



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO  
CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

**PATRÍCIA MARGARIDA MATOS OLIM CARDOSO**

***RELEVÂNCIA PROGNÓSTICA DAS MUTAÇÕES DOS GENES  
DO FLT3 E NPM1 EM DOENTES COM NEOPLASIAS  
MIELÓIDES***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO**

**AGOSTO/2011**



## ÍNDICE

I - RESUMO .....	VI
II - ABSTRACT .....	X
III – ABREVIATURAS .....	XIII
IV – INTRODUÇÃO .....	1
V - MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
1. Selecção e caracterização da amostra .....	8
1.1. Caracterização dos doentes com Leucemia Mieloblástica Aguda ....	8
1.1. Caracterização dos doentes com Doença Mieloproliferativa e Síndrome Mielodisplásica .....	9
2. Extracção de ADN e detecção de mutações dos genes do <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> ...	9
3. Análise Estatística.....	11
VI - RESULTADOS.....	14
1. Caracterização epidemiológica, clínica e laboratorial dos doentes com neoplasias mielóides .....	14
1.2. Caracterização dos doentes com Leucemia Mieloblástica Aguda ..	15
1.3. Caracterização dos doentes com Doença Mieloproliferativa .....	18
1.4. Caracterização dos doentes com Síndrome Mielodisplásica .....	19
2. Caracterização do tipo de resposta ao tratamento .....	20
3. Avaliação das mutações dos genes do <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> - Relação com as características clínicas e biológicas os doentes com neoplasias mielóides ....	21
3.1. Análise da Frequência das Mutações .....	21

3.2. Relação entre o estado mutacional dos genes <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> e as características clínicas e biológicas dos doentes.....	23
3.3. Relação entre o estado mutacional dos genes <i>FLT3</i> e <i>NPM1</i> e o tipo de resposta ao tratamento .....	26
4. Análise de sobrevivência .....	29
VI - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	37
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45



## RESUMO

A proteína fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) é um receptor com actividade de tirosina cinase cujo gene se encontra mutado em cerca de um terço das Leucemias Mielóides Agudas (LMA), estando as duplicações internas em tandem (ITDs) associadas a prognóstico adverso.

Por outro lado, no braço logo do cromossoma 5 (5q35) está localizado o gene que codifica, uma fosfoproteína nucleolar, a nucleofosmina (NPM1), cuja mutação no exão 12 se encontra em cerca de metade dos doentes com LMA, conferindo um melhor prognóstico.

Contudo, o papel do estado mutacional destes genes em Doenças Mieloproliferativas (DMP) e na Síndrome Mielodisplásica (SMD), não está bem definido, nomeadamente o seu papel como marcador potencial de progressão para LMA.

Num estudo, foi avaliada a frequência das mutações dos genes do *FLT3* e *NPM1* em doentes com Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Doenças Mieloproliferativas (DMP) e Síndrome Mielodisplásica (SMD), caracterizados citogeneticamente, e analisada a sua correlação com a clínica, com a evolução da doença, a resposta ao tratamento e o prognóstico.

Para atingir estes objectivos a pesquisa de mutações dos genes do *FLT3* e *NPM1* foi efectuada em ADN genómico extraído a partir de amostras de sangue periférico (SP) ou medula óssea (MO) de 76 doentes com as neoplasias mielóides, dos quais 52 com o diagnóstico de LMA, 19 com DMP e 5 com SMD, de acordo com critérios FAB (French-American-British) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008.

A detecção das mutações no gene *FLT3*, em particular as Duplicações Internas em Tandem (ITD) e mutação pontual D835 foi efectuada após amplificação, por PCR e PCR por RFLP respectivamente, enquanto a pesquisa das mutações do gene *NPM1* (exão 12) foi efectuada por sequenciação.

A presença de mutações no gene *FLT3* (ITD) e no exão 12 do gene *NPM1* apenas foram identificadas nos doentes com LMA não tendo sido detectadas em nenhum dos doentes com DMP e SMD incluídos neste estudo. No entanto, em 2 doentes com DMP (trombocitêmia essencial) foi identificada a mutação D835 no gene *FLT3*.

A incidência das mutações *FLT3*-ITD e do exão 12 do gene *NPM1* nos doentes com LMA foi de 28 e 9,6%, respectivamente. Além disso, nestes doentes registou-se uma contagem de leucócitos e percentagem de blastos mais elevadas.

Por outro lado, os nossos resultados mostram que os doentes em que foram identificadas as duas mutações em simultâneo (*ITD+/NPM1+*), eram aqueles em que a taxa de Remissão Completa (RC) era mais baixa (34%), relativamente à observada nos doentes sem nenhuma das mutações (*ITD-/NPM1-*), ou em que apenas uma das mutações foi identificada (*ITD-/NPM1+* ou *ITD+/NPM1-*). A maior taxa de RC foi atingida nos doentes *ITD-/NPM1+* (100%).

De igual modo, a sobrevivência global (SG) foi superior tanto nos doentes sem a mutação ITD do gene *FLT3* (*FLT3/ITD* negativo) como nos doentes com a mutação no gene *NPM1* (*NPM1* positivo).

Estes resultados indicam-nos que a mutação ITD no gene *FLT3* confere pior prognóstico aos doentes com LMA inseridos no estudo, enquanto a mutação no gene *NPM1* confere um prognóstico favorável a estes doentes.

Como as mutações nestes genes são as mais frequentes em doentes com LMA e conferem prognóstico distinto, a sua detecção precoce poderá contribuir para avaliação do prognóstico e abordagem terapêutica individualizada e dirigida a alvos moleculares. Da mesma forma, a detecção destas mutações em doentes com SMD e DMP poderá também ter relevância prognóstica, contudo são necessários estudos mais amplos.

**Palavras Chave:** Neoplasias mielóides, *FLT3*, *NPM1*, Mutações, Prognóstico





## ABSTRACT

The fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) protein is a tyrosine kinase receptor which gene is mutated in about one third of acute myeloid leukemia (AML) patients, being the *FLT3* internal tandem duplications (ITD's) mutations associated with an adverse prognosis in this disease.

By other side, in the long arm of chromosome 5 (5q35) is localized the gene that encodes a nucleolar phosphoprotein, Nucleophosmin (NPM1), which mutation in exon 12 is found in about a half of AML patients, giving a better prognosis.

Therefore, the mutational status role of these genes in Myeloproliferative Neoplasms (MPN) and Myelodysplastic Syndrome (MDS), is not well defined, namely their's role as a potential marker of progression to AML.

In this study was analyzed the frequency of the *NPM1* and *FLT3* genes in patients with AML, MPN and MDS, cytogenetically characterized, and analyzed their correlation with clinical parameters, disease progression, treatment response and prognosis/survival.

To achieve our objectives, the *FLT3* and *NPM1* genes mutations was performed on genomic DNA extracted from peripheral blood (PB) or bone marrow (MO) samples of 76 patients with myeloid malignancies, including 52 with AML diagnosis, 19 with MPN's and 5 with MDS, according to FAB (French-American-British) criteria and World Health Organization (WHO) (2008).

Detection of *FLT3* gene mutations, in particular the Internal tandem duplications (ITD) and the D835 mutation was achieved after amplification by PCR (Polymerase Chain Reaction) and by RFLP (*Restriction Length Polymorfisms*) analysis, respectively, while the search for mutations of *NPM1* gene (exon 12) was carried out by gene sequencing.

In this study, the presence of *FLT3*-ITD and exon 12 of *NPM1* genes mutations were only identified in AML patients, while none of the MPN and MDS patients carried out this kind of mutation. However, in two MPN patients (Trombocitemia Essential) we found the D835 FLT3 mutation.

The incidence of FLT3-ITD and NPM1 exon-12 mutations in AML patients was 28 and 9,6%, respectively. Moreover, these patients had higher white blood cell count and percentage of blasts.

On the other hand, our results show that patients positive for both mutations (*ITD* +/*NPM1* +), were those in which the rate of complete remission (CR) was lower (34%), compared with that seen in patients without mutations (*ITD*-/*NPM1*-), or with those in which only one mutation was identified (*ITD*-/*NPM1*+ or *ITD*+ / *NPM1*-). The highest rate of CR was achieved in patients *ITD*-/*NPM1* + (100%).

Similarly, the overall survival (OS) was much higher in patients without the *ITD* gene mutation (*FLT3/ITD* negative) as well as in patients with *NPM1* gene mutation (*NPM1* positive).

These results suggests that the ITD mutation in the *FLT3* gene confers a worse prognosis for AML patients enrolled in the study, while *NPM1* gene mutations confers a favorable prognosis for these patients.

Since the frequency of these genes mutations are more common in AML patients and confer distinct prognosis, early detection can contribute to prognosis assessment and to individualized therapeutic approach directed at molecular targets. Similarly, the detection of these mutations in patients with MPN and MDS may also have prognostic relevance, but larger studies are needed.

**Key words:** Myeloid Neoplasms, *FLT3*, *NPM1*, Mutations, Prognosis



## ABREVIATURAS

AREB – Anemia Refractária com Excesso de Blastos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

CEBPA – CCAAT/enhancer- binding protein- $\alpha$

D835 – codão 835

DE – Doença Estável

DMP – Doença Mieloprolifertiva

DNA – Desoxirribonucleic acid

DP – Doença Progressiva

FAB – French-American-British

FLT3 - Fms-like tyrosine kinase 3

IDT – Duplicação Interna em Tandem

IPSS – Sistema de Score Prognóstico Internacional

JAK – Janus cinase

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMA- CN - Leucemia Mielóide Aguda de cariótipo normal

LMA- DH - Leucemia Mielóide Aguda secundária a doença hematológica

LMA-t - Leucemia Mielóide Aguda secundária a tratamento (químio ou radioterapia)

LMMC – Leucemia Mielomonocítica Crónica

NA – Não Aplicável

MO – Medula Óssea

MFP – Mielofibrose Primária

NPM1 – Nucleofosmina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reacção de Polimerização em Cadeia

PCR-RFLP – Reacção de Polimerização em Cadeia por polimorfismos de fragmentos de restrição

PV – Policitemia Vera

RC – remissão completa

RP – remissão parcial

RTK – receptor tirosina cinase

SG – Sobrevivência Global

SMD – Síndrome Mielodisplásica

SP – Sangue Periférico

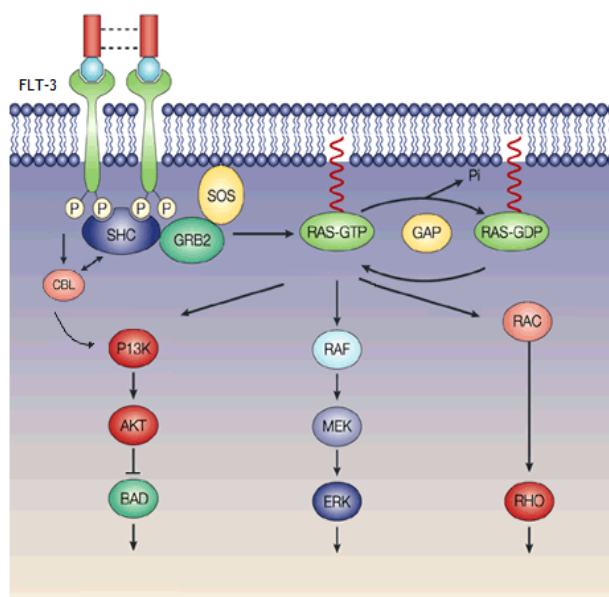
TE – Trombocitose essencial

TK – Tirosina Cinase



## INTRODUÇÃO

A proteína fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) é um receptor membranal da classe III com actividade de tirosina cinase (RTK) expresso em células precursoras hematopoiéticas normais que desaparece ao longo da diferenciação celular (Small, 2006). Este receptor desempenha um papel chave na hematopoiese e sobrevida, uma vez que activa vias de sinalização intracelulares que actuam na regulação o crescimento, proliferação e sobrevivência das células do sistema hematopoiético (Figura 1) (Kim *et al.*, 2010). Este receptor através do seu domínio de tirosina cinase localizado na região intracitoplasmática é capaz de activar de activar proteínas envolvidas no controlo do ciclo celular por fosforilação em resíduos e tirosina (Shami K *et al.*, 2008; Thompson, 2009).



**Figura 1 – Vias de sinalização activadas pelo receptor FLT3.** Activação do receptor FLT3 pelo ligando FL conduz à activação do domínio intracelular de tirosina cinase do receptor com consequente activação das vias de sinalização intracelulares PI3K/AKT e MAPK (Adaptado de Stirewalt e Radich, 2003).



O gene humano que codifica este receptor, está localizado no braço longo do cromossoma 13 (13q12), e codifica uma proteína com 993 resíduos de aminoácidos, o RTK FLT3, já mencionado (Kim *et al.*, 2010).

As mutações no gene do *FLT3* ocorrem em cerca de 30 a 40% das Leucemias Mieloblásticas Agudas com cariótipo normal (LMA-CN) (Singh *et al.*, 2011) sendo as mais frequentes as duplicações internas em tandem (ITDs), no domínio justa-membranar (25%) enquanto as mutações pontuais *missense* no domínio da tirosina cinase no codão 835 (D835), foram identificadas em 5 a 7% dos casos (Foran, 2010).

A presença da mutação ITD no gene *FLT3* origina um receptor FLT3 alterado com amplificação da porção justa-membranar o que condiciona a activação permanente do domínio de tirosina cinase e conseqüente proliferação descontrolada das células mielóides (Kim *et al.*, 2010). A incidência de mutações FLT3 aumenta com a idade e tem sido associada a cariótipo normal, a contagem de leucócitos elevada (Haferlach *et al.*, 2011) e aos subtipos da classificação FAB (French-American-British) M3 e M5 (Baer *et al.*, 2009). Além disso, na presença deste tipo de mutação os doentes apresentam taxa remissão completa (RC) e sobrevivência global (SG) inferiores. Este prognóstico desfavorável é mais notório em doentes jovens (idade inferior a 60anos) enquanto em idosos (idade superior a 60 anos) o impacto no prognóstico parece ser menor (Singh *et al.*, 2011; Foran *et al.*, 2010). Por outro lado, a presença da mutação pontual (D835) parece não estar associada a prognóstico adverso (Foran *et al.*, 2010).

As mutações do gene *FLT3* foram também descritas em cerca de 3 a 6% de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) de alto risco estando associadas a maior taxa de progressão para Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) (Small, 2006).

Relativamente às Doenças Mieloproliferativas (DMP) há poucos estudos relacionados com a presença da mutação do gene *FLT3*.

No braço longo do cromossoma 5 (5q35) está o gene que codifica uma fosfoproteína nucleolar, a nucleofosmina (NPM1) uma proteína multifuncional envolvida na manutenção da estabilidade genómica controlando a reparação do DNA e duplicação do centrómero durante a mitose. Além disso, desempenha um papel crucial na regulação da biogénese dos ribossomas e no controlo da via de supressão tumoral ARF-p53 (Kim *et al.*, 2010; Falini, 2011).

As mutações deste gene têm sido identificadas em cerca de 50% dos casos de LMA de novo em adultos, em 35% dos casos de LMA-CN (Schnttger *et al.*, 2011), na maioria envolvendo o exão 12, do tipo *frame shift* na translação, o que provoca uma localização aberrante da proteína no citoplasma (Kim *et al.*, 2010; Falini, 2011). A presença isolada desta mutação em doentes com LMA-CN parece conferir uma resposta favorável à terapêutica, com melhor prognóstico e SG maiores (Thompson, 2009; Foran *et al.*, 2010). Cerca de um terço dos doentes com mutação no gene *NPM1* também tem a mutação no gene *FLT3* (Thompson, 2009). Por estas razões, a LMA com *NPM1* mutado é uma nova entidade provisória incluída na classificação das Neoplasias Mielóides da OMS de 2008 (Arber *et al.*, 2008).

Num estudo efectuado em doentes chineses com SMD a mutação do gene *NPM1* foi encontrada em cerca de 5% dos casos (Bains *et al.*, 2011).

Relativamente às Doenças Mieloproliferativas (DMP) há poucos estudos relacionados com a presença da mutação no exão 12 do gene *NPM1*.

A LMA, as DMP e a SMD são neoplasias mielóides em que ocorre proliferação celular clonal anómala de células da linha mielóide na medula óssea. Contudo, enquanto na

LMA a evolução/progressão é mais rápida, nas DMP e SMD, o curso da doença é normalmente mais indolente/gradual. No entanto, os doentes SMD ou DMP apresentam risco aumentado de evoluir para LMA apresentando pior resposta ao tratamento e sobrevivência menor.

A LMA é uma doença heterogénea cujo prognóstico é multifactorial e cuja evolução e prognóstico depende de diversos factores clínicos e laboratoriais. Entre estes factores é de salientar: a idade, a *performance status*, a leucocitose, a percentagem de blastos e o valor de LDH (Haferlach *et al.*, 2011), a existência de quimioterapia prévia e a resposta à quimioterapia de indução, o subtipo FAB (favorável M2, M3, M4 e desfavorável M0, M6, M7), a citogenética (distingue 3 grupos de risco – favorável: t(8;21), inv 16 e t(15;17); intermédio: normal, +8, +6, del (12p) e t (11;17) e desfavorável: -7, del 7q, -5, del 5q e cariótipo complexo) e alterações moleculares (*FLT3*, *NPM1* e *CEBPA*) (Schneider *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2010; Baer *et al.*, 2009). Além disso, os doentes com LMA de novo têm melhor prognóstico do que aqueles que apresentam doença hematológica prévia (LMA-DH) ou secundária a tratamentos com citostáticos ou radiação (LMA-t) para outras neoplasias (Baer *et al.*, 2009).

As DMP são doenças clonais da célula estaminal hematopoiética pluripotencial caracterizadas por proliferação de uma ou mais linhagens mielóides (granulocítica, eritróide, megacariocítica e mastocítica) e que envolvem geralmente mutações em genes que codificam proteínas com actividade tirosina cinase (TK). São habitualmente patologias do adulto (50-70 anos) de início insidioso, de evolução lenta em várias etapas, durante a qual se podem transformar umas nas outras (Swerdlow *et al.*, 2008).

A classificação semimolecular apresentada por Tefferi *et al* (2006) dividia as DMP clássicas em doenças *BCR/ABL* positivas e negativas. Em 2008 foi apresentada a nova classificação da OMS. Como mencionado, estas doenças envolvem uma mutação adquirida num gene que codifica uma tirosina cinase citoplasmática, sendo a mutação mais frequente nas chamadas DMP *BCR/ABL* negativas, a mutação Jak2 V617F, a qual foi identificada na maioria dos doentes com PV e em aproximadamente 50% dos doentes com TE e MFP (Skoda, 2010).

A PV e TE têm melhor prognóstico com uma sobrevivência mediana superior a 10 anos. Apresentam um curso clínico indolente, na maioria assintomático que ocasionalmente manifestam episódios tromboembólicos ou hemorrágicos que muitas vezes são fatais. Os factores de risco que predizem tais eventos não estão bem definidos (Skoda, 2010; Schnittger *et al.* 2011). Por outro lado, a MFP é a DMP com pior prognóstico, dependendo de vários factores como a idade, valores de hemoglobina e plaquetas, cariótipo e estágio morfológico ao diagnóstico (Schnittger *et al.* 2011).

A SMD é uma doença da célula pluripotencial hematopoiética, caracterizada por falência medular com alterações quantitativas das três linhagens mielóides, hematopoiese ineficaz e alta probabilidade de progressão para LMA. Engloba um grupo de doenças divididas em 5 subtipos segundo a classificação FAB, incluindo a leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) (List *et al.*, 2009). Actualmente, a revisão da Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou esta entidade como doença mielodisplática/mieloproliferativa com um sistema de *score* prognóstico próprio, com 4 grupos de risco, sendo as SMD estratificadas segundo o sistema de *score* prognóstico internacional (IPSS) em 3 grupos de risco, consoante a previsão da sobrevivência e evolução para LMA (List *et al.*, 2009, Garcia-Manero, 2010). A

idade é um factor prognóstico independente, sendo favorável para os doentes com menos de 60 anos (List *et al.*, 2009; Bains *et al.*, 2011).

Apesar de alguns estudos sobre a importância das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* na LMA, a sua relevância no prognóstico da generalidade das neoplasias mielóides, não está totalmente clarificada.

Com este estudo pretende-se avaliar a frequência das mutações dos genes do *FLT3* e *NPM1* em doentes com neoplasias mielóides, em particular LMA, SMD e DMP, caracterizados citogeneticamente, e analisar a sua correlação com as características clínicas, evolução da doença, resposta ao tratamento e conseqüente impacto no prognóstico.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Seleção e caracterização da amostra**

Neste estudo foram incluídos 76 doentes, 40 do sexo masculino e 36 do sexo feminino, com uma idade mediana de 63 anos, seguidos por neoplasia mielóide no Serviço de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, 52 dos quais com o diagnóstico de LMA, 19 com DMP e 5 com SMD, de acordo com critérios de classificação FAB e OMS de 2008.

Na maioria dos casos os estudos moleculares foram realizados ao diagnóstico em amostras de MO durante um procedimento de diagnóstico (doentes com LMA sem tratamento) ou de monitorização de resposta terapêutica (doentes com DMP ou SMD) em fase de doença estável. Para colheita de dados foram consultados os registos laboratoriais e clínicos relativos a cada doente. Foi obtido um consentimento informado para análise genética e utilização de dados para investigação de acordo com a Declaração de Helsínquia.

#### **1.1. Caracterização dos doentes com LMA**

Em todos os doentes com LMA foi previamente realizado o estudo cromossómico por citogenética convencional. No entanto, em 12 dos casos não foi possível obter cariótipo quer por ausência de metáfases quer por número insuficiente das mesmas.

Os doentes com LMA foram subdivididos em 3 grupos de risco citogenético: favorável (t(8;21), inv 16), intermédio (diplóide, -Y) e desfavorável (5q-, 11q23, complexo). As LMA-DH e LMA-t foram agrupadas separadamente das LMA de novo que foram divididas consoante o subtipo FAB (M0 a M5).

## **1.2. Caracterização dos doentes com DMP e SMD**

Todos os casos diagnosticados de DMP ou SMP foram classificados de acordo com os critérios actuais da OMS (2008) e/ou FAB. Os dados relativos à análise citogenética e testes moleculares (ex. mutações *JAK 2*) foram colhidos quando disponíveis.

Os doentes com SMD foram classificados em grupos de prognóstico de acordo com os critérios do IPSS usando 3 factores: percentagem de blastos na medula, citogenética e número de citopenias.

## **2. Extracção de ADN e Detecção de Mutações dos genes *FLT3* e *NPM1***

A pesquisa de mutações dos genes do *FLT3* e *NPM1* foi efectuada em ADN genómico a partir de dois grupos de amostras em suspensão, obtidas de sangue periférico (SP) ou medular (MO), fixadas com metanol e ácido acético, previamente preparadas para análise citogenética convencional, e uma fracção enriquecida de células mononucleares. No primeiro tipo de amostra foi utilizado o DNazol para extracção de ADN (Amorim et al, 2007), enquanto no outro grupo o ADN foi extraído com recurso ao kit *QIAamp DNA Midi* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a obtenção de amostras de ADN, efectuou-se a determinação da sua concentração e grau de pureza por espectrofotometria de absorção recorrendo ao quantificador SmartSpec Plus (BioRad). O grau de pureza do ADN foi determinado através da razão entre as densidades ópticas avaliadas no comprimento de onda de 260 nm e de 280 nm, tendo o tampão de eluição das amostras sido utilizado como referência (branco). As amostras de ADN foram consideradas puras para a razão entre as densidades ópticas de 260 nm e 280 nm igual a 1.8.



Todas as amostras com um grau de pureza entre 1.7 e 1.9 e uma concentração entre 100 e 200 ng/μL foram guardadas a -80 °C até à sua posterior utilização.

Posteriormente foram pesquisados dois tipos de mutação no gene *FLT3*: as ITD e a mutação pontual D835 (Yamamoto *et al.*, 2001; kiyoi *et al.*, 1997). A detecção da mutação pontual D835 (exão 17) foi efectuada por análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição pela reacção de polimerização em cadeia (PCR-RFLP) (Yamamoto *et al.*, 2001). Para amplificação do exão 17 do gene *FLT3* foram utilizados *primers*: 5'-CCGCCAGGAACGTGCTTG-3' (directo) e 5'-GCAGCCTCACATTGCCCC-3' (inverso). Utilizando o termociclador My Cycler (BioRad), esta reacção decorreu com uma fase de desnaturação inicial à temperatura de 95 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação (95 °C durante 1 minuto), emparelhamento (57 °C durante 30 segundos), extensão (72 °C durante 45 segundos) e um período de extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Após amplificação procedeu-se à digestão enzimática do fragmento obtido com a endonuclease de restrição do tipo II, *Eco RV* (New England BioLabs) durante 2 horas a 37 °C. Os produtos digeridos foram visualizados, simultaneamente com um marcador de pesos moleculares de 100 pb (GE HealthCare), em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio, fotografados e identificados. Para detecção da mutação FLT3/ITD, localizada nos exões 11 e 12, foi efectuada a amplificação por PCR utilizando *primers*: 11F, 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' (directo) e 12 R, 5'-CTTTCAGCATTTTGAGGGAACC-3' (inverso) (kiyoi *et al.*, 1997). Utilizando o termociclador My Cycler (BioRad), a amplificação foi realizada segundo uma fase de desnaturação inicial à temperatura de 95 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação (95 °C durante 30 segundos), emparelhamento (56 °C durante 60 segundos), extensão (72 °C durante 120 segundos) e um período de extensão final a 72 °C durante 10

minutos. Os produtos amplificados foram visualizados, em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio, fotografados e identificados.

A amplificação do exão 12 do gene da *NPM1* foi efectuada por PCR (Chen *et al.*, 2006) utilizando *primers*: NPM1-F, 5'-TTAACTCTCTGGTGGTAGAATGAA-3' (*sense*) e NPM1-R 5'-CAAGACTATTTGCCATTCCTAAC-3' (*antisense*). Utilizando o termociclador My Cycler (BioRad), as amostras foram amplificadas com uma fase de desnaturação inicial à temperatura de 95 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação (95 °C durante 30 segundos), emparelhamento (57 °C durante 60 segundos), extensão (72 °C durante 120 segundos) e um período de extensão final a 72 °C durante 10 minutos, utilizando o termociclador My Cycler (BioRad). Os produtos amplificados foram visualizados, em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio, fotografados e identificados. Após este processo foi realizada a reacção de sequenciação, utilizando o kit *Big Dye<sup>TM</sup> v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Bioscience). A migração efectua-se em função do tamanho dos fragmentos, o que permite proceder ao alinhamento das bases nucleotídicas das sequências em análise. A mutação só é confirmada quando é detectada nas duas cadeias *sense* e *antisense*. Apenas temos os resultados da cadeia *sense*.

Foram usados dois tipos de controlos negativos: reacção de amplificação sem ADN em cada ensaio e reacção de amplificação com ADN de indivíduos saudáveis.

### **3. Análise Estatística**

Para a análise estatística os doentes foram divididos por patologias LMA, DMP e SMD.

O tratamento estatístico dos resultados foi efectuado utilizando o programa SPSS versão 19.0. A análise de sobrevivência foi realizada pelo método Kaplan Meier e para análise comparativa foi usado os testes de significância Logrank e regressão Cox. Foi considerado um nível de significância estatística a 95% ( $p < 0,05$ ).

O follow-up foi considerado como o tempo desde o diagnóstico até à última data em que o doente foi observado.

A resposta ao tratamento inicial foi avaliada após a terapêutica de indução em doentes com LMA, sendo a remissão completa (RC) caracterizada pela existência de blastos na MO  $< 5\%$ , neutrófilos  $> 1\text{G/L}$  e plaquetas  $> 100\text{ G/L}$  em SP.

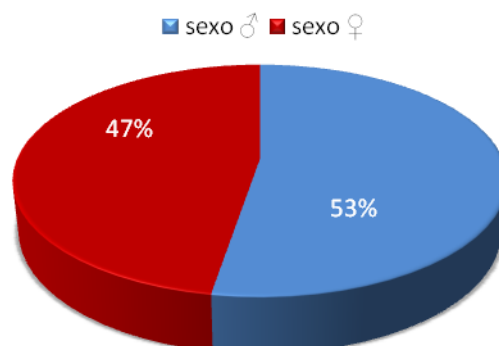
A sobrevivência global (OS) foi considerada como o tempo desde o diagnóstico até morte devido a qualquer causa ou até a última data em que o doente foi observado, no caso doentes que permanecem dos vivos.



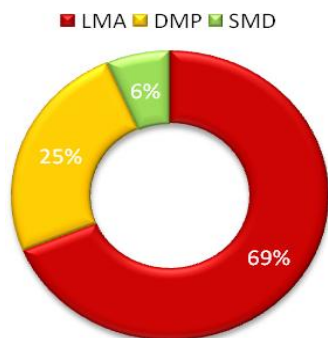
## RESULTADOS

### 1. Caracterização epidemiológica, clínica e laboratorial dos doentes com neoplasia mielóides

Foram analisados os dados relativos a 76 doentes com neoplasias mielóides, 40 do sexo masculino (53%) e 36 do sexo feminino (47%) (Figura 1), com uma idade mediana de 63 anos, 52 (69%) dos quais com o diagnóstico de Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA), 19 (25%) com Doença Mieloproliferativa (DMP) e 5 (6%) com Síndrome Mielodisplásica (SMD) (Figura 2), segundo os critérios de diagnóstico da OMS.



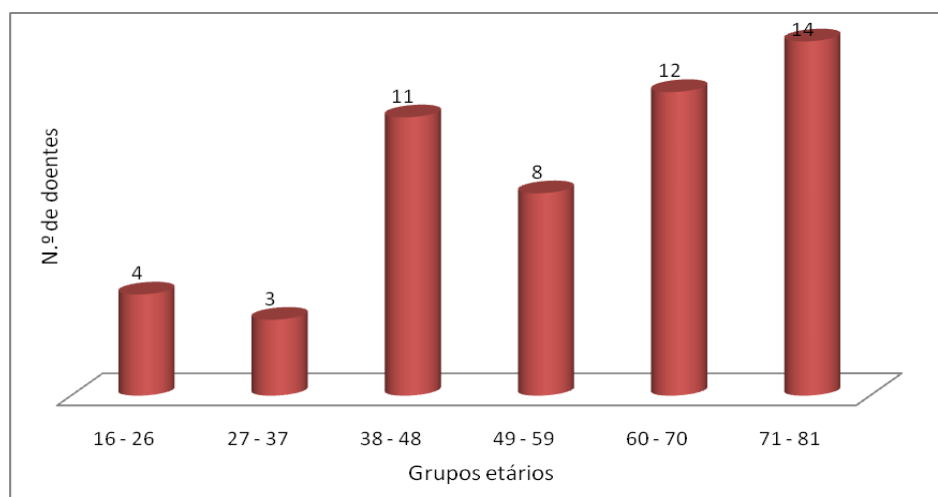
**Figura 1 – Distribuição dos doentes com neoplasias mielóides por sexos.** Foram analisados 76 doentes com neoplasias mielóides. Os resultados estão expressos em percentagem (%), de acordo com o sexo: a vermelho os doentes do sexo feminino e a azul os doentes do sexo masculino.



**Figura 2 – Distribuição dos doentes segundo o tipo de neoplasia mielóide.** Os resultados estão expressos em percentagem (%), de acordo com a patologia dos doentes: a azul doentes com LMA, a vermelho doentes com DMP e a verde doentes com SMD.

### **1.1. Caracterização dos doentes com Leucemia Mieloblástica Aguda**

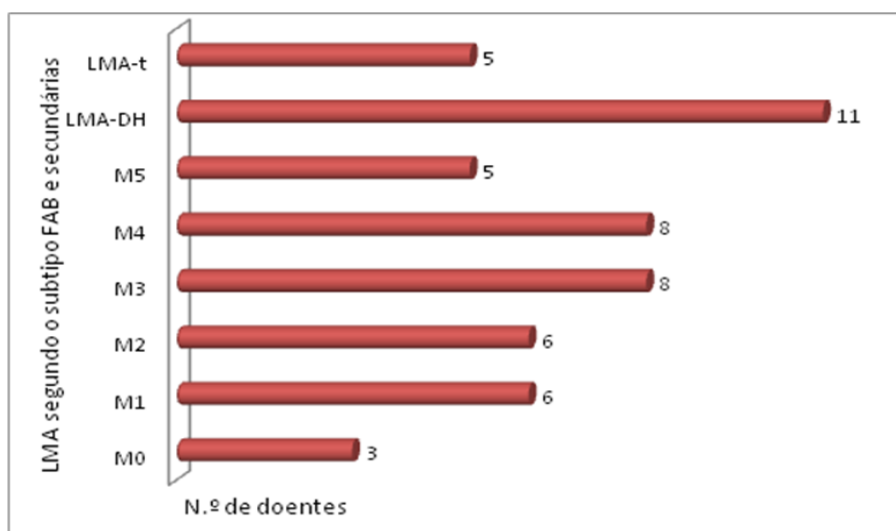
Dos 52 doentes com LMA inseridos no estudo, 26 eram do sexo masculino e 26 do sexo feminino, com uma idade mediana de 62 anos. No entanto, como podemos observar na Figura 3, metade dos doentes tem idade inferior a 60 anos, e aproximadamente um quarto encontra-se no grupo etário dos 38 a 48 anos.



**Figura 3 – Distribuição dos doentes com LMA por grupos etários.** Foram analisados 52 doentes com LMA. Os resultados apresentados correspondem ao número de doentes em cada faixa etária.

Ao diagnóstico, os doentes com LMA, apresentavam um valor mediano de leucócitos de 25 G/L (0,6 a 424 G/L) e uma percentagem mediana de blastos de 80% (21 a 98%).

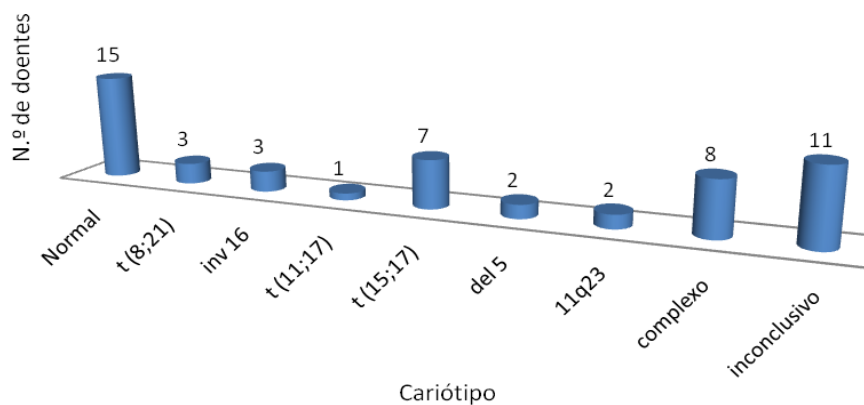
Quando analisamos a distribuição dos doentes com LMA segundo a classificação FAB, (subtipos M0 a M5), verificamos que na nossa amostra existe um predomínio de doentes com os subtipos M3 e M4 (16 doentes no total; 30,8%), registando-se 11 doentes com LMA-DH (21, 2%) e 5 doentes com LMA-t (9,6%) (Figura 4). O subtipo menos frequente foi o M0 (apenas 3 doentes, 5,8%) (Figura 4).



**Figura 4 - Distribuição dos doentes com LMA por subtipo FAB e LMA secundária.** O gráfico representa a distribuição dos 52 doentes com LMA pelos diferentes subtipos segundo a classificação FAB (French-American-British): M0, indiferenciada; M1, sem maturação; M2 com maturação granulocítica; M3 promielocítica; M4, com maturação granulocítica e monocítica e M5 monoblástica e monocítica. A LMA secundária está distribuída pelo LMA-t, relacionada com quimio ou radioterapia prévias e LMA-DH, secundária a doença hematológica.

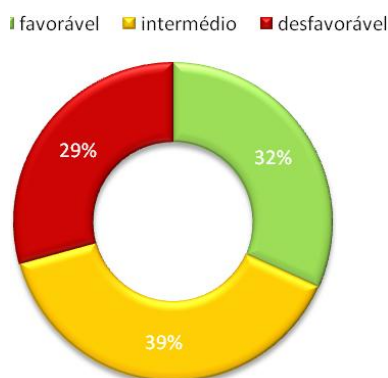
Na figura 5 está representado o resultado da análise citogenética dos doentes com LMA. Como podemos observar nesta figura, esta foi inconclusiva em 11 doentes (21%), e nos

restantes 41 doentes salienta-se que, 15 doentes tinham cariótipo normal (36%), 8 cariótipo complexo (19%) e em 7 doentes foi identificada a t(15;17) (17%).



**Figura 5 – Distribuição dos doentes com LMA segundo o cariótipo.** O gráfico representa a distribuição dos 52 doentes com LMA segundo o tipo de alteração citogenética encontrada.

De acordo com os dados da citogenética os doentes com LMA foram divididos em grupos de prognóstico consoante o risco, sendo favorável em 13 (32%), risco intermédio em 16 (39%) e em 12 doentes (29%) o cariótipo era desfavorável (Figura 6).



**Figura 6 – Distribuição dos doentes com LMA por grupo de risco citogenético.** O gráfico representa a distribuição em percentagem (%) dos doentes com LMA segundo o grupo de risco, favorável, intermédio e desfavorável.



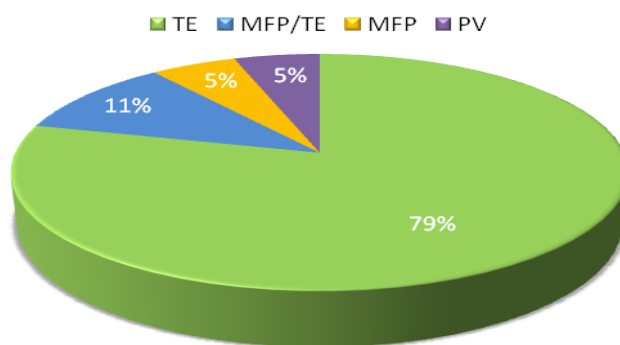
## 1.2. Caracterização dos doentes com Doença Mieloproliferativa

Os 19 doentes com DMP, 9 eram do sexo masculino e 10 do sexo feminino, com uma idade mediana de 65 anos (24-82). Ao diagnóstico apresentavam um valor mediano de hemoglobina de 13,5 g/dl (11,7 a 15,6 g/dl), leucócitos de 9,5 G/L (7,1 a 96,3 G/L) e contagem mediana de plaquetas de 726 G/L (95 a 1450 G/L) (Tabela I).

**Tabela I – Características clínicas e laboratoriais dos doentes com DMP**

<b>Parâmetros</b>	
<b><i>Epidemiológicos</i></b>	<b>Nº doentes</b>
sexo ♀	10
sexo ♂	9
<b><i>Laboratoriais</i></b>	<b>Valor</b>
Hemoglobina (g/dl)	13,5
Leucócitos (G/L)	9,5
Plaquetas (G/L)	726

Na figura 7 está representada a distribuição dos doentes com DMP segundo o tipo de doença mieloproliferativa de acordo com a classificação da OMS. Assim, a maior parte dos doentes tem o diagnóstico de TE (15 doentes, 79%), 2 doentes de MFP/TE (11%) e os restantes 2 doentes estão repartidos igualmente por MFP e PV.



**Figura 7 – Distribuição dos doentes por subtipos de DMP.** Os resultados estão expressos em percentagem (%), de acordo com a patologia dos doentes: a azul, 15 doentes com TE; a vermelho, 2 doentes com MFP/TE; a verde, 2 doentes com MFP e a roxo, 2 doentes com PV.

### 1.3. Caracterização dos doentes com Síndrome Mielodisplásica

Os 5 doentes com SMD eram todos do sexo masculino com uma mediana de idade de 72 anos (48-74). Ao diagnóstico apresentavam um valor mediano de hemoglobina de 10,6 g/dl (7,2 a 14,5 g/dl), leucócitos de 5,4 G/L (2,9 a 156 G/L) e contagem mediana de plaquetas de 44 G/L (5 a 120 G/L). Estão distribuídos por 2 subtipos segundo a classificação FAB: AREB I (2 doentes) e LMMC (3 doentes).

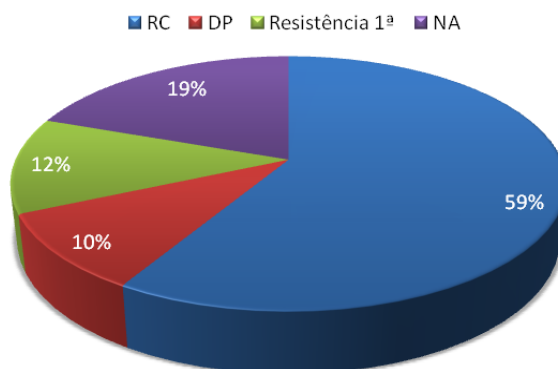
A análise citogenética dos doentes com SMD detectou 4 doentes com cariótipo normal e um com trissomia do cromossoma 13 (Tabela II). De acordo com o IPSS, ambos doentes com AREB I apresentam risco intermédio, enquanto os doentes com LMMC são de baixo risco.

**Tabela II – Características clínicas e laboratoriais dos doentes com SMD**

<b>Parâmetros</b>	
<b><i>Epidemiológicos</i></b>	<b>Nº doentes</b>
sexo ♂	5
sexo ♀	0
<b><i>Laboratoriais</i></b>	<b>valor</b>
Hemoglobina (g/dl)	10,6
Leucócitos (G/L)	5,4
Blastos (%)	3
Plaquetas (G/L)	44
<b><i>Biológicos/Cariótipo</i></b>	<b>Nº doentes</b>
46, XY	4
Trissomia 8	1

## **2. Caracterização do tipo de resposta ao tratamento**

Dos 52 doentes com LMA inseridos no estudo, 11 apenas ofereciam condições para terapêutica de suporte dada a idade avançada e co-morbilidades ao diagnóstico, os restantes 41 receberam quimioterapia intensiva, tendo 3 destes sido submetidos a transplante alogénico e 1 a transplante autólogo de progenitores hematopoiéticos periféricos. Dos 41 doentes tratados com esquemas com agressivos, 24 doentes apresentaram RC (59%), 5 manifestaram resistência primária à quimioterapia de indução (12%), 4 doença progressiva (DP) (10%) e em 8 não foi possível avaliar a resposta (NA) por intercorrência infecciosa e/ou hemorrágica durante a fase de aplasia profunda com conseqüente morte (Figura 8).



**Figura 8 - Tipo de resposta à terapêutica em doentes com LMA tratados com quimioterapia de indução.** Os resultados estão expressos em percentagem (%), de acordo com o tipo de resposta obtida pelos 52 doentes com LMA: remissão completa (RC) em 59%, doença progressiva (DP) em 10%, resistência primária em 12% e não houve possibilidade de avaliar a resposta (NA) em 19%.

### **3 - Avaliação das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* – Relação com as características clínicas e biológicas dos doentes com neoplasias mielóides**

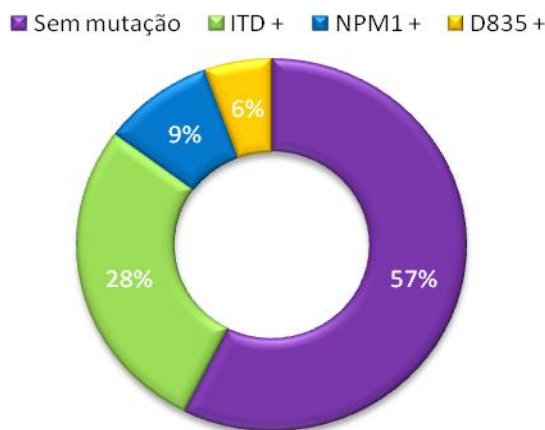
#### **3.1. Análise da frequência das mutações**

Nos 76 doentes com neoplasias mielóides inseridos no nosso estudo foram identificadas mutações no gene do *FLT3* em 17 doentes (22,5%), a maior parte do tipo ITD (94% dos casos) (*FLT3/ITD*) e no gene *NPM1* em 7 doentes (9,2%).

É de salientar que dos 17 doentes onde foi identificada a mutação do gene do *FLT3*, aproximadamente 94% (16 doentes) tinham o diagnóstico de LMA e 1 doente era portador de DMP (TE). Por outro lado, 71,4% dos doentes em que foi identificada a mutação no gene *NPM1* tinham LMA e 28,5% tinham TE.

Como a maior parte dos doentes em que foram detectadas mutações nos genes em estudo tinham o diagnóstico de LMA, fomos caracterizar melhor as mutações nestes doentes, como representado a figura 9. Nesta figura podemos observar que dos 52 doentes com LMA,

15 doentes têm a mutação *FLT3-ITD* (28%) e 3 a mutação *FLT3-D835* (6%), embora 2 destes doentes (12,5%) sejam portadores de ambas as mutações. A mutação do exão 12 do gene *NPM1* foi encontrada em 5 doentes (9,6%) e destes 3 apresentavam concomitantemente a *FLT3-ITD* (60%).



**Figura 9 – Frequência das mutações do *FLT3* e *NPM1* em doentes com LMA.** Os resultados estão expressos em percentagem (%), de acordo com a frequência das mutações dos genes do *FLT3* e *NPM1*: a vermelho a mutação *FLT3/ITD* (ITD+), a verde a mutação do exão 12 do gene *NPM1* (NPM1+), a roxo a mutação *FLT3/D835* (D835+), a azul aqueles doentes em quem não foi identificada mutação.

Nos doentes com DMP não foi identificada a mutação do *FLT3-ITD*. Apenas um doente apresentou a mutação no codão D835 do gene *FLT3*. Os 2 doentes em que foi encontrada a mutação no exão 12 da *NPM1* tinham diagnóstico de TE, como mencionado.

Em nenhum dos doentes com SMD foi detectada qualquer das mutações dos genes em estudo. Mas, não podemos esquecer que a amostra de doentes com esta patologia é muito pequena.

3.2. **Relação entre o estado mutacional dos genes *FLT3* e *NPM1* e as características clínicas e biológicas dos doentes**

Foram avaliadas e correlacionadas as características biológicas ao diagnóstico com o estado mutacional dos genes *FLT3* e *NPM1* (Tabela III).

Os nossos resultados mostram que os doentes em que foram identificadas as mutações dos genes em estudo apresentam características clínicas e laboratoriais, como contagem de leucócitos, percentagem de blastos, valor de LDH e idade, diferentes das dos doentes em que as referidas alterações genéticas não foram detectadas.

Assim, o grupo de doentes que é *FLT3-ITD* positivo apresenta maior contagem de leucócitos no SP, percentagem de blastos na MO mais elevada, e um valor de LDH superior, quando comparado com o grupo negativo para esta mutação (Tabela III). De igual modo, nos doentes em que foi identificada a mutação no exão 12 do gene *NPM1* foi encontrada uma contagem de leucócitos no SP superior e percentagem de blastos na MO mais elevada quando comparado com o grupo negativo para esta mutação. Pelo contrário, a maioria dos doentes sem a mutação no gene *NPM1* observou-se aumento da LDH.

Além disso, verificámos que a mutação *FLT3-ITD* é mais frequente nos doentes mais jovens quando comparada com a idade dos doentes sem a referida mutação. A frequência das mutações analisadas parece ser independente o sexo, uma vez que não foram encontradas diferenças entre os doentes com e sem as mutações (Tabela III).

**Tabela III – Relação entre as características clínicas dos doentes com LMA e o estado mutacional dos genes *FLT3* e *NPM1***

Características	Todos Nº	FLT3-ITD Nº	FLT3-wt Nº	NPM1 Nº	NPM1-wt Nº
<b>Sexo</b>					
♀	26	8	18	3	23
♂	26	7	19	2	24
<b>Idade (anos)</b>					
<60	26	10	16	2	24
>60	26	5	21	3	23
<b>Leucócitos (G/L)</b>					
<20	21	4	17	1	20
20-40	6	3	3	0	6
>40	25	8	17	4	21
<b>Blastos (%)</b>					
20 – 50	13	2	11	0	13
>50	39	13	26	5	34
<b>LDH (g/dl)</b>					
Normal	9	1	8	1	8
Elevada	43	14	29	4	39

Posteriormente, fomos analisar se a presença ou ausência das mutações está relacionada ou não com algum subtipo de LMA segundo a classificação FAB e/ou alguma alteração citogenética específica.

Como podemos observar na Tabela IV, o subtipo de LMA-FAB em que foi detectada a mutação ITD do gene *FLT3* (*FLT3-ITD+*) em maior número de doentes foi na LMA-M4 (33%), seguida de número igual de casos nos subtipos LMA-M1, M3 e M5 (13%). Apenas em 6% dos doentes com LMA-M2 foi identificada esta mutação e nenhum dos doentes com LMA-M0, tinha a mutação. Nos doentes com LMA-DH e LMA-t a frequência da mutação *FLT3-ITD* foi de 6 e 13%, respectivamente. A mutação do gene *NPM1* foi detectada apenas num doente de cada um dos seguintes subtipos, LMA-M2, LMA-M4 e LMA-M5, estando presente em 40% dos casos dos doentes com LMA-t.

Ainda na Tabela IV podemos verificar que dos 15 doentes com LMA e cariótipo normal (LMA-CN), a mutação *FLT3-ITD* foi detectada em 4 (26,6%) e a mutação do exão 12 do gene *NPM1* em 2 doentes. Além disso e apesar do tamanho relativamente pequeno da amostra, todos os doentes em que a análise citogenética identificou a inv16, tinham a mutação ITD do gene *FLT3*. A mutação *NPM1* foi encontrada em 2 doentes com cariótipo normal e em 3 doentes cuja análise citogenética foi inconclusiva.

**Tab. IV – Frequência das mutações nos genes *FLT3* e *NPM1* nos doentes com LMA segundo o subtipos FAB e cariótipo**

<b>Parâmetros</b>	<b>Todos</b>	<b>FLT3-ITD +</b>	<b>NPM1 +</b>
<b><i>FAB</i></b>	Nº	Nº (%)	Nº (%)
M0	3	0	0
M1	6	2 (13)	0
M2	6	1 (6)	1 (20)
M3	8	2 (13)	0
M4	8	5 (33)	1 (20)
M5	5	2 (13)	1 (20)
LMA-DH	11	1(6)	0
LMA-t	5	2 (13)	2 (40)
<b><i>Cariótipo</i></b>	Nº	Nº (%)	Nº (%)
Normal	15	4 (26)	2 (40)
t (8;21)	3	2 (13)	0
inv 16	3	3 (20)	0
t (11;17)	1	0	0
t (15;17)	7	2 (13)	0
del 5	2	0	0
11q23	2	0	0
Complexo	8	3 (20)	0
Inconclusivo	11	4 (26)	3 (60)

LMA-t-Leucemia Mieloblástica Aguda secundária a terapêutica

LMA-DH-Leucemia Mieloblástica Aguda secundária a doença hematológica

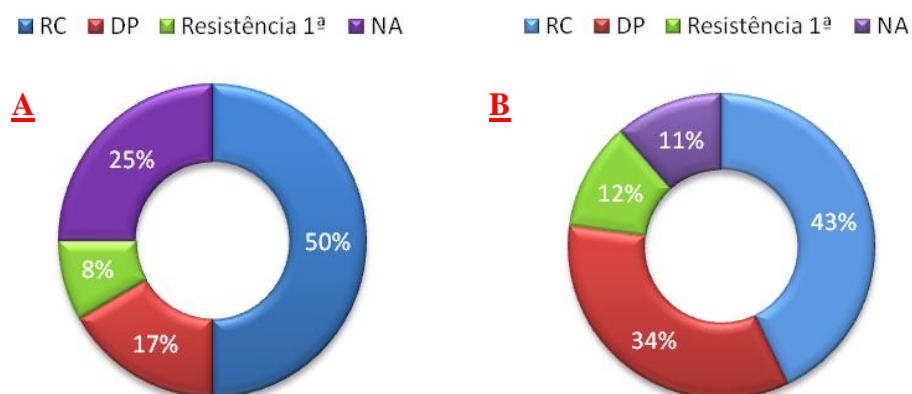


Nos doentes com DMP, a mutação do gene *JAK2* V617F foi identificada em 14 doentes (73%), dos quais 3 em homozigotia e 11 em heterozigotia (78%). Em 5 doentes esta mutação não foi investigada. De salientar que dos doentes com DMP, a mutação no exão 12 do gene *NPM1*, apenas foi detectada em dois doentes com TE e um deles também apresentava a mutação do gene *JAK2* V617F em heterozigotia.

### **3.3. Relação entre o estado mutacional dos genes *FLT3* e *NPM1* e o tipo de resposta ao tratamento**

Para avaliar a repercussão das mutações genéticas em estudo com a resposta dos doentes com LMA ao tratamento, fomos correlacionar a taxa de respostas completas (RC), de doença progressiva (DP), doença estável (DE) e resistência primária ao tratamento com o estado mutacional dos genes *FLT3* e *NPM1*. Avaliámos também os doentes que faleceram durante a terapêutica de indução e por tal não foi possível a avaliação da resposta a esta terapêutica (NA).

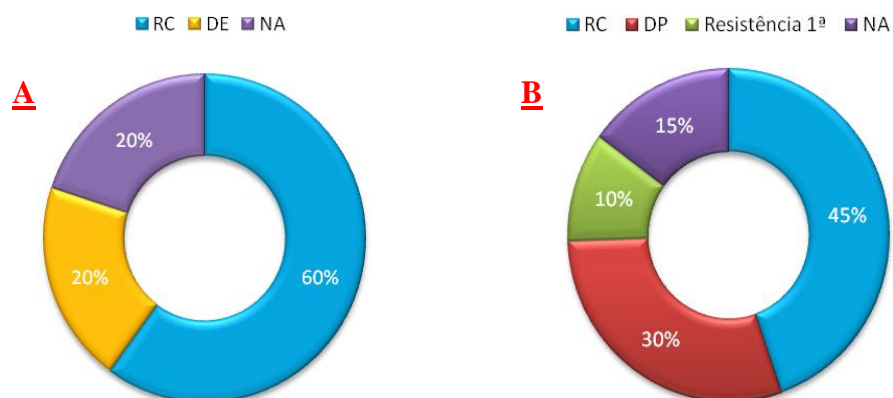
Na Figura 10 está representado o tipo de resposta ao tratamento nos doentes com LMA *FLT3/ITD+* (Figura 10-A) e *FLT3/ITD-* (Figura 10-B). Como podemos observar na figura, a taxa de RC parece ser independente da ausência e/ou presença da mutação, uma vez que esta foi atingida em aproximadamnte 46% a 50% dos doentes, respectivamente. No entanto, nos doentes portadores da mutação ITD do gene *FLT3* a percentagem de doentes que faleceu durante a terapêutica de indução é superior (25% vs 11%).



**Figura 10 – Tipo de resposta ao tratamento nos doentes com LMA *FLT3/ITD+* (A) e *FLT3/ITD-* (B).** Na análise estão incluídos os 15 doentes com LMA *FLT3/ITD+* (A) e 37 *FLT3/ITD-* (B). Os resultados estão expressos em percentagem (%). O tipo de resposta está assinalado de cor diferente: a azul, RC (Resposta Completa); a vermelho, DP (Doença Progressiva); a verde, Resistência primária e a roxo, NA (avaliação de resposta Não Aplicável por morte durante a indução).

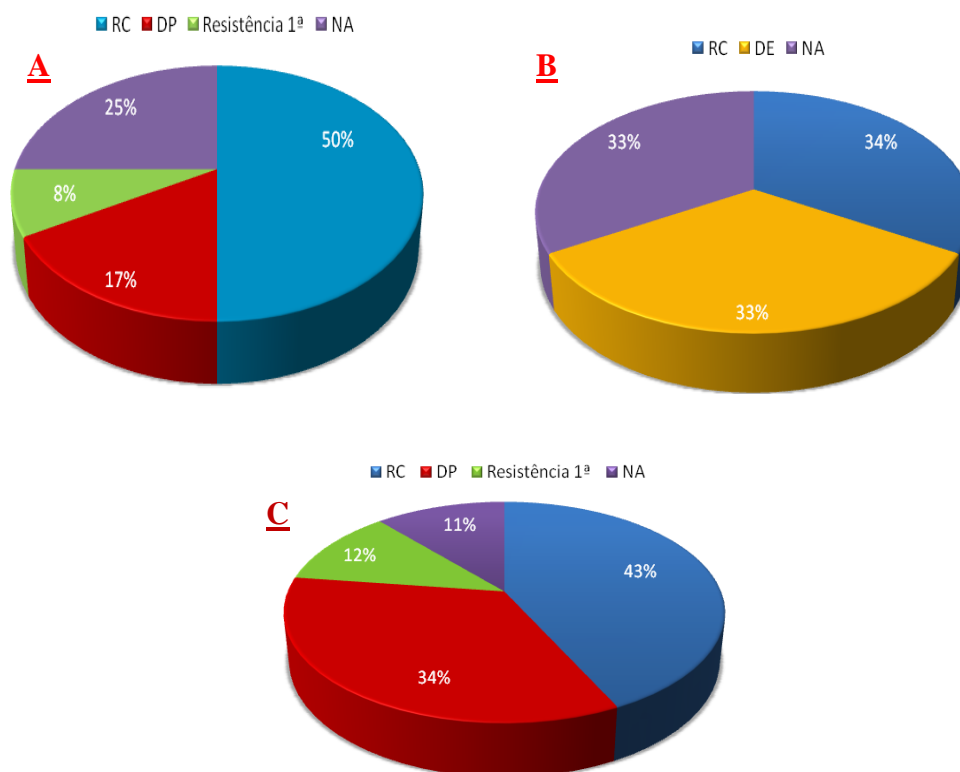
Nos 5 doentes em que foi identificada a mutação do gene *NPM1* a taxa de RC foi superior (60%) relativamente aos doentes sem esta mutação (45%) (Figura 11-A e B, respectivamente). No entanto, se considerarmos os doentes que têm apenas esta mutação, verificamos que todos estes doentes atingiram a RC (100%).

Além disso, os doentes em que não foi identificada a mutação neste gene (*NPM1-*), 30% tem DP e 10% apresenta resistência primária ao tratamento (Figura 11-B), o que não se verifica em nenhum doente *NPM1+* (Figura 11-A).



**Figura 11 – Tipo de resposta ao tratamento nos doentes com LMA *NPM1+* (A) e *NPM1-* (B).** Na análise estão incluídos os 5 doentes com LMA *NPM1+* (A) e 47 *NPM1-* (B). Os resultados estão expressos em percentagem (%). O tipo de resposta está assinalado de cor diferente: a azul, RC (Resposta Completa); a laranja, DE (Doença Estável); a vermelho, DP (Doença Progressiva); a verde, Resistência primária e a roxo, NA (avaliação de resposta Não Aplicável por morte durante a indução).

Quando analisada a presença das duas mutações em simultâneo, a maior taxa de RC foi atingida nos 2 doentes sem a mutação ITD no gene *FLT3* mas com a mutação no gene *NPM1* (*ITD-/NPM1+*) (100%), seguido do grupo de doentes *ITD+/NPM1-* (50%) (Figura 12-A). Nos doentes sem nenhuma mutação identificada, *ITD-/NPM1-*, a taxa de RC obtida foi de 43% (Figura 12-C). Por outro lado, nos doentes com a presença das 2 mutações, *ITD+/NPM1+*, a taxa de RC foi a mais baixa (34%) (Figura 12-B), sendo inferior a qualquer um dos outros 3 grupos. A taxa de doentes que faleceu durante a indução foi superior no grupo de doentes *ITD+/NPM1-* quando comparada com os doentes *ITD-/NPM1-* (25 vs 11) (Figura 12-A e 12-C). Estes resultados não são estatisticamente significativos.

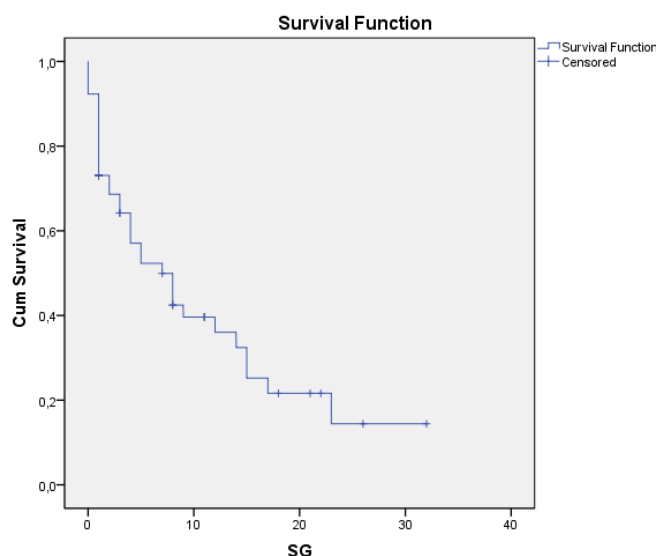


**Figura 12 – Tipo de resposta ao tratamento nos doentes com LMA *ITD+/NPM1-* (A) e *ITD+/NPM1+* (B) e *ITD-/NPM1-* (C).** Na análise estão incluídos os 12 doentes com LMA *ITD+/NPM1-* (A), 3 com *ITD+/NPM1+* (B) e 35 *ITD-/NPM1-* (C). Os resultados estão expressos em percentagem (%). O tipo de resposta está assinalado de cor diferente: a azul, RC (Resposta Completa); a laranja, DE (Doença Estável); a vermelho, DP (Doença Progressiva); a verde, Resistência 1ª (primária) e a roxo, NA (avaliação de resposta Não Aplicável por morte durante a indução).

Os 2 doentes com TE em que foi identificada a mutação no exão 12 da NPM1 estão em RC tal como o grupo de doentes com esta patologia negativos para a mutação.

#### 4. Análise de sobrevivência

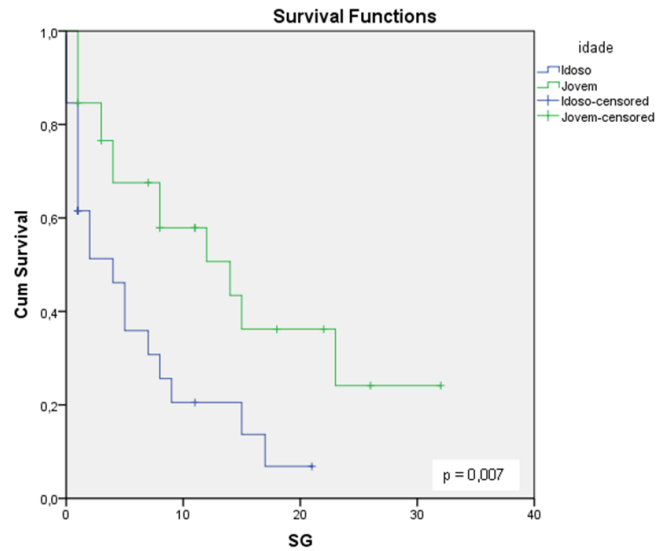
O *follow-up* mediano dos doentes com LMA foi de 8 meses e a sobrevivência global (SG) mediana de 7 meses (0 a 32 meses). Como podemos observar na Figura 13 ao fim de 7 meses a SG foi de 50% e ao fim de 32 meses apenas 19% dos doentes estavam vivos.



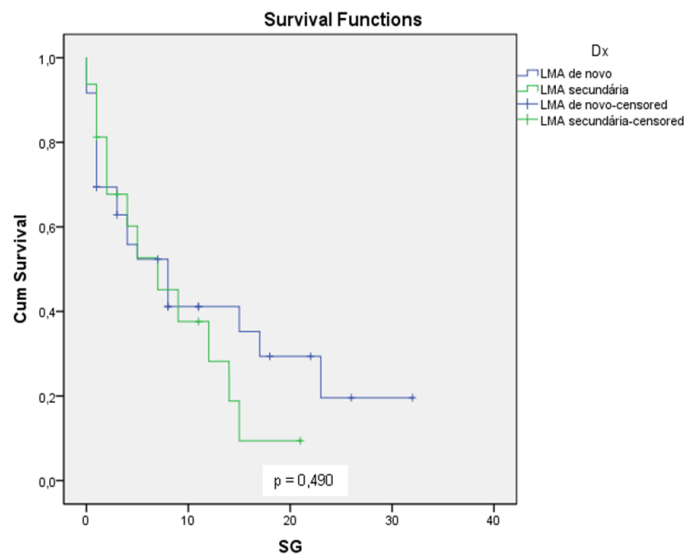
**Figura 13 – Análise da sobrevivência global dos doentes com Leucemia Mieloblástica Aguda - Curva de Kaplan-Meier.** A SG está expressa em meses. Estão incluídos os 52 doentes com LMA inseridos no estudo.

No entanto, no grupo de doentes idosos ( $n=26$ ) a SG foi significativamente menor, com uma mediana de 4 meses (0 a 23 meses), relativamente aos doentes mais jovens ( $n=26$ ) em que a SG mediana foi de 14 meses (1 a 32 meses) ( $p=0,007$ ). De facto, se analisarmos de acordo com a idade, a SG dos doentes com idade inferior a 60 anos (jovens) foi de 69% e dos doentes idosos de 35% aos 7 meses e aos 32 meses 25% dos doentes jovens estavam vivos enquanto os idosos não sobreviveram além dos 23 meses (Figura 14).

Nos doentes com LMA de novo a SG mediana foi superior aos doentes com LMA secundária (LMA-DH e LMA-t) (8 vs 7 meses), mas sem significado estatístico ( $p=0,490$ ). Contudo, na Figura 15, podemos observar que aos 32 meses já não é possível analisar a SG dos doentes com LMA secundária e esta foi de 19% nos doentes com LMA de novo.

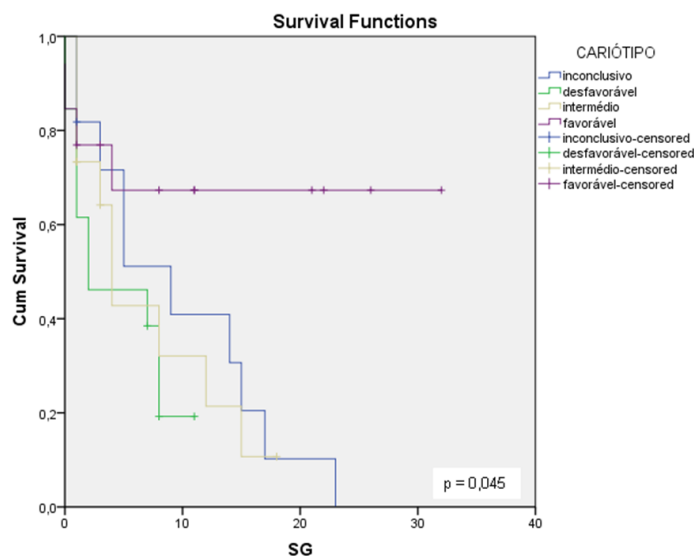


**Figura 14 – Análise comparativa da sobrevivência global dos doentes com LMA de acordo com a idade.** A SG está expressa em meses. Estão incluídos os 52 doentes com LMA divididos em 2 grupos de acordo com a idade: 26 jovens (idade < a 60 anos, linha verde) e 26 idosos (idade > a 60 anos, linha azul).



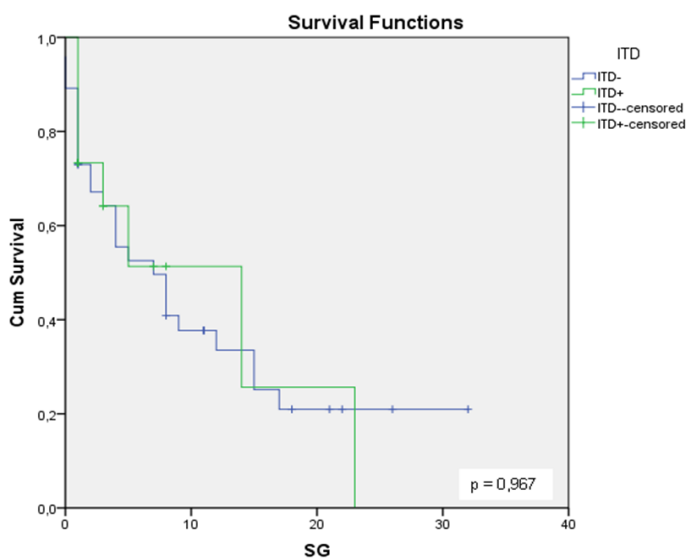
**Figura 15 – Análise da sobrevivência global dos doentes com LMA de novo e secundárias.** A SG está expressa em meses. Estão incluídos os 52 doentes com LMA, comparados em dois grupos: Doentes com LMA de novo, linha azul e LMA secundária, 60 anos, linha verde.

Quando analisamos a SG dos doentes com LMA de acordo com a citogenética e respectivo grupo de risco prognóstico, constatamos que os doentes do grupo de prognóstico favorável têm SG mediana mais elevada relativamente ao grupo de doentes com prognóstico desfavorável (7 vs 2 meses). Na Figura 16, podemos verificar que aos 10 meses, a SG foi diferente nos 3 grupos de risco citogenético de acordo com o prognóstico, sendo de 68% no grupo de prognóstico favorável, seguida de 32% no grupo intermédio e apresentando um valor inferior no grupo desfavorável (19%). Aos 32 meses 68% dos doentes do grupo de prognóstico favorável estavam vivos o que não se verifica em nenhum dos outros grupos. As diferenças encontradas foram estatisticamente significativas ( $p=0,045$ ).



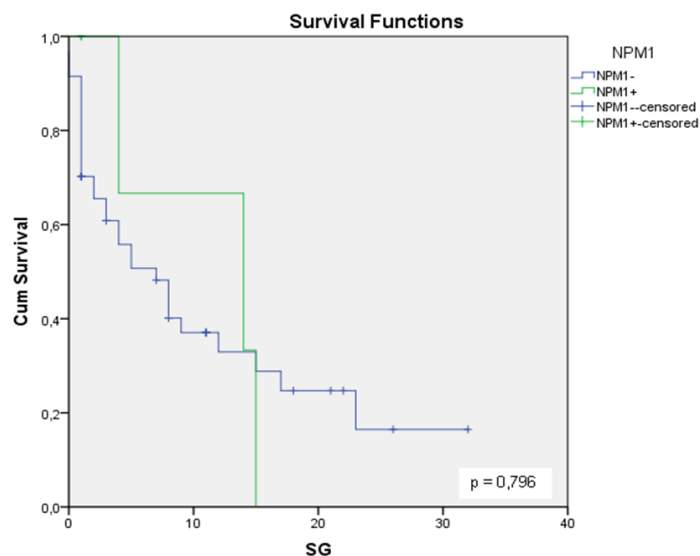
**Figura 16 – Análise da sobrevivência global dos doentes com LMA segundo o grupo de risco prognóstico citogenético.** A SG está expressa em meses. Estão comparados os 52 doentes com LMA divididos em 4 grupos de acordo com a análise citogenética e inclusão em grupos de risco prognóstico citogenético: favorável, linha roxa (13 doentes); intermédio, linha amarelo-palha (15 doentes); desfavorável, linha verde (13 doentes) e inconclusivo, linha azul (11 doentes).

A análise das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos doentes com cada uma das mutações isoladas dos genes *FLT3* (Figura 17) e *NPM1* (Figura 18), mostram que os doentes que não têm a mutação ITD do gene *FLT3* e os que apresentam a mutação do gene *NPM1* têm SG medianas superiores. De facto, na Figura 17 podemos observar, no grupo com mutação ITD do gene *FLT3*, que a SG aos 32 meses foi de 20% e no grupo ITD- nenhum dos doentes estava vivo. No grupo *NPM1* positivo quando comparada a SG mediana com o *NPM1* negativo foi de 14 vs 7,  $p=0,796$ ). No entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas.



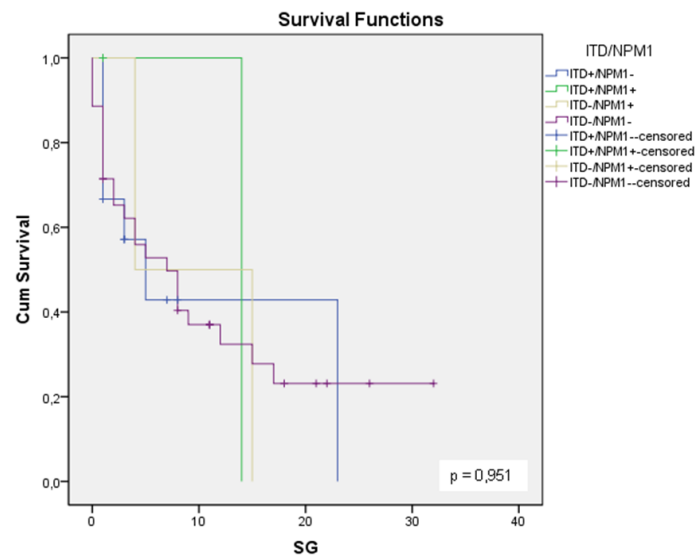
**Figura 17 – Análise da sobrevivência global dos doentes com LMA com e sem a mutação ITD do gene *FLT3*.** A SG está expressa em meses. Presença da mutação ITD+ (linha verde); ausência da mutação ITD- (linha azul)





**Figura 18** –Análise da sobrevivência global dos doentes com LMA como ou sem mutação do gene do gene *NPM1*. Presença da mutação *NPM1+* (linha verde); ausência da mutação *NPM1* (linha azul).

A análise de sobrevivência dos 4 genótipos possíveis, tendo em atenção as combinações da análise das mutações dos genes em estudo, revelou que os doentes *ITD<sup>+</sup>/NPM1<sup>+</sup>* têm SG mediana superior em relação aos doentes *ITD<sup>+</sup>/NPM1<sup>-</sup>* (14 vs 5 meses). Por outro lado, os doentes *ITD<sup>-</sup>/NPM1<sup>+</sup>* têm SG mediana inferior quando comparada com o *ITD<sup>-</sup>/NPM1<sup>-</sup>* (4 vs 7 meses). Estas diferenças não apresentam significado estatístico ( $p=0,951$ ). No entanto, se analisarmos a Figura 19, podemos observar nos 2 grupos em que há uma maior representatividade, *ITD<sup>-</sup>/NPM1<sup>-</sup>* e *ITD<sup>+</sup>/NPM1<sup>-</sup>*, com 35 e 12 doentes respectivamente, que a SG do primeiro grupo foi de quase 50% e do segundo grupo foi de 42% aos 7 meses e aos 32 meses 23% dos doentes *ITD<sup>-</sup>/NPM1<sup>-</sup>* estavam vivos enquanto os doentes *ITD<sup>+</sup>/NPM1<sup>-</sup>* não sobreviveram além dos 23 meses.



**Figura 19 – Análise da sobrevivência global dos doentes com LMA segundo o estado mutacional das mutações dos genes *FLT3* e *NPM1* em simultâneo.** A SG está expressa em meses. As diferentes curvas de Kaplan Meier representam as curvas de sobrevivência dos 52 doentes com LMA e as 4 combinações mutacionais, sendo 12 doentes *ITD+/NPM1-* (linha azul), 3 doentes *ITD+/NPM1+* (linha verde), 2 doentes *ITD-/NPM1+* (linha amarelo-palha) e 35 doentes *ITD-/NPM1-* (linha roxa).

Os doentes com DMP apresentaram uma SG mediana de 18 meses (12 a 127 meses), sendo a SG mediana dos doentes com TE de 17 meses (2 a 102 meses).

A SG mediana nos doentes com SMD foi de 27 meses (1 a 210 meses).



## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Diferentes mutações em vários genes estão envolvidas na patogênese das neoplasias mieloides, interferindo quer com mecanismos proliferativos quer antiapoptóticos, sendo descritas em elevada frequência as mutações dos genes *FLT3* e *NPM1* na LMA (Foran, 2010; Singh *et al.*, 2011).

Neste estudo avaliámos a frequência das mutações dos genes *FLT3* e *NPM1* em doentes com Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA), Doenças Mieloproliferativas (DMP) e Síndrome Mielodisplásica (SMD), caracterizados citogeneticamente, e correlacionámos as alterações identificadas com a clínica, a evolução da doença, a resposta ao tratamento e o prognóstico/sobrevivência dos doentes.

Os nossos resultados mostram que, a incidência das mutações ITD do gene *FLT3*, *FLT3-ITD*, e do exão 12 do gene *NPM1* nos doentes com LMA foi de 28,8 e 9,6%, respectivamente, sendo nos doentes com cariótipo normal, LMA-CN, a frequência de 26 e 13%, respectivamente. Estes resultados são inferiores ao descrito por Kim *et al.*, 2011 e Singh *et al.*, 2011. Nos doentes com cariótipo alterado apenas foi detectada a mutação do gene *FLT3* em 46% dos casos.

Contrariamente ao descrito por outros autores (Baer *et al.*, 2009; Thompson, 2009; Wang *et al.*, 2010), a maior parte dos doentes em que foi identificada a mutação do gene *FLT3* eram do subtipo FAB LMA-M4 (33%), sendo os restantes dois terços distribuídos pelos outros subtipos FAB, com excepção dos doentes com LMA-M0, em que não se observou a mutação. A mutação do exão 12 do gene *NPM1* foi detectada em igual frequência (20%) em doentes com os subtipos FAB M2, M4 e M5, em oposição

---

ao relatado por Wang *et al.* cuja frequência da referida mutação foi superior no subtipo M5 e por Kim *et al.* que detectou maior número de casos no subtipo FAB M2.

Nos doentes com LMA de novo a frequência das mutações *FLT3-ITD* e do exão 12 do gene *NPM1* foi de 33 e 8%, respectivamente. Quando avaliada nos doentes com LMA secundária (LMA-DH e LMA-t) a frequência da mutação *FLT3-ITD* foi de 18,75% e a mutação do gene *NPM1* esteve presente em 12,5% dos casos. Apesar destes resultados, o número reduzido de casos destes tipos de LMA não permite avaliar se a existência destas mutações estão relacionadas com terapêuticas prévias.

As características clínicas e laboratoriais apresentadas ao diagnóstico, pelos doentes com LMA, nomeadamente a contagem de leucócitos, a percentagem de blastos e os níveis de LDH têm sido associadas às mutações em análise. Assim, nos doentes com a mutação *FLT3-ITD* e *NPM1* inseridos no estudo, registou-se uma contagem de leucócitos e percentagem de blastos mais elevadas, o que está de acordo com o publicado previamente por Haferlach *et al.* (2011).

Quando avaliadas as mutações isoladamente, a taxa de RC parece ser independente da ausência e/ou presença da mutação, uma vez que esta foi atingida em aproximadamente 46% a 50% dos doentes, respectivamente, facto que é oposto ao impacto prognóstico associado a esta mutação em doentes com LMA (Foran *et al.*, 2010). No entanto, nos doentes portadores da mutação ITD do gene *FLT3* a percentagem de doentes que faleceu durante a terapêutica de indução é superior (25% vs 11%) (Figura 10).

Por outro lado, a taxa de RC foi superior nos doentes em que foi identificada a mutação do gene da *NPM1* (60%) relativamente aos doentes negativos para esta

---

mutação (45%) (Figura 11). Ainda, se considerarmos os doentes que têm apenas esta mutação, verificamos que todos estes doentes atingiram a RC (100%). Estes resultados estão de acordo com o descrito para esta mutação neste tipo de patologia (Foran *et al.*, 2010). Além disso, os doentes em que não foi identificada a mutação neste gene (*NPM1*-), 30% tem DP e 10% apresenta resistência primária ao tratamento, o que não se verifica em nenhum doente *NPM1*+

A análise das duas mutações em simultâneo, evidenciou que os doentes que apresentam as 2 mutações (*ITD*+/*NPM1*+) são os que possuem taxa de RC mais baixa (34%) relativamente aos outros doentes. Por outro lado, os 2 doentes que apresentam a maior taxa de RC (100%), são aqueles que não têm a mutação do gene *FLT3*, mas possuem a mutação *NPM1* (*ITD*-/*NPM1*+). Estes achados são semelhantes aos divulgados na literatura (Arber *et al.*, 2008) e sugerem a importância da análise destas mutações na avaliação da resposta ao tratamento nos doentes com LMA. Os grupos de doentes com *ITD*+/*NPM1*- e *ITD*-/*NPM1*- apresentaram uma taxa de RC de 50% e 43%, respectivamente, enquanto a taxa de doentes que faleceram durante a indução foi de 25 e 17 %, respectivamente. No entanto, temos de ter em atenção o tamanho reduzido da amostra, pelo que só aumentando o número de doentes do estudo poderemos tirar conclusões estatisticamente mais válidas.

Outro aspecto importante é a relevância deste tipo de estudos no prognóstico e sobrevivência dos doentes. Nesse sentido, avaliámos a influência das características clínicas, biológicas e moleculares (estado mutacional dos genes em estudo) dos doentes inseridos no nosso estudo, em particular doentes com LMA, na SG dos doentes.

O follow-up mediano para todos os doentes com neoplasia mielóide em estudo foi de 8 meses (0-210), sendo nos doentes com LMA de apenas 7 meses, naqueles com DMP de 18 meses (12-127) e em doentes com SMD de 27 meses (1-210).

Nos doentes com LMA a sobrevivência global (SG) mediana foi de 7 meses (0 a 32 meses), sendo que aos 7 meses a SG foi de 50% e ao fim de 32 meses apenas 19% dos doentes estavam vivos.

Tal como esperado, a SG mediana foi significativamente superior no grupo de doentes com LMA mais jovens relativamente aos doentes idosos (14 vs 4 meses). De facto, nestes dois grupos de doentes, quando comparada a SG aos 7 meses constatamos que foi superior nos doentes com idade inferior a 60 anos (69 vs 35%) e aos 32 meses observamos que 25% dos estavam vivos, enquanto os idosos não sobreviveram além dos 23 meses (Figura 14).

Além disso, embora haja tendência da sobrevivência mediana nos doentes com LMA de novo ser maior do que naqueles com LMA secundária (8 vs 7 meses), este resultado não é estatisticamente significativo (Baer, 2009). No entanto, observamos que aos 32 meses já não é possível analisar a SG dos doentes com LMA secundária e esta é de 19% nos doentes com LMA de novo (Figura 15).

Por outro lado, a análise do perfil citogenético dos doentes com LMA revelou-se importante na avaliação da sobrevivência dos doentes. Assim, e de acordo com o descrito por outros autores, os doentes com prognóstico favorável são os que têm SG mediana mais elevada em oposição aos doentes de prognóstico desfavorável (7 vs 2 meses). (Schneider *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2010; Baer *et al.*, 2009). Aferimos que aos 10 meses, a SG foi diferente nos 3 grupos de risco citogenético de acordo com o

---

prognóstico, sendo de 68% no grupo de prognóstico favorável, seguida de 32% no grupo intermédio com um valor inferior no grupo desfavorável (19%). Aos 32 meses 68% dos doentes do grupo de prognóstico favorável estavam vivos o que não se verifica em nenhum dos outros grupos. As diferenças encontradas nestes grupos foram estatisticamente significativas ( $p=0,045$ ) (Figura 16).

Na análise do estado mutacional de cada uma das mutações dos genes em estudo, verificámos que os doentes sem a mutação *FLT3/ITD* e/ ou com a mutação do gene *NPM1* são os que apresentam SG mediana superiores. No entanto, estas diferenças não são estatisticamente significativas.

Estes resultados sugerem que a presença da mutação ITD no gene *FLT3* nos doentes com LMA confere pior prognóstico. Pelo contrário, a presença da mutação *NPM1* neste tipo de neoplasias constitui um factor de prognóstico favorável, o que está de acordo com o descrito na literatura (Arber *et al.* 2008; Foran *et al.*, 2010). No entanto, necessitamos de aumentar a nossa amostra para que estes resultados tenham significância estatística.

Na análise dos resultados da SG dos doentes, de acordo com os 4 genótipos, observamos que os doentes  $ITD^+/NPM1^+$  têm SG mediana superior em relação aos doentes  $ITD^+/NPM1^-$  (14 vs 5 meses). Por outro lado, os doentes  $ITD^-/NPM1^+$  têm SG mediana inferior quando comparada com o  $ITD^-/NPM1^-$  (4 vs 7 meses). Estas diferenças não apresentam significado estatístico ( $p=0,951$ ). No entanto, se analisarmos os 2 grupos em que há uma maior representatividade, *ITD-/NPM1-* e *ITD+/NPM1-*, com 35 e 12 doentes respectivamente, verificamos que a SG aos 7 meses no primeiro grupo foi de quase 50% e do segundo grupo foi de 42% e aos 32 meses 23% dos doentes *ITD-*

---



*/NPM1-* estavam vivos enquanto os doentes *ITD+/NPM1-* não sobreviveram além dos 23 meses (Figura 19). Mais uma vez, não podemos tirar conclusões a partir destes resultados pelo que, é necessário aumentar a nossa amostra para que as diferenças encontradas apresentem significância estatística.

Nos doentes com DMP e SMD incluídos nesta análise não foram detectadas mutações no exão 17 do gene *NPM1* nem a *ITD* no gene *FLT3*. No entanto, não podemos ainda afirmar que nestas patologias este tipo de mutações não ocorre. Por um lado, porque a amostra é relativamente pequena e, por outro, porque nos 24 doentes com DMP e SMD, a maioria das amostras foi obtida numa fase em que os doentes apresentam doença estável e um terço ao diagnóstico. Deste modo, seria interessante averiguar a sua presença numa altura em que ocorra progressão da doença.

Uma vez que as mutações destes genes são as mais frequentes em doentes com LMA e conferem um prognóstico distinto, a sua detecção precoce é crucial para a avaliação do prognóstico e abordagem terapêutica individualizada e dirigida a estes potenciais alvos moleculares. Da mesma forma, a detecção destas mutações em doentes com SMD e DMP poderá também ter relevância prognóstica, contudo são necessários estudos mais amplos.

Além disso, um acompanhamento mais prolongado ao longo da evolução da doença poderá informar o impacto que terá o estado mutacional destes genes na progressão destas doenças ditas crónicas (SMD e DMP) para uma fase aguda (LMA).

Nos Hospitais da Universidade de Coimbra a pesquisa das mutações dos genes *FLT3* e *NPM1* não é realizada por rotina, pelo que este estudo é importante, não só para investigação mas sobretudo para avaliação e seguimento dos doentes com LMA, além

disso poder-se-iam estender às DMP e SMD caso as mutações tivessem sido detectadas. Por todas estas razões, são necessários mais estudos para melhor caracterização da relevância prognóstica das mutações dos genes do *FLT3* e *NPM1* em doentes com neoplasias mielóides.



## BIBLIOGRAFIA

Amorim M. (2007) DNA extraction from fixed cytogenetic cell suspensions. *Genet. Mol. Res.*; 6 (3): 500-503

Arber D. *et al.* (2008) Acute Myeloid Leukemia with recurrent genetic abnormalities. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*; 4<sup>th</sup> Ed: 110-123

Bains A. *et al.* (2011) FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes: Frequency and potencial value for predicting progression to acute myeloid leukemia. *American Journal of Clinical Pathology*; 135 (1): 62-9

Baer M. *et al.* (2009) Acute Myeloid Leukemia in Adults. *Wintrobe's Clinical Hematology*; 20<sup>th</sup> Ed: 1843-1888

Falini B. (2011) Acute Myeloid Leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?. *Blood Journal* [hematologylibrary.org](http://hematologylibrary.org); doi: 10.1182/blood-2010-08-299990

Foran J. (2010) New Prognostic Markers in Acute Myeloid Leukemia: Perspective from the clinic. *American Society of Hematology – Education Program Book*. 30<sup>th</sup> Ed: 47-61

Garcia-Manero G. *et al.* (2010) FLT3 Prognostic of Myelodysplastic Syndromes. *American Society of Hematology – Education Program Book*. 30<sup>th</sup> Ed: 330-337

Haferlach T. *et al.* (2011) Amount of bone marrow blasts is strongly correlated to NPM1 and FLT3-ITD mutation rate in AML with normal Karyotype. *Leukemia Research* (2011); doi: 10.1016/j.leukres.2011.04.026

Kim Y. *et al.* (2010) Prognostic significance of NPM1 mutations and FLT3 internal tandem duplication in adult patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The Korean Journal of Hematology*; 45 (1): 36-45.

Kiyoi H. *et al.* (1997) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*. (1997 Oct);11(10):1605-9.

List A. *et al.* (2009) Myelodysplastic Syndromes. *Wintrobe's Clinical Hematology*; 20<sup>th</sup> Ed: 1956-1987

- Santos F. *et al* (2010) Prognostic Value of FLT3 Mutations Among Different Cytogenetic Subgroups in Acute Myeloid Leukemia. Wiley Online library; doi:10.1002/cncr.25670
- Schneider F. *et al.* (2011). Age-dependnt frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal Karyotype AML (NK-AML). *Annals Hematology* (2011); doi 10.1007/s00277-011-1280-6
- Schnittger S. *et al.* (2011). Characterization of NPM1-mutated AML with history of myelodysplastic syndromes or myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* (2011) 25, 615-621
- Shami, K. S. (2008). FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Expert Rev in Hematology*, 1(2): 153-160 .
- Singh H. *et al.* (2011). Outcome of older adults with cytogenetically normal AML (CN-AML) and FLT3 mutations. *Leukemia Research* (2011); doi: 10.1016/j.leukres.2011.05.032
- Small D. (2006) FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *American Society of Hematology – Education Program Book*. 26<sup>th</sup> Ed: 178-184
- Skoda R. *et al*, (2010) Biological basis of myeloproliferative neoplasms. *Hematology Education* 2010; 4: 183-188
- Stirewalt D. & J. Radich (2003). The Role of FLT3 in Haematopoietic Malignancies. *Cancer*. 3: 650-665.
- Tefferi A, Gilliland DG. Classification of myeloproliferative disorders. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19:361-364
- Thompson M. (2009). Molecular Genetics of Acute Leukemia. *Wintrobe's Clinical Hematology*; 20<sup>th</sup> Ed:1791-1807