NMP que apresenta como características a presença de SA na MO e trombocitose. Dos doentes com ARSA-T 6/7 (85,7%) apresentavam a mutação *JAK2V617F* e 5/7 (71,4%) apresentavam as mutações *JAK2V617F* e *SF3B1*. Em todos os doentes com ARSA-T foi encontrada uma mutação no gene *SF3B1* ou a mutação *V617F* no gene *JAK2*. Recentemente, Jeromin *et al.* (2012), num estudo com 47 ARSA-T, observou uma frequência de 87,3% para a mutação no gene *SF3B1*, dos quais, 63,8% apresentam simultaneamente *JAK2V617F* e *SF3B1* mutado (43). Estes resultados reforçam a ideia de que a ARSA-T é uma neoplasia com características mielodisplásicas e mieloproliferativas, tanto a nível clínico como molecular.

Malcovati *et al.* (2011) observou um maior tempo de sobrevida nos SMD com mutação *SF3B1* comparativamente aos SMD sem mutação *SF3B1* (média de sobrevivência: 90 vs 50 meses, $p = 0,001$) (14). Estes resultados foram corroborados por Patnaik *et al.* (2012) e Papaemamanuil *et al.* (2011), que demonstraram que a presença desta alteração molecular nos SMD está associada a uma clínica favorável, com prognóstico independente da idade, sexo e alterações citogenéticas. No entanto, Thol *et al.* (2012)

sugeriram que o prognóstico favorável de doentes com SMD com mutação *SF3B1* é consequência do fenótipo clínico benigno dos doentes com SMD-SA (44).

Neste trabalho, não se observou um impacto favorável no tempo de sobrevida (OS) nos doentes com mutação *SF3B1* em relação aos doentes sem mutação *SF3B1* ($p=0,73$; $p=0,92$), à semelhança de Damm *et al.* (2012), mesmo quando apenas são incluídos os subtipos de baixo risco. Estes resultados podem estar relacionados com o tamanho e heterogeneidade das amostras estudadas e idade mais elevada no grupo de doentes com mutação.

Do total de doentes com SMD e SMD/NMP estudados, 8 (10,8%) progrediram para LMA; destes, apenas 1 apresentava mutação no gene *SF3B1* (ARSA). Segundo Makishima *et al.* (2012), mutações no gene *SF3B1* são pouco frequentes em doentes com formas avançadas de SMD, sugerindo que a mutação não contribui para a progressão da doença. Estudos prévios sugerem que o risco de evolução leucémica é baixo (~5,3%) em doentes com mutação *SF3B1*(18). No nosso estudo, dos 29 doentes com mutação *SF3B1*, um doente (3,4%) evoluiu para LMA e 6 faleceram (20,7%).

Estudos recentes em doentes com Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) observaram a presença de mutações no gene *SF3B1* em doentes com LLC, nomeadamente a mutação K700E no exão 15.

Dos 80 doentes com LLC estudados, apenas 2 (2,5%) apresentavam mutação no gene *SF3B1* – K700E. Quesada *et al.* (2012) detetaram mutações no *SF3B1* em 9,7% (27/279) dos doentes com LLC e observaram que estes doentes apresentavam doença avançada ao diagnóstico, menor tempo de progressão da doença e de sobrevida em relação aos doentes sem mutação. Estes autores observaram que a mutação *SF3B1* apresenta valor prognóstico independente do estadio clínico e da expressão de CD38 ou ZAP-70, sugerindo que mutações no *SF3B1* estão associadas com formas agressivas de LLC (17).

Relativamente aos 2 doentes com LLC e mutação K700E, ambos sob tratamento, apresentavam idade ao diagnóstico superior a 80 anos e ausência de expressão dos marcadores de prognóstico CD38 e ZAP70 por citometria de fluxo. Um dos doentes em estadio IVa apresenta a deleção 13q14 associada a prognóstico favorável e teve uma resposta parcial ao tratamento citostático. Nos dois doentes, a presença da mutação foi avaliada ao diagnóstico e após início de tratamento (*follow-up*), tendo sido detetada em

ambos os momentos, o que demonstra que a mutação K700E não foi adquirida durante o tratamento, tal como sugerido por alguns autores (40). Os resultados obtidos neste estudo, não permitem avaliar o impacto da mutação *SF3B1* no prognóstico dos doentes com LLC, dado o baixo número de doentes com a mutação *SF3B1* (n=2) e devido à idade avançada.

Uma vez que nos SMD a presença de mutações no gene *SF3B1* está fortemente associada à presença de SA, e que estudos *in vitro* demonstram uma relação entre a mutação *SF3B1* e a formação de SA, seria interessante investigar a presença de SA nestes doentes com LLC, no entanto, por ausência de aspirado de MO não foi possível averiguar quanto à presença de SA. Na literatura nenhum estudo refere a investigação e/ou a presença de SA nas LLC com mutação no gene *SF3B1*.

6. CONCLUSÃO

Estudos recentes sugerem que os genes que codificam proteínas do spliceossoma são alvos frequentes de mutações somáticas em neoplasias hematológicas. Neste trabalho a pesquisa de mutações no gene *SF3B1* foi efetuada em 74 doentes com SMD e SMD/NMP e em 80 doentes com LLC.

Observou-se que 39,2% (29/74) dos doentes com SMD e SMD/NMP e que 90% dos doentes com SA $\geq 15\%$ na MO, apresentavam mutações *missense* em heterozigotia no gene *SF3B1*. A prevalência de mutação no gene *SF3B1* foi de 100% nas ARSA e CRDM-SA, 85,7% nas ARSA-T e de 20% dos SMD-U. Dos doentes com ARSA-T 85,7% apresentavam a mutação *JAK2V617F* e 71,4% apresentam simultaneamente as mutações *JAK2V617F* e no *SF3B1*.

Existe uma forte associação entre a presença de mutação no gene *SF3B1* e a presença de SA $\geq 15\%$ na MO ($p < 0.001$), com um VPP de 100% (CI 95%, 87%-100%). Não se observou um impacto favorável no tempo de sobrevida (OS) nos doentes com mutação *SF3B1* em relação aos doentes sem mutação ($p = 0,73$). Dos 29 doentes com mutação *SF3B1*, 1 (3,4%) evoluiu para LMA e 6 faleceram (20,7%).

Apenas 2 doentes (2,5%) com LLC apresentavam uma mutação no exão 15 do gene *SF3B1* – K700E, em heterozigotia. Estes doentes apresentavam a mutação *SF3B1* ao diagnóstico e após tratamento, sem outros marcadores associados a mau prognóstico. Os 2 doentes com mutação K700E tiveram necessidade de tratamento, no entanto, devido ao número reduzido da amostra não é possível retirar conclusões relativamente ao impacto da mutação *SF3B1* nos doentes com LLC.

A técnica de HRM parece ser uma estratégia rápida e económica para o *screening* de mutações no exão 15 do gene *SF3B1*, uma vez que permite identificar amostras com alteração do perfil de *melting* para posterior sequenciação direta. Por HRM foi possível identificar todas as amostras com mutação K700E.

A descoberta de mutações em componentes do spliceossoma, nomeadamente no gene *SF3B1*, e a sua especificidade para ARSA, CRDM-SA e ARSA-T, fortemente associadas à presença de SA $\geq 15\%$, fornece uma nova ferramenta de diagnóstico de subtipos de SMD e SMD/NMP e a possibilidade de desenhar novas estratégias terapêuticas.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011;3(7).
2. Hahn CN, Scott HS. Spliceosome mutations in hematopoietic malignancies. Nature genetics. Nature Publishing Group; 2012;44(1):9–10.
3. Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, Nojima T, Hagiwara M, Ishigami K, et al. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. Nature chemical biology. 2007;3(9):576–83.
4. David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. Genes & development. 2010;24(21):2343–64.
5. Cools J. When splicing turns bad. Haematologica. 2012;97(1):1.
6. Folco EG, Coil KE, Reed R. The anti-tumor drug E7107 reveals an essential role for SF3b in remodeling U2 snRNP to expose the branch point-binding region. Genes & development. 2011;25(5):440–4.
7. Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbuccia N, Hidalgo-Curtis C, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. Blood. 2012 2.
8. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. Cell. 2009;136(4):701–18.
9. Ward AJ, Cooper TA. NIH Public Access. 2011;220(2):152–63.
10. Corrionero A, Miñana B, Valcárcel J. Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. Genes & development. 2011;25(5):445–59.
11. Maciejewski JP, Padgett R a. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. British journal of haematology. 2012;158(2):165–73.

12. Cazzola M, Rossi M, Malcovati L. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood*. 2012
13. Wolf E, Kastner B, Deckert J, Merz C, Stark H, Lührmann R. Exon, intron and splice site locations in the spliceosomal B complex. *The EMBO journal*. 2009;28(15):2283–92.
14. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* . 2012;119(14):3203–10.
15. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2011;365(26):2497–506.
16. Patnaik MM, Lasho TL, Hodnefield JM, Knudson R a, Ketterling RP, Garcia-Manero G, et al. SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value. *Blood*. 2012;119(2):569–72.
17. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics*. Nature Publishing Group; 2012;44(1):47–52.
18. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boultonwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6239–46.
19. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. UKPMC Funders Group Author Manuscript Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring. 2012;365(15):1384–95.
20. Graubert T a, Shen D, Ding L, Okeyo-Owuor T, Lunn CL, Shao J, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics*. Nature Publishing Group; 2012;44(1):53–7.

21. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. (Eds.): WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
22. Vardiman JW, Thiele J, Arber D a, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937–51.
23. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* . 2002;100(7):2292–302.
24. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Porta MGD, Pascutto C, Invernizzi R, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. 2007;25(23):3503–10.
25. Visconte V, Makishima H, Jankowska a, Szpurka H, Traina F, Jerez a, et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2012;26(3):542–5.
26. Cuijpers MLH, Raymakers R a P, Mackenzie M a, de Witte TJM, Swinkels DW. Recent advances in the understanding of iron overload in sideroblastic myelodysplastic syndrome. *British journal of haematology*. 2010;149(3):322–33.
27. Cazzola M, Invernizzi R. Ring sideroblasts and sideroblastic anemias. *Haematologica*. 2011;96(6):789–92.
28. Nikpour M, Pellagatti A, Liu A, Karimi M, Malcovati L, Gogvadze V, et al. Gene expression profiling of erythroblasts from refractory anaemia with ring sideroblasts (RARS) and effects of G-CSF. *British journal of haematology*. 2010;149(6):844–54.
29. Boultonwood J, Pellagatti A, Nikpour M, Pushkaran B, Fidler C, Cattani H, et al. The role of the iron transporter ABCB7 in refractory anemia with ring sideroblasts. *PloS one*. 2008;3(4):e1970.

30. Malcovati L, Cazzola M. Myelodysplastic/myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2008;93(1):4–6.
31. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. Nature Publishing Group; 2011;478(7367):64–9.
32. Visconte V, Rogers HJ, Singh J, Barnard J, Bupathi M, Traina F, et al. myelodysplastic syndromes SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. 2012;3173–86.
33. Visconte V, Makishima H, Maciejewski JP, Tiu RV. Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* Nature Publishing Group; 2012;(January):1–33.
34. Rossi D, Gaidano G. ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter. *Haematologica*. 2012;97(1):5–8.
35. Sagatys EM, Zhang L. Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center*. 2012;19(1):18–25.
36. Hsi ED. Pathologic and molecular genetic features of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*. Elsevier Inc.; 2012;39(1):74–9.
37. Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*. 2005;106(9):3175–82.
38. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews. Cancer*. 2010;10(1):37–50.
39. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101–5.

40. Rossi D, Bruscaggini A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Brief report Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Program.* 2011;118(26):6904–8.
41. Taylor S, Scott R, Kurtz R, Fisher C, Patel V. amplification. 2009;
42. Quesada V, Ramsay AJ, Lopez-Otin C. Chronic lymphocytic leukemia with SF3B1 mutation. *The New England journal of medicine.* 2012 Jun 28;366(26):2530.
43. Jeromin S, Haferlach T, Grossmann V, Alpermann T, Kowarsch A, Haferlach C, et al. High frequencies of SF3B1 and JAK2 mutations in refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis strengthen the assignment to the category of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2012.
44. Thol F, Kade S, Schlarman C, Löffeld P, Morgan M, Krauter J, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012 Apr 12 [cited 2012 Jul 22];119(15):3578–84.