



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

TARCÍSIO PAULO DE ALMEIDA FILHO

**EXPRESSÃO E PERFIL MUTACIONAL DO GENE *BCR-ABL* EM PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM INIBIDORES DE TIROSINA
QUINASE**

FORTALEZA

2017

TARCÍSIO PAULO DE ALMEIDA FILHO

EXPRESSÃO E PERFIL MUTACIONAL DO GENE *BCR-ABL* EM PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM INIBIDORES DE TIROSINA
QUINASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito obrigatório à obtenção do título de mestre em Patologia. Área de concentração: Doenças onco-hematologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Caroline Aquino Moreira-Nunes.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A451e Almeida Filho, Tarcísio Paulo de.
Expressão e perfil mutacional do gene BCR-ABL em pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com inibidores de tirosina quinase / Tarcísio Paulo de Almeida Filho. – 2017.
66 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientação: Profa. Dra. Caroline Aquino Moreira-Nunes.

1. chronic myeloid leukemia. 2. BCR-ABL. 3. transcript. I. Título.

CDD 571.9

TARCÍSIO PAULO DE ALMEIDA FILHO

EXPRESSÃO E PERFIL MUTACIONAL DO GENE *BCR-ABL* EM PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM INIBIDORES DE TIROSINA
QUINASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito obrigatório à obtenção do título de mestre em Patologia. Área de concentração: Doenças onco-hematologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jose Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Silvia Maria Meira Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Arlandia Cristina Lima Nobre de Morais
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força nos momentos de dificuldades e de dúvida, concedendo-me discernimento para fazer as melhores escolhas.

À minha família, pelo amor e pelo apoio incondicional, encorajando-me nos momentos mais difíceis e não medindo esforços para que eu chegasse nesse momento.

Aos amigos do Laboratório de hematologia por toda a assistência, conhecimento e brincadeiras compartilhadas.

Aos meus amigos farmacêuticos, que sempre estiveram comigo quando eu mais precisei, agradeço a vocês pelos conselhos, pelo carinho e por sempre acreditarem em mim. Vocês estarão sempre comigo. Obrigado por tudo!

À minha orientadora, Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, por me receber de braços abertos no seu laboratório e pela ajuda na construção deste trabalho.

À minha coorientadora, Caroline Aquino Moreira-Nunes, pelo investimento e conhecimentos concedidos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

A maioria dos pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) expressam os transcritos *b2a2*, *b3a2* ou ambos do gene *BCR-ABL*. O papel desses transcritos no prognóstico dos pacientes em tratamento com inibidores de tirosina quinase (ITKs) tem sido pouco investigado e até o momento permanece incerto. Neste estudo, foi avaliado o valor prognóstico dos principais transcritos nos pacientes com LMC, através da avaliação da expressão e perfil mutacional do gene *BCR-ABL* em pacientes tratados com ITKs. Sessenta pacientes com LMC foram avaliados transversalmente. Os dados demográficos, hematológicos, clínicos e o perfil de mutações dos pacientes com LMC tratados com ITKs foram obtidos através dos prontuários. As análises moleculares para a determinação dos transcritos e das mutações (T315, E255V e Y253H) foram realizadas pela técnica de qPCR. As análises estatísticas foram realizadas através dos testes Kruskal-Wallis ou one-way ANOVA dependendo da normalidade dos dados. O nível de significância foi de 0,05 e valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos. Dos sessenta pacientes, 12 (20%) expressavam o transcrito *b2a2*, 18 (30%) o transcrito *b3a2*, 10 (16,7%) ambos os transcritos *b2a2/b3a2* e 20 (33,3%) apresentaram níveis indetectáveis. Vinte e oito pacientes (46,7%) eram do sexo feminino e 32 (53,3%) do sexo masculino, com média de idade $46,5 \pm 15,7$ anos (variando de 19-82). A análise comparativa dos dados hematológicos com transcritos mostrou diferença significativa na quantidade de leucócitos nos pacientes que expressavam os transcritos *b2a2* e *b3a2* ($p < 0,05$), sendo os pacientes com o transcrito *b2a2* associados a quantidades inferiores. Os demais dados, hematológicos e clínicos, não mostraram diferença estatisticamente significantes com relação aos transcritos ($p > 0,05$). Quanto às mutações do domínio quinase, não foi evidenciada a presença das mutações T315, E255V e Y253H nos pacientes em estudo. Estes são os primeiros resultados encontrados nesta população, sendo necessário mais estudos com um número maior de indivíduos e avaliação das respostas citogenéticas e moleculares ao tratamento. Se confirmado como fator de prognóstico capaz de proporcionar melhores desfechos e resposta ao tratamento, os transcritos poderão ser empregados na elaboração de novos modelos matemáticos para estratificação de risco dos pacientes e na seleção da melhor terapia com ITKs para pacientes com LMC.

Palavras-chave: leucemia mielóide crônica. BCR-ABL. transcrito.

ABSTRACT

Most patients with chronic myeloid leukemia (CML) express the transcripts *b2a2*, *b3a2* or both of the *BCR-ABL* gene. The role of these transcripts in the prognosis of patients undergoing treatment with tyrosine kinase inhibitors (ITKs) has been poorly investigated and remains unclear to date. In this study, we evaluated the prognostic value of the main transcripts in patients with CML, by evaluating the expression and mutational profile of the *BCR-ABL* gene in patients treated with ITKs. Sixty patients with CML were evaluated transversally. Demographic, hematological, and clinical data and mutation profile of CML patients treated with ITKs were obtained from medical records. Molecular analyzes for the determination of transcripts and mutations (T315, E255V and Y253H) were performed by the qPCR technique. Statistical analyzes were performed using the Kruskal-Wallis or one-way ANOVA tests, depending on the normality of the data. The level of significance was 0.05 and *p* values of less than 0.05 were considered significant. Of the sixty patients, 12 (20%) expressed the *b2a2* transcript, 18 (30%) the *b3a2* transcript, 10 (16.7%) both *b2a2/b3a2* transcripts and 20 (33.3%) had undetectable levels. Twenty-eight patients (46.7%) were female and 32 (53.3%) were males, with a mean age of 46.5 ± 15.7 years (ranging from 19-82). The comparative analysis of hematological data with transcripts showed a significant difference in the number of leukocytes in patients expressing the *b2a2* and *b3a2* transcripts ($p < 0.05$), with patients with the *b2a2* transcript associated with lower amounts. The other data, hematological and clinical, did not show statistically significant differences in relation to transcripts ($p > 0.05$). Regarding mutations of the kinase domain, the presence of the T315, E255V and Y253H mutations in the study patients was not evidenced. These are the first results found in this population, being necessary more studies with a greater number of individuals and evaluation of the cytogenetic and molecular responses to the treatment. If confirmed as a prognostic factor capable of providing better outcomes and response to treatment, the transcripts could be used in the elaboration of new mathematical models for patient risk stratification and in the selection of the best therapy with ITKs for patients with CML.

Keywords: chronic myeloid leukemia. BCR-ABL. transcript.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Translocação recíproca entre os cromossomos 9, 22 na leucemia mieloide crônica.....	20
Figura 2 – Principais pontos de quebra dos genes <i>ABL</i> e <i>BCR</i>	21
Figura 3 – Domínios funcionais da p190, p210 e p230.....	22
Figura 4 – Regulação da atividade tirosina quinase nas proteínas ABL e do BCR-ABL.....	23
Figura 5 – Mecanismo de ação do Mesilato de imatinibe.....	26
Figura 6 – Estrutura do BCR-ABL e principais mutações.....	36
Figura 7 – Variáveis analisadas no estudo.....	41
Figura 8 – Fluxograma do estudo.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Contagem de leucócitos de acordo com o tipo de transcrito.....	47
Gráfico 2 – Correlação entre o número de leucócitos e blastos com o nível de hemoglobina em pacientes ao diagnóstico e sob tratamento com ITKs.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escore de risco EBMT para o transplante.....	30
Tabela 2 – Definição de resposta hematológica.....	31
Tabela 3 – Definição de resposta citogenética de acordo com a citogenética clássica....	31
Tabela 4 – Definição de resposta molecular.....	32
Tabela 5 – Definições de resposta ao tratamento com ITKs usados como 1ª linha.....	33
Tabela 6 – Definições de resposta ao tratamento com ITKs usados como 2ª linha.....	34
Tabela 7 – Reagentes utilizados na qPCR em tempo real.....	42
Tabela 8 – Desenho de <i>primers</i> e sondas (<i>Custom taqMan® Gene expression. Assay</i>) dos genes <i>ABL</i> e <i>BCR-ABL</i>	42
Tabela 9 – Pontos de mutação no domínio quinase do BCR/ABL utilizados no estudo.....	43
Tabela 10 – Reagentes utilizados na PCR alelo específica em tempo real.....	43
Tabela 11 – Perfil dos pacientes com níveis de transcritos indetectáveis.....	46
Tabela 12 – Estratificação dos dados demográficos quanto ao tratamento.....	46
Tabela 13 – Características hematológicas dos pacientes de acordo com o tipo de transcrito.....	47
Tabela 14 – Perfil de mutação dos pacientes com LMC tratados com ITKs de 2ª geração.....	49
Tabela 15 – Características sociodemográficas dos pacientes tratados com ITKs de 2ª geração.....	49
Tabela 16 – Frequência dos transcritos em diferentes países.....	50

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Principais sinais e sintomas da leucemia mieloide crônica ao diagnóstico..... 18
- Quadro 2 – Definição da fase acelerada e blástica na leucemia mieloide crônica de acordo com as recomendações da *European LeukemiaNet*..... 19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ -bcr	Região micro do gene <i>BCR</i>
ABC	Análise de bandeamento cromossômico
ABL	<i>Abelson Leukemia Virus</i>
AloTCTH	Transplante alogênico de células tronco hematopoéticas
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BMO	Biopsia da medula óssea
CC	Domínio oligomerização coiled-coil
c-KIT	Receptor do fator de célula tronco
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CYP2A4	Citocromo P450 2A4
DASISION	<i>DA</i> Satinib versus <i>Imatinib Study In treatment-Naive CML patient</i>
DH	Domínio de homologia Dbl
DK	Domínio quinase
DLA	Domínio de ligação à actina
DLD	Domínio de ligação ao DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBMT	<i>European Group for Blood and Marrow Transplantation</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELN	European Leukemia Net
ENESTnd	<i>Efficacy and Safety in Clinical Trials–Newly Diagnosed Patients</i>
FA	Fase acelerada
FB	Fase blástica
FC	Fase crônica
FISH	Hibridização de fluorescência in situ
GRB-2	Proteína 2 de ligação ao receptor de fator de crescimento
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
IFN- α	Interferon alfa
ITK	Inibidor de tirosina quinase
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica

M- <i>bcr</i>	Região maior do gene <i>BCR</i>
m- <i>bcr</i>	Região menor do gene <i>BCR</i>
MI	Mesilato de imatinibe
MO	Medula óssea
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PDGF-R	Receptor do fator crescimento derivado de plaquetas
PH	Domínio de homologia à pleckstrina
Quinase-y	Domínio quinase
RAC-GAP	Proteína ativadora de GTPase RAC
RCg	Remissão citogenética
RCgA	Remissão citogenética ausente
RCgC	Remissão citogenética completa
RCgm	Remissão citogenética menor
RCgmin	Remissão citogenética mínima
RCgP	Remissão citogenética parcial
RHC	Remissão hematológica completa
RMM	Remissão molecular maior
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
S/T quinase	Domínio serina/treonina quinase
SEN	Sinal de exportação nuclear
SH1	Domínio de homologia SRC 1
SH2	Domínio de homologia SRC 2
SH3	Domínio de homologia SRC 3
SLE	Sobrevida livre de evento
SLLCa	Sítio de ligação lipídica dependente de cálcio
SLN	Sinal de localização nuclear
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	Sangue periférico
SRC	Proteína do sarcoma de Rous
SRP	Sítio rico em prolina para a ligação ao SH3
TE	Trombocitemia essencial
Y177	Sítio de ligação a GRB2

qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
ACM	Anormalidade citogenética Maior
ACC	Anormalidade citogenética clonal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Considerações gerais na LMC.....	17
1.2	Epidemiologia.....	17
1.3	Curso clínico.....	17
1.4	Aspectos genéticos da LMC.....	20
1.5	Estrutura da proteína BCR-ABL e patogenia.....	22
1.6	Diagnóstico.....	24
1.7	Tratamento.....	25
1.7.1	<i>Inibidores de tirosina quinase.....</i>	25
1.7.1.1	<i>Imatinibe (Inibidor de tirosina quinase de 1ª geração).....</i>	25
1.7.1.2	<i>Nilotinibe e Dasatinibe (Inibidores de tirosina quinase de 2ª geração).....</i>	27
1.7.1.3	<i>Bosutinibe e Ponatinibe (Inibidores de tirosina quinase de 3ª geração).....</i>	28
1.7.2	<i>Transplante alogênico de células tronco hematopoéticas.....</i>	29
1.8	Monitoramento da doença e critérios resposta ao tratamento.....	30
1.9	Resistência aos ITKs.....	34
1.10	Prognóstico.....	36
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3	MÉTODOS.....	40
3.1	Casuística.....	40
3.2	Local de Estudo.....	40
3.3	Seleção da amostra.....	40
3.4	Coleta de amostras e dados.....	40
3.5	Análise molecular.....	41
3.5.1	<i>Extração de RNA.....</i>	41
3.5.2	<i>Transcrição reversa RNA em cDNA.....</i>	41
3.5.3	<i>Identificação do tipo de transcrito do gene BCR-ABL.....</i>	41
3.5.4	<i>Medida de expressão dos transcritos e interpretação.....</i>	42
3.5.5	<i>Análise de mutações de resistência.....</i>	43
3.6	Aspectos éticos.....	43
3.7	Análise estatística.....	44

4	RESULTADOS.....	45
4.1	Características gerais.....	45
4.2	Análises dos dados demográficos.....	46
4.3	Análise dos dados hematológicos.....	47
4.4	Mutações do domínio quinase.....	48
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARE-	
	CIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA.....	64
	ANEXO A – EXTRAÇÃO DE RNA CELULAR EM SANGUE TOTAL.....	65
	ANEXO B – TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA BCR-ABL.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais na LMC

A LMC foi descrita pela primeira vez em 1845 quando John Hughes Bennett relatou um "Caso de hipertrofia do baço e do fígado em que a morte decorreu de supuração do sangue" no *Edinburgh Medical Journal* (BENNETT, 1845). Em 1847, Rudolf Virchow relatou um caso semelhante e pela primeira vez utilizou o termo leucemia para descrever esta doença recém-descoberta (VIRCHOW, 1847).

Anos depois, Neumann observou que a doença se originava na medula óssea e a nomeou de leucemia mielóide (NEUMANN, 1878). Em 1960, a descoberta do cromossomo *Philadelphia* (Ph) contribuiu para o melhor entendimento da patogênese da doença (NOWELL, 1960). Treze anos mais tarde, evidenciou-se que o cromossomo Ph era gerado a partir da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (ROWLEY, 1973). Na década de 1980, o oncogene fusional *BCR-ABL* foi descrito, sendo este traduzido em uma proteína funcional p210 BCR-ABL cuja atividade tirosina quinase era essencial para a transformação leucêmica (BENNERIAH *et al.*, 1986; HEISTERKAMP *et al.*, 1983).

Hoje sabemos que a LMC se trata de uma doença mieloproliferativa clonal das células tronco hematopoéticas, caracterizada por um curso evolutivo bifásico ou trifásico. Os pacientes são geralmente diagnosticados na fase crônica (FC), mas podem progredir para uma fase mais avançada, denominada de fase blástica (FB) que algumas vezes é precedida por uma fase intermediária conhecida como fase acelerada (FA) (MELO; BARNES, 2007; ROWLEY, 1973).

1.2 Epidemiologia

A LMC ocorre com uma incidência anual de 1,0 a 1,5/100.000 habitantes, acometendo principalmente adultos, entre 50 e 55 anos. No Brasil, em 2012, foram registrados 81.001 procedimentos de quimioterapia de LMC do adulto, no Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS - SIA-SUS, apontando para uma prevalência anual de cerca de 10.125 casos desta doença. Dados sobre a população brasileiras indicam que a mediana de idade na apresentação da doença é, no mínimo, dez anos mais baixa que a encontrada na literatura internacional, com mediana de idade ao diagnóstico entre 40 e 46 anos (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008; SWERDLOW, 2008; DE CAMPOS, 2010).

1.3 Curso clínico na LMC

A FC na LMC é definida por exclusão e depende da ausência de fatores agressivos da doença. Noventa por cento dos pacientes são diagnosticados nesta fase. Na maioria das vezes, se apresenta de forma assintomática. Quando sintomáticos, os pacientes apresentam fadiga, anorexia, perda de peso, sudorese e febrícula e, ao exame clínico, apresentam palidez e hepatoesplenomegalia (QUADRO 1). A esplenomegalia está presente em 80% dos casos e, dependendo do volume, pode causar desconforto abdominal e efeitos compressivos, ocasionando plenitude pós-prandial. A hepatomegalia também pode estar presente. Em alguns casos os pacientes apresentam elevadas contagens de leucócitos, causando manifestações características da hiperviscosidade como dispneia, sonolência, zumbido, priapismo e alterações visuais. Se não tratada, esta fase tem uma duração média de 3 – 5 anos antes de evoluir para fases mais agressivas da doença. (CORTES; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996; JABBOUR; KANTARJIAN, 2014; KANTARJIAN *et al.*, 1993; LICHTMAN; ROWE, 1982; SAVAGE; SZYDLO; GOLDMAN, 1997; SPIERS, 1977).

Quadro 1 – Principais sinais e sintomas da leucemia mieloide crônica ao diagnóstico.

Mais frequentes	Menos frequentes
<ul style="list-style-type: none"> • Fadiga; • Sudorese noturna; • Perda de peso e mal-estar; • Saciedade, desconforto e dor no quadrante superior esquerdo; • Esplenomegalia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Priapismo; • Hemorragias da retina; • Trombose e/ou hemorragia; • Dor óssea;* • Hepatomegalia; • Linfadenopatia;* • Infiltração da pele;* • Massa extramedular (cloroma).*

Fonte: Adaptado de Apperley (2015). Nota | (*) Deve levantar suspeitas de apresentação com doença em fase avançada.

O sangue periférico (SP) dos pacientes nesta fase é caracterizado por uma leucocitose que comumente encontra-se acima de $100 \times 10^9/L$. Na contagem diferencial, encontram-se todos os estágios de maturação dos granulócitos com predomínio de mielócitos, metamielócitos e outras formas maduras. Os mieloblastos e promielócitos também estão presentes, porém a soma desses dois estágios de maturação representam menos de 30% das células do SP, sendo os mieloblastos encontrados em quantidade inferior a 15%. A basofilia é um achado comum e a eosinofilia pode estar presente. A anemia comumente é discreta e a contagem de plaquetas pode estar normal ou aumentada. A medula óssea (MO) desses pacientes

apresenta-se com intensa hiperplasia granulocítica. O número de blasto é inferior a 15%, a soma de blastos e promielócitos representam menos de 30% das células da MO. A biopsia da medula óssea (BMO) pode ser útil na detecção de fibrose. A fosfatase alcalina leucocitária é baixa na maioria dos pacientes nesta fase e as concentrações séricas de desidrogenase láctica e ácido úrico estão elevadas (BACCARANI *et al.*, 2013; CORTES; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996; DEKMEZIAN *et al.*, 1987; ROSNER; SCHREIBER; PARISE, 1972).

Com a progressão da doença, os pacientes com LMC evoluem para a FB que pode ser precedida da FA que tem duração de alguns meses e é caracterizada por uma resistência à terapia, aumento da esplenomegalia, da basofilia e do número de células blásticas, trombocitose ou trombocitopenia, mielofibrose e evolução clonal citogenética. Nesta fase, os pacientes podem estar assintomáticos ou, mais frequentemente, sintomáticos, apresentando febre e dores ósseas (BACCARANI *et al.*, 2013; CORTES; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996; KANTARJIAN *et al.*, 1988;).

A FB é caracterizada pela presença de mais de 30% de células blásticas na MO ou SP. Estas células imaturas podem ser mieloblastos em 50% dos casos, linfoblastos em 25% e no restante são células indiferenciadas ou bifenotípicas. Na FB é comum a presença de pacientes sintomáticos apresentando febre, sudorese noturna, anorexia, perda de peso e dores ósseas (QUADRO 2). Há um aumento da esplenomegalia e pode ocorrer infiltração extramedular, principalmente nos linfonodos, pele, ossos e sistema nervoso central. (BACCARANI *et al.*, 2013; CORTES; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996; DERDERIAN *et al.*, 1993; JACKNOW *et al.*, 1985; TERJANIAN *et al.*, 1987).

Quadro 2 – Definição da fase acelerada e blástica na leucemia mieloide crônica de acordo com as recomendações da *European LeukemiaNet*.

Fase acelerada

Número de blastos no SP ou na MO 15-29%, ou blastos mais promielócitos no SP ou na MO >30%, com blastos <30%;

Basófilos no sangue $\geq 20\%$;

Trombocitopenia persistente ($< 100 \times 10^9 / L$) não relacionada com a terapia;

Anormalidades cromossômicas clonais em células Ph+ (CCA/Ph+) sob o tratamento.

Fase blástica

Blastos no SP ou na MO $\geq 30\%$;

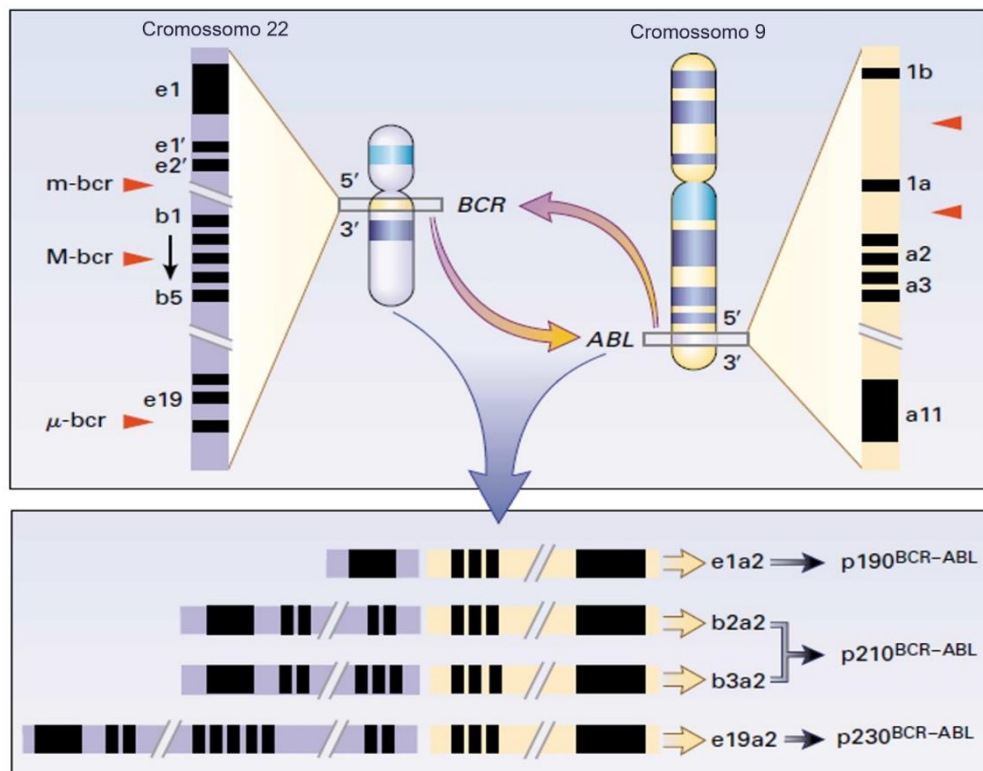
Proliferação extramedular de blastos, exceto no baço.

Fonte: Adaptado de Baccarani (2013). Legenda | Medula Óssea (MO); Sangue periférico (SP). Nota | A fase crônica é definida pela ausência dos critérios citados a cima.

1.4 Aspectos genéticos da LMC

A translocação recíproca e balanceada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 nas células progenitoras hematopoéticas é o evento genético marcante da LMC. Esta translocação resulta na fusão dos genes *ABL* (*Abelson Leukemia Virus*), presente no cromossomo 9q34, e *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*), presente no cromossomo 22q11, formando, assim, dois novos genes, o *BCR-ABL* no cromossomo 22q-, o denominado cromossomo Ph, e o *ABL-BCR* no cromossomo 9q+ (FIGURA 1). Este novo gene híbrido e anormal (*BCR-ABL*) produz uma proteína desregulada e constitutivamente ativada com elevada atividade tirosina quinase que é necessária e suficiente para causar a transformação maligna na célula (CORTES *et al.*, 1996; DALEY; VAN ETTEN; BALTIMORE, 1990; KONOPKA; WATANABE; WITTE, 1984; LUGO *et al.*, 1990; MCLAUGHLIN; CHIANESE; WITTE, 1987; NOWELL, 1960; ROWLEY, 1973).

Figura 1 – Translocação recíproca entre os cromossomos 9, 22 na leucemia mieloide crônica.

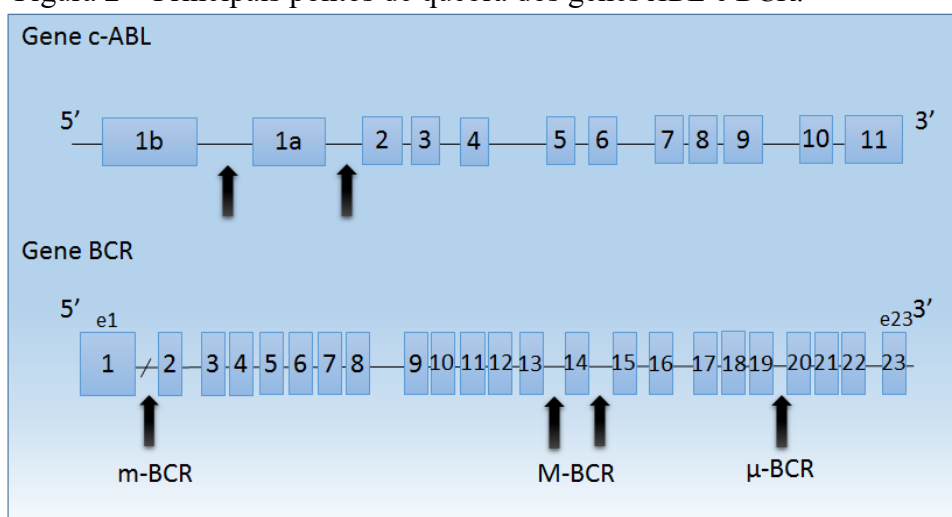


Fonte: Adaptado de Epstein (1999). Legenda: Região menor do gene *BCR* (*m-bcr*); Região maior do gene *BCR* (*M-bcr*); Região micro do gene *BCR* (*μ-bcr*); *Abelson Leukemia virus* (*ABL*); *Breakpoint Cluster Region* (*BCR*).

O gene híbrido predominante na LMC resulta da cisão do gene *BCR* na localização denominada região maior (*M-bcr*) com a fusão do gene *ABL* no nível do éxon 2 (*a2*). A quebra do gene *BCR* na região maior pode, ainda, ocorrer depois do éxon 13 (*e13* ou *b2*) ou depois do

éxon 14 (*e14* ou *b3*) gerando, assim, o gene *BCR-ABL* que quando transcrito pode formar moléculas de mRNA *b2a2* ou *b3a2*, ambos originando uma proteína quimérica de 210 kDa conhecida como p210 que está presente na maioria dos pacientes com LMC (FIGURA 2). Cerca de 5-10% dos pacientes podem, ainda, apresentar eventos de *splicing* alternativo o que permite a expressão simultânea dos transcritos *b2a2* e *b3a2* (EPSTEIN *et al.*, 1999; EPSTEIN *et al.*, 1988; HOLYOAKE, 2001; MELO, 1996a).

Figura 2 – Principais pontos de quebra dos genes *ABL* e *BCR*.



Fonte: Adaptado de Holyoake (2001). Legenda: Região menor do gene *BCR* (*m-bcr*); Região maior do gene *BCR* (*M-bcr*); Região micro do gene *BCR* (μ -*bcr*); *Abelson Leukemia virus* (*ABL*); *Breakpoint Cluster Region* (*BCR*).

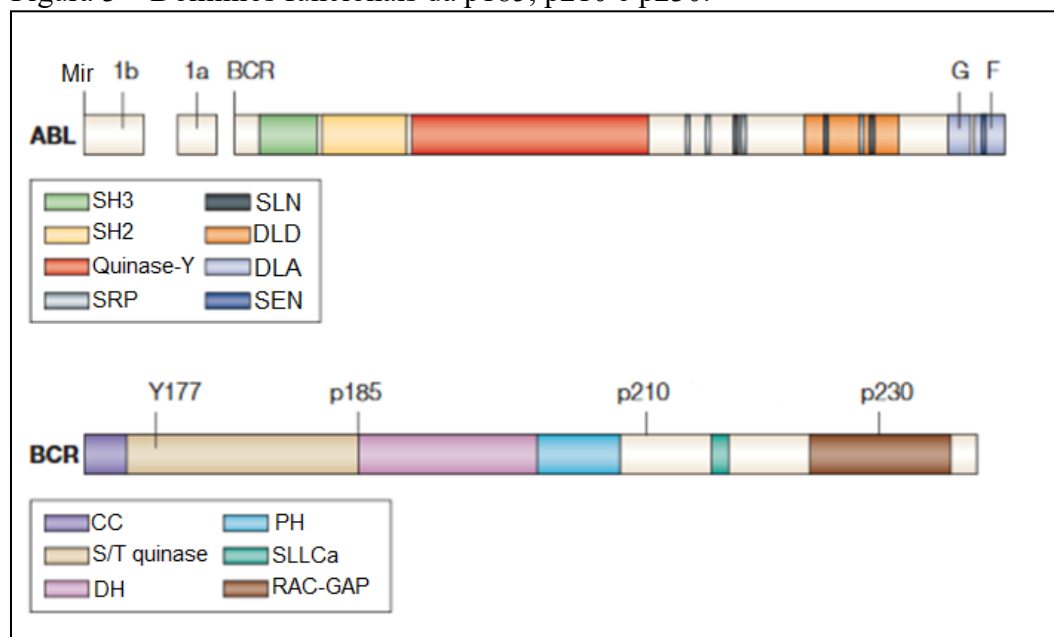
Com menor frequência, a quebra do gene *BCR* pode ocorrer em outras duas posições, conhecidas como região menor (*m-bcr*) e região micro (μ -*bcr*). Dependendo da região envolvida, o produto do rearranjo genético obtido a partir da fusão do gene *BCR* com gene *ABL* no nível do éxon *a2* pode originar uma proteína de fusão de 190 kDa (p190) ou 230 kDa (p230). A primeira resulta da cisão do gene *BCR* no nível do éxon *e1* e fusão com o gene *ABL* no nível do éxon *a2*, gerando um transcrito *e1a2* que está associado à leucemia linfóide aguda (LLA Ph+) que, também, pode estar presente nos pacientes com LMC de forma predominante ou coexpressa em baixos níveis com a p210. A segunda é originada a partir da cisão do gene *BCR* correspondente ao éxon *e19* com a fusão do segmento *a2* do gene *ABL* formando o transcrito *e19a2* que está associado a leucemia neutrofílica crônica Ph+ (BENNOUR *et al.*, 2012; ELLIOTT *et al.*, 2005; FADERL; JEHA; KANTARJIAN, 2003; LUGO *et al.*, 1990; MCLAUGHLIN; CHIANESE; WITTE, 1989; PANE *et al.*, 1996). Com frequência ainda menor, outros transcritos variantes na LMC podem ser encontrados, tais como: os transcritos

e14a3 (b3a3), *e13a3 (b2a3)* e o *e8a2*, no entanto são pouco conhecidos (HUET *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2003; XIAOMIN *et al.*, 2015).

1.5 Estrutura da proteína BCR-ABL e patogenia

Na translocação, partes dos genes *ABL* e *BCR* são ligados para formar um novo gene, que é transcrito em moléculas de mRNA e este traduzido, na maioria dos casos de LMC, em uma proteína p210 cujo ponto de fusão e domínios funcionais são melhor visualizados na Figura 3 (EPSTEIN *et al.*, 1988; REN, 2005).

Figura 3 – Domínios funcionais da p185, p210 e p230.

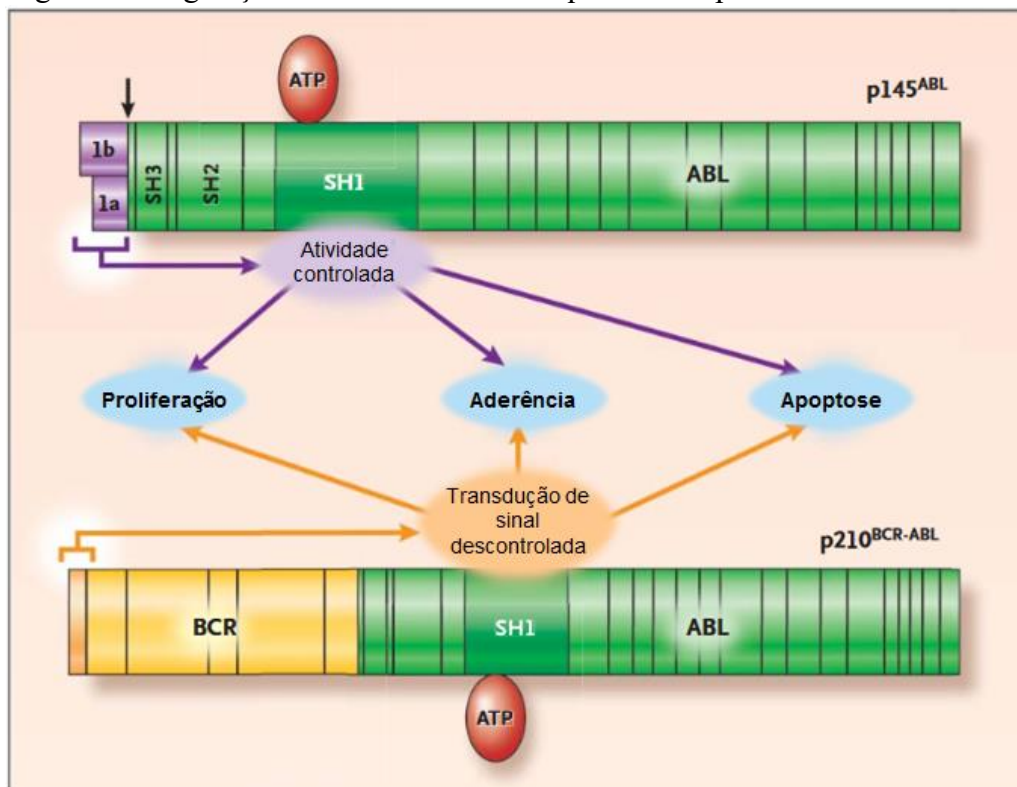


Fonte: Adaptado de Ren (2005). Legenda | Porção ABL: SH3 (Domínio 3 de homologia à Src), SH2 (Domínio 2 de homologia à Src), Quinase-Y (Domínio quinase), SRP (Sítio rico em prolina para a ligação ao SH3), SLN (Sinal de localização nuclear), SEN (Sinal de exportação nuclear), DLD (Domínio de ligação ao DNA), DLA (Domínio de ligação à actina). Porção BCR: CC (Domínio oligomerização coiled-coil), S/T quinase (Domínio serina/treonina quinase), DH (Domínio de homologia DbI), PH (Domínio de homologia à pleckstrina), SLLCa (Sítio de ligação lipídica dependente de cálcio), RAC-GAP (Proteína ativadora de GTPase RAC), Y177 (Sítio de ligação a GRB2).

Os diversos domínios funcionais do ABL e do BCR na p210 podem contribuir para o fenótipo leucêmico observado na LMC e um dos mais importantes é o domínio tirosina quinase (SH1) na porção ABL, que tem um papel crucial na fosforilação de alvos proteicos. Este domínio é normalmente regulado na proteína ABL provavelmente pela ligação intramolecular com a região cap na extremidade N-terminal que é cercada pelo éxon 1 (1a ou 1b) e éxon *a2*, no entanto a perda da região cap do ABL e a presença do domínio de oligomerização (CC) do BCR após a translocação é responsável pela ativação constitutiva do domínio SH1. Desta forma, a atividade tirosina quinase descontrolada do BCR-ABL usurpa as

funções fisiológicas da proteína ABL normal, interagindo com vários efetores proteicos e resultando na proliferação celular desregulada, redução da adesão das células leucêmicas ao estroma medular e redução da resposta apoptótica a estímulos mutagênicos (FIGURA 4). Assim, a atividade tirosina quinase (SH1) da porção ABL do BCR-ABL é, incontestavelmente, a mais importante para a transformação oncogênica (GOLDMAN; MELO, 2003; HOLYOAKE, 2001; REN, 2005).

Figura 4 – Regulação da atividade tirosina quinase nas proteínas ABL e BCR-ABL.



Fonte: Adaptado de Goldman; Melo (2003). Legenda | Adenosina trifosfato (ATP); Domínio de homologia SRC 1,2 e 3 (SH1, SH2, SH3); *Abelson Leukemia virus* (ABL); *Breakpoint Cluster Region* (BCR).

Além do domínio SH1, o BCR-ABL conta com outros domínios importantes na transformação celular, tais como: o domínio SH2 que pode se ligar à fosfotirosinas e mediar interações com outras proteínas Src-quinases, o domínio de ligação à actina que é importante na interação com outras proteínas, o domínio *coiled-coil* (CC) que é importante na oligomerização e, portanto, no processo de autofosforilação da oncoproteína, a tirosina 177 (Y177) que é crucial para a ligação com a proteína 2 de ligação ao receptor de fator de crescimento (GRB-2) e o domínio serina/treonina quinase (S/T quinase) que é importante para interação com proteínas que contenham domínio SH2, incluindo o próprio c-ABL

(DEININGER; DRUKER, 2003; DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000; GOLDMAN; MELO, 2003; HANTSCHHEL; SUPERTI-FURGA, 2004).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da LMC pode ser feito através da citogenética convencional, da técnica de hibridação de fluorescência *in situ* (FISH) ou ainda através de uma reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) (JABBOUR; KANTARJIAN, 2014).

A análise do bandeamento cromossômico (ABC) pela citogenética convencional é o padrão ouro para a detecção do cromossomo Ph e para a avaliação da resposta citogenética (RCg), no entanto, apresenta como desvantagem uma baixa sensibilidade e a necessidade de aspiração da medula óssea para a obtenção de células em metáfase. Além disso, a citogenética convencional é importante na detecção de anormalidades citogenéticas adicionais especialmente nos casos de evolução clonal dos clones Ph⁺ ou Ph⁻ durante a terapia, o qual podem, em raros casos, progredirem para síndrome mielodisplásica ou leucemia mieloide aguda. De acordo com as recomendações da *European LeukemiaNet* (ELN), a ABC deve ser realizada em pelo menos 20 células em metáfases da medula óssea (BACCARANI *et al.*, 2013; BENNOUR; SAAD; SENNANA, 2016).

Como mencionado acima, o FISH também pode ser utilizado no diagnóstico de pacientes com LMC principalmente quando a citogenética convencional não gerar resultados conclusivos ou quando as células em metáfase não podem ser obtidas. De acordo com as recomendações da ELN a análise dos núcleos das células em intérfase do sangue periférico pela técnica de FISH pode substituir a ABC no monitoramento da doença quando o paciente alcança uma remissão citogenética completa (RCgC) sendo esta definida com <1% de núcleos *BCR-ABL*⁺ com a análise de pelo menos 200 núcleos (BACCARANI *et al.*, 2013; BENNOUR *et al.*, 2016).

Outra alternativa disponível para o diagnóstico da LMC é o RT-PCR qualitativo, na qual se avalia a presença do transcrito do gene *BCR-ABL*. O RT-PCR também pode ser quantitativo podendo ser utilizado para a identificação de doença residual mínima após transplante de medula óssea e para o monitoramento da doença durante tratamento (BACCARANI *et al.*, 2013; DE LOCHT; VAN KESSEL; WITTE, 1998; JABBOUR; KANTARJIAN, 2014).

1.7 Tratamento na LMC

O tratamento dos pacientes com LMC mudou ao longo do tempo, sendo iniciado com os compostos de continham arsênico com ativo (solução de Fowler) e posteriormente com a radiação esplênica. Estas intervenções terapêuticas proporcionavam um alívio dos sintomas, no entanto não aumentavam sobrevida dos pacientes, sendo, assim, substituída pelos agentes citostáticos tais, como: bussulfano e hidroxiuréia (DEININGER; DRUKER, 2003). Embora a quimioterapia com essas duas drogas controlasse as manifestações hematológicas em 80% dos pacientes, prevenindo as complicações provenientes da hiperleucocitose e aliviando as manifestações clínicas da doença, raramente induziam remissão citogenética e não alteravam o curso clínico da doença, o qual inevitavelmente progredia para FB fatal (FADERL *et al.*, 1999; KANTARJIAN *et al.*, 1998).

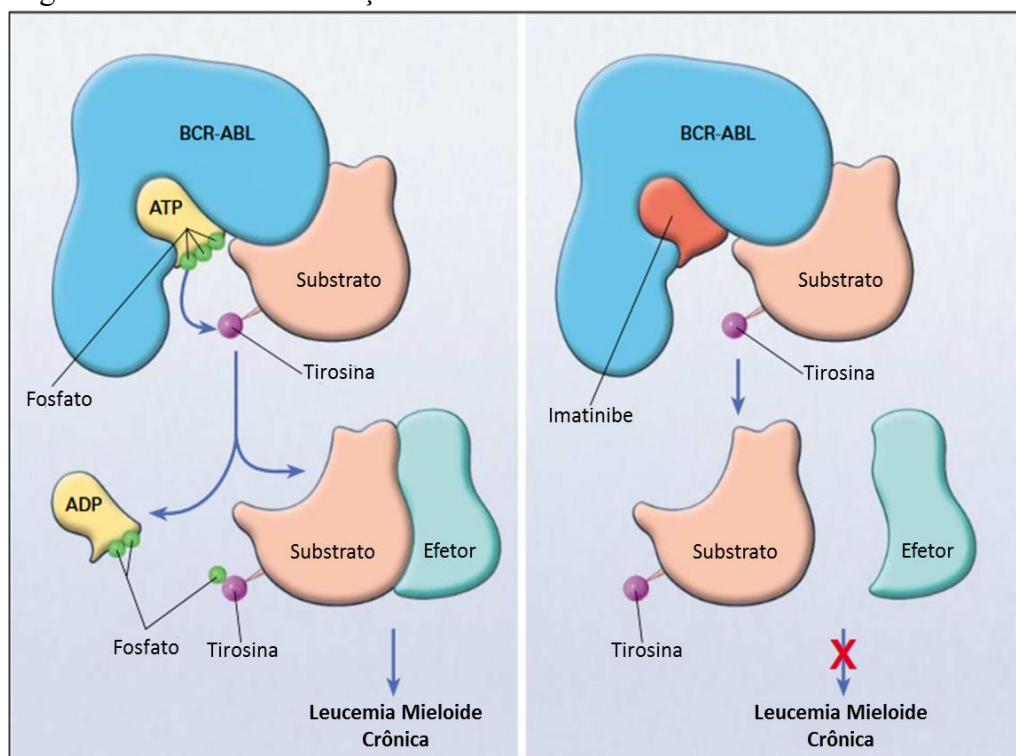
Em seguida, a terapia com IFN- α para o tratamento da LMC foi introduzida e sua utilização promoveu uma melhora significativa da sobrevida dos pacientes quando comparado com as drogas citostáticas, tais como: hidroxiuréia e bussulfano. O IFN- α é capaz de induzir remissão hematologia completa (RHC) em 70 - 80% dos pacientes com LMC na fase crônica e resposta citogenética maior em aproximadamente 0 - 38%. Apesar de conferir vantagens na sobrevida dos pacientes, esta modalidade terapêutica estava sujeita a muitos efeitos adversos, tornando rara a sua utilização após o advento dos ITKs (DELANNOY *et al.*, 1997; SILVER *et al.*, 1999.).

1.7.1 Inibidores de tirosina quinase

1.7.1.1 Imatinibe (Inibidor de tirosina quinase de 1ª geração)

O primeiro ITK, o mesilato de imatinibe (MI, STI-571 ou Glivec®), usado para o tratamento da LMC foi desenvolvido como um inibidor específico do receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-R), no entanto mostrou-se um poderoso e relativamente específico inibidor de tirosina quinases, incluindo o BCR-ABL p210 e BCR-ABL p190 (SAVAGE; ANTMAN, 2002). O MI atua como um inibidor competitivo do sítio de ligação do ATP (trifosfato de adenosina) da enzima, o qual leva à inibição da fosforilação da tirosina de proteínas envolvidas na transdução de sinal mediada pelo BCR-ABL, os quais são críticos para uma variedade de processos biológicos, tais como: crescimento, diferenciação e morte celular. Desta forma, o MI é capaz de interromper o crescimento celular e induzir a apoptose nas células hematopoéticas que expressam o BCR-ABL (FIGURA 5) (DRUKER; LYDON, 2000; DRUKER *et al.*, 1996; GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 1997).

Figura 5 – Mecanismo de ação do Mesilato de imatinibe.



Fonte: Adaptado de Savage; Antman (2002). Legenda | ATP: Trifosfato de adenosina; ADP: Difosfato de adenosina. Nota | O painel da esquerda mostra a oncoproteína BCR-ABL com uma molécula de ATP no domínio de quinase e o substrato sendo ativado pela fosforilação de um dos seus resíduos de tirosina. Deste modo, o substrato pode, então, ativar outras moléculas efectoras adjacentes. No painel a direita, o imatinibe ocupa a o domínio quinase inibindo, assim, a ação da oncoproteína BCR-ABL, impedindo a fosforilação do seu substrato.

Atualmente, o MI faz parte da primeira linha de tratamento para pacientes com LMC na FC, no entanto outros ITKs também podem ser utilizados como primeira linha, tais como: nilotinibe e dasatinibe. A dose recomendada para o imatinibe é de 400 mg podendo ser aumentada para 800 mg (400 mg 2 vezes ao dia) quando utilizado como segunda linha de tratamento (BACCARANI *et al.*, 2013).

O uso desta droga está associado com uma variedade de efeitos adversos os quais, na maioria dos pacientes, podem variar de leve a moderada intensidade e geralmente duram poucos meses, não necessitando reduzir ou interromper o tratamento. Um dos efeitos adversos é a neutropenia e trombocitopenia transitória, que pode ocorrer nos primeiros meses de tratamento e decorre de uma variabilidade no ritmo de regeneração da hematopoese normal depois da supressão da hematopoese dos clones Ph positivo pelo MI. Outros efeitos adversos também podem estar presentes nesses pacientes, tais como: náuseas, vômitos, fadiga, disfunção hepática, *rash* cutâneo, retenção de fluidos, edema periorbital, câimbras, mialgia, artralgia, ginecomastia e anemia macrocítica (SCHIFFER, 2007).

O MI é capaz de induzir uma RHC em 97% dos pacientes, RCgC em uma taxa que pode variar de 49% a 77% e remissão molecular maior (RMM) em uma taxa que pode variar

de 18% a 58%. Embora tenha revolucionado o tratamento dos pacientes com LMC, uma resposta duradoura ao MI se restringe aos pacientes na FC, no entanto alguns dos pacientes nesta fase da doença e a maioria dos pacientes nas fases mais avançadas apresentam recaídas em alguns meses ou anos depois do tratamento com MI devido ao desenvolvimento de resistência (BACCARANI *et al.*, 2013; DRUKER *et al.*, 2001; GOLDMAN; MELO, 2003; O'BRIEN *et al.*, 2003; SAWYERS *et al.*, 2002).

Desta forma, os novos ITKs, os de 2ª geração, foram desenvolvidos para superar a resistência ao imatinibe e melhorar a eficácia do tratamento dos pacientes com LMC (JABBOUR; KANTARJIAN, 2014).

1.7.1.2 Nilotinibe e Dasatinibe (Inibidores de tirosina quinase de 2ª geração)

O Nilotinibe (Tasigna®) é um análogo estrutural do imatinibe, portanto apresentam um mecanismo de ação semelhante. A sua afinidade pelo domínio quinase da proteína BCR-ABL é cerca de 50 vezes maior do que o imatinibe resultando, assim, em uma maior potência e seletividade à proteína (MANLEY; COWAN-JACOB; MESTAN, 2005; WEISBERG *et al.*, 2005).

Atualmente, pode ser utilizado como 1ª linha de tratamento na dose de 300 mg duas vezes ao dia podendo, também, ser utilizado como 2ª linha de tratamento e nas linhas subsequentes, na dose de 400 mg duas vezes ao dia, quando há intolerância ou falha de um dos ITK usados como primeira linha (imatinibe, nilotinibe e dasatinibe). Sua utilização está associada a alguns efeitos adversos hematológicos, não hematológicos e bioquímicos, cujos mais frequentes são: neutropenia, trombocitopenia, *rash* cutâneo, prurido, náuseas, fadiga, cefaleia, diarreia, vômito, constipação, hiperbilirrubinemia, elevação de lipase, hipofosfatemia e hiperglicemia (BACCARANI *et al.*, 2013; QUINTÁS-CARDAMA *et al.*, 2010).

O estudo *Efficacy and Safety in Clinical Trials–Newly Diagnosed Patients* (ENESTnd) comparou a taxa de RMM aos 12 meses entre os pacientes em uso de nilotinibe (300 ou 400 mg duas vezes ao dia) e os pacientes em uso de imatinibe 400 mg uma vez ao dia. Os resultados mostraram uma taxa de RMM significativamente maior nos pacientes em uso de nilotinibe em ambas as dosagens quando comparada com os pacientes em uso de imatinibe (44%-43% versus 22%, $p < 0,001$). Além disso, a taxa de progressão da doença para FA ou FB foi menor nos pacientes em uso de nilotinibe demonstrando, assim, a superioridade desta droga em relação ao imatinibe (LARSON *et al.*, 2012).

Outro ITK de 2ª geração aprovado para o tratamento da LMC é o dasatinibe, que é uma pequena molécula não relacionada ao imatinibe. O dasatinibe é um inibidor competitivo

do ATP e consegue inibir o BCR-ABL bem como outras quinases, tais como a família das quinases Src, c-KIT e PDGFR- α e β . Dasatinibe é cerca de 350 vezes mais potente do que o imatinibe e apresenta atividade contra diversas mutações clinicamente relevantes, contudo, assim como nilotinibe, não demonstra atividade contra a mutação T315I (LOMBARDO *et al.*, 2004; MARTENS, 2014).

Semelhante ao nilotinibe, o dasatinibe pode ser utilizado como 1^a, 2^a ou linhas subsequentes de tratamento, podendo ser administrado em dose única de 100 mg ou na dose de 140 mg quando utilizado como 2^a ou subsequentes linhas de tratamento (BACCARANI *et al.*, 2013). A utilização dessa droga está associada a efeitos adversos em aproximadamente todos os pacientes. Estes efeitos podem variar de leve a moderada intensidade sendo os mais frequentes a retenção de líquidos, a diarreia, a cefaleia, as náuseas, o *rash*, a dispneia, a hemorragia, a fadiga, os vômitos, a tosse, a dor abdominal e a febre (MARTENS, 2014)

No estudo *DASatinib versus Imatinib Study In treatment-Naive CML patient* (DASISION), o dasatinibe administrado na dose de 100 mg ao dia foi comparado ao imatinibe administrado na dose de 400 mg diários. Neste estudo foi evidenciado que os paciente em uso de dasatinibe alcançaram RCgC em 12 meses mais frequentemente do que os pacientes em uso de imatinibe (77% versus 66%, $p=0,007$). Além disso, a taxa de RMM foi maior nos pacientes em uso de dasatinibe do que nos pacientes em uso de imatinibe (46% versus 28%, $p<0,0001$) e esta resposta foi mais rápida nos pacientes em uso de dasatinibe ($p<0,0001$). Por último, a taxa de progressão para FA ou para FB foi maior nos pacientes em uso de imatinibe do que nos pacientes em uso de dasatinibe mostrando, assim, a superioridade do dasatinibe em relação ao imatinibe (KANTARJIAN *et al.*, 2010).

De maneira geral, os ITK de 2^a geração são úteis no tratamento dos pacientes com mutações de resistência ao imatinibe, no entanto novas mutações têm emergido conseguindo manter a resistência ao nilotinibe e dasatinibe, sendo a T315I uma das mais importantes mutações envolvidas nesse processo (JABBOUR; KANTARJIAN, 2014).

1.7.1.3 Bosutinibe e Ponatinibe (Inibidores de tirosina quinase de 3^a geração)

Bosutinibe é um potente inibidor da tirosina quinase ABL e Src que demonstra um potencial inibitório do ciclo celular nas células leucêmica da LMC tanto em experimentos *in vitro* e *in vivo* e tem mostrado ser promissor em pacientes com LMC resistentes ou intolerantes ao MI (MARTENS, 2014)

Os resultados de muitos estudos indicam que o bosutinibe pode ser utilizado por pacientes com várias mutações que levam a falha ao MI, no entanto, assim como nilotinibe e

dasatinibe, o bosutinibe não apresenta atividade contra a mutação T315I. Atualmente, bosutinibe pode ser utilizado por pacientes com resistência ou intolerância a alguns dos outros ITKs. A utilização de bosutinibe está associada a um perfil de toxicidade relativamente distinto de outros ITKs, tendo como principais efeitos tóxicos a diarreia e outros problemas gastrointestinais (BACCARANI *et al.*, 2013; CORTES *et al.*, 2011; JABBOUR; KANTARJIAN, 2014; PUTTINI *et al.*, 2006; REDAELLI *et al.*, 2009).

Outro ITK de 3ª geração é o ponatinibe, sua utilização deve ser considerada para pacientes que desenvolvem a mutação T315I ou quando os outros ITKs não são indicados. Atualmente, não existe outra droga comercialmente disponível que demonstre atividade contra a mutação T315I tornando a utilização do ponatinibe uma ferramenta indispensável para estes pacientes. A utilização desta droga está associada a eventos trombóticos, no entanto os benefícios de sua utilização superam os riscos para a maioria dos pacientes, uma vez que há poucas opções terapêuticas para o controle da doença nos pacientes com essa condição (JABBOUR; KANTARJIAN, 2014).

1.7.2 Transplante alogênico de células tronco hematopoéticas

O transplante alogênico de células tronco hematopoéticas (AloTCTH) é, atualmente, o único tratamento disponível que pode manter uma resposta molecular negativa e duradoura, que pode ser utilizada em pacientes na FA ou blástica, pacientes com mutação T315I e no caso de falha ou intolerância aos ITKs de segunda geração. Essa abordagem terapêutica pode resultar em um aumento na sobrevida e provável cura, principalmente quando realizada em pacientes na fase crônica (BACCARANI *et al.*, 2013; PAVLŮ *et al.*, 2011).

Uma clara desvantagem do procedimento está associada com altas taxas de morbidade e mortalidade que ocorre precocemente depois do transplante. Esse desfecho pode ser melhorado através da seleção de pacientes que mais provavelmente se beneficiariam com o procedimento. Neste contexto, um escore de risco foi elaborado pelo *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) para pacientes com LMC, sendo a ferramenta mais frequentemente utilizadas para indicação do transplante. O escore EBMT leva em consideração 5 variáveis, tais como: tipo de doador, fase da doença, idade do receptor, combinação do sexo entre doador e receptor e o intervalo entre o diagnóstico e o transplante. O escore pode variar de 0 – 7 dependendo da pontuação adquirida em cada variável analisada e o aumento do escore está correlacionado com piores desfechos. A distribuição de pontos para cada variável está demonstrada na Tabela 1 (GRATWOHL *et al.*, 1998; PAVLŮ *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Escore de risco EBMT para o transplante.

Fator de risco	Escore
Idade	
< 20 anos	0
Entre 20 – 40 anos	1
> 40 anos	2
Intervalo entre o diagnóstico e o transplante	
< 1 ano	0
> 1 ano	1
Fase da doença	
Crônica	0
Acelerada	1
Blástica	2
Combinação do sexo entre doador e receptor	
Doador feminino e receptor masculino	1
Outras combinações	0
Tipo de doador	
Irmãos com HLA compatíveis	0
Outro tipo de doador	1

Fonte: Adaptado de Baccarani (2006)

Com a introdução dos ITKs na prática clínica o número de transplantes nos pacientes com LMC tem declinado. Atualmente, o AtoTCTH não é mais recomendado pela ELN como tratamento de primeira linha para paciente com LMC na FC, sendo indicado somente para aqueles pacientes que apresentam resistência e/ou intolerância a pelo menos dois ITK de segunda geração. Embora apresente um potencial de manter um grande número de pacientes livres da doença por >25 anos a mortalidade precoce relacionada ao transplante é considerada muito alta para justificar o AtoTCTH como uma opção de tratamento na FC da doença (BACCARANI *et al.*, 2013; BARRETT; ITO, 2015; KOENECKE *et al.*, 2016).

1.8 Monitoramento da doença e critérios de resposta ao tratamento

O monitoramento da doença é feito através do hemograma completo, da citogenética e da biologia molecular, o qual é utilizada para a quantificação dos níveis dos transcritos do gene *BCR-ABL* e detecção de mutações pontuais no domínio quinase da proteína (BACCARANI *et al.*, 2009).

O hemograma deve ser solicitado ao diagnóstico, a cada 15 dias até que seja alcançada e confirmada a RHC (TABELA 2), e então a cada 3 meses ou quando houver necessidade (BACCARANI *et al.*, 2009).

Tabela 2 – Definição de resposta hematológica

Tipo de resposta	Definição
Hematológica	
RHC	Leucócitos < 10x10 ⁹ /L Basófilos < 5% Ausência de mieloblastos, promielócitos e mielócito Contagem de plaquetas < 450x10 ⁹ /L Baço não palpável

Fonte: Adaptado de Baccarani (2009). Legenda | Remissão hematológica completa (RHC).

De acordo com as recomendações da ELN, a citogenética com ABC deve ser realizada em pelo menos 20 células em metáfases da medula óssea e deve ser solicitada ao diagnóstico, a cada 3 meses nos primeiros seis meses de tratamento e posteriormente a cada 6 meses até que seja alcançado e confirmado uma RCgC. Após este período, a ABC pode ser realizada a cada 12 meses quando o monitoramento molecular não estiver disponível. Além disso, a ABC deve sempre ser realizada nos casos de resposta subótima, falha ao tratamento, achados mielodisplásicos, trombocitopenia ou anemia inexplicável. Além da avaliação da resposta ao tratamento, a análise citogenética é importante na detecção de anormalidades citogenéticas adicionais especialmente nos casos de evolução clonal dos clones Ph⁺ ou Ph⁻ durante a terapia (BACCARANI *et al.*, 2009; BENNOUR *et al.*, 2016). As definições de RCg é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3 – Definição de resposta citogenética de acordo com a citogenética clássica.

Tipo de resposta	Definição
Citogenética	
Completa (RCgC)	Ausência de metáfases Ph ⁺
Parcial (RCgP)	1 – 35% de metáfases Ph ⁺
Menor (RCgm)	36 – 65% de metáfases Ph ⁺
Mínima (RCgmin)	66 – 95% de metáfases Ph ⁺
Ausente (RCgA)	> 95% de metáfases Ph ⁺

Fonte: Adaptado de Baccarani (2009). Legenda | Cromossomo *Philadelphia* (Ph⁺).

A ABC da medula é preferível ao I-FISH (*interphase fluorescent in situ hybridization*) uma vez que a definição dos diferentes graus de resposta citogenética foi baseada

na ABC e porque o I-FISH detecta apenas a anormalidade citogenética clonal (ACC)/Ph⁺ ou ACC/Ph⁻. No entanto, uma vez alcançado a RCgC, a ABC pode ser substituída pelo I-FISH (*interphase fluorescent in situ hybridization*) quando não for possível obter um número adequado de células medulares em metáfase ou quando há problemas de coleta destas células para a ABC. Para o monitoramento da RCgC pela técnica de I-FISH, o qual é definida por <1% de núcleos de células BCR-ABL positivas, a ELN recomenda a análise de pelo menos 200 núcleos em intérfase do sangue periférico (BACCARANI *et al.*, 2009).

O monitoramento molecular é realizado de acordo com uma escala internacional (SI), o qual é calculado pela razão entre o número de transcritos do *BCR-ABL* e o número de transcritos do *ABL* ou outro transcrito reconhecido como controle. Esta razão é expressada como porcentagem de *BCR-ABL* sob escala logarítmica, na qual 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% e 0,001% corresponde, respectivamente, a uma diminuição de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0 logs abaixo da linha basal usada no estudo IRIS, o qual é recomendada pela ELN (BACCARANI *et al.*, 2013).

O monitoramento molecular da doença para avaliar a resposta ao tratamento deve ser realizado a cada 3 meses até que uma RMM seja alcançada e confirmada e posteriormente a cada 6 meses. Além disso, o monitoramento molecular da doença para avaliar o surgimento de mutações pontuais do domínio quinase deve ser solicitado na presença de resposta subótima ou falha ao tratamento, sendo este exame necessário para a troca do tratamento por outros ITKs ou por outras terapias (BACCARANI *et al.*, 2009). A definição de RM é mostrada na Tabela 4

Tabela 4 – Definição de resposta molecular

Tipo de resposta	Definição
Molecular	
Completa (RMC)	Doença indetectável por PCR em tempo real ou nested PCR em duas amostras de sangue consecutivas de qualidade adequada (sensibilidade > 10 ⁴).
Maior (RMM)	Relação BCR-ABL/ABL (ou outro gene controle) ≤ 0,1% na escala internacional.

Fonte: Adaptado de Baccarani (2009).

A resposta aos ITKs é o fator de prognóstico mais importante e pode ser classificada como ótima, alarme e falha. A resposta ótima está associada a melhores desfechos a longo prazo não necessitando de alteração no tratamento, a falha está associada a piores desfechos havendo necessidade de troca terapêutica para limitar a progressão da doença ou morte. Entre a resposta

ótima e a falha terapêutica existe uma zona intermediária conhecida como alarme o qual requer um monitoramento mais frequente para permitir uma rápida intervenção terapêutica caso ocorra uma falha (BACCARANI *et al.*, 2013). Os critérios de resposta aos ITKs utilizados como primeira linha de tratamento são mostrados na Tabelas 5:

Tabela 5 – Definições de resposta ao tratamento com ITKs usados como 1ª linha

	Ótima	Alarme	Falha
Basal	NSA	Alto risco Ou ACC/Ph+, ACM	NSA
3 meses	BCR-ABL ≤ 10% e/ou Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL > 10% Ph+ 36 – 95%	Ausência de RHC e/ou Ph+ > 95%
6 meses	BCR-ABL < 1% e/ou Ph+ 0	BCR-ABL 1 – 10% e/ou Ph+ 1 – 35%	BCR-ABL > 10% e/ou Ph+ > 35%
12 meses	BCR-ABL ≤ 0,1%	BCR-ABL 0,1 – 1%	BCR-ABL > 1%
>12 meses	BCR-ABL ≤ 0,1%	ACC/Ph- (-7 ou 7q-)	Perda de RHC Perda de RCgC Perda de RMM* Mutações ACC/Ph+

Fonte: Adaptado de Baccarani (2013).

*Deve ser realizado 2 testes para a conformação da perda de RMM, no qual um dos testes deve apresentar um nível de transcrito do *BCR-ABL* ≥ 1%.

Legenda | NSA – Não se aplica, ACC – Anormalidade citogenética clonal adicional, ACM – Anormalidade citogenética maior, RHC – Resposta hematológica completa, RCgC – Resposta citogenética completa, RMM – Resposta molecular maior.

Estas definições de respostas são as mesmas para os pacientes em FC, FA ou FB e aplicam-se, também, ao tratamento de segunda linha quando o tratamento de primeira linha for alterado por intolerância. A resposta pode ser avaliada com um teste molecular ou citogenético, mas ambos são recomendados sempre que possível (BACCARANI *et al.*, 2013).

As definições de resposta ao tratamento com ITKs utilizados como segunda linha de tratamento são mostradas na Tabela 6. Estas definições estão limitadas ao dasatinibe e ao nilotinibe, no entanto podem ser utilizadas provisoriamente para a avaliação da resposta aos outros TKIs, tais como: bosutinibe e ponatinibe. Essas definições têm implicações terapêuticas profundas uma vez que impõem limites críticos que determinam a utilização dos TKIs ou AtoTCTH (BACCARANI *et al.*, 2013).

Tabela 6 – Definições de resposta ao tratamento com ITKs usados como 2ª linha

	Ótima	Alarme	Falha
Basal	NSA	Ausência ou perda da RHC ao imatinibe ou falta de RyC ao ITK usado como primeira linha ou alto risco	NSA
3 meses	BCR-ABL ≤ 10% e/ou Ph+ ≤ 65%	BCR-ABL > 10% Ph+ 65 – 95%	Ausência de RHC e/ou Ph+ > 95% ou nova mutação
6 meses	BCR-ABL ≤ 10% e/ou Ph+ < 35	Ph+ 35 – 65%	BCR-ABL > 10% e/ou Ph+ > 65% ou nova mutação
12 meses	BCR-ABL < 1% e/ou Ph+ 0	BCR-ABL 1 – 10% e/ou Ph+ 1 – 35%	BCR-ABL > 10% e/ou Ph+ > 35% e/ou Novas mutações
>12 meses	BCR-ABL ≤ 0,1%	ACC/Ph- (-7 ou 7q-) Ou BCR-ABL > 0,1%	Perda de RHC Perda de RCgC ou RCgP Novas mutações Perda de RMM* ACC/Ph+

Fonte: Adaptado de Baccarani (2013).

*Deve ser realizado 2 testes para a conformação da perda de RMM, no qual um dos testes deve apresentar um nível de transcrito do *BCR-ABL* ≥ 1%

Legenda | NSA – Não se aplica, ACC – Anormalidade citogenética clonal adicional, ACM – Anormalidade citogenética maior, RHC – Resposta hematológica completa, RCgC – Resposta citogenética completa, RMM – Resposta molecular maior.

1.9 Resistência ao tratamento com inibidores de tirosina quinase

Embora a utilização dos ITKs promova altos índices de respostas, casos de resistência a esses fármacos têm sido observados em todas as fases da doença, sendo mais frequentes nas FA e FB (VALENT, 2008; MELO; CHUAH, 2007, PINILLA-IBARZ; CORTES; MAURO, 2011). A resistência aos ITKs pode ser dividida em duas categorias, são elas: resistência primária ou refratariedade a qual é definida como ausência de resposta no início da terapia e resistência secundária ou adquirida definida como perda de resposta hematológica, citogenética ou molecular (VAIDYA; GHOSH; VUNDINTI, 2011).

Existem vários mecanismos de resistência os quais podem ser classificados em dois grupos, os mecanismos dependentes do BCR-ABL e mecanismos independentes do BCR-ABL. Dentre os mecanismos independentes do BCR-ABL podemos citar a quiescência das células tronco malignas, alteração na biodisponibilidade oral (variabilidade individual na concentração de CYP2A4), ligação a proteínas plasmáticas (glicoproteína ácida 1α), alterações na

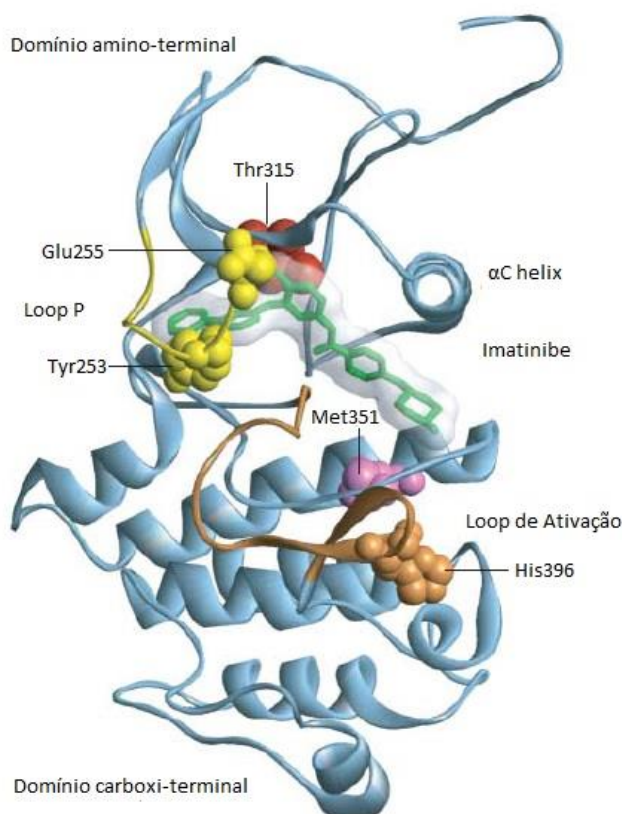
disponibilidade intracelular do fármaco (por efluxo ou influxo) dentre outros. Já os mecanismos dependentes do BCR-ABL são representados pela amplificação do gene *BCR-ABL*, mutações pontuais no domínio quinase e mutações fora do domínio quinase (VAIDYA *et al.*, 2011).

As mutações pontuais no domínio quinase (DK) são reconhecidas como o mecanismo mais comum de falha ao imatinibe e mais de 90 mutações já foram relatadas. A prevalência de mutações é 50-90% em pacientes com resistência ao MI, sendo as principais a T315I, Y253H/F, M351T, G250E, E255K/V, F359V e H396R. Estas mutações apresentam variações quanto a sensibilidade ao MI e algumas apresentam resistência tanto para os ITK de 1ª geração quanto para os ITKs de 2ª geração, tais como o nilotinibe e dasatinibe (APPERLEY, 2007; GORRE *et al.*, 2001; HOCHHAUS *et al.*, 2002; JABBOUR *et al.*, 2011; MELO; CHUAH, 2007; O'HARE; EIDE; DEININGER, 2007).

De modo geral, as mutações pontuais no domínio quinase são distribuídas no *loop P*, *loop A* (sítio de ativação), domínio catalítico e no resíduo *gatekeeper*, esta última é uma das mutações mais frequentes do DK e corresponde a um resíduo de treonina na posição 315 (Thr315) do BCR-ABL o qual mantém ligações de hidrogênios importantes com o imatinibe e controla estericamente a ligação do imatinibe a porções hidrofóbicas adjacentes ao sítio de ligação do ATP, mutações como a T315I na qual há substituição de uma treonina por uma isoleucina, perdem as ligações de hidrogênio que, em adição ao impedimento estérico imposto pela extensa cadeia lateral da isoleucina, prejudica a ligação com o imatinibe e causa insensibilidade completa a este composto bem como a outros ITKs, tais como: nilotinibe, dasatinibe e bosutinibe (APPERLEY, 2007; DAUB; SPECHT; ULLRICH, 2004; QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2009).

Uma outra região do DK comumente mutada é o *loop P*, uma estrutura rica em glicina, extremamente flexível que serve como um sítio de acoplamento para os grupos fosfatos do ATP. Quando ligado ao DK, o imatinibe induz o deslocamento do *loop P* para baixo, o qual forma uma espécie de capa hidrofóbica ao redor do imatinibe. Esta interação é importante para a ligação do imatinibe ao DK, portanto mutações nesse sítio (Y253H/F e E255D/K/R/F) podem prejudicar a ligação do imatinibe ao DK (APPERLEY, 2007; DEININGER; BUCHDUNGER; DRUKER, 2005). A estrutura esquemática do BCR-ABL é mostrada na Figura 6.

Figura 6 – Estrutura do BCR-ABL e principais mutações



Fonte: Adaptado de Daub (2004). Legenda | A estrutura do domínio quinase Abl formando um complexo com imatinibe (verde) é mostrada. A Thr315 que está em contato direto com o imatinibe ligado ao domínio quinase é realçado em vermelho. O *loop-P* e os aminoácidos Tyr253 e Glu255, que são afetados por mutações genéticas frequentemente observadas nesta região, são mostrados em amarelo. O *loop* de ativação que alberga o resíduo His396 é mostrado em marrom e o resíduo Met351, que é afetado pela mutação M351T, é mostrado em rosa.

As mutações mais frequentes do DK são as T315I, Y253F e E255K, sendo a primeira mutação correspondente a alteração no sítio de ligação do imatinibe e as duas últimas ao *loop* de ligação ao nucleotídeo (*loop P*). Estas mutações demonstram um grande potencial oncogênico, o que é consistente com o pior desfecho encontrado nos pacientes que albergam esse tipo de mutação o que, portanto, confere um pior prognóstico nesses pacientes (APPERLEY, 2007; SHAH *et al.*, 2002; VALENT, 2008).

1.10 Prognóstico

O prognóstico dos pacientes pode variar de acordo com as fases evolutivas da doença. Um fator de prognóstico conhecido para os pacientes com LMC é a presença de ACC/Ph+. Estas anormalidades conferem um prognóstico adverso particularmente nos pacientes com ACM que incluem a trissomia do cromossomo 8, Ph, 19, o isocromossomo 17 e a *ider(22)(q10)t(9;22)(q34;q11)* (BACCARANI *et al.*, 2013).

Há índices medidos ao diagnóstico que visam individualizar grupos de risco baixo, intermediário e alto. Os índices mais utilizados são o escore proposto por Sokal *et al.* (1984) em pacientes que usavam Hidroxiuréia ou Bussulfan, e o proposto por Hasford *et al.* (1998) em paciente que usavam interferon. Apesar de serem proposto nos pacientes tratados com a quimioterapia convencional ou com interferon, esses escores podem, também, ser utilizados para estratificar e prever os desfechos dos pacientes tratados com ITKs (DE LAVALLADE, 2008; DRUKER *et al.*, 2006). Recentemente, o escore EUTOS foi proposto em pacientes que usavam o imatinibe, o primeiro ITK. Esse sistema de escore surgiu a partir dos dados de 2060 pacientes tratados com imatinibe e foi desenvolvido pela ELN. O escore é capaz de prever a probabilidade de o paciente alcançar remissão citogenética completa em 18 meses, a qual é o principal marcador de sobrevida nos pacientes com LMC (BACCARANI *et al.*, 2009; HASFORD, 2011). Até o momento, não há evidência de que qualquer uma das três escores de risco seja superior ou mais conveniente (BACCARANI *et al.*, 2009, 2013; HASFORD *et al.*, 1998; SOKAL *et al.*, 1984).

Um estudo recente avaliou a sobrevida dos pacientes com LMC em tratamento com imatinibe, tendo como causa da morte a própria doença. A morte devido à LMC foi definida pelo óbito após a progressão da doença. Neste estudo, a idade aumentada, o aumento do baço, o aumento da contagem de blastos e a contagem de plaquetas diminuída foram associados significativamente com aumento da probabilidade de óbito por LMC, sendo estes parâmetros utilizados na elaboração de um novo escore de sobrevida a longo prazo (ELTS) (PFIRRMANN *et al.*, 2016).

A descoberta de novos fatores de prognóstico pode contribuir para o melhor acompanhamento terapêutico dos pacientes e, pensando nisso, os diferentes transcritos podem ser candidatos, uma vez que diferenças estruturais no domínio SH1 tem sido reportada nas proteínas codificadas pelos transcritos *b2a2* e *b3a2*, podendo assim afetar a atividade tirosina quinase e os desfechos clínicos desses pacientes (HAI *et al.*, 2014).

Existe um número relativamente pequeno de estudos que tratam sobre os transcritos na LMC e a sua significância prognóstica (AL-ACHKAR *et al.*, 2015; BENNOUR *et al.*, 2013; MEISSNER *et al.*, 1999; PEREGO *et al.*, 2000; PREJZNER, 2002; SHARMA *et al.*, 2010). Embora poucos, estudos indicam um pior desfecho nos pacientes com o transcrito *b2a2* (BENNOUR *et al.*, 2013; JAIN *et al.*, 2016; PEREGO *et al.*, 2000). Apesar dos esforços em determinar a significância prognóstica desses transcritos sua real contribuição permanece incerta.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o valor prognóstico

dos principais transcritos e das mutações pontuais do DK nos pacientes com LMC, através da avaliação da expressão e perfil mutacional do gene *BCR-ABL* em pacientes com LMC tratados com inibidores de tirosina quinase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão e o perfil mutacional do gene *BCR-ABL* em pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com inibidores de tirosina quinase.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil demográfico dos pacientes em estudo;
- Determinar a frequência dos transcritos do gene *BCR-ABL*;
- Avaliar possíveis associações entre as variantes transcricionais do gene *BCR-ABL* com os dados laboratoriais (hemograma);
- Avaliar a correlação entre a quantidade de leucócitos e percentagem de blastos com a dosagem de hemoglobina ao diagnóstico;
- Avaliar a correlação entre a quantidade de leucócitos com a dosagem de hemoglobina nos pacientes em tratamento com ITKs;
- Verificar a presença de mutações pontuais T315I, E255V, Y253H nos pacientes com LMC tratados com inibidores de tirosina quinase de segunda geração.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo transversal com 60 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de LMC. Os pacientes foram provenientes do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

3.2 Local de Estudo

O estudo foi realizado no HEMOCE, onde foram coletadas as amostras sanguíneas de rotina, no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, onde foi realizado o processamento das amostras e no Laboratório de Citogenômica do Câncer, onde foram realizados os testes laboratoriais.

3.3 Seleção da Amostra

Critérios de Inclusão:

- Pacientes adultos, de ambos os sexos, com LMC em uso de inibidores de tirosina quinase.

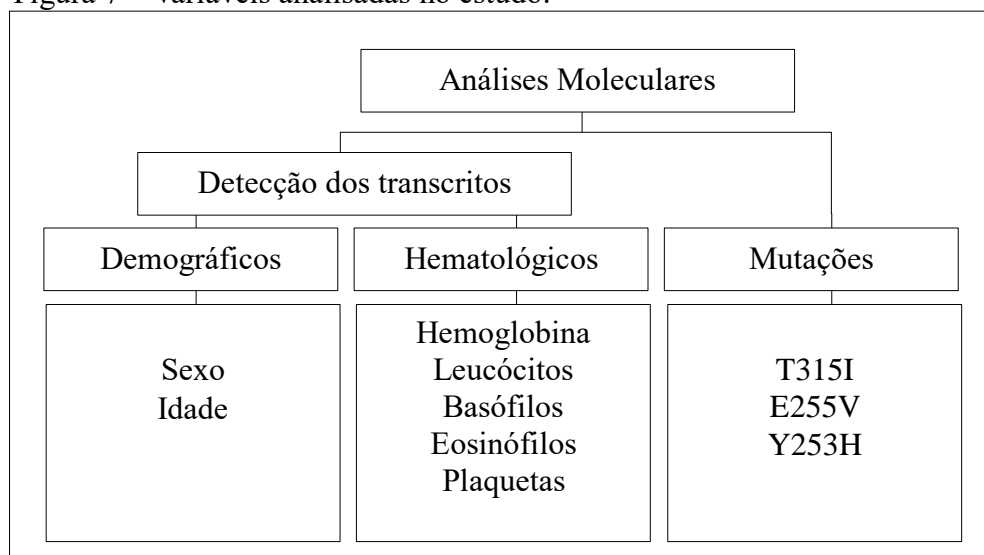
Critérios de Exclusão:

- Pacientes que tenham sido submetidos a transfusão sanguínea nos últimos 6 meses;
- Pacientes que estejam em uso de algum imunossupressor;
- Pacientes com comorbidades;
- Pacientes tabagistas, etilistas e gestantes;
- Prontuários com dados insuficientes.

3.4 Coleta de amostras e dados

Foram selecionados os pacientes atendidos no ambulatório do Serviço de Hematologia do HUWC no período de fevereiro de 2016 a julho de 2016. Os pacientes envolvidos no estudo foram diagnosticados entre o ano de 2000 até o ano de 2016. Destes pacientes, foi coletado 4mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA como anticoagulante para a realização das análises moleculares (determinação dos transcritos e das mutações pontuais no domínio quinase). Os dados hematológicos e clínicos foram obtidos dos prontuários médicos (FIGURA 7).

Figura 7 – Variáveis analisadas no estudo.



Nota | Os dados hematológicos do dia da coleta e os escores de risco foram obtidos dos prontuários médicos.

3.5 Análise molecular

3.5.1 Extração de RNA

Para a extração de RNA total foi utilizado 250 μ L de leucócitos do sangue periférico com guanidina isotiocianato (Trizol LSTM - Invitrogen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (ANEXO A).

3.5.2 Transcrição reversa RNA em cDNA

Após a extração do RNA, foi sintetizado o cDNA de acordo com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher Scientific, USA) para converter o RNA extraído e purificado em cDNA (ANEXO B). O procedimento foi realizado dentro de 24 horas.

Após essa etapa de transcrição reversa as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento da análise.

3.5.3 Identificação do tipo de transcrito do gene *BCR-ABL*

Após o isolamento de RNA e sua conversão em cDNA, a detecção da expressão dos transcritos do gene *BCR-ABL* foi determinada pela técnica de PCR em tempo real quantitativa (qPCR), utilizando o equipamento *ABI 7500* (Applied Biosystem®, USA) e kit comercial *TaqMan® Expression Master Mix* (ThermoFisher®, USA). O protocolo da reação utiliza as quantidades de reagentes descritas na Tabela 7, totalizando uma reação de 25 μ L. O protocolo de amplificação da reação constituiu-se da seguinte ciclagem: $50^{\circ}\text{C}/2$ min, $95^{\circ}\text{C}/10$ min e 50 ciclos de $95^{\circ}\text{C}/15$ segundos e $60^{\circ}\text{C}/1$ min.

Tabela 7 - Reagentes utilizados na qPCR em tempo real.

Reagentes	μL
Água deionizada ultrapura	8,5
TaqMan® gene expression master Mix	12,5
Custom TaqMan® Gene expression assay	1
Cdna	3
	25 μL

As seguintes regiões foram amplificadas: éxon *a2* do gene *ABL*, como um controle endógeno, e a fusão *BCR-ABL*, identificando os transcritos *b2a2* e *b3a2*. Para a realização do experimento foram utilizados os seguintes desenhos de *primers* e sondas, de acordo com Lemos *et al.*, 2005:

Tabela 8 – Desenho de *primers* e sondas (Custom TaqMan® Gene expression assay) dos genes *ABL* e *BCR-ABL*

Genes	Primers
<i>ABL</i> <i>a2</i>	cA2 (GGCCAGTAGCATCTGACTTTGA); cA2R (GTCCAGCGAGAAGGTTTTTCCT); cA2P (FAM-CCTCAGGGTCTGAGTGAAGCCGCTC-TAMRA).
<i>BCR-ABL</i> <i>b2a2</i>	jB2F (TGACCAACTCGTGTGTGAACTC); jA2R (TCAGACCCTGAGGCTCAAAGTC); jA2P (FAM-AGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATC-TAMRA).
<i>BCR-ABL</i> <i>b3a2</i>	jB3F (CCTGTTAAGCAGAGTTCAA); jA2R (TCAGACCCTGAGGCTCAAAGTC); jA2P (FAM-AGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATC-TAMRA).

3.5.4 Medida de expressão dos transcritos do gene *BCR-ABL*

Após a amplificação, os fragmentos foram quantificados pela análise dos dados fluorescentes através do software versão 1.1 no equipamento *ABI PRISM 7500 SDS Applied Biosystems*.

Para estabelecer o grau de expressão de cada um dos transcritos do gene *BCR-ABL*, utilizamos como referência o nível de expressão do gene *ABL*, gene de expressão constitutiva e que se presta como referência de expressão entre as diferentes amostras.

Na análise de PCR em tempo real, a quantificação é baseada no *Cycle threshold* (CT), que é inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias iniciais (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998). O CT é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que os produtos de PCR se tornaram detectáveis.

3.5.5 Análise de mutações de resistência

A pesquisa de mutações foi baseada em um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), através da presença das variantes de resistência que apresentem falha na resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe. Os SNPs foram selecionados de acordo com a literatura como podemos observar na Tabela 9.

Tabela 9 – Pontos de mutação no domínio quinase do BCR/ABL utilizados no estudo.

Mutação genômica	Aminoácido	Localização/ABL	IC ₅₀ (μM)
C 68721 T	T315I	éxon 6	>6400
A 58802 T	E255V	éxon 4	>6400
T 58795 C	Y253H	éxon 4	>6400

Nota | A posição do nucleotídeo ABL refere-se ao locus U07563.1 extraída do banco de dados NCBI.

Para a detecção foram utilizados *primers* e sondas *TaqMan® Mutation Detection Assay* (*ThermoFisher®*), de acordo com as sequências disponibilizadas pelo fabricante.

A detecção das mutações por PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o aparelho *ABI Prism 7500* (*Applied Biosystems®*) e o kit comercial *TaqMan® Genotyping Master Mix* (*ThermoFisher®*). O protocolo da reação utiliza as quantidades de reagentes descritas na Tabela 10. O protocolo de amplificação da reação foi constituído pela seguinte ciclagem: 50°C/2 min, 95°C/10 min e 50 ciclos de 95°C/15 segundos e 60°C/1 min. A leitura das mutações do gene *BCR/ABL* em tempo real foi baseada no polimorfismo de nucleotídeo único, sendo utilizado fluoróforo VIC e FAM para marcar os nucleotídeos do alelo selvagem e do alelo mutado respectivamente.

Tabela 10 – Reagentes utilizados na PCR alelo específica em tempo real.

Reagentes	μL
Água deionizada ultrapura	8,5
<i>TaqMan® Genotyping master Mix</i>	12,5
<i>TaqMan® Mutation Detection Assay</i>	1
cDNA	3
25 μL	

3.6 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFC com número de parecer 1.533.784. Todos os participantes da pesquisa que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1). Os dados dos participantes da pesquisa foram mantidos em sigilo, bem como todas as informações contidas

nos formulários utilizados pelos pesquisadores responsáveis.

3.7 Análise estatística

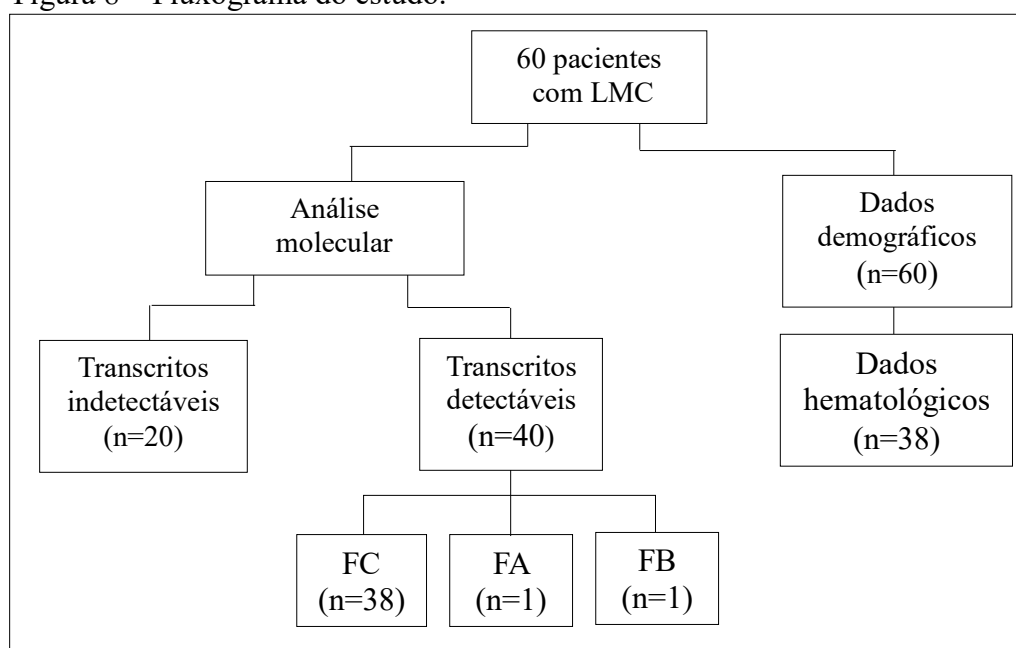
A análise estatística foi realizada através do Programa *GraphPad Prism* 6.0. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para a análise das variáveis quantitativas com três grupos foram usados o teste de *Kruskal-Wallis* ou *one-way ANOVA*, dependendo da normalidade dos dados. Para avaliação da relação entre a quantidade de leucócitos e blastos com o nível de hemoglobina foi utilizado o teste de correlação de *Pearson*. O nível de significância de 0,05 foi adotado e valores de *p* menores do que o nível de significância foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Características gerais

A distribuição dos pacientes para as análises dos dados demográficos, hematológicos e clínicos foram realizados de acordo com a disponibilidade dos dados e dos critérios de elegibilidade (FIGURA 8). Sessenta pacientes com diagnóstico clínico, hematológico e molecular de LMC foram avaliados. Destes 60 pacientes, 58 (96,6%) estavam em fase crônica da doença, 1 pacientes estava em fase acelerada (1,7%) e 1 (1,7%) na fase blástica.

Figura 8 – Fluxograma do estudo.



Legenda | leucemia mieloide crônica (LMC); fase crônica (FC); fase acelerada (FA); fase blástica (FB).

Quanto à expressão dos transcritos do gene *BCR-ABL*, doze pacientes (20%) expressavam o transcrito *b2a2*, 18 pacientes (30%) apresentavam expressavam o transcrito *b3a2*, 10 pacientes (16,7%) expressavam ambos os transcritos *b2a2/b3a2* e vinte pacientes (33,3%) apresentaram níveis indetectáveis dos transcritos pesquisados.

Dos vinte pacientes com níveis indetectáveis de transcritos, 8 (40%) eram do sexo feminino e 12 (60%) eram do sexo masculino. A média de idade foi de $51 \pm 15,2$ anos. Quatorze pacientes (70%) utilizavam ITKs de primeira geração enquanto que 6 (30%) faziam uso de ITKs de segunda geração. O perfil dos pacientes com níveis de transcritos indetectáveis é mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Perfil dos pacientes com níveis de transcritos indetectáveis (n=20).

Paciente	Sexo	Idade	ITK	Troca de ITK	Tempo de tratamento (meses)	Intervalo D/T (meses)
LMC 01	F	44	Imatinibe	NSA	19,7	1,5
LMC 04	F	34	Imatinibe	NSA	86,7	34,3
LMC 05	F	47	Imatinibe	NSA	7,7	2,2
LMC 09	M	46	Nilotinibe	FT	27,0	1,4
LMC 10	M	47	Nilotinibe	P/FT	21,6	1,0
LMC 12	M	45	Nilotinibe	P/E/L	138,1	8,6
LMC 15	F	41	Imatinibe	NSA	49,2	1,4
LMC 17	F	64	Imatinibe	NSA	94,1	10,5
LMC 18	M	55	Imatinibe	NSA	101,6	2,0
LMC 19	F	65	Imatinibe	NSA	40,2	2,6
LMC 27	F	52	Imatinibe	NSA	113,6	40,3
LMC 30	F	57	Imatinibe	NSA	45,0	1,1
LMC 31	M	66	Imatinibe	NSA	41,7	1,7
LMC 33	M	19	Imatinibe	NSA	36,2	0,5
LMC 34	M	52	Imatinibe	NSA	114,1	0,7
LMC 35	M	78	Dasatinibe	E/P/A	109,1	48,7
LMC 36	M	24	Dasatinibe	I	79,7	0,0
LMC 37	M	47	Imatinibe	NSA	29,7	1,1
LMC 39	M	75	Imatinibe	NSA	37,8	4,4
LMC 40	M	63	Dasatinibe	FT/A/P	113,9	0,3

Legenda | Não se aplica (NSA), não informado (NI), falha terapêutica (FT), plaquetopenia (P), evolução clonal (E), leucopenia (L), intolerância (I), anemia (A), inibidor de tirosina quinase (ITK), intervalo entre diagnóstico/tratamento com imatinibe (ID/T). Nota | O tempo de tratamento considerado foi desde o início do ITK até o dia da coleta.

4.2 Análise dos dados demográficos

Dos 60 pacientes, 28 pacientes (46,7%) eram do sexo feminino e 32 (53,3%) do sexo masculino. A média de idade foi de $46,5 \pm 15,7$ anos (variando de 19-82). Quarenta e quatro pacientes (73,3%) estavam em tratamento com imatinibe e 16 (26,7%) faziam uso de nilotinibe ou dasatinibe. A estratificação dos dados demográficos da população em estudo quanto ao tratamento é mostrada na Tabela 12.

Tabela 12 – Estratificação dos dados demográficos quanto ao tratamento.

	Valor absoluto (%) ou Média \pm desvio padrão		
	Inibidor de 1ª geração	Inibidor de 2ª geração	Total
Sexo			
Masculino	22 (50,0)	10 (62,5)	32 (53,3)
Feminino	22 (50,0)	6 (37,5)	28 (46,7)
Idade	44,5 \pm 15,2	52,0 \pm 16,3	46,5 \pm 15,7

Nota | Inibidor de 1ª geração (Imatinibe), Inibidor de 2ª geração (Nilotinibe e Dasatinibe).

4.3 Análises dos dados hematológicos

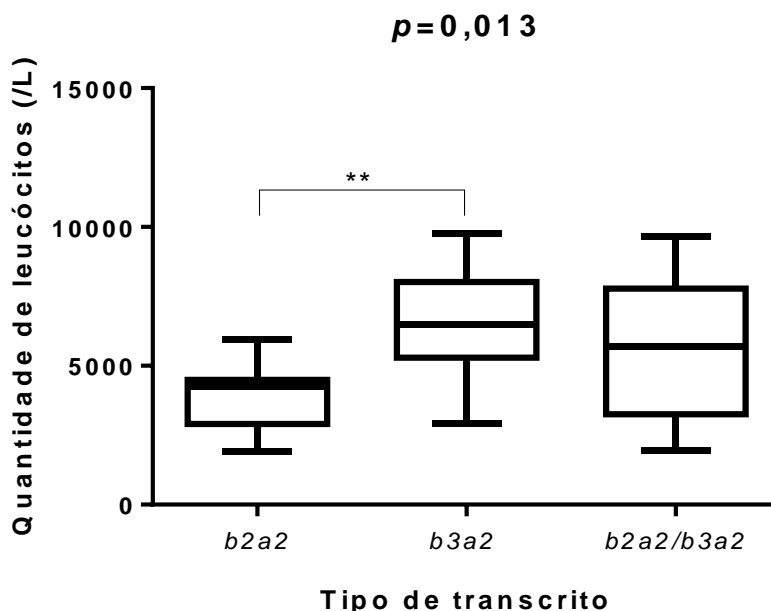
As análises comparativas entre os dados hematológicos e os diferentes transcritos do *BCR-ABL* são mostradas na Tabela 13. A análise estatística revelou que a contagens de leucócitos se altera com o tipo de transcrito e a média de $4,0 \times 10^3/L$, $6,4 \times 10^3/L$, $5,6 \times 10^3/L$ corresponde respectivamente aos transcritos *b2a2*, *b3a2* e *b2a2/b3a2* ($p=0,013$) (GRÁFICO 1, TABELA 13). A análise dos outros dados hematológicos não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) quando comparado com tipo de transcrito.

Tabela 13 – Características hematológicas dos pacientes de acordo com o tipo de transcrito.

Variáveis	N _T (n _{b2a2} /n _{b3a2} /n _{b2a2;b3a2})	Média ± desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil)			p
		<i>b2a2</i>	<i>b3a2</i>	<i>b2a2/b3a2</i>	
Hemoglobina (g/dL)	38 (11/18/9)	11,8 ± 1,9	12,5 ± 2,0	12,4 ± 1,2	0,606
Leucócitos ($10^3/L$)	34 (11/16/7)	4,0 ± 1,2	6,4 ± 2,0	5,6 ± 2,6	0,013
Basófilo (%)	38 (11/18/9)	1,0 (0-2)	1,0 (0-1)	1 (0-2)	0,493
Eosinófilos (%)	37 (11/17/9)	2,0 (1-6)	2,0 (0-9)	3,0 (0-6)	0,906
Plaquetas ($10^3/L$)	37 (11/18/8)	209,2 ± 52,5	194,8 ± 34,6	160 ± 42,5	0,051

Nota | Os outliers foram retirados para a realização das análises estatísticas.

Gráfico 1 – Contagem de leucócitos de acordo com o tipo de transcrito (n=34).

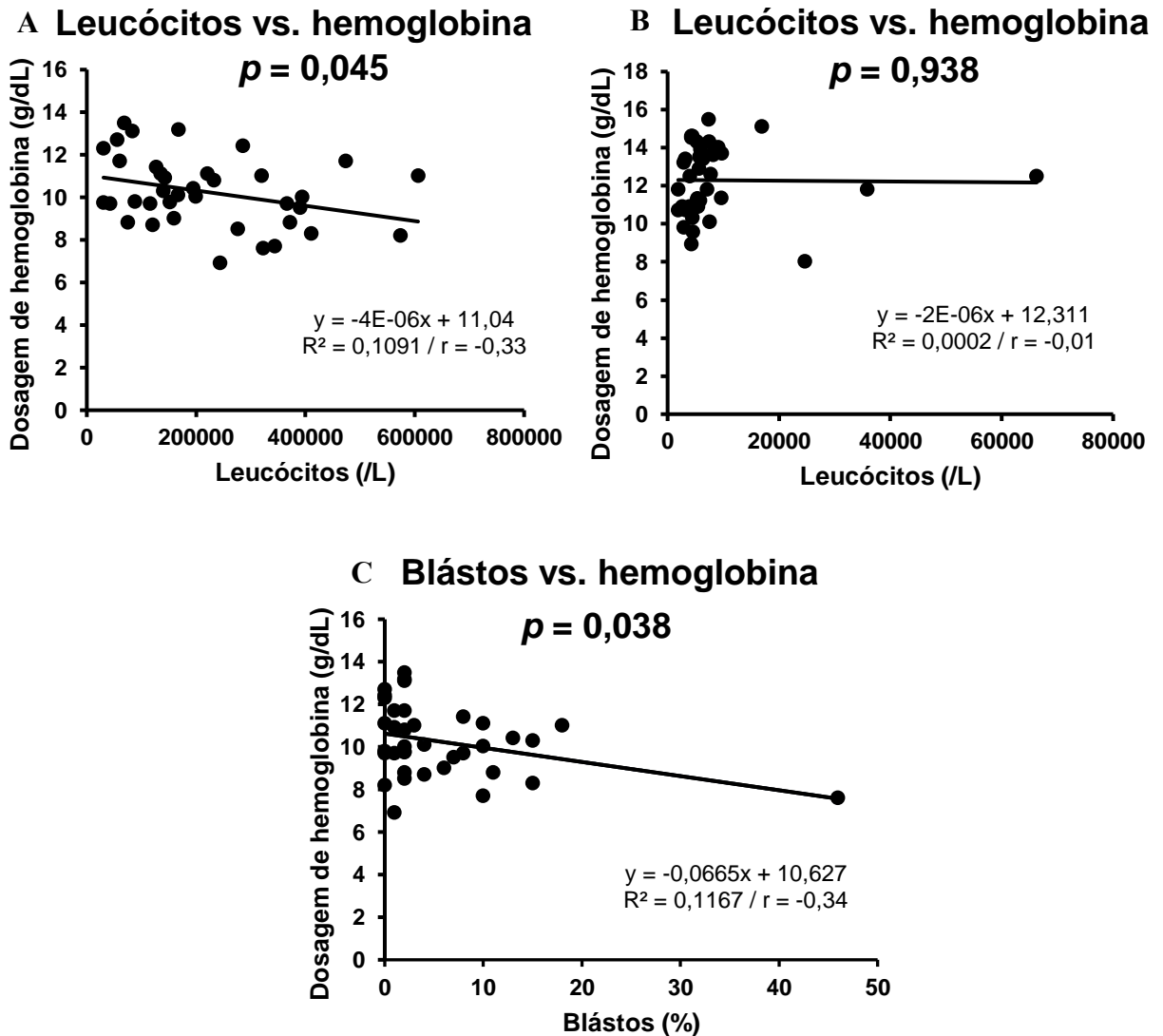


Nota | * $p<0,01$

Apesar de não encontrarmos diferença estatística nos níveis de hemoglobina nos pacientes que expressam diferentes transcritos, constatamos uma correlação negativa deste

parâmetro com o grau de leucocitose e blastos ao diagnóstico (GRÁFICO 2). Ao repetirmos o teste em pacientes sob tratamento com ITKs a correlação foi desfeita como podemos observar na Gráfico 2.

Gráfico 2 – Correlação entre o número leucócitos e blastos com o nível de hemoglobina em pacientes ao diagnóstico e sob tratamento com ITKs.



Nota | (A) e (C) correspondem aos dados provenientes de pacientes ao diagnóstico. (B) corresponde aos dados provenientes de pacientes em tratamento com ITKs. Legenda | Inibidores de tirosina quinase (ITKs).

4.4 Mutações do domínio quinase

O perfil de mutações e as características sociodemográficas dos pacientes com LMC tratados com ITKs de segunda geração é ilustrada na Tabela 14 e 15. Não foi evidenciada a presença das mutações T315, E255V e Y253H nos pacientes em estudo.

Tabela 14 – Perfil de mutações dos pacientes com LMC tratados com ITKs de 2ª geração (n=16).

Paciente	Fase	Transcrito	Resposta (Log)	Ano Diag.	Intervalo D/T	Histórico de In/Ad	Mutações		
							T315I	Y253H	E255V
LMC 09	FC	Indetectável	I	2012	< 1 ano	N/N	A	A	A
LMC 10	FC	Indetectável	I	2013	< 1 ano	N/N	A	A	A
LMC 12	FC	Indetectável	I	2003	< 1 ano	N/N	A	A	A
LMC 13	FC	<i>b2a2/b3a2</i>	-0,66	2002	> 1 ano	N/N	A	A	A
LMC 16	FC	<i>b2a2/b3a2</i>	0,15	2013	< 1 ano	S/N	A	A	A
LMC 23	FC	<i>b3a2</i>	0,58	2003	> 1 ano	S/N	A	A	A
LMC 26	FC	<i>b2a2/b3a2</i>	2,15	2015	< 1 ano	S/N	A	A	A
LMC 28	FC	<i>b3a2</i>	-0,16	2009	< 1 ano	N/N	A	A	A
LMC 29	FC	<i>b3a2</i>	-1,33	2005	> 1 ano	N/S	A	A	A
LMC 35	FC	Indetectável	I	2003	> 1 ano	S/N	A	A	A
LMC 36	FC	Indetectável	I	2009	< 1 ano	S/N	A	A	A
LMC 40	FC	Indetectável	I	2006	< 1 ano	S/S	A	A	A
LMC 46	FC	<i>b2a2/b3a2</i>	1,7	2000	> 1 ano	N/N	A	A	A
LMC 48	FC	<i>b3a2</i>	-2,18	2011	< 1 ano	S/N	A	A	A
LMC 50	FC	<i>b3a2</i>	-3,44	2011	< 1 ano	S/N	A	A	A
LMC 51	FC	<i>b2a2/b3a2</i>	-2,10	2007	< 1 ano	N/N	A	A	A

Legenda | intervalo diagnóstico/tratamento (D/T), fase crônica (FC), ausência de mutação (A), indetectável (I), inibidores de tirosina quinase (ITKs), leucemia mielóide crônica (LMC), intolerância (In), adesão (Ad).

Tabela 15 – Características sociodemográficas dos pacientes tratados com ITKs de 2ª geração.

Paciente	Sexo	Idade	Naturalidade	Paciente	Sexo	Idade	Naturalidade
LMC 09	M	46	Fortaleza	LMC 29	M	62	Madalena
LMC 10	M	47	Fortaleza	LMC 35	M	78	Fortaleza
LMC 12	M	45	Maracanaú	LMC 36	M	24	Fortaleza
LMC 13	F	66	Fortaleza	LMC 40	M	63	Fortaleza
LMC 16	F	38	Aratuba	LMC 46	M	49	Tauá
LMC 23	F	82	Baturité	LMC 48	F	49	Maracanaú
LMC 26	F	23	Fortaleza	LMC 50	F	59	Fortaleza
LMC 28	M	49	Varjota	LMC 51	M	52	Pacajus

Legenda | leucemia mielóide crônica (LMC); masculino (M); feminino (F).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, o transcrito *b3a2* foi o mais frequentemente encontrado nos pacientes em fase crônica da LMC sob tratamento com ITKs. Alguns estudos têm reportado uma maior frequência dos transcritos *b3a2* em pacientes ao diagnóstico (POLAMPALLI *et al.*, 2008; PREJZNER, 2002; SHARMA *et al.*, 2010), o que corrobora nossos dados. Estudos sobre a frequência dos transcritos na população brasileira têm encontrado resultados semelhantes ao nosso, mostrando uma maior frequência dos transcritos *b3a2* (DE LEMOS *et al.*, 2005; SCERNI *et al.*, 2009).

Apesar de poucos, alguns estudos relatam uma maior frequência do transcrito *b2a2*, essa diferença encontrada poderia ser explicada por componentes genéticos associados à etnia da população-alvo. A frequência dos transcritos do gene *BCR-ABL* em pacientes ao diagnóstico em diferentes países é mostrada na Tabela 16.

Tabela 16 – Frequência dos transcritos em diferentes países.

Países	n	Fonte	Tipo de transcrito (%)		
			<i>b2a2</i>	<i>b3a2</i>	<i>b2a2/b3</i>
(DE LEMOS <i>et al.</i> , 2005)	22	Brasil	41,0	59,0	0,0
(LOMAIA <i>et al.</i> , 2006)	27	Rússia	33,3	66,6	0,0
(PAZ-Y-MIÑO <i>et al.</i> , 2002)	37	Equador	94,6	5,4	0,0
(SCERNI <i>et al.</i> , 2009)	40	Brasil	27,5	72,5	0,0
(OSMAN <i>et al.</i> , 2010)	42	Sudão	54,8	42,9	2,3
Presente estudo	60	Brasil	30,0	45,0	25,0
(PREJZNER 2002)	61	Polônia	29,5	62,3	8,2
(SHARMA <i>et al.</i> , 2010)	87	Índia	38,0	54,0	8,0
(MONDAL <i>et al.</i> , 2006)	112	Índia	30,5	63,9	5,6
(SHEPHERD <i>et al.</i> , 1995)	119	Reino Unido	34,0	61,0	5,0
(BACCARANI <i>et al.</i> , 1995)	146	Itália	43,0	57,0	0,0
(POLAMPALLI <i>et al.</i> , 2008)	202	Índia	32,0	68,0	0,0
(KHORASHAD <i>et al.</i> , 2008)	316	Reino Unido	46,5	41,5	12,0
(JAIN <i>et al.</i> , 2016)	481	USA	42,0	41,0	18,0

Muitos estudos avaliaram os níveis de hemoglobina, leucócitos, basófilos, plaquetas e escore Sokal nos pacientes com LMC com diferentes transcritos ao diagnóstico (AL-ACHKAR *et al.*, 2015; BENNOUR *et al.*, 2013; MEISSNER *et al.*, 1999; PEREGO *et al.*, 2000; PREJZNER, 2002). Neste estudo, além destes, foram avaliadas as contagens de eosinófilo, escore Hasford, escore EUTOS e o escore ELTS em pacientes com LMC em fase crônica sob tratamento com ITKs.

A análise dos nossos dados, obtidos de pacientes em tratamento com ITKs, estão de acordo com trabalhos anteriores que avaliaram pacientes ao diagnóstico, mostrando que não

existe diferença no nível de hemoglobina, número de basófilos e eosinófilos entre os pacientes que expressam diferentes tipos de transcritos (AL-ACHKAR *et al.*, 2015; BENNOUR *et al.*, 2013; JAIN *et al.*, 2016; MEISSNER *et al.*, 1999; PEREGO *et al.*, 2000; POLAMPALLI *et al.*, 2008; PREJZNER, 2002; SHARMA *et al.*, 2010).

Embora nossos resultados mostrem que o nível de hemoglobina não é influenciado pelo tipo de transcrito do gene *BCR-ABL* e, apesar de não fazer parte dos objetivos específicos, propomos que a anemia dos pacientes com LMC pode ser atribuída, pelo menos em parte, pela leucocitose e pelo número de blastos encontrados no SP (FIGURA 10) que, por sua vez, refletem a hiperplasticidade da medula óssea, o qual pode desregular o microambiente necessário para eritropoese normal.

A análise da contagem de leucócitos mostrou níveis progressivamente maiores nos pacientes com transcritos *b2a2*, *b2a2/b3a2* e *b3a2*, no entanto, só foi evidenciada diferença estatística entre os pacientes com transcrito *b2a2* e *b3a2*. Um estudo que avaliou pacientes com LMC recém diagnosticados mostrou uma relação inversa com os nossos achados, demonstrando uma maior carga tumoral nos pacientes que expressam o transcrito *b2a2* (HANFSTEIN *et al.*, 2014). Uma possível explicação para essa diferença pode estar relacionada à diferença na atividade tirosina quinase das proteínas codificadas pelos diferentes transcritos do gene *BCR-ABL* e ao mecanismo de supressão das células tronco normais na medula óssea pelas células tronco da LMC.

Estudos prévios demonstraram que células tronco *BCR-ABL*⁺ de ratos apresentam expressão e secreção persistente de lipocalina, uma glicoproteína que regula negativamente o crescimento de células tronco. Além disso, as células tronco leucêmicas apresentam redução da expressão do receptor de lipocalina permitindo, dessa forma, o crescimento dessas células em detrimento das células tronco normais. Tem sido relatado, também, que a expressão da oncoproteína *BCR-ABL* e sua atividade tirosina quinase são necessárias para a indução da expressão da lipocalina nas células leucêmicas (DEVIREDDY *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005).

Um estudo recente reportou que a presença de 25 aminoácidos extras codificados pelo éxon 14 do *BCR*, que está ausente no transcrito *e13a2* (*b2a2*), promove alterações estruturais nos domínios de homologia SRC (SH1, SH2 e SH3) e no domínio de ligação ao DNA na oncoproteína *BCR-ABL* (HAI *et al.*, 2014). Acredita-se que estas alterações estruturais presentes nas proteínas codificadas pelos diferentes transcritos possam afetar a atividade tirosina quinase da proteína, uma vez que a determinação dessa atividade tem sido reportada ser maior nos pacientes com o transcrito *b2a2* (LUCAS *et al.*, 2009).

Dessa forma, hipotetizamos que nos pacientes em tratamento com ITKs, as células

tronco leucêmicas resistentes da medula óssea produtoras de lipocalina inibiriam o crescimento das células tronco normais, dessa maneira, os pacientes com o transcrito *b2a2*, por apresentarem uma maior atividade tirosina quinase, apresentariam uma maior habilidade de inibição das células tronco normais, conferindo, nesses pacientes, contagens de leucócitos inferiores em relação aos pacientes que expressam o transcrito *b3a2* ou ambos.

Quanto à contagem de plaquetas, alguns trabalhos com pacientes recém diagnosticados com LMC mostraram valores maiores deste parâmetro nos pacientes que expressavam o transcrito *b3a2* (JAIN *et al.*, 2016; PEREGO *et al.*, 2000; POLAMPALLI *et al.*, 2008). Além disso, tem sido frequentemente relatado casos de trombocitose semelhante à trombocitemia essencial (TE) em pacientes com LMC que expressavam o transcrito *b3a2* ao diagnóstico (MELO, 1996b). Controversamente, também há na literatura relatos de que esse parâmetro funcione com um fator independente do tipo de transcrito expresso e casos de trombocitose semelhante a TE em pacientes que expressavam os transcritos *b2a2* e/ou ambos, mesmo que como menor frequência (AL-ACHKAR *et al.*, 2015; EMILIA *et al.*, 1997; MEISSNER *et al.*, 1999; PREJZNER, 2002; SHARMA *et al.*, 2010).

Nossos dados demonstraram que não houve diferença na contagem de plaquetas em pacientes em tratamento com ITKs que expressavam diferentes transcritos, sugerindo que a contagem de plaquetas é independente do tipo de transcrito expresso. Diferente da contagem de leucócitos, o número de plaquetas nos pacientes com LMC ao diagnóstico nem sempre se apresentam elevadas. Além disso, apesar de a maioria dos estudos que relataram doença semelhante a TE o encontrarem frequentemente nos pacientes com o transcrito *b3a2*, deve-se levar em consideração que este transcrito é, com raras exceções, o mais frequente nos pacientes ao diagnóstico, sugerindo, dessa forma, que este parâmetro possa ser influenciado por outros fatores além do tipo de transcrito expresso o que explicaria os diferentes resultados encontrados na literatura. Neste contexto, estudos sobre os mecanismos de sinalização mediada pela oncoproteína BCR-ABL e sua interação com as vias envolvidas na trombopoese são de grande importância para melhor entender o comportamento deste parâmetro e elaborar intervenções terapêuticas para os pacientes com trombocitose.

No que diz respeito às mutações do domínio quinase, vários estudos têm reconhecido esse mecanismo como a causa mais comum de falha ao tratamento com imatinibe, sendo detectado em 50% dos pacientes com falha do tratamento ou progressão da doença (BACCARANI *et al.*, 2013; JABBOUR *et al.*, 2011; JABBOUR *et al.*, 2006). Em nosso estudo nenhum paciente apresentou as mutações estudadas, indicando que possivelmente outros fatores possam ser responsáveis pela falha terapêutica e, conseqüentemente, pela troca do

medicamento. Uma das possíveis causas seria a falta de adesão ao tratamento. Estudos recentes têm reportado que a falta de adesão é um problema comum entre os pacientes com LMC e cerca de um terço dos pacientes apresentam algum nível de não adesão ao tratamento (DARKOW *et al.*, 2007; MARIN *et al.*, 2010; NOENS *et al.*, 2009). Notavelmente, muitos dos pacientes incluídos no estudo residem no interior e dependem de transporte público para ter acesso ao serviço de saúde o que pode prejudicar o acompanhamento terapêutico e a dispensação do medicamento, levando a não adesão. Além disso, de acordo com as diretrizes brasileiras, o tratamento com MI para os pacientes diagnosticados antes de 2008 era restrito apenas aos pacientes em FA, FB ou em FC intolerantes ao interferon (BRASIL, 2001), o que pode ter impactado negativamente os desfechos clínicos desses pacientes e impulsionado a troca do ITK.

Nossos dados mostraram que as três séries sanguíneas podem apresentar-se alteradas nos pacientes com LMC, no entanto parecem ser influenciadas de modo diferente pela doença. A quantidade de leucócitos parece ser influenciada pelos diferentes transcritos do gene *BCR-ABL*, enquanto que para a quantidade de plaquetas esse parece exercer apenas uma contribuição, sendo influenciadas por outros fatores além do tipo de transcrito expresso. Por sua vez a série vermelha parece não ser influenciada de forma direta pelos transcritos *BCR-ABL*, estando correlacionada com o volume da doença. Apesar de promissor, estes são os primeiros resultados encontrados nesta população, sendo necessário mais estudos com um número maior de indivíduos e avaliando as respostas citogenéticas e moleculares ao tratamento. Se confirmado como fator de prognóstico capaz de proporcionar melhores desfechos e resposta ao tratamento, os transcritos poderão ser empregados na elaboração de novos modelos matemáticos para estratificação de risco dos pacientes e na seleção da melhor terapia com ITKs para pacientes com LMC.

6 CONCLUSÃO

- Neste estudo, foi encontrado um predomínio do sexo masculino nos pacientes com LMC. A média de idade (anos) e desvio padrão encontrada foi de $46,5 \pm 15,7$;
- O transcrito *b3a2* foi o mais frequentemente encontrado nos pacientes LMC;
- Não foram evidenciadas diferenças nas quantidades de plaquetas, basófilo, eosinófilos e nível de hemoglobina nos pacientes com LMC que expressavam diferentes transcritos do gene *BCR-ABL*;
- Diferenças nas quantidades de leucócitos foram observadas nos pacientes que expressavam os transcritos *b2a2* e *b3a2*, sendo menor nos pacientes com o transcrito *b2a2*;
- Foi evidenciada uma correlação negativa entre a dosagem de hemoglobina com o grau de leucocitose e percentagem de blastos ao diagnóstico.
- Não foi encontrada correlação entre a dosagem de hemoglobina e quantidade de leucócitos nos pacientes sob tratamento com ITKs;
- Não foi evidenciada a presença das mutações T315, E255V e Y253H nos pacientes tratados com ITKs de 2ª geração.

REFERÊNCIAS

- AL-ACHKAR, W. *et al.* Correlation of p210 BCR-ABL transcript variants with clinical, parameters and disease outcome in 45 chronic myeloid leukemia patients. **Journal of Balkan Union of Oncology**, v. 21, n. 2, p. 444-449, 2015.
- APPERLEY, J. F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Lancet Oncology**, v. 8, n. 11, p. 1018-1029, 2007.
- APPERLEY, J F. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 385, n. 9976, p. 1447-1459, 2015.
- BACCARANI, M. *et al.* Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 35, p. 6041-6051, 2009.
- BACCARANI, M. *et al.* European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 872-884, 2013.
- BACCARANI, M. *et al.* Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v.108, n.6, p.1809-1820, 2006.
- BACCARANI, M. *et al.* Chronic myeloid-leukemia, bcr/abl transcript, response to alpha-interferon and survival. **Leukemia**, v.9, n.10, p.1648-1652, 1995.
- BARRETT, A. J.; ITO, S. The role of stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia in the 21st century. **Blood**, v.125, n.21, p.3230-3235, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº431, de 3 de outubro de 2001. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas: tratamento da leucemia mieloide crônica do adulto. **Diário Oficial da União**, 5 out. 2001.
- BEN-NERIAH, Y. *et al.* The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. **Science**, v.233, n.4760, p.212-214, 1986.
- BENNETT, J. H. Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver: In which Death Took Place from Suppuration of the Blood. **Edinburgh Medical and Surgical Journal**, v.64, p.433, 1845.
- BENNOUR, A. *et al.* Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. **Medical Oncology**, v.30, n.1, p.1-6, 2013.
- BENNOUR, A. *et al.* Comprehensive analysis of BCR/ABL variants in chronic myeloid leukemia patients using multiplex RT-PCR. **Clinical Laboratory**, v.58, n.5-6, p.433-439, 2012.
- BENNOUR, A.; SAAD, A.; SENNANA, H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.97, p.263-

274, 2016.

BORTOLHEIRO, T.; CHIATTONE, C.S. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. supl. 1, p. 3-7, 2008.

CORTES, J. E. *et al.* Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome–positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. **Blood**, v. 118, n. 17, p. 4567-4576, 2011.

CORTES, J. E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia: a review. **The American Journal of Medicine**, v. 100, n. 5, p. 555-570, 1996.

DALEY, G. Q.; VAN ETTEN, R. A.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. **Science**, v. 247, n. 4944, p. 824-830, 1990.

DARKOW, T. *et al.* Treatment interruptions and non-adherence with imatinib and associated healthcare costs. **Pharmacoeconomics**, v. 25, n. 6, p. 481-496, 2007.

DAUB, H.; SPECHT, K.; ULLRICH, A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1001-1010, 2004.

DE CAMPOS, M.G.V. *et al.* Chronic myeloid leukemia: a disease of youth in Brazil. **Leukemia Research**, v.34, n.4, p.542-544, 2010.

DE LAVALLADE, H. *et al.* Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v.26, n.20, p.3358-3363, 2008.

DE LEMOS, J. *et al.* Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.4, p.803-11, 2005.

DE LOCHT, V.; VAN KESSEL, G.; WITTE, D. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. **British Journal of Haematology**, v. 102, n. 3, p. 768-774, 1998.

DEININGER, M.; BUCHDUNGER, E.; DRUKER, B. J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2640-2653, 2005.

DEININGER, M. W.; DRUKER, B. J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 401-423, 2003.

DEININGER, M. W.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343-3356, 2000.

DEKMEZIAN, R. *et al.* The relevance of reticulin stain-measured fibrosis at diagnosis in chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, v. 59, n. 10, p. 1739-1743, 1987.

- DELANNOY, A. *et al.* Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 21, p. 1616-1620, 1997.
- DERDERIAN, P. M. *et al.* Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis. **The American Journal of Medicine**, v. 94, n. 1, p. 69-74, 1993.
- DEVIREDDY, L. R. *et al.* A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. **Cell**, v. 123, n. 7, p. 1293-1305, 2005.
- DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 1, p. 3-7, 2000.
- DRUKER, B. J. *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 2001, n. 344, p. 1031-1037, 2001.
- DRUKER, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nature medicine**, v. 2, n. 5, p. 561-566, 1996.
- DRUKER, B. J. *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v.355, n.23, p.2408-2417, 2006.
- ELLIOTT, M. *et al.* WHO-defined chronic neutrophilic leukemia: a long-term analysis of 12 cases and a critical review of the literature. **Leukemia**, v. 19, n. 2, p. 313-317, 2005.
- EMILIA, G. *et al.* Relationship between BCR/ABL fusion proteins and leukemia phenotype. **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3889-3889, 1997.
- EPSTEIN, F. H. *et al.* The biology of chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 3, p. 164-172, 1999.
- EPSTEIN, F. H. *et al.* The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 15, p. 990-998, 1988.
- FADERL, S.; JEHA, S.; KANTARJIAN, H. M. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 98, n. 7, p. 1337-1354, 2003.
- FADERL, S. *et al.* Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. **Annals of internal medicine**, v. 131, n. 3, p. 207-219, 1999.
- GAMBACORTI-PASSERINI, C. *et al.* Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 23, n. 3, p. 380-394, 1997.
- GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 15, p. 1451-1464,

2003.

GORRE, M. E. *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. **Science**, v. 293, n. 5531, p. 876-880, 2001.

GRATWOHL, A. *et al.* Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. **The Lancet**, v. 352, n. 9134, p. 1087-1092, 1998.

HAI, A. *et al.* Differences in structural elements of Bcr-Abl oncoprotein isoforms in Chronic Myelogenous Leukemia. **Bioinformatics**, v. 10, n. 3, p. 108, 2014.

HANFSTEIN, B. *et al.* Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. **Haematologica**, v. 99, n. 9, p. 1441-1447, 2014.

HANTSCHHEL, O.; SUPERTI-FURGA, G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 33-44, 2004.

HASFORD, J. *et al.* A New Prognostic Score for Survival of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Interferon Alfa Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 11, p. 850-859, 1998.

HASFORD, J. *et al.* Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. **Blood**, v. 118, n. 3, p. 686-692, 2011.

HEISTERKAMP, N. *et al.* Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v. 306, p. 239-242, 1983.

HOCHHAUS, A. *et al.* Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. **Leukemia**, v. 16, n. 11, p. 2190-2196, 2002.

HOLYOAKE, D. T. L. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. **British Journal of Haematology**, v. 113, n. 1, p. 11-23, 2001.

HUET, S. *et al.* Molecular characterization and follow-up of five CML patients with new BCR-ABL1 fusion transcripts. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 54, n. 10, p. 595-605, 2015.

JABBOUR, E. *et al.* Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 9, p. 1800-1811, 2011.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 5, p. 547-556, 2014.

- JABBOUR, E. *et al.* Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. **Leukemia**, v. 20, n. 10, p. 1767-1773, 2006.
- JACKNOW, G. *et al.* Extramedullary presentation of the blast crisis of chronic myelogenous leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 61, n. 2, p. 225-236, 1985.
- JAIN, P. *et al.* Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors. **Blood**, v. 127, n. 10, p. 1269-1275, 2016.
- KANTARJIAN, H. *et al.* Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 24, p. 2260-2270, 2010.
- KANTARJIAN, H. M. *et al.* Chronic myelogenous leukemia: a concise update. **Blood**, v. 82, n. 3, p. 691-703, 1993.
- KANTARJIAN, H. M. *et al.* Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, v. 61, n. 7, p. 1441-1446, 1988.
- KANTARJIAN, H. M. *et al.* Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 12, n. 1, p. 31-80, 1998.
- KHORASHAD, J. S. *et al.* Finding of kinase domain mutations in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia responding to imatinib may identify those at high risk of disease progression. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 29, p. 4806-4813, 2008.
- KOENECKE, C. *et al.* Outcome of patients with chronic myeloid leukemia and a low-risk score: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of targeted therapy. A report from the EBMT Chronic Malignancies Working Party. **Bone Marrow Transplantation**, 2016.
- KONOPKA, J. B.; WATANABE, S. M.; WITTE, O. N. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. **Cell**, v. 37, n. 3, p. 1035-1042, 1984.
- LARSON, R. *et al.* Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. **Leukemia**, v. 26, n. 10, p. 2197-2203, 2012.
- LEE, M. *et al.* Association of the responsiveness to interferon therapy with the bcr/abl splicing pattern in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 80, n. suppl I, p. 210a, 1992.
- LICHTMAN, M. A.; ROWE, J. M. Hyperleukocytic leukemias: rheological, clinical, and therapeutic considerations. **Blood**, v. 60, n. 2, p. 279-283, 1982.
- LIN, H. *et al.* Bcr-Abl-mediated suppression of normal hematopoiesis in leukemia. **Oncogene**, v. 24, n. 20, 2005.

LIU, L. G. *et al.* Chronic myelogenous leukemia with e13a3 (b2a3) type of BCR-ABL transcript having a DNA breakpoint between ABL exons a2 and a3. **American Journal of Hematology**, v. 74, n. 4, p. 268-272, 2003.

LOMAIA, E. G. *et al.* b2a2 Type bcr-abl Transcript Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Patients in Chronic Phase (CP) on Glivec Achieve Complete Cytogenetic Remission (CCyR) Earlier Than Those with b3a2. **Blood**, v. 108, n. 11, p. 4780-4780, 2006.

LOMBARDO, L. J. *et al.* Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino) thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 27, p. 6658-6661, 2004.

LUCAS, C. M. *et al.* Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. **Haematologica**, v. 94, n. 10, p. 1362-1367, 2009.

LUGO, T. G. *et al.* Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. **Science**, v. 247, n. 4946, p. 1079-1082, 1990.

MANLEY, P. W.; COWAN-JACOB, S. W.; MESTAN, J. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1754, n. 1, p. 3-13, 2005.

MARIN, D. *et al.* Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 14, p. 2381-2388, 2010.

MARTENS, U. M. **Small Molecules in Oncology**. Springer, 2014. ISBN 3642544894.

MCLAUGHLIN, J.; CHIANESE, E.; WITTE, O. N. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 18, p. 6558-6562, 1987.

MCLAUGHLIN, J. A. M. I.; CHIANESE, E. R. I. N.; WITTE, O. N. Alternative forms of the BCR-ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 5, p. 1866-1874, 1989.

MEISSNER, R. D. V. *et al.* Analysis of mRNA transcripts in chronic myeloid leukemia patients. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 475-479, 1999.

MELO, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. **Blood**, v. 88, n. 7, p. 2375-2384, 1996a.

MELO, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. **American Society of Hematology**, 1996b.

MELO, J. V.; BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 6, p. 441-453, 2007.

MELO, J. V.; CHUAH, C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. **Cancer Letters**, v.249, n.2, p.121-132, 2007.

MONDAL, B. C. *et al.* Molecular profiling of chronic myeloid leukemia in eastern India. **American Journal of Hematology**, v.81, n.11, p.845-849, 2006.

NEUMANN, E. Uber myelogene leukemia. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 15, p. 69-72, 1878.

NOENS, L. *et al.* Prevalence, determinants, and outcomes of nonadherence to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: the ADAGIO study. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5401-5411, 2009.

NOWELL, P. C. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497-1501, 1960.

O'BRIEN, S. G. *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 11, p. 994-1004, 2003.

O'HARE, T.; EIDE, C. A.; DEININGER, M. W. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2242-2249, 2007.

OSMAN, E.-A. I. *et al.* Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 229-231, 2010.

PANE, F. *et al.* Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). **Blood**, v. 88, n. 7, p. 2410-2414, 1996.

PAVLŮ, J. *et al.* Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? **Blood**, v. 117, n. 3, p. 755-763, 2011.

PAZ-Y-MIÑO, C. *et al.* BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 132, n. 1, p. 65-67, 2002.

PEREGO, R. *et al.* The possible influences of B2A2 and B3A2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukaemia. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 11, p. 1395-1401, 2000.

PFIRRMANN, M. *et al.* Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 1, p. 48-56, 2016.

PINILLA-IBARZ, J.; CORTES, J.; MAURO, M. J. Intolerance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 4, p. 688-697, 2011.

POLAMPALLI, S. *et al.* Analysis and comparison of clinicohematological parameters and molecular and cytogenetic response of two Bcr/Abl fusion transcripts. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p. 1138-49, 2008.

PREJZNER, W. Relationship of the BCR gene breakpoint and the type of BCR/ABL transcript to clinical course, prognostic indexes and survival in patients with chronic myeloid leukemia. **Medical Science Monitor**, v. 8, n. 5, p. BR193-BR197, 2002.

PUTTINI, M. *et al.* In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl⁺ neoplastic cells. **Cancer Research**, v.66, n.23, p.11314-11322, 2006.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 113, n. 8, p. 1619-1630, 2009.

QUINTÁS-CARDAMA, A. *et al.* Nilotinib. In: (Ed.). **Small Molecules in Oncology**: Springer, 2010. p.103-117.

REDAELLI, S. *et al.* Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 3, p. 469-471, 2009.

REN, R. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 172-183, 2005.

ROSNER, F.; SCHREIBER, Z. R.; PARISE, F. Leukocyte alkaline phosphatase: Fluctuations with disease status in chronic granulocytic leukemia. **Archives of Internal Medicine**, v. 130, n. 6, p. 892-894, 1972.

ROWLEY, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, p. 290-293, 1973.

SAVAGE, D. G.; ANTMAN, K. H. Imatinib mesylate—a new oral targeted therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 9, p. 683-693, 2002.

SAVAGE, D. G.; SZYDLO, R. M.; GOLDMAN, J. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. **British Journal of Haematology**, v. 96, n. 1, p. 111-116, 1997.

SAWYERS, C. L. *et al.* Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3530-3539, 2002.

SCERNI, A. C. C. *et al.* Influence of late treatment on how chronic myeloid leukemia responds to imatinib. **Clinics**, v. 64, n. 8, p. 731-734, 2009.

SCHIFFER, C. A. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 258-265, 2007.

SHAH, N. P. *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v. 2, n. 2, p. 117-125, 2002.

SHARMA, P. *et al.* Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. **Annals of Hematology**, v. 89, n. 3, p. 241-247, 2010.

SHEPHERD, P. *et al.* Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. **British Journal of Haematology**, v. 89, n. 3, p. 546-554, 1995.

SOKAL, J. E. *et al.* Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v. 63, n. 4, p. 789-799, 1984.

SPIERS, A. The clinical features of chronic granulocytic leukaemia. **Clinics in Haematology**, v. 6, n. 1, p. 77-95, 1977.

SWERDLOW, S. *et al.* WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 4th Ed.(2008). 2008.

TERJANIAN, T. *et al.* Clinical and prognostic features of patients with philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia and extramedullary disease. **Cancer**, v. 59, n. 2, p. 297-300, 1987.

TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 49-53, 1998.

VAIDYA, S.; GHOSH, K.; VUNDINTI, B. R. Recent developments in drug resistance mechanism in chronic myeloid leukemia: a review. **European journal of haematology**, v. 87, n. 5, p. 381-393, 2011.

VALENT, P. Emerging stem cell concepts for imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia: implications for the biology, management, and therapy of the disease. **British Journal of Haematology**, v. 142, n. 3, p. 361-378, 2008.

VIRCHOW, R. Zur pathologischen Physiologie des Bluts. **Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin**, v. 1, n. 3, p. 547-563, 1847.

WEISBERG, E. *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. **Cancer Cell**, v. 7, n. 2, p. 129-141, 2005.

XIAOMIN, G. *et al.* Chronic myeloid leukemia with e14a3 BCR-ABL transcript: analysis of characteristics and prognostic significance. **Leukemia & Lymphoma**, v. 56, n. 12, p. 3343-3347, 2015.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) como participante de uma pesquisa. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar para que todos os procedimentos dessa pesquisa sejam esclarecidos. O projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da expressão do gene *BCR-ABL*, do perfil mutacional, da genotoxicidade e citotoxicidade em pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com inibidores de tirosino-quinase**” tem como objetivo principal avaliar a expressão do gene *BCR-ABL*, o perfil mutacional, a genotoxicidade e citotoxicidade de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica em tratamento com inibidores da tirosina-quinase, em acompanhamento no ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em Fortaleza-Ceará. Os resultados encontrados na pesquisa poderão contribuir para um melhor acompanhamento clínico dos pacientes com LMC e uma melhoria na qualidade de vida dos mesmos.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Para tanto, necessitamos que o Sr.(a) autorize a obtenção de 2 (dois) tubos de sangue (4 mL). A coleta de sangue será realizada em uma veia do braço de sua preferência, no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). A participação na pesquisa, não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas o desconforto da dor e a possibilidade de formação de uma pequena mancha roxa devido à coleta do sangue. As amostras de sangue serão processadas em nosso laboratório, onde serão realizados as análises moleculares e os testes de toxicidade. O senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa, como a coleta de informações sociodemográficas (sexo e idade), clínicas (sinais e sintomas) e laboratoriais (hematologia e bioquímica) dos prontuários médicos.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Pedro Aurio Maia Filho, Laboratório de Hematologia, endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 – Porangabussu, CEP 60430-370 - Fortaleza, CE – Brasil, Telefone: (85) 33668264.

Se o Senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UFC/PROPESQ- Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo; Fone: (0xx) 85 3366-8344 (Horário: 8:00 às 12:00 h de segunda à sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. O abaixo assinado

_____, ____ anos, RG _____, declara que é de livre e espontânea vontade a participação na pesquisa.

Caso o Senhor (a) sinta-se suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se o Senhor (a) concorda em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente/ representante legal

Assinatura da testemunha

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO A – EXTRAÇÃO DE RNA CELULAR EM SANGUE TOTAL

Procedimento

1. Identificar os tubos de 1,5mL com a numeração consecutiva do Protocolo de Registro de Amostras;

Lise celular

2. Adicionar 1 mL de TRI Reagent® Solution ao tubo já identificado;
3. Adicionar 250 µL de pellet de leucócitos do sangue periférico em seus respectivos tubos;
4. Agitar no vórtex até obter uma mistura homogênea e incubar por 5 minutos à temperatura ambiente;
5. Adicionar 200 µL de clorofórmio;
6. Agitar no vórtex por 15 segundos até obter uma mistura homogênea e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente;
7. Centrifugar a 12000 x rcf por 15 minutos;
8. Transferir 500µL da fase aquosa (sobrenadante) para tubos estéreis de 1,5 mL e desprezar o restante;

Precipitação

9. Adicionar 500 µL de isopropanol absoluto;
10. Homogeneizar por inversão durante 20 segundos e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente;
11. Centrifugar a 12000 x rcf por 10 minutos;
12. Desprezar o sobrenadante virando o tubo cuidadosamente;
13. Adicionar 500 µL de etanol 75% e agitar no vórtex;
14. Centrifugar a 7400 x rcf por 5 minutos;
15. Desprezar o sobrenadante virando o tubo cuidadosamente;
16. Adicionar 500 µL de etanol 75% e agitar no vórtex;
17. Centrifugar novamente a 7400 x rcf por 5 minutos;
18. Retirar o sobrenadante com a pipeta, tomando cuidado para não aspirar o pellet formado no fundo do tubo, sempre deixando um mínimo de líquido do centrifugado;
19. Inverter os tubos sobre papel toalha até completa evaporação do álcool (aproximadamente 1h);

Hidratação

20. Adicionar 20 µL de água nos tubos;

ANEXO B – TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA BCR-ABL

Reagentes:

- Água Ultra-Pura
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

Cuidados que antecedem a preparação:

1. Ligue a capela de fluxo laminar e a lâmpada UV por 15 minutos antes de preparar a reação.
2. Utilize luvas estéreis e sem talco.

Passos

3. Calcule a quantidade necessária de cada reagente a ser utilizado para preparar um mix;
4. Na capela de fluxo laminar, pipete as quantidades devidas de reagentes em um tubo de 1,5mL para preparação de mix, conforme a seguinte tabela:

Nº Amostras	Água	Buffer	Primer	dNTP	Transcriptase	Volume Final
1	4,2	2	2	0,8	1	10
2	8,4	4	4	1,6	2	20
3	12,6	6	6	2,4	3	30
4	16,8	8	8	3,2	4	40
5	21	10	10	4	5	50
6	25,2	12	12	4,8	6	60
7	29,4	14	14	5,6	7	70
8	33,6	16	16	6,4	8	80
9	37,8	18	18	7,2	9	90
10	42	20	20	8	10	100
11	46,2	22	22	8,8	11	110
12	50,4	24	24	9,6	12	120
13	54,6	26	26	10,4	13	130
14	58,8	28	28	11,2	14	140
15	63	30	30	12	15	150
16	67,2	32	32	12,8	16	160
17	71,4	34	34	13,6	17	170
18	75,6	36	36	14,4	18	180
19	79,8	38	38	15,2	19	190
20	84	40	40	16	20	200
21	88,2	42	42	16,8	21	210
22	92,4	44	44	17,6	22	220
23	96,6	46	46	18,4	23	230
24	100,8	48	48	19,2	24	240

5. Adicionar 20 µL do mix aos 20 µL do RNA hidratado;
6. Identificar os tubos de 0,2 mL e transferir os 40 µL do preparado da reação;
7. Colocar no termociclador com a respectiva programação para a reação de transcrição;
8. Ao término da reação, congelar no freezer -20 °C as amostras de cDNA.