



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Marina Magnago Cruz

**O valor prognóstico da quantificação da carga leucêmica ao diagnóstico
utilizando o gene *GUS* como gene controle em pacientes com Leucemia
Mieloide Crônica**

Rio de Janeiro

2014

Marina Magnago Cruz

O valor prognóstico da quantificação da carga leucêmica ao diagnóstico utilizando o gene *GUS* como gene controle em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ilana Zalcberg Renault

Coorientadora: Prof.^a Dra. Cristiana Solza

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C957 Cruz, Marina Magnano

O valor prognóstico da quantificação da carga leucêmica ao diagnóstico utilizando o gene GUS como gene controle em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica / Marina Magnano Cruz – 2014.
80 f.

Orientadora: Ilana Zalberg Renault

Coorientadora: Cristiana Solza

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Leucemia mielóide de fase crônica – Teses. 2. Prognóstico – Teses. 3. Análise citogenética. 4. Apoptose. I. Renault, Ilana Zalberb. II. Solza, Cristiana. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.155.392-036.12

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marina Magnago Cruz

O valor prognóstico da quantificação da carga leucêmica ao diagnóstico utilizando o gene *GUS* como gene controle em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 18 de julho de 2014.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ilana Zalcberg Renault

Instituto Nacional do Câncer

Coorientadora: Prof.^a Dra. Cristiana Solza

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Maria Christina Paixão Maioli

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Andréa Ribeiro Soares

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Dra. Paola Alejandra Cappelletti

Instituto Nacional do Câncer

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

À minha mãe. Seu orgulho me comove... me move.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ilana Zalberg Reanult, pela honra de me permitir ser sua aluna, pela dedicação maternal e inacreditável confiança.

À Dra. Cristiana Solza, por ter sido canal da realização deste sonho.

A Simone Bonecker. Querida, colocar todo o seu conhecimento à disposição do próximo foi divino. Nada do que eu disser será suficiente, simplesmente obrigada.

A Diego Coutinho. Sua dedicação e busca pelo conhecimento científico são inspiradoras. Sua amizade é uma honra.

A Michelle. O que seria de todos nós sem você?

Ao Dr. Silva pela contribuição analítica.

À querida Celeste Couto por toda paciência na revisão.

À querida Roberta Bitencourt pela iniciativa da criação do banco de dados. Sua dedicação torna tudo o que você faz muito bem feito.

À divisão de laboratórios do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) e toda equipe técnica do Laboratório de Biologia Molecular do CEMO/Instituto Nacional do Câncer (INCA). Obrigada pelo constante apoio e incentivo.

Às queridas Letícia Boechat e Patrícia Helena pelo impulso no início. Até hoje me lembro de suas palavras dizendo: “você ainda vai muito mais longe do que jamais imaginou”.

A equipe do serviço de análise técnica do Componente especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF/RJ) e especialmente ao meu chefe Tiago e ao meu colega Max por serem tão flexíveis e compreensivos.

À equipe da secretaria da Pós Graduação em Ciências Médicas (PGCM/UERJ), especialmente à Marianna e ao João, pela disponibilidade em serem facilitadores deste processo.

À querida família Padrão. As orações e o carinho de vocês foi o meu sustento.

Aos melhores amigos que eu poderia ter, Carol, Claudinha, Fefê, Helber, Roberta e Taia, vocês bem sabem o quanto caminhei pra chegar até aqui.

Às minhas queridas amigas “cariocas”, especialmente Lucyana, Eulália, Rachel, Adriana, Andressa, Daniele, Juliana Paula, Juliana Giacomini e Ivana. A amizade de vocês foi com certeza uma das maiores alegrias que o Rio de Janeiro me deu.

A Helber, meu irmão que a vida escolheu, minha inspiração, meu exemplo.

A Léo, meu amor, pela paciência, companhia, pelo Caio, presença de Deus em forma de criança, e até por me tirar o foco. Quando olho para você e para a relação que construímos fica fácil enxergar que tudo valeu a pena.

A meu pai, por me tornar tão forte.

À minha mãe, por tanto amor... o maior que eu poderia ter e sempre mais do que mereço. Quando eu for mãe quero ser igual a você.

Aos meus queridos avós, meu irmão, minha cunhada, minha sobrinha, meus tios e primos pela constante e sincera torcida.

A Deus, por cada um aqui citado, instrumentos Seus para a realização deste sonho.

RESUMO

CRUZ, Marina Magnago. **O valor prognóstico da quantificação da carga leucêmica ao diagnóstico utilizando o gene GUS como gene controle em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.** 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica caracterizada pela presença de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, que resulta em um cromossomo marcador chamado “Philadelphia” (Ph). O gene de fusão formado (*BCR-ABL*) leva à produção de um RNA mensageiro quimérico e a expressão da proteína de fusão (*BCR-ABL*) com atividade de tirosina quinase constitutiva, desregulando diversas vias de sinalização e provocando, por exemplo, aumento da proliferação celular, resistência à apoptose e modificação das características de adesão celular. O desenvolvimento da primeira droga alvo-específica inibidora da atividade tirosina quinase (ITK) e a sua introdução na prática clínica modificou radicalmente o tratamento da LMC e tornou necessário o estabelecimento de novos parâmetros para definição de resposta terapêutica. Tal resposta é estabelecida de acordo com níveis crescentes de sensibilidade: Resposta Hematológica (RH), Resposta Citogenética (RCg) ou Resposta Molecular (RM). Visando a uniformização da conduta clínica, o Consórcio Europeu LeukemiaNet (ELN) agrupou os pacientes com LMC em distintas categorias operacionais de resposta. O tempo necessário para um paciente atingir a RM é tido como fator preditivo precoce da resposta terapêutica ao longo de sua evolução clínica. Estudos recentes estabelecem uma associação entre obtenção precoce de RM maior e durabilidade da RCg completa. Em 2013, tais categorias de resposta foram atualizadas levando em consideração a existência dos ITK de 2ª geração e a avaliação molecular já aos três meses após o início do ITK. Desta maneira, o conceito do valor da RM aos três meses é hoje o marco de resposta precoce com maior valor prognóstico independente de outros parâmetros analisados. Diante disso, a aplicação de um controle interno adequado à metodologia é essencial para uma determinação precisa da RM. Para corrigir as variações na qualidade e quantidade de RNA e calcular a sensibilidade da medição por PCR em tempo real (qRT-PCR), um gene de controle (GC) da transcrição deve ser amplificado em paralelo ao gene de fusão. Estudos demonstram que os GC, *BCR* e *ABL*, mais amplamente utilizados, não possuem linearidade quando os níveis de transcritos são elevados (> 10%), porque possuem interferentes com o gene de fusão *BCR-ABL* gerando valores falsos. Desta forma, se a carga leucêmica ao diagnóstico e a velocidade de decaimento desta podem ser utilizadas como biomarcadores preditivos e precoces da resposta terapêutica não pode ser respondida com o uso do GC *ABL* e *BCR*. Neste estudo, foram avaliados 204 pacientes para correlação entre RCg e níveis de transcrito *BCR-ABL*, e observamos que em pacientes com RCg completa a média de transcritos *BCR-ABL/ABL*^{EI} foi de 0,6 % (n = 97) ou seja *BCR-ABL/ABL*^{EI} < 1% (p<0,0001). Foi possível avaliar 31 pacientes para o estudo do gene *GUS* como GC das avaliações moleculares. Ao medirmos os níveis de transcritos *BCR-ABL* ao diagnóstico, os pacientes classificados como respondedores tiveram níveis de *BCR-ABL/ABL*% de 87,84 (26,8 – 164,5) e níveis de *BCR-ABL/GUS*% de 28,38 (8,2 – 217) (p<0,0001). Os pacientes classificados como não respondedores tiveram níveis de *BCR-ABL/ABL*% de 93,72 (30,87 – 184,5) e níveis de *BCR-ABL/GUS*% de 40,92 (17,21 – 96,85) (p=0,89).

Palavras-chave: Leucemia mieloide crônica. Real time PCR. Mesilato de imatinibe. Gene GUS.

ABSTRACT

CRUZ, Marina Magnago. **The prognostic value of quantification of leukemic burden at diagnosis using the *GUS* gene as control gene in patients with Chronic Myeloid Leukemia.** 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematologic malignancy characterized by the presence of a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, resulting in a marker chromosome called "Philadelphia" (Ph). The fusion gene formed (*BCR-ABL*) leads to the production of a messenger RNA and expression of chimeric fusion protein (*BCR-ABL*) with constitutive tyrosine kinase activity, deregulating several signaling pathways and causing, for example, increased cell proliferation, resistance to apoptosis, and modification of the characteristics of cell adhesion. The development of the first target-specific inhibitory drug of tyrosine kinase (ITK) activity and its introduction into clinical practice radically changed the treatment of CML and made it necessary to establish new parameters for defining therapeutic response. Such a response is established according to increasing levels of sensitivity: Hematologic response (HR), Cytogenetic Response (CgR) or Molecular Response (MR). Aiming a standardization of clinical management, the European Consortium LeukemiaNet (ELN) grouped patients with CML in different operational response categories. The required time to a patient reach MR is considered an early predictor of therapeutic response throughout his clinical course. Recent studies establishing an association between early MR obtaining and durability of complete CgR. In 2013, such response categories were updated taking into account the existence of 2nd generation ITK and molecular assessment already at three months after initiation of ITK. Thus, the concept of the value of MR at three months is now the hallmark of early response, with greater prognostic value independent of other parameters. Therefore, the application of an appropriate internal control methodology is essential for an accurate determination of RM. To correct the variations in RNA quality and quantity and to calculate the sensitivity of the measurement by real-time PCR (qRT-PCR), a control gene (CG) of the transcript should be amplified in parallel to the fusion gene. Studies have shown that the CG *BCR* and *ABL*, the most widely used, do not have linearity when transcript levels are elevated ($> 10\%$), because they have interference with the *BCR-ABL* gene fusion with false values. Thus, the question if the leukemic burden at diagnosis and the rate of decay of this burden can be used as predictive early biomarkers and therapeutic response, this question can not be answered with the use of *ABL* and *BCR* GC. In this study, 204 patients were analyzed for correlation between CgR and transcripts levels $BCR-ABL/ABL^{EI}$ average of 0.6% ($n = 97$) where $BCR-ABL/ABL^{EI} < 1\%$ ($p < 0,0001$). It was possible to evaluate 31 patients for the study *GUS* gene as the molecular GC reviews. By measuring the levels of *BCR-ABL* at diagnosis, patients classified as responders had levels $BCR-ABL/ABL\%$ of 87.84 (26.8 to 164.5) and levels of $BCR-ABL/GUS\%$ of 28.38 (8.2 to 217) ($p < 0.0001$). Patients classified as non-responders had levels $BCR-ABL/ABL\%$ of 93.72 (30.87 to 184.5) and levels of $BCR-ABL/GUS\%$ of 40.92 (17.21 to 96.85) ($p = 0.89$).

Keywords: Chronic myeloid leukemia. Real time PCR. Imatinib mesylate. *GUS* gene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama esquemático da translocação, que forma o cromossomo Ph e representação esquemática dos genes BCR e ABL	17
Figura 2 – Localização dos pontos de quebra nos genes e a estrutura dos mRNAs formados das várias quebras ABL e BCR	21
Figura 3 – Vias de sinalização ativadas em células BCR-ABL positivas	22
Figura 4 – Mecanismo de ação do IM	24
Figura 5 – Esquema ilustrativo das definições de profundidade da RM	31
Figura 6 – Propriedades teóricas de genes de controle amplamente utilizados	34
Figura 7 – Diagrama esquemático do fluxo das amostras dentro do LabBioMol e construção dos resultados	40
Figura 8 – Esquema ilustrativo das etapas de extração do RNA	41
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do RNA extraído onde se observa as subunidades 28s, 18s e 5s	42
Figura 10 – Esquema ilustrativo das etapas para a realização da síntese de cDNA	43
Figura 11 - Gel de agarose com resultado do RT-PCR Multiplex para diagnóstico molecular qualitativo	44
Figura 12 – Mapa do vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen-Life Technologies)	47
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose para visualização	49
Figura 14 – Desenho esquemático da placa utilizada no ensaio	59
Figura 15 – Parâmetros para a construção da curva padrão, nas diferentes concentrações de <i>primers</i> e sondas	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Frequência da distribuição das isoformas ao diagnóstico	53
Gráfico 2 –	Valores de transcritos de BCR-ABL ^{EI} no momento da Resposta Citogenética	56
Gráfico 3 –	Níveis dos transcritos de BCR-ABL ^{EI} ao longo do tratamento	57
Gráfico 4 –	Ensaio para avaliar a variabilidade intra e interensaio	59
Gráfico 5 –	Curva das diferentes concentrações de sondas e <i>primers</i> testados para o <i>GUS</i>	61
Gráfico 6 –	Comparação dos níveis de BCR-ABL/GC% entre grupos de respondedores (Resp) e não respondedores (NãoResp) ao diagnóstico	63
Gráfico 7 –	Comparação dos níveis de BCR-ABL/GC% entre grupos de respondedores (Resp) e não respondedores (NãoResp) após três meses do início do tratamento com IM	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Comparação dos critérios para a definição de FA e CB pela ELN e OMS	19
Quadro 2 –	Cálculo do risco relativo	20
Quadro 3 –	Definição dos diferentes tipos de resposta ao tratamento com ITK	27
Quadro 4 –	Quadro comparativo entre as mudanças das definições que ocorreram nas revisões do ELN de 2009 e 2013 em relação ao tratamento de 1 ^a linha com IM	29
Quadro 5 –	Instituições de saúde que possuem colaboração com o LabBioMOL para envio de amostras para análise molecular de pacientes com LMC	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> e sonda utilizados no qRT-PCR	46
Tabela 2 – Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados	52
Tabela 3 – Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados para o <i>GUS</i>	62
Tabela 4 – Características clínicas e demográficas dos pacientes com LMC dos pacientes do HUPE/UERJ	65
Tabela 5 – Estatísticas das variáveis relacionadas à RM na subcoorte dos pacientes do HUPE/UERJ	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aloTCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico
ATP	Nucleotídeo Adenosina trifosfato
CB	Crise blástica
ACA	Alterações citogenéticas adicionais
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
EI	Escala Internacional
ELN	Consórcio europeu <i>European Leukemia Net</i>
FA	Fase acelerada
FC	Fase crônica
GC	Gene controle
IM	Mesilato de Imatinibe
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRIS	Estudo internacional randomizado do interferon
ITK	Inibidor de tirosina quinase
ITK-2G	Inibidor de tirosina quinase de 2 ^a geração
LabBioMol	Laboratório de Biologia Molecular
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
MO	Medula óssea
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph	Cromossomo Philadelphia
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RCg	Resposta Citogenética
RCgC	Resposta Citogenética Completa
RCgMe	Resposta Citogenética Menor
RCgMi	Resposta Citogenética Mínima
RCgP	Resposta Citogenética Parcial

RH	Resposta Hematológica
RHC	Resposta Hematológica Completa
rIFN α	Interferon-alfa Recombinante
RM	Resposta Molecular
RMC	Resposta Molecular Completa
SG	Sobrevida global
SLE	Sobrevida livre de evento
SLP	Sobrevida livre de progressão
SLT	Sobrevida livre de transformação
SP	Sangue periférico
STI	Inibidor da transdução de sinal
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Comportamento clínico da LMC	18
1.1.1	<u>Fases da LMC</u>	18
1.1.2	<u>Fatores Prognósticos da LMC</u>	19
1.2	Biologia molecular da LMC	20
1.2.1	<u>O gene <i>BCR-ABL</i></u>	20
1.2.2	<u>A proteína BCR-ABL</u>	21
1.3	Evolução no tratamento da LMC	23
1.3.1	<u>Mesilato de Imatinibe</u>	24
1.3.2	<u>Inibidores de tirosina quinase de 2^a geração</u>	25
1.4	Avaliação de resposta ao tratamento	26
1.4.1	<u>Respostas ao tratamento com inibidores de tirosina quinase</u>	26
1.4.2	<u>A importância da resposta molecular aos três meses</u>	30
1.4.3	<u>Importância da uniformização da “Resposta Molecular Completa” (RMC) ou níveis de transcritos BCR-ABL indetectáveis</u>	30
1.4.4	<u>Correlação entre a resposta citogenética e os níveis de transcritos BCR-ABL^{EI}</u>	32
1.5	A escolha de um gene constitutivo para controle	33
2	JUSTIFICATIVA	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Desenho experimental e amostras estudadas	38
4.2	Método de Extração de RNA total	40
4.3	Método de síntese de DNA complementar (c-DNA)	42
4.4	PCR Qualitativo para detecção do gene <i>BCR-ABL</i>	43
4.5	PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) e fator de correção	44
4.6	Definições de resposta ao tratamento	45

4.7	Padronização do ensaio de quantificação de transcritos BCR-ABL por PCR em Tempo Real (RT-qPCR) utilizando <i>GUS</i> como controle endógeno	46
4.8	Preparação do plasmídeo pME-2	46
4.8.1	<u>Construção de Curva Padrão com o plasmídeo pME-2 para a quantificação absoluta</u>	47
4.9	Análise estatística	49
5	RESULTADOS	51
5.1	Agupamento dos dados clínicos dos pacientes	51
5.2	PCR qualitativa para a identificação de BCR-ABL	52
5.3	Correlação entre as diferentes categorias de resposta citogenética e os níveis de transcritos BCR-ABL/ABL^{EI}	54
5.3.1	<u>Resposta Molecular aos três meses: marcador preditivo de maior valor prognóstico independente para identificação precoce de falha terapêutica</u>	56
5.4	Padronização do qRT-PCR para a detecção de transcritos BCR-ABL utilizando <i>GUS</i> como gene controle	57
5.4.1	<u>Teste de variabilidade intraensaio e interensaio</u>	58
5.4.2	<u>Concentração ideal de <i>primers</i> e sondas para o <i>GUS</i></u>	60
5.4.3	<u>Avaliação dos níveis de BCR-ABL usando o gene <i>GUS</i> como gene controle</u> ...	61
5.5	Subcoorte para caracterização dos pacientes tratados no HUPE/UERJ	64
6	DISCUSSÃO	66
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE – Ficha de coleta de dados – Grupo de Pesquisa LMC	75
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética – INCA	79

INTRODUÇÃO

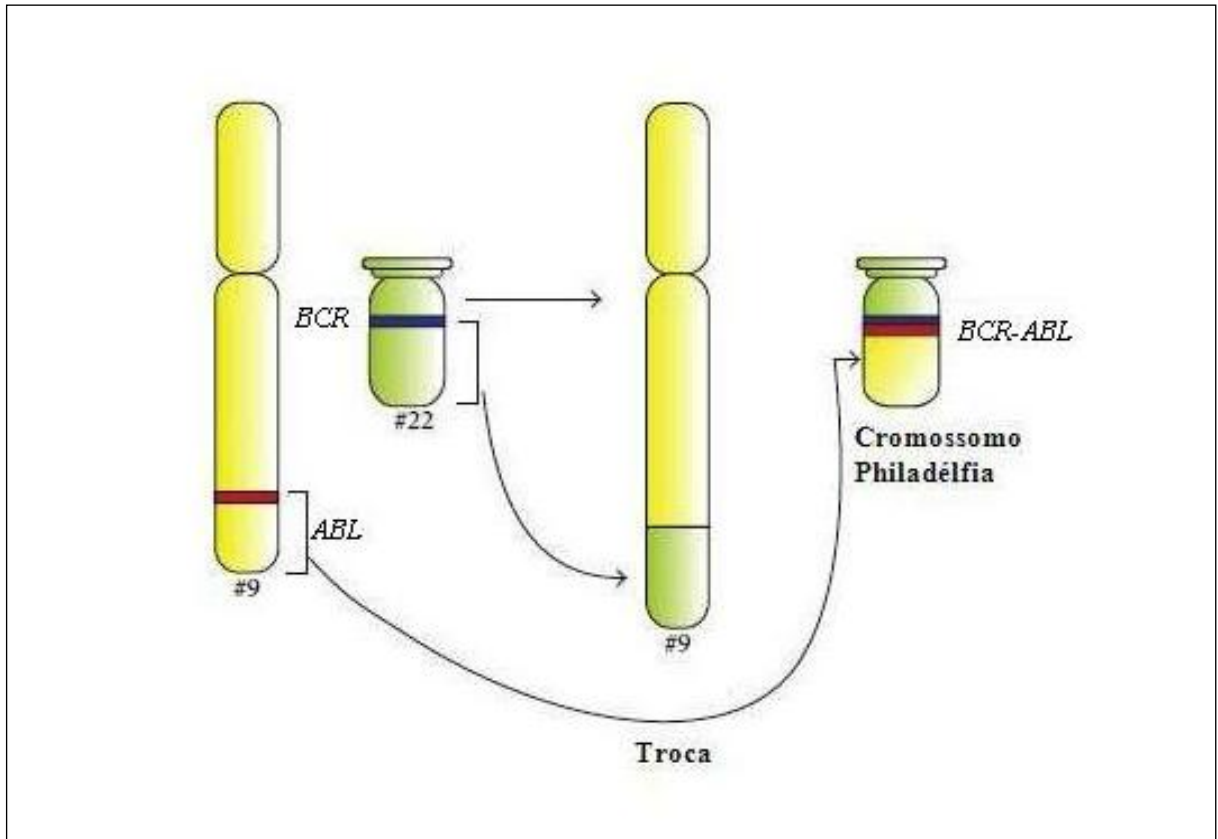
A incidência da Leucemia Mieloide Crônica (LMC) em registros internacionais é de um a dois casos por 100.000 habitantes, representando 15 a 20% dos casos de leucemias dos adultos. A faixa etária preferencial se situa entre 45 e 55 anos de idade, podendo ocorrer, mais raramente, em idosos, crianças e adolescentes (FADERL et al., 1999). No Brasil, não há dados de incidência específicos para a LMC, entretanto, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014), estimam-se, para 2014 em adultos, 5.050 casos novos de leucemia em homens e 4.320 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,2 casos novos para cada 100.000 homens e 4,24 para cada 100.000 mulheres.

Em 2009, nos Estados Unidos, a prevalência do somatório de casos de Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA) foi de 271.800 casos. É de se ressaltar que o sucesso terapêutico obtido no tratamento da LMC é de tal ordem, que a prevalência estimada de casos de LMC para 2040 no mesmo país é de 200.000 casos (OEHLER, 2013).

A LMC é uma neoplasia hematológica considerada um modelo para outros tipos de câncer por: a) ser a primeira associação descrita entre uma anomalia cromossômica, o cromossomo *Philadelphia* (Ph) (NOWEFL; HUNGERFORD, 1960) e uma leucemia; b) elucidar a associação entre uma translocação cromossômica t(9;22) e um oncogene (*ABL*); c) ser a primeira doença a ter uma terapia específica contra um alvo molecular (HOCHHAUS, 2007a). De acordo com a classificação das neoplasias mieloides da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2008 a LMC é uma neoplasia mieloproliferativa decorrente da t(9;22) (q34;q11), positiva para o gene de fusão *BCR-ABL* com ativação constitutiva de uma proteína quinase citoplasmática BCR-ABL (VARDIMAN et al., 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Em 95% dos casos, a LMC é caracterizada pela presença do cromossomo Ph, que resulta de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22. Molecularmente, a t(9;22)(q34;q11) justapõe regiões dos genes *BCR* e *ABL*, gerando o gene de fusão *BCR-ABL*. O produto gênico é uma proteína quimérica com atividade tirosina quinase constitutiva, a P210^{BCR-ABL}; sua presença confere uma vantagem de crescimento às células leucêmicas. A P210^{BCR-ABL} é condição necessária e suficiente para a manutenção do fenótipo maligno na LMC (DALEY; VAN ETTEN; BALTIMORE, 1990; MELO, 1996; ROWLEY, 1973).

Figura 1 - Diagrama esquemático da translocação (9;22), que forma o cromossomo Ph e representação esquemática dos genes *BCR* e *ABL*



Legenda: cromossomo (#) Philadélfia (Ph).

Fonte: Adaptado de TRELA; GLOWACKI; BŁASIAK, 2014.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Comportamento clínico da LMC

1.1.1 Fases da LMC

A LMC, se não tratada, apresenta uma evolução caracterizada por três estágios clínicos: fase crônica (FC), de curso indolente com duração média de 1-4 anos, que evoluiu para uma fase acelerada (FA), que pode ou não progredir para uma fase aguda ou crise blástica (CB), esta fatal e quase sempre não responsiva a nenhum tipo de tratamento. Dependendo da natureza das células blásticas, a agudização pode ser linfoide ou mieloide (THIJSSEN et al., 1999).

A FC é caracterizada por proliferação exacerbada e hematopoese efetiva. Nesta fase, o diagnóstico de suspeita da LMC é normalmente resultado de um exame de rotina onde a alteração dos parâmetros hematológicos é observada. A principal alteração é o aumento da leucometria às custas de neutrófilos maduros, frequentemente associada a um aumento de eosinófilos e basófilos.

De acordo com os critérios propostos pela OMS, a FA é definida por uma trombocitopenia persistente (< 100.000 plaquetas/ mm^3), 10 – 19% de células blásticas em sangue periférico (SP) ou medula óssea (MO), $\geq 20\%$ de basófilos em SP, ganho de alterações citogenéticas adicionais ao clone Ph+ (ACA/Ph+) durante o tratamento, leucocitose, trombocitose ($>1000 \times 10^9/\text{L}$) e esplenomegalia não responsivas ao tratamento. Para a CB, os seguintes critérios são considerados: percentual de células blásticas $\geq 20\%$ em SP ou MO, a proliferação blástica extramedular em outro sitio além do baço, e grandes focos ou grupamentos de blastos na biópsia de medula óssea (BACCARANI, 2006; BACCARANI et al., 2013). Os critérios considerados pelo consórcio europeu *European Leukemia Net* (ELN) apresentam algumas variações e estão relacionados e comparados aos da OMS no Quadro 1.

Quadro 1 - Comparação dos critérios para a definição de FA e CB pela ELN e OMS

Fase Acelerada	
critérios ELN	<ul style="list-style-type: none"> * Entre 15-29% de blastos em SP ou MO , ou blastos + promielócitos > 30%, com blastos < 30% * Basófilos \geq 20% em SP * Trombocitopenia persistente (<100 x 10⁹/L) não relacionada à terapia * ACA/Ph+ durante o tratamento
critérios WHO	<ul style="list-style-type: none"> * Entre 10 - 19% de blastos em SP ou MO * Basófilos \geq 20% em SP * Trombocitopenia persistente (<100 x 10⁹/L) não relacionada à terapia * ACA/Ph+ durante o tratamento * Trombocitose (> 1000 x 10⁹/L) não responsiva ao tratamento * Aumento do baço e da leucometria não responsivos ao tratamento
Crise Blástica	
critérios ELN	<ul style="list-style-type: none"> * Blastos \geq 30% em SP ou MO * Proliferação blástica extramedular, além do baço
critérios WHO	<ul style="list-style-type: none"> * Blastos \geq 30% em SP ou MO * Proliferação blástica extramedular, além do baço * Agrupamento de blastos na biópsia de MO

Legenda: Fase acelerada (FA); crise blástica (CB); European LeucemiaNet (ELN); Organização Mundial da Saúde (OMS); sangue periférico (SP); medula óssea (MO); alterações citogenéticas adicionais (ACA); cromossomo Philadelphia (Ph).

Fonte: Adaptado de BACCARANI et al., 2013.

1.1.2 Fatores Prognósticos da LMC

Existem vários sistemas prognósticos baseados nas características clínicas e parâmetros hematológicos dos pacientes com LMC. Um deles é o índice Sokal que confere uma pontuação com valor preditivo a resposta ao tratamento, e considera os seguintes parâmetros: tamanho do baço (em centímetros a partir do rebordo costal), contagem de plaquetas, percentual de blastos e a idade. Os pacientes são estratificados em grupos de risco diferenciados de acordo com a probabilidade de alcançar uma resposta ótima; de transformação e de sobrevida global, de acordo com a seguinte pontuação: valores < 0,8 baixo risco; de 0,8 a 1,2 risco intermediário; e >1,2 alto risco.

Uma outra pontuação, de Hasford, é feita de acordo com a idade, percentual de eosinófilos e basófilos, número de plaquetas, tamanho do baço em centímetros e percentual de blastos. O paciente é discriminado para o grupo de baixo risco quando o resultado é \leq 780, risco intermediário entre 780 e 1480 e \geq alto risco 1480 (BACCARANI, 2006; SOUZA et al.,

2012). Por fim, o sistema prognóstico EUTOS, atualmente bastante utilizado, considera somente dois parâmetros: o tamanho do baço e o número de basófilos. Os cálculos para obtenção das pontuações utilizadas nos sistemas de risco Sokal, Harsford e EUTOS se encontram descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Cálculo do risco relativo

Estudo	Cálculo	Definição de risco
Sokal et al, 1984	$0.0116 \times (\text{idade em anos} - 43.4) + 0.0345 \times (\text{baço} - 7.51) + 0.188 \times [(\text{plaquetas} \div 700)^2 - 0.563] + 0.0887 \times (\text{blastos} - 2.10)$	baixo risco: < 0.8 risco intermediário: 0.8-1.2 alto risco: > 1.2
Euro Hasford et al, 1998	0.666 quando idade ≥ 50 anos + $(0.042 \times \text{baço}) + 1.0956$ quando plaquetas $> 1500 \times 10^9/L + (0.0584 \times \text{blastos}) + 0.20399$ quando basófilos $> 3\% + (0.0413 \times \text{eosinófilos}) \times 100$	baixo risco ≤ 780 risco intermediário 781-1480 alto risco > 1480
EUTOS Hasford et al, 2011	Baço $\times 4 + \text{basófilos} \times 7$	baixo risco ≤ 87 alto risco > 87

Fonte: Adaptado de BACCARANI et al., 2013.

1.2 Biologia molecular da LMC

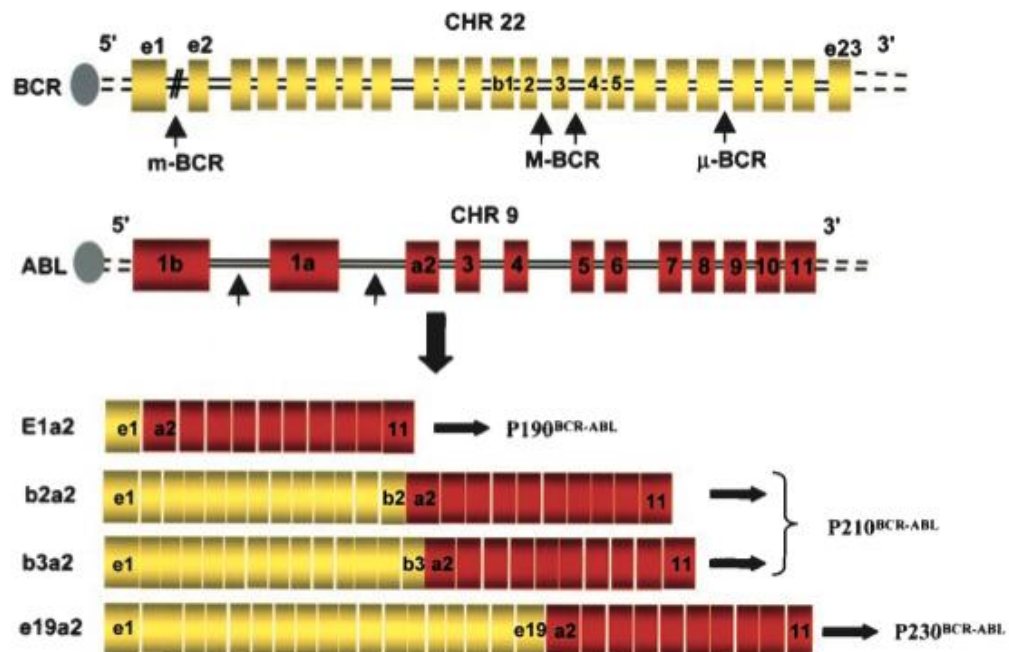
1.2.1 O gene *BCR-ABL*

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa crônica que decorre da expansão clonal de precursores hematopoéticos primitivos. A t(9;22) (q34;q11) resulta na formação de dois genes híbridos: o *BCR-ABL* no cromossomo Ph e o *ABL-BCR* no derivativo 9q+. Para a formação do gene de fusão *BCR-ABL*, a quebra no gene *BCR* pode ocorrer em três diferentes regiões (DALEY; VAN ETTEN; BALTIMORE, 1990; MELO, 1996). Em 98% dos casos de LMC, o gene *BCR* apresenta ponto de quebra em uma região de 5,8 kb, *major-BCR* (*M-BCR*), situada entre os éxons 12-16 (também chamados b1-b5). Quebras na região *M-BCR* ocorrem entre os éxons 13 e 14 (b2 e b3, respectivamente).

O gene *ABL*, em condições normais presente no cromossomo 9, tem 11 éxons e codifica uma proteína tirosina quinase não receptora de 145 kDa, que apresenta três domínios de homologia SRC (SH1, SH2, SH3). O domínio SH1 exerce a função tirosina quinase, enquanto os domínios SH2 e SH3 permitem a interação com outras proteínas e regulam a atividade quinase da proteína *ABL*.

Na formação do gene de fusão *BCR-ABL* o local da quebra em *ABL* pode ocorrer entre o éxon 1b e 1a, em direção 5' ao éxon 1b, ou em direção 3' ao éxon 1a. Devido ao *splicing* alternativo do RNAm, a porção do *BCR* se funde quase que invariavelmente ao éxon 2 do *ABL*, dando origem assim aos RNAm e13a2 ou e14a2 (b2a2 e b3a2, respectivamente) que levam à expressão de uma proteína de 210 kDa BCR-ABL (p210^{BCR-ABL}). O gene *BCR* possui mais dois pontos de quebra descritos, o m-*BCR* que codifica a p190^{BCR-ABL} envolvida na LLA Ph+ e em casos de LMC e LMA, e o μ -*BCR* que codifica a p230^{BCR-ABL} envolvida com a leucemia neutrofílica crônica (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000; TRELA; GLOWACK; BŁASIAK, 2014).

Figura 2 - Localização dos pontos de quebra nos genes *BCR* e *ABL* e a estrutura dos mRNAs formados das várias quebras *ABL* e *BCR*



Fonte: SALESSE; VERFAILLIE, 2002.

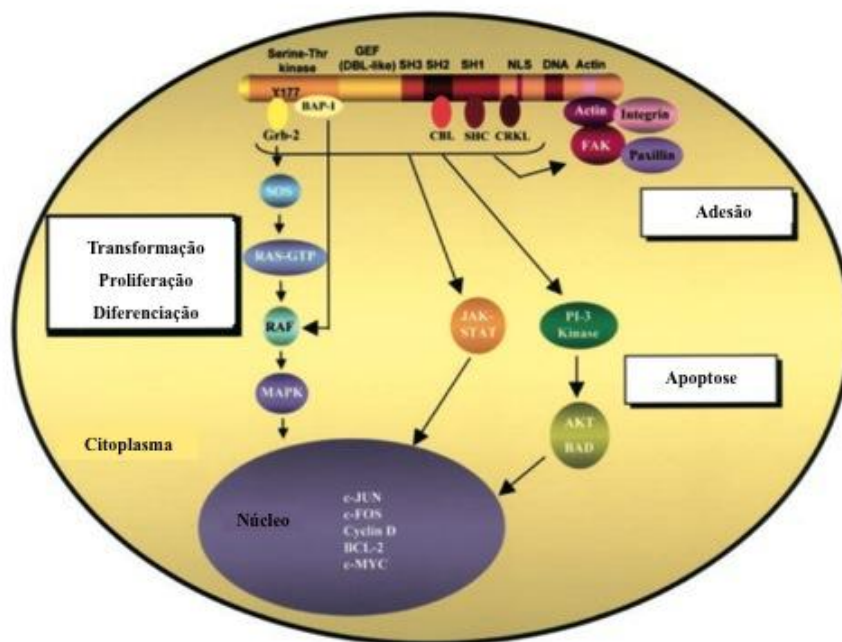
1.2.2 A proteína BCR-ABL

A atividade normal tirosina quinase da proteína ABL é rigidamente controlada e possui livre circulação entre o núcleo e o citoplasma. Em contraste, a oncoproteína p210^{BCR-ABL} perde esta propriedade, sendo retida preferencialmente no citoplasma. Proteínas com

atividade de tirosina quinase, catalizam a transferência de um grupamento fosfato do ATP para resíduos de tirosina de outras proteínas, estas quando fosforiladas induzem mudanças fenotípicas características da LMC. Com a justaposição da sequência BCR, a oncoproteína BCR-ABL, retida no citoplasma e constitutivamente fosforilada, desregula diversas vias de sinalização celular.

As principais vias ativadas por BCR-ABL são RAS, PI3-k/Akt, NF- κ B e JAK-STAT (Figura 3). Por exemplo, a ativação de RAS, JAK-STAT, PI3-k resulta em aumento da proliferação, diferenciação e diminui a apoptose e a adesão ao estroma da medula óssea das células leucêmicas progenitoras. A ativação destas diferentes vias é mediada pelas proteínas adaptadoras GRB2, CBL, SHC e CRKL (SALESSE; VERFAILLIE, 2002).

Figura 3 - Vias de sinalização ativadas em células BCR-ABL positivas



Fonte: Adaptada de SALESSE; VERFAILLIE, 2002.

São três os principais mecanismos subjacentes à transformação maligna por BCR-ABL: inibição da apoptose; sinalização para proliferação, via receptores de mitógenos, constitutivamente ativa; e modificação dos padrões de adesão celular. A desregulação destes processos celulares está na base da transformação de um fenótipo celular normal em um leucêmico (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000).

1.3 Evolução no tratamento da LMC

As diretrizes do tratamento da LMC sofreram grandes mudanças nos últimos anos. A história do tratamento da LMC é considerada um dos maiores sucessos da terapia moderna, pela capacidade de modificar o prognóstico dos pacientes com LMC, doença fatal quando não tratada, em uma doença crônica controlada pelo uso de um medicamento oral (BACCARANI; PANE, 2014). O primeiro tratamento da LMC incluía radiação-x no baço e drogas convencionais como o Bussulfan e Hidroxiureia. Estas drogas melhoravam a qualidade de vida dos pacientes durante a fase crônica, por limitar a expansão das células mieloides, entretanto, não impediam ou retardavam, significativamente, a progressão da doença (BACCARANI, 2006; HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

A introdução do transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico (aloTCTH) foi o primeiro avanço importante no tratamento da LMC. Cerca de 50% dos pacientes submetidos ao aloTCTH tornam-se indetectáveis para o número de células com cromossomo Ph positivo assim como as células positivas para o gene *BCR-ABL*. Entretanto, apesar de ser a única modalidade terapêutica curativa, a possibilidade de realização e o sucesso de um aloTCTH dependem da idade, existência de um doador além das possíveis complicações relativas a um aloTCTH, em particular, doença enxerto contra o hospedeiro, infecção e recaída (BACCARANI et al., 2014).

O tratamento com interferon-alfa recombinante ($rIFN\alpha$) deve ser avaliado de acordo com parâmetros específicos para avaliação desta resposta. Em particular, a resposta citogenética ao $rIFN\alpha$ constitui o padrão ouro para a avaliação. Embora uma minoria de pacientes alcancem uma resposta citogenética completa (RCgC - ou ausência de células positivas para Ph em pelo menos 20 metáfases analisadas) aqueles que a alcançam, a mantêm de forma duradoura. Além disso, mesmo os pacientes que alcançam uma RCg maior, que é a soma dos pacientes com RCgC e aqueles com resposta citogenética parcial (RCgP < 35% de células Ph+) também a mantêm de forma duradoura. Em comparação com a quimioterapia convencional, o uso do $rIFN\alpha$ proporcionou em, 15% a 30% dos pacientes, uma vantagem de sobrevida estatisticamente significativa quando comparada ao uso da quimioterapia convencional (BACCARANI, 2006; BACCARANI et al., 2014; HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

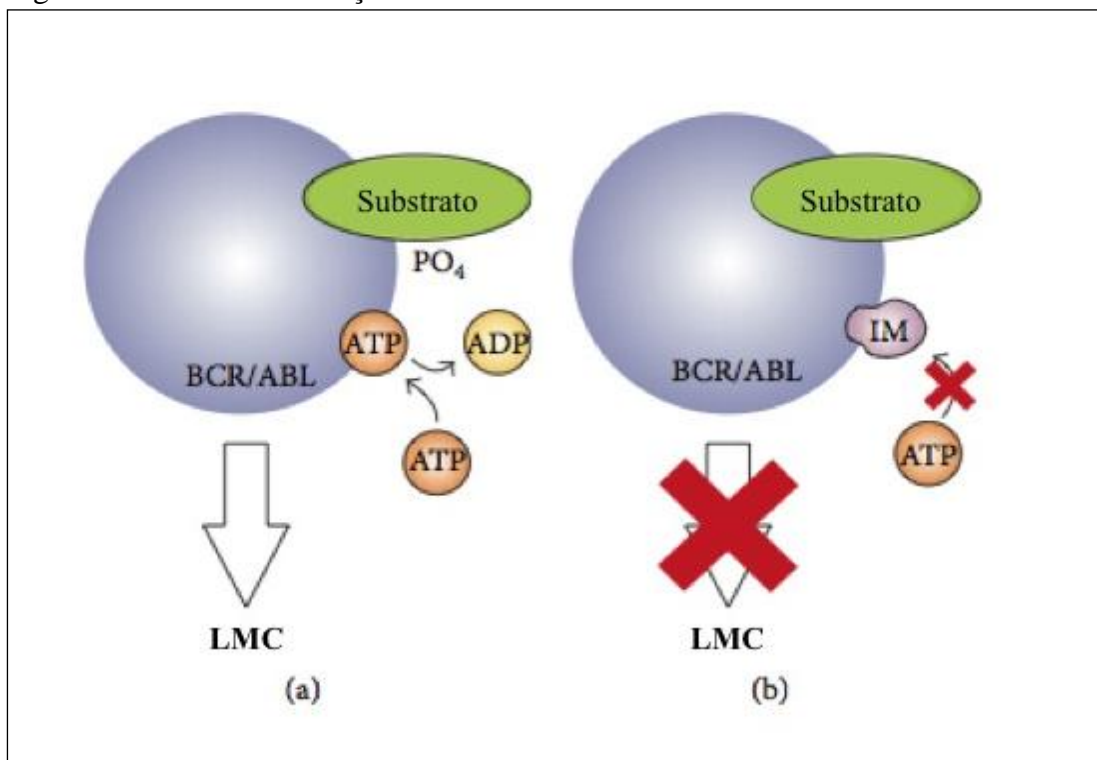
O mesilato de imatinibe, cujo medicamento referência é o Glivec® (Novartis) é um inibidor de tirosina quinase (ITK) específico para *ABL*, *c-Kit* e *PDGFR* que modificou

radicalmente o tratamento da LMC. Atualmente, além do imatinibe (IM) estão disponíveis no Brasil os ITK de segunda geração (ITK-2G), Dasatinibe (Sprycel; Bristol-Myers Squibb) e Nilotibe (Tasigna; Novartis), que são mais potentes e/ou mais seletivos que o IM para a inibição da $p210^{BCR-ABL}$, sendo indicados, no Brasil, para o tratamento de pacientes resistentes ou intolerantes ao IM (BACCARANI et al., 2014).

1.3.1 Mecanismo de Imatinibe

O IM foi o primeiro inibidor da transdução de sinal (STI) utilizado na prática clínica. Este medicamento inibe seletivamente a atividade da $p210^{BCR-ABL}$, pela competição do sítio de ligação do ATP no domínio quinase, revertendo a ativação das vias transdutoras de sinais proliferativos e antiapoptóticos, levando assim à morte da célula afetada (Figura 4) (DEININGER, 2008; SACHA, 2013).

Figura 4 - Mecanismo de ação do IM



Legenda: (a) proteína BCR-ABL constitutivamente ativa pela interação do ATP ao sítio de ligação; (b) IM se ligando ao sítio do ATP inibindo a atividade enzimática. Mesilato de Imatinibe (IM); adenosina trifosfato (ATP); Leucemia Mieloide Crônica (LMC).

Fonte: Adaptada de TRELA; GLOWACKI; BŁASIAK, 2014.

O uso do IM apresentou efeito em todas as fases da doença, tendo sido mais substancial e estável nos pacientes recém-diagnosticados e em FC e tornou-se o tratamento de escolha para estes pacientes com base nos resultados do “Estudo Internacional Randomizado do Interferon e STI571” (estudo IRIS) (O’BRIEN et al., 2003). Após sete anos de acompanhamento, os pacientes randomizados no braço do IM no estudo IRIS, que continuaram em uso do ITK, ainda apresentaram respostas duradouras satisfatórias: 86% de sobrevida global (SG), 81% de sobrevida livre de evento (SLE) e 93% de sobrevida livre de transformação (SLT). Além disso, 82% alcançaram uma RCgC, dos quais 17% a perderam durante o tratamento (DEININGER et al., 2009). Estatísticas recentes mostram que a SG de 10 anos aumentou de aproximadamente 20% para 80-90%. Esta terapia tem como objetivo: prolongar e manter o paciente em FC; diminuir o risco de progressão da doença; e alcançar uma sobrevida duradoura (JABBOUR et al., 2012).

1.3.2 Inibidores de tirosina quinase de 2^a geração

Os medicamentos dasatinibe (Sprycel®, Bristol- Myers Squibb) e nilotinibe (Tasigna®, Novartis) são ITK-2G aprovados no Brasil para o tratamento, em segunda linha, de pacientes que apresentaram resistência ou intolerância ao tratamento com imatinibe (TRELA; GLOWACKI; BŁASIAK, 2014). O dasatinibe foi aprovado para pacientes com LMC em FC, FA e CB resistentes ao IM. É capaz de inibir as quinases da família SRC (*short for sarcoma*), o PDGFR, o receptor c-kit e as formas ativas e inativas da BCR-ABL. Ele atua no sítio de ligação do ATP em ABL sendo 325 vezes mais potente que o imatinibe (HOCHHAUS, 2007b) e foi efetivo em todas as mutações descritas de BCR-ABL, com exceção da T315I (HOCHHAUS, 2007c).

O nilotinibe foi desenvolvido a partir de uma modificação química do IM e possui sítio de ligação da proteína quase idêntico. Porém, necessita de menos ligações de hidrogênio o que permite sua ligação a várias moléculas BCR-ABL mutantes resistentes ao IM. Apesar de mais potente e seletivo que o IM, não possui atividade contra as quinases da família SCR (TRELA; GLOWACKI; BŁASIAK, 2014).

1.4 Avaliação de resposta ao tratamento

1.4.1 Respostas ao tratamento com inibidores de tirosina quinase

A eficácia terapêutica de um ITK em pacientes com LMC é avaliada de acordo com o tipo de resposta: hematológica (RH), citogenética (RCg) e molecular (RM); alcançadas em tempos pré-definidos, em diferentes momentos ao longo do tratamento (GABERT et al., 2003). As diferentes categorias de resposta se diferenciam em relação ao grau de sensibilidade alcançado: análise morfológica (clínica/hematológica), citogenética (1×10^2 – uma célula tumoral em cada 100 células normais) e molecular (1×10^5 – uma célula tumoral em cada 100.000 células normais).

A RH completa (RHC) é definida por uma leucometria $< 10 \times 10^9/L$, contagem de basófilos $< 5\%$, ausência de mielócitos, promielócitos e mieloblastos, contagem de plaquetas $< 450 \times 10^9/L$ e baço não palpável. A RCg é definida de acordo com a porcentagem de metáfases positivas para o cromossomo Ph e pode ser completa (RCgC) quando há ausência de células Ph+; resposta citogética parcial (RCgP) quando o número de células Ph+ estiver entre 1 – 35%; Resposta Citogenética Menor (RCgMe) quando entre 36 – 65% de células Ph+; resposta citogenética mínima (RCgMi) quando entre 66 – 95% de células Ph+, e ausência de resposta quando a porcentagem de células Ph positivas for superior a 95% (BACCARANI et al., 2009) (Quadro 3, a seguir).

Quadro 3 – Definição dos diferentes tipos de resposta ao tratamento com ITK

Tipo de Resposta		Definição
RHC	Resposta Hematológica Completa	Plaquetas <450 10 ⁹ /L, Leucócitos <10 ⁹ /L, diferencial sem granulócitos imaturos e menos de 5% de basófilos, sem esplenomegalia
NoCg	Ausência de Resposta Citogenética	> 95% de metáfases Ph+
RCgMi	Resposta Citogenética Mínima	66 - 95% de metáfases Ph+
RCgMe	Resposta Citogenética Menor	56 - 65% de metáfases Ph+
RCgP	Resposta Citogenética Parcial	1 - 35% de metáfases Ph+
RCC	Resposta Citogenética Completa	0% de metáfases Ph+
RMM ou RM ³	Resposta Molecular Maior	BCR-ABL/ABL ≤ 0,1% (EI)
RM ⁴		BCR-ABL/ABL ≤ 0,001% (EI), ou seja, redução de 4 log
RM ^{4.5}		BCR-ABL/ABL ≤ 0,003% (EI), ou seja, redução de 4.5 log
RM ⁵		BCR-ABL/ABL ≤ 0,001% (EI), ou seja, redução de 5 log

Legenda: Inibidor de tirosina quinase (ITK); Escala internacional (EI).

Com a introdução dos ITK como terapia padrão atual, devido ao grande número de pacientes que atingem uma RCgC após o 1º ano de tratamento, a RM, de maior sensibilidade, é hoje considerada o parâmetro de referência para discriminar precocemente um paciente respondedor de um não respondedor (BACCARANI et al., 2013). A RM é dada pela quantificação dos níveis de transcritos BCR-ABL. O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR, do inglês *Real Time quantitative Reverse Transcription PCR*), estabelece um valor de carga leucêmica pela quantificação do número de cópias de transcritos BCR-ABL no sangue periférico ou na medula óssea. Quando utilizado em amostras seriadas durante o tratamento possibilita a avaliação da cinética tumoral ou da doença residual mínima (GABERT et al., 2003). A introdução destas novas técnicas moleculares no acompanhamento do paciente com LMC permitiu a reestratificação dos pacientes que alcançaram uma RCgC de acordo com os níveis da RM, possibilitando a reorientação terapêutica e aumentando o sucesso do tratamento pela possibilidade de intervenção precoce.

A RM resulta da razão entre os níveis de transcritos BCR-ABL e um gene controle (GC), e os GC mais utilizados são *ABL*, *BCR*, *B2M* (beta-2-microglobulina) e *GUS* (beta-glucuronidase). A quantificação dos níveis de transcritos BCR-ABL é realizada por qRT-PCR, sendo os valores obtidos pela análise do SP equivalentes aos encontrados na MO, o que faz com que um paciente possa ser acompanhado ao longo do tratamento de forma não invasiva (MÜLLER et al., 2007).

No estudo IRIS foi pela primeira vez demonstrado o significado prognóstico do acompanhamento seriado dos transcritos BCR-ABL em pacientes com LMC por qRT-PCR. Neste estudo, o valor dos níveis de BCR-ABL, obtidos por qRT-PCR, e convertidos para uma escala logarítmica (\log_{10}) foi utilizado, ao longo do tratamento com IM, para a aferição da redução da carga leucêmica obtida pela relação BCR-ABL/GC (O'BRIEN et al., 2003).

Para a comparação de resultados entre diferentes laboratórios, que utilizam técnicas e métodos diferentes, uma uniformização de diferentes abordagens foi proposta. Para tal, atingir este objetivo uma Escala Internacional (EI) foi construída. Na EI, uma linha de base foi construída a partir da mediana da quantidade de transcritos BCR-ABL em 30 amostras de pacientes com LMC, não tratados, e em FC. Esta mediana, diferente em cada laboratório, foi equalizada para 100%, sendo esta, a carga leucêmica atribuída a todo paciente ao diagnóstico, independente da quantidade real de transcritos BCR-ABL em sua amostra (GABERT et al., 2003).

Assim sendo, uma redução de 3-log da linha de base ($\leq 0,1\%$) equivale a uma RM maior (RMM ou RM^3). Quando ocorre uma redução de 4-log ($\leq 0,01\%$), isso equivale a uma RM^4 . Uma redução de 4,5-log ($\leq 0,0032\%$) significa uma $RM^{4,5}$. Em geral, as metodologias sugeridas pelos laboratórios de referência internacionais, podem chegar à sensibilidade de até 5 logs (RM^5) (CROSS et al., 2012) (Quadro 3).

A correlação entre profundidade, tempo de alcance das respostas e progressão da doença fortaleceu a utilização destes parâmetros como guia para a intervenção terapêutica. Em 2006, o consórcio ELN elaborou uma série de recomendações para o acompanhamento de pacientes com LMC tratados com IM em primeira linha, que foram amplamente aceitas pela comunidade médico-científica. Nestas recomendações, as definições de RH, RC e RM foram estabelecidas. Além disso, parâmetros operacionais foram sugeridos para o manejo do paciente com LMC (BACCARANI, 2006; HUGHES et al., 2006). As definições de resposta elaboradas em 2006 foram revistas e publicadas em fins de 2009. Esta atualização incluiu as definições de respostas ótimas ao longo do tempo além do monitoramento molecular. Em 2013 foi publicada uma nova atualização, considerando os dados obtidos pela incorporação à clínica dos ITK-2G (BACCARANI et al., 2013).

A resposta ótima, falha terapêutica e *warning* foram estabelecidas segundo os critérios recomendados no ELN 2013. Quando um paciente é classificado como em falha terapêutica isto significa que é improvável que este paciente alcance uma resposta favorável, com o uso do mesmo ITK, recomendando-se, portanto, a mudança do tipo de ITK. Por sua vez, uma

resposta subótima (ELN 2006 e 2009) ou *warning* (ELN 2013) indica que o paciente ainda poderá ter um benefício, mesmo que a longo prazo, com o uso do ITK de primeira geração. Este tipo de resposta pode ser indicativa da manutenção do ITK em doses maiores ou de alteração para um ITK-2G (BACCARANI, 2006; BACCARANI et al., 2009, 2013).

Nas recomendações da ELN de 2009, o valor preditivo da resposta molecular ainda era um ponto controverso, embora a obtenção da RMM aos 18 meses tenha sido considerada como um importante marco associado à estabilidade e manutenção da RCgC. As recomendações atuais do consórcio europeu foram atualizadas em 2013 (ELN 2013). A grande diferença em relação às recomendações de 2009 é a antecipação dos tempos de obtenção para respostas ótimas, o valor da resposta molecular aos três meses e a inclusão da resposta molecular para a discriminação de falha terapêutica (Quadro 4).

Quadro 4 - Quadro comparativo entre as mudanças das definições que ocorreram nas revisões do ELN de 2009 e 2013 em relação ao tratamento de 1ª linha com IM

T	2009				2013		
Tipo de Resposta							
	Ótima	Sub-ótima	Falha	Atenção	Ótima	Atenção	Falha
Dx				Alto risco; ACA/Ph+		Alto risco ou ACA/Ph+	
3m	RHC e Ph+≤65%	Nenhuma RCg	sem RHC	NA	BCR-ABL≤10% e/ou Ph+≤35%	BCR-ABL > 10% e/ou Ph+ 36-95%	Sem RHC e/ou Ph+>95%
6m	Ph+≤35%	< RCgP	sem RCg	NA	BCR-ABL<1% e/ou Ph+ = 0	BCR-ABL 1-10% e/ou Ph+1-35%	BCR-ABL >10% e/ou Ph+>35%
12m	RCgC	RCgP	< RCgP	< RMM	BCR-ABL≤0,1%	BCR-ABL 0,1=1%	BCR-ABL > 1% e/ou Ph+>0
18m	RMM	< RMM	Perda da RHC; Perda da RCg; mutações; ACA/Ph+	Aumento nos níveis d e transcritos; ACA/Ph+			

Legenda: Alterações Citogenéticas Adicionais (ACA); Diagnóstico (Dx); 3 meses (3m); 6 meses (6m); 12 meses (12m); 18 meses (18m); Filadélfia positivo (Ph+); Resposta Citogenética (RCg); Resposta Citogenética Completa (RCgC); Resposta Citogenética Parcial (RCgP); Resposta Hematológica Completa (RHC); Resposta Molecular Maior (RMM); Tempo após os início do IM em meses (T).

Um paciente é classificado como respondedor ótimo quando atinge a RMM ou RM³ aos 12 meses de tratamento, e é considerado como não respondedor quando sua resposta molecular aos 12 meses foi equivalente à falha (BCR-ABL >1%) ou quando o paciente teve perda de resposta. Perda de resposta ao IM foi definida como a perda da melhor resposta obtida (RCg ou RM). Para a resposta molecular, a perda de resposta foi definida após duas análises moleculares consecutivas (BACCARANI et al., 2013).

1.4.2 A importância da resposta molecular aos três meses

Em estudos recentes foi estabelecido um marco precoce de resposta molecular, passível de uso nas diferentes modalidades terapêuticas, com correlação com a evolução clínica futura do paciente com LMC em uso de um ITK. Estes estudos mostraram que a RM obtida aos três meses de tratamento com um ITK é preditiva do risco de progressão e desfecho no tratamento de pacientes com LMC recém-diagnosticados (BACCARANI et al., 2013; CROSS et al., 2012).

A importância do marco de resposta aos três meses foi confirmada em relação aos níveis de transcrito BCR-ABL. Pacientes com níveis de BCR-ABL $\leq 10\%$ aos três meses apresentam uma probabilidade de sobrevida global em oito anos significativamente maior, quando comparados aqueles com níveis $>10\%$. Além disso, tendo em conta a equivalência entre o número de células cromossomo Ph+ e os níveis de BCR-ABL ($\leq 35\%$ e $\leq 10\%$, respectivamente) este marco de resposta foi validado também em relação aos níveis de células Ph+ (HANFSTEIN et al., 2011; HOCHHAUS et al., 2011, 2012; MARIN et al., 2011; NICOLINI et al., 2011).

Desta maneira, o conceito do valor da resposta molecular aos três meses é hoje o marco de resposta precoce com maior valor prognóstico independente de outros parâmetros analisados. Falhas no monitoramento do tratamento com ITK pode resultar em manejo clínico deficiente e possível evolução da doença para a FA e CB, sendo estas fases de difícil tratamento mesmo na era dos ITK (BACCARANI et al., 2013; CROSS et al., 2012; HAZNEDAROGLU, 2013).

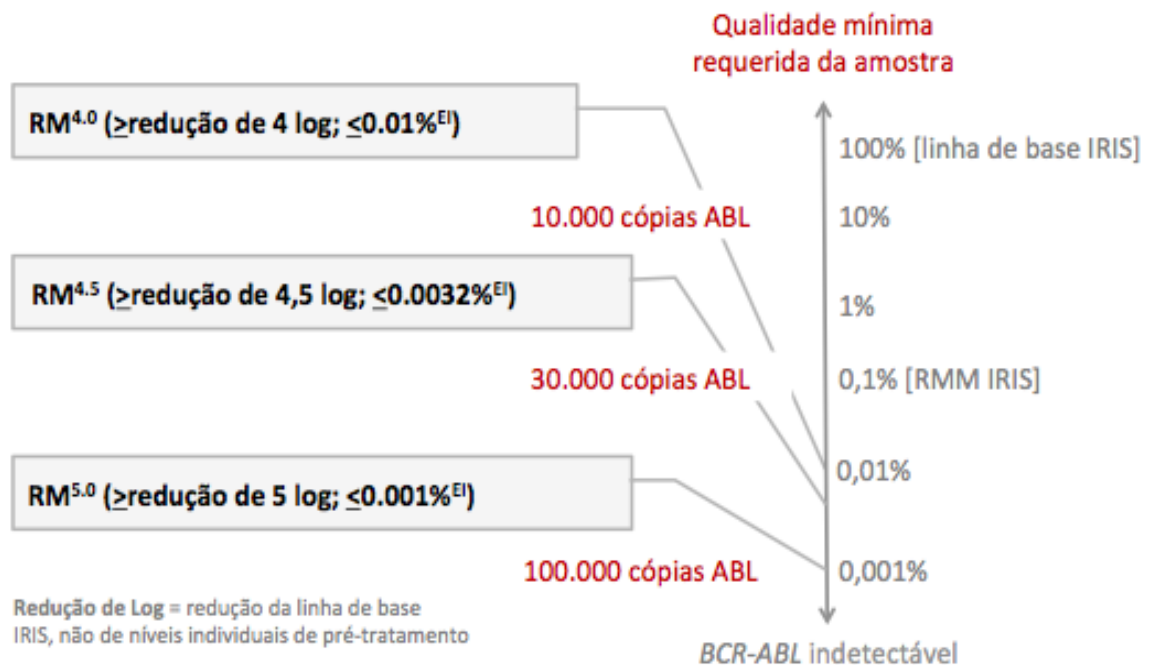
1.4.3 Importância da uniformização da "Resposta Molecular Completa" (RMC) ou níveis de transcritos BCR-ABL indetectáveis

Recentemente, vários estudos sobre a descontinuidade do uso de ITK em pacientes com RMC estão sendo realizados (BRECCIA; ALIMENA, 2014; MAHON et al., 2010; ROSS; HUGHES, 2014). Enquanto metade dos pacientes manteve a RMC após a suspensão, os outros 50% tiveram recaída nos primeiros seis meses após a interrupção. O parâmetro mais

importante para a manutenção da RMC frente à descontinuidade do uso do ITK foi o tempo de manutenção da RMC anterior à suspensão assim como a profundidade da resposta molecular (MAHON et al., 2010).

A partir destes estudos, tem sido uma preocupação da comunidade internacional uniformizar o que cada laboratório chama de RMC ou o termo atualmente utilizado “níveis de transcritos BCR-ABL indetectáveis”. A RMC pode variar de acordo com a profundidade atingida da RM (RM^4 , $RM^{4.5}$ ou RM^5). A obtenção de profundidades de respostas aumentadas depende da sensibilidade da técnica disponível e da qualidade da amostra refletida pela detecção do gene controle, como exemplo, o *ABL*. Desta forma, a profundidade da RM, em casos onde os níveis de transcritos BCR-ABL são indetectáveis, pode ser avaliada em função dos níveis de *ABL*. Uma RM^4 é obtida quando os níveis de *ABL* forem ≥ 10.000 cópias, a $RM^{4.5}$ $ABL \geq 32.000$ e RM^5 $ABL \geq 100.000$ cópias. Pacientes com maiores chances de sucesso frente à descontinuidade do ITK são aqueles com RM na profundidade de $RM^{4.5}$ (Figura 5) (CROSS et al., 2012).

Figura 5 - Esquema ilustrativo das definições profundidade da RM



Legenda: Resposta Molecular (RM).

Fonte: Adaptada de CROSS et al., 2012.

1.4.4 Correlação entre a resposta citogenética e os níveis de transcritos BCR-ABL^{EI}

Como observado nas recomendações previamente mencionadas, existe uma associação entre as RCg e RM. Entretanto, não existem dados consistentes publicados que permitam estabelecer uma correlação entre a RCg e os níveis de transcritos BCR-ABL obtidos por qRT-PCR na escala internacional (BCR-ABL^{EI}).

Em um estudo anterior, foi demonstrado que taxas diferenciadas de progressão livre de doença de 100%, 98% e 87% foram encontradas naqueles pacientes com RCgC associada a RMM, RCgC não associada a RMM e em ausência de RCC aos 12 meses, respectivamente (HANFSTEIN et al., 2011). Posteriormente, este estudo foi estendido, confirmando que, dentre os pacientes que atingiram uma RCgC, em 100% dos casos em que a RCgC esteve associada a RMM não houve progressão da doença (HUGHES et al., 2010; MÜLLER et al., 2009).

A disponibilidade deste tipo de correlação permitiria que os níveis de células Ph+ pudessem ser bem estimados apenas a partir de resultados de respostas moleculares. Como não é rara a recusa do paciente em realizar um mielograma a cada três ou seis meses, esta correlação pode ser bastante útil para conhecimento do número de células Ph+, a partir da análise molecular, que apresenta perfeita equivalência se realizada no sangue periférico (SP) ao invés da medula óssea (MO).

A correlação entre RCg e níveis de transcritos BCR-ABL pode ser validada em laboratórios envolvidos no monitoramento da LMC, para ser utilizada na ausência e em substituição dos resultados da análise citogenética, uma vez que a RM tem sido utilizada como desfecho nos estudos clínicos atuais.

Pacientes que atingem a RCgC em até 12 meses do tratamento apresentam maior probabilidade de atingirem uma RMM (RM³). Foi sugerido, que uma redução de 3-logs nos níveis de transcritos BCR-ABL (0,1% na EI), o equivalente a RMM ou RM³, está associada a uma probabilidade maior de Sobrevida Livre de Eventos (SLE). Entretanto, se a obtenção da RMM por um paciente em RCgC está associada a maior Sobrevida Global (SG) ou Sobrevida Livre de Progressão (SLP) ainda é controverso. Esforços recentes estão sendo realizados para a avaliação da existência de um marco de resposta molecular, associado ao desfecho do tratamento de um paciente com LMC, que seja mais efetivo do que a RCgC. O que se procura, é definir precocemente qual o nível de transcritos BCR-ABL almejado como resposta ao tratamento de um paciente (HANFSTEIN et al., 2012).

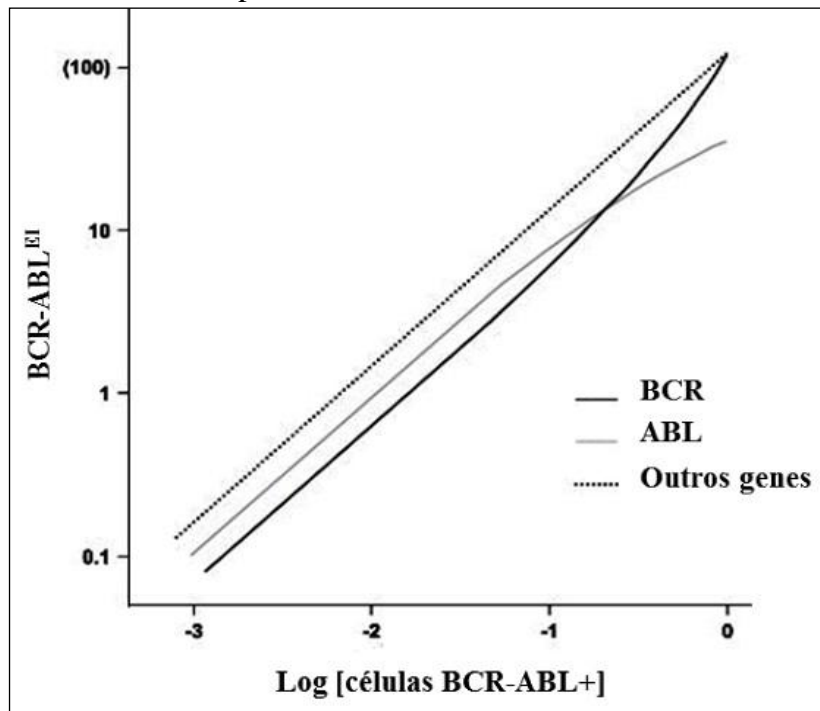
Foi sugerido que reduções mais profundas da carga leucêmica, dada pelo alcance de respostas moleculares do tipo RM³, RM^{4.5} ou RM⁵ por pacientes em RCgC, confere um benefício adicional em termos de SG ou SLP. Atualmente, evolui-se de modo rápido para a consolidação de novos marcos de resposta, relacionados à resposta molecular. Tal fato salienta a importância da avaliação de amostras seriadas ao longo do tratamento para a obtenção da RM. Este tipo de abordagem identificou a existência de biomarcadores precoces preditivos da resposta futura a um ITK (MARIN, 2013).

1.5 A escolha de um gene constitutivo para controle

A aplicação de um controle interno adequado à metodologia é essencial para a determinação precisa dos níveis de BCR-ABL. Isso porque o RNA proveniente de amostras clínicas varia muito, tanto na qualidade como na quantidade. Para corrigir as variações na qualidade e na quantidade de RNA, e para calcular a sensibilidade de cada medição por qRT-PCR, um gene de controle (GC) da transcrição deve ser amplificado em paralelo ao gene de fusão (BEILLARD et al., 2003). A escolha do gene controle é parte importante do processo de padronização.

O gene controle ideal deve ser: uniformemente expresso em diferentes tipos celulares; independente do status proliferativo; não afetado pelo tratamento; invariante entre indivíduos e expresso em níveis similares ao gene BCR-ABL. De fato, um gene controle ideal não existe. Portanto, a escolha reside no candidato mais adequado, de acordo com os critérios discutidos, considerando-se suas limitações. Diferentes genes controle, em número de 14, foram testados pelo grupo “Europa Contra o Câncer” (*European Against Cancer* - EAC) (BEILLARD et al., 2003), para normalização dos resultados de qRT-PCR, dentre eles: *ABL*, *B2M*, *GUS* e *BCR*. Embora outros tenham sido testados, esses quatro genes foram os mais adequados e são os mais largamente utilizados, pois se comportam muito bem quando as células leucêmicas estão em minoria, isto é, quando os valores de transcritos BCR-ABL^{EI} são inferiores a 10%. É importante notar que para os genes controles *ABL* e *BCR* a escala internacional só é linear para níveis de transcritos BCR-ABL menores que 10% (Figura 6).

Figura 6 - Propriedades teóricas de genes de controle amplamente utilizados



Nota: Abaixo de 10%, genes de controle diferentes possuem resultados lineares com a mesma inclinação e são, portanto, aplicáveis para a conversão para a EI. Acima de 10%, as distorções de distância da linearidade surgem tanto para ABL e BCR, mas não para os genes de controle independentes, como *GUS* ou *B2M*.

Fonte: Adaptada de CROSS, 2009.

Assim, em níveis de $BCR-ABL^{EI}$ maiores que 10%, as diferenças de resultado em amostras durante o acompanhamento da doença não devem ser consideradas para direcionamento de alteração terapêutica. A perda de linearidade, com o uso do gene *ABL*, ocorre porque o *ABL* tem dois promotores alternativos que amplificam tanto o gene *BCR-ABL* quanto o *ABL* constitutivo. Logo, a quantificação dos níveis de $BCR-ABL$ é, na verdade, o resultado de uma divisão entre o numerador: $BCR-ABL$, e o denominador: $ABL + BCR-ABL$. Esta equação é obviamente diferente da relação, teoricamente correta, $BCR-ABL/ABL$, para a obtenção dos níveis de transcrito $BCR-ABL$. Assim, é de se notar que na presença de níveis muito elevados de carga leucêmica, a quantificação de $BCR-ABL$ seja superestimada. Com o uso do gene *BCR* como GC, a perda de linearidade também ocorre em situações de alta carga leucêmica, embora os *primers* sejam específicos para o *BCR* selvagem e não amplifiquem o *BCR* do *BCR-ABL*. Entretanto, enquanto as células normais apresentam dois alelos ativos a nível transcricional, as células leucêmicas possuem um só, o que torna a quantificação não linear em níveis elevados de doença. Apesar dos genes *GUS* e *B2M* não

sofrerem distorções em altos níveis de *BCR-ABL*, *ABL* e *BCR*, são os genes controle mais utilizados por razões históricas vinculadas ao grande número de publicações iniciais (CROSS, 2009; LEE et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Como discutido, valores de transcritos BCR-ABL > 10% não apresentam linearidade quando são utilizados os genes de controle *ABL* e *BCR*. Mais ainda, a EI não é pautada nos valores reais da carga leucêmica de um paciente ao diagnóstico na medida em que independente do valor real da carga leucêmica de um paciente ao diagnóstico, esta é considerada como o valor ideal de 100%. Assim, a questão de se a carga leucêmica ao diagnóstico e a velocidade de decaimento desta podem ser utilizadas como biomarcadores preditivos e precoces da resposta terapêutica não pode ser respondida com o uso de genes de controle do tipo *ABL* e *BCR* nem tampouco através do uso da EI.

Dentro deste contexto se insere o objetivo deste estudo, ou seja, avaliar o possível valor dos níveis reais de transcritos BCR-ABL ao diagnóstico como biomarcador precoce e preditivo da resposta terapêutica futura utilizando o gene *GUS* como controle da quantificação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o valor da quantificação dos níveis de transcritos BCR-ABL/GUS ao diagnóstico como marcador precoce e preditivo da resposta terapêutica ao Imatinibe.

Para atingir este objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram perseguidos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer um banco de dados clínicos de um grupo de pacientes com LMC para estudos de correlação com os níveis de transcritos BCR-ABL;
- b) Estabelecer a metodologia para detecção de BCR-ABL/GUS;
- c) Analisar a carga leucêmica em amostras seriadas ao longo do tratamento;
- d) Estabelecer um padrão de comparação entre a resposta citogenética (RCg) e molecular (RM) com BCR-ABL/ABL.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental e amostras estudadas

No período de março de 1997 a setembro de 2013 foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular (LabBioMol) do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional do Câncer (INCA) 7823 amostras de 1325 pacientes, para o diagnóstico e análise da resposta terapêutica de pacientes com suspeita ou diagnóstico estabelecido de LMC, respectivamente. Os casos incluídos neste estudo tiveram o diagnóstico de LMC realizado por citogenética (presença do cromossomo Ph) e/ou por biologia molecular (PCR qualitativo para detecção do gene *BCR-ABL*). O monitoramento da resposta terapêutica ao ITK foi realizado por PCR em tempo real (qRT-PCR).

Na etapa inicial deste estudo, foram analisados os níveis de *BCR-ABL* ao diagnóstico e após três meses de tratamento de amostras pertencentes a pacientes oriundos do serviço de hematologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)/Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), do Instituto Nacional do Câncer (INCA) e demais centros colaboradores (Quadro 5, a seguir) que utilizaram IM como primeira e/ou segunda linha de terapia.

Quadro 5 - Instituições de saúde que possuem colaboração com o LabBioMoL para envio de amostras para análise molecular de pacientes com LMC

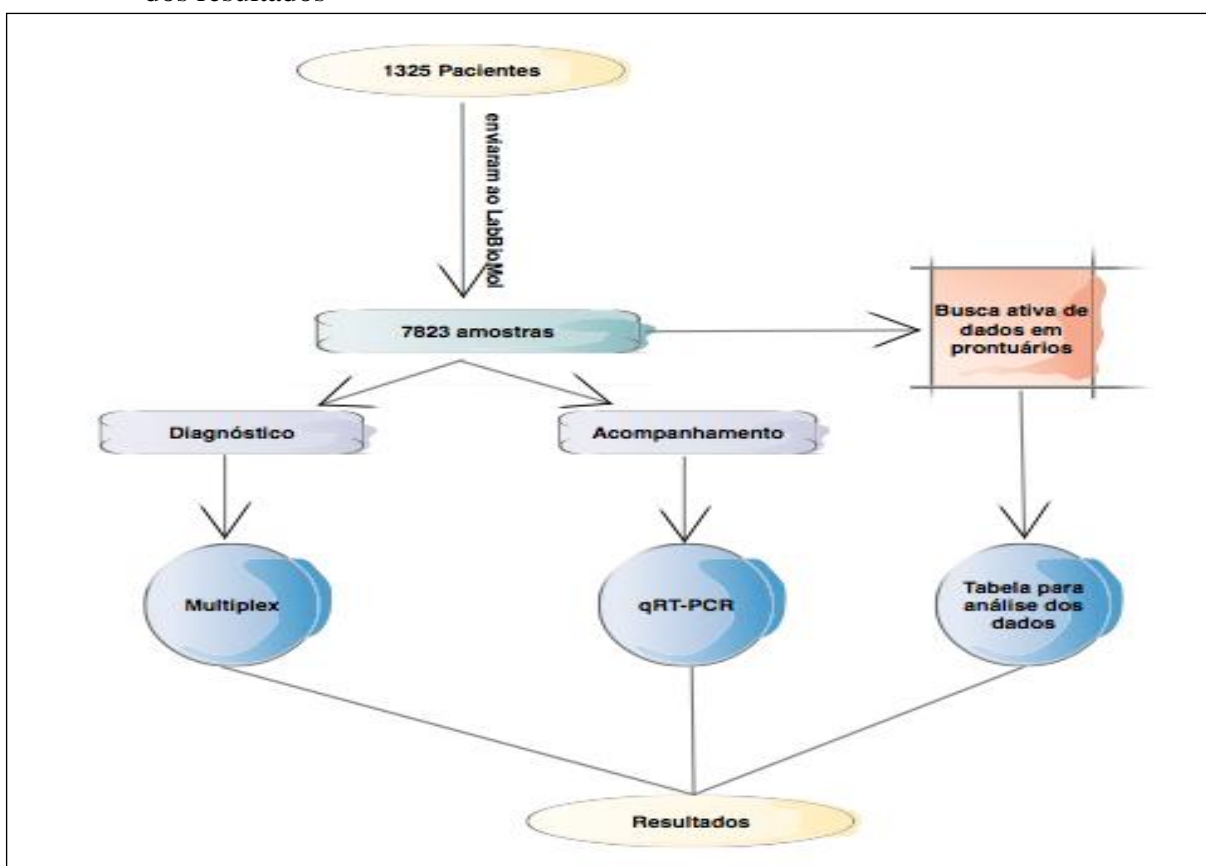
Intituição	Sigla	Localização
Associação feminina de prevenção e combate ao câncer	ASCOMCER	Juiz de Fora (MG)
Associação Piauiense de Combate ao Câncer/ Hospital São Marcos	HSM	Teresina (PI)
Centro de terapia oncológica	CTO	Petrópolis (RJ)
Centro de Transplante de Medula Óssea	CEMO/INCA	Rio de Janeiro (RJ)
Clínica Oncosul	ONCOSUL	Itabuna (BA)
Fundação Benedito Pereira Nunes/Hospital Escola Álvaro Alvim	HEAA	Campos dos Goytacases (RJ)
Fundação HEMOPE	HEMOPE	Recife (PE)
Hospital Central da Polícia Militar	HCPM	Rio de Janeiro (RJ)
Hospital das Clínicas de Uberlândia	HCU	Uberlândia (MG)
Hospital de Base do Distrito Federal	HBDF	Brasília (DF)
Hospital de Clínicas de Porto Alegre	HCPA	Porto Alegre (RS)
Hospital de Ensino Alcides Carneiro	HEAC	Petrópolis (RJ)
Hospital de Força Aérea do Galeão	HFAG	Rio de Janeiro (RJ)
Hospital Evangélico de Vila Velha	Evagélico	Vila Velha (ES)
Hospital Federal Cardoso Fontes	HFCF	Rio de Janeiro (RJ)
Hospital Federal da Lagoa	HFL	Rio de Janeiro (RJ)
Hospital Federal dos Servidores do Estado	HFSE	Rio de Janeiro (RJ)
Hospital Federal de Bonsucesso	HFB	Rio de Janeiro (RJ)
Hospital Onco Beda	ONCOBEDA	Campos dos Goytacases (RJ)
Hospital Santa Rita	Santa Rita	Vitória (ES)
Hospital Universitário Antônio Pedro	HUAP	Niterói (RJ)
Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes	HUCAM	Vitória (ES)
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho	HUCFF	Rio de Janeiro (RJ)
Hospital Universitário Gafree Guinle	HUGG	Rio de Janeiro (RJ)
Hospital Universitário Pedro Ernesto	HUPE	Rio de Janeiro (RJ)
Hospital Universitário Walter Cantídio	HUWC	Fortaleza (CE)
Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira	IPPMG	Rio de Janeiro (RJ)
Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti	HEMORIO	Rio de Janeiro (RJ)
Instituto Nacional do Câncer	Hemato/INCA	Rio de Janeiro (RJ)
Real Hospital Português de Beneficência em Pernambuco	RHP	Recife (PE)
Sociedade Portuguesa de Beneficência de Campos	SPBC	Campos dos Goytacases (RJ)

Legenda: Leucemia Mieloide Crônica (LMC).

Os critérios de inclusão para o estudo foram: a) diagnóstico confirmado de LMC; b) uso de IM em primeira linha ou seguido do uso de rIFN α ; c) dados clínicos completos; d) disponibilidade de amostra do diagnóstico e aos três meses; e) amostras de seguimento para avaliação da resposta molecular por um período mínimo de 24 meses. Para o acompanhamento das respostas ao longo do tratamento foi construído um banco de dados contendo informações clínicas e laboratoriais através de uma busca ativa nos formulários eletrônicos seguida de cadastramento e gerenciamento de dados. As informações clínicas e demográficas de cada paciente foram coletadas do prontuário mediante uma ficha especialmente elaborada para este estudo (APÊNDICE). Para a avaliação da carga leucêmica e para o acompanhamento longitudinal ao longo do tratamento, métodos quantitativos (qRT-PCR) uniformizados para uma escala internacional (EI) foram utilizados. Neste estudo foram obedecidas às diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/1996) de acordo com o Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA de número 100/04 e 129/10 (ANEXO).

Após a análise de cada caso, os pacientes foram classificados em respondedores ótimos e não respondedores, de acordo com os critérios propostos pela ELN 2013. A partir daí, foram selecionados os grupos para a análise do valor da carga tumoral ao diagnóstico como biomarcador precoce e preditivo da resposta terapêutica e correlação entre as RCg e RM (Figura 7).

Figura 7 - Diagrama esquemático do fluxo das amostras dentro do LabBioMol e construção dos resultados

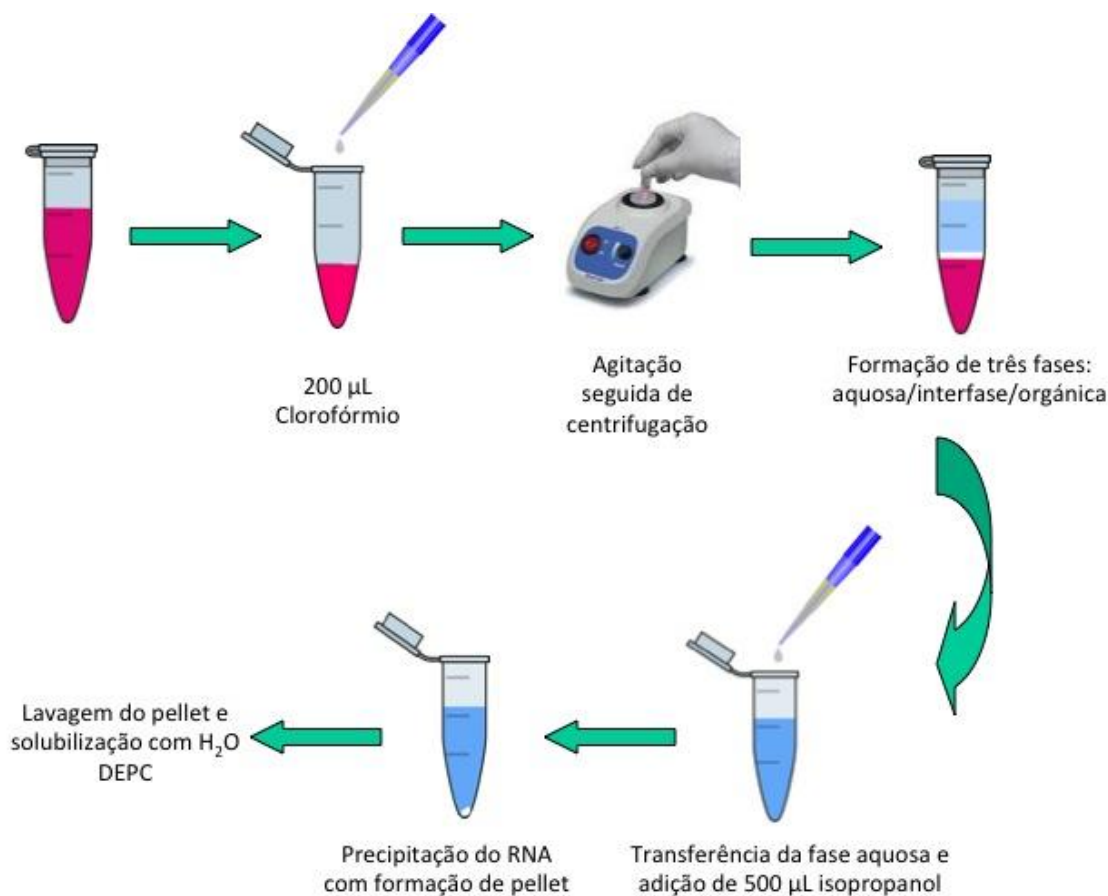


4.2 Método de Extração de RNA total

As amostras de SP e/ou MO, ao diagnóstico e pós-tratamento (acompanhamento), foram processadas para obtenção de RNA total. Após a lise de hemácias nas amostras de SP e/ou MO, uma quantidade de $5-8 \times 10^6$ células foi ressuspensa em 1 ml de Trizol®, de acordo com as instruções do fabricante. As células em Trizol® foram agitadas mecanicamente (tipo vórtex) e incubadas por 3-5 minutos à temperatura ambiente (TA) e após, foram adicionados

0,2 ml de clorofórmio (Merck). A amostra foi centrifugada a 12.000 rotações/minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa, onde está contido o RNA total, foi transferida para um tubo de microcentrífuga novo e o mesmo foi precipitado mediante a adição de 0,5 ml de isopropanol (Merck), seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. O sedimento (RNA) foi lavado com 1 ml da solução etanol 75%, hidratado com H₂O DEPC (dicarbonato de dietila), secado à TA por 5-10 minutos e solubilizado em 12 µl de H₂O DEPC (Figura 8).

Figura 8 - Esquema ilustrativo das etapas de extração do RNA

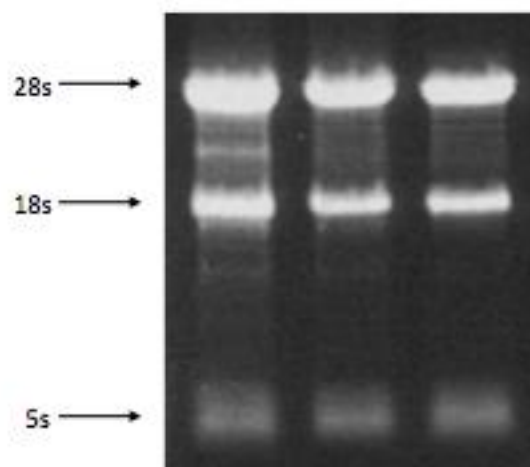


Legenda: ácido ribonucleico (RNA); água em dicarbonato de dietila (H₂O DEPC).

A quantificação e o grau de pureza do RNA foram obtidos por espectrofotometria (NanoDrop[®]), pela leitura no comprimento de onda em 260 e 280 nm. Uma amostra foi considerada adequada sempre quando a razão RNA/proteína: 260/280 foi maior que 1,8. A integridade do RNA extraído foi avaliada a partir de eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão fosfato (Na₂HPO₄ 0,1M) seguido de coloração com brometo de etídio (3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinium 0,5 µg/mL) para identificação dos fragmentos de ácidos nucleicos

por meio da formação de complexos fluorescentes de intercalação com o RNA sob exposição à luz ultravioleta. Um RNA foi considerado íntegro sempre quando as três bandas ribossomais 28s, 18s e 5s de aproximadamente 5, 2 e 0,1-0,3 kb respectivamente foram observadas dentro da proporção esperada (Figura 9).

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do RNA extraído onde se observa as subunidades 28s, 18s e 5s



4.3 Método de síntese de DNA complementar (c-DNA)

O c-DNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total em uma reação contendo iniciadores randômicos e a enzima Transcriptase Reversa (Superscript[®]). Resumidamente, as reações de retro-transcrição foram realizadas em volumes de 20-40 µl. Para a síntese do cDNA, 2 µg de RNA total foram incubados com iniciadores randômicos hexaméricos [5 µM] (Random Hexamer Primers, Invitrogen) por 10 minutos a 65°C. Adicionou-se então uma mistura contendo tampão [20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], MgCl₂ [2,5mM], DTT [10mM], dNTPs [1mM], a enzima transcriptase reversa SuperscriptTM (10U/ml) (Invitrogen), o inibidor de RNase RNAGuard (1U/ml) (Invitrogen) e H₂O DEPC até completar o volume. A incubação foi realizada por 50 minutos a 42°C. Após o término da

retro-transcrição, os tubos foram incubados a 65°C, por 5 minutos, para inativação da atividade transcriptase reversa. O cDNA foi armazenado a -20°C (Figura 10).

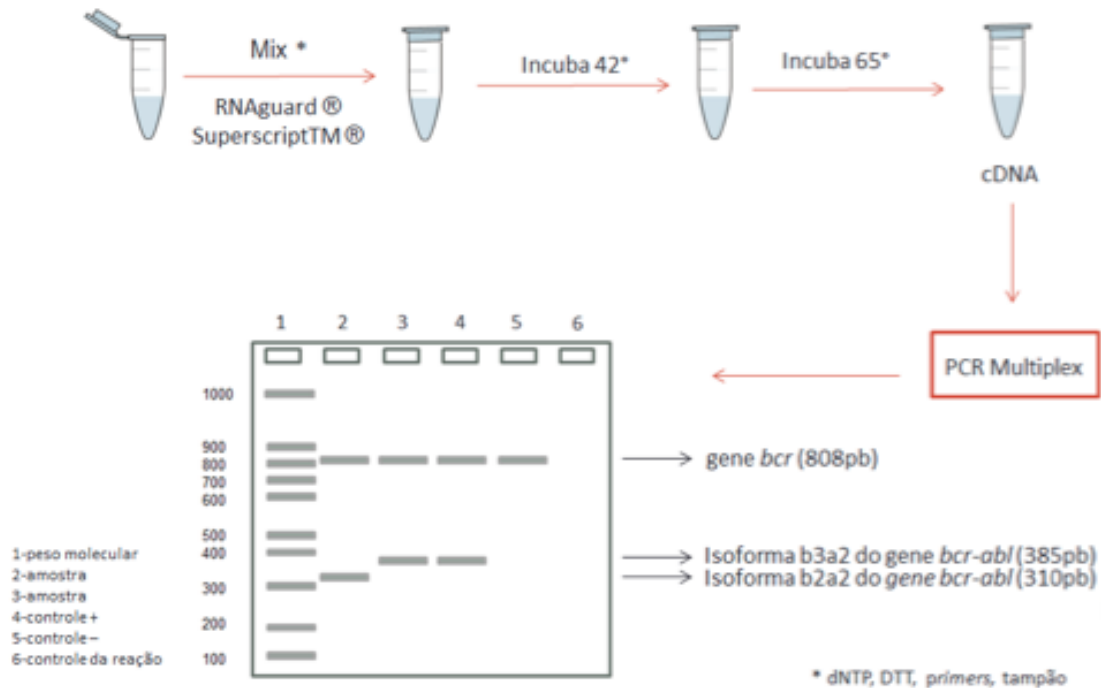


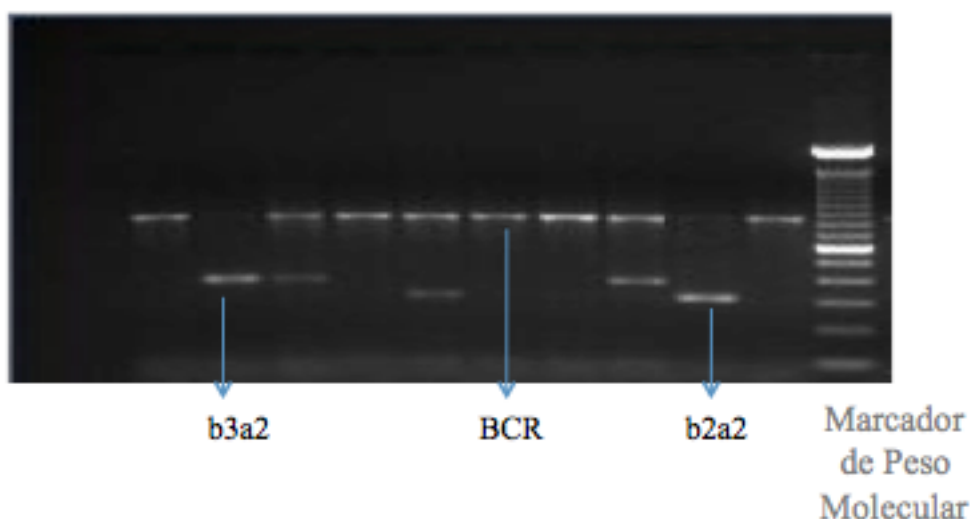
Figura 10 - Esquema ilustrativo das etapas para a realização da síntese de cDNA

4.4 PCR Qualitativo para detecção do gene *BCR-ABL*

A presença do gene *BCR-ABL* foi identificada mediante uma primeira amplificação com vários pares de iniciadores (*PCR Multiplex*) para detecção das isoformas b3a2, b2a2 (p210); e1a2 (p190) e e19a2 (p230). Como controle interno das reações foi utilizado o gene *BCR* selvagem. A amplificação de um gene constitutivo é utilizada para o controle da qualidade do procedimento de extração de RNA e da transcrição reversa. Em caso de uma amostra de diagnóstico, o paciente com o resultado do PCR multiplex negativo não foi considerado como portador da LMC. Em casos de acompanhamento, quando o resultado do PCR multiplex foi negativo, uma segunda técnica, a do PCR *Nested* ou PCR em ninho foi

utilizada, visando-se amplificar o transcrito BCR-ABL em baixos níveis. Na segunda etapa desta técnica são utilizados iniciadores internos aumentando assim sua sensibilidade (CROSS et al., 1994; GABERT et al., 2003; OTAZÚ et al., 2003). A sensibilidade do PCR Nested é de 10^{-5} e a do PCR multiplex de 10^{-3} (detecção de uma célula positiva *BCR-ABL*/100000 células normais e uma célula positiva *BCR-ABL*/1000 células normais, respectivamente). O resultado das reações de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. A determinação do tipo de isoforma do paciente, ao diagnóstico, é etapa necessária para a quantificação na medida em que o qRT-PCR, utilizado neste estudo, só detecta as isoformas b2a2 e b3a2 (Figura 11).

Figura 11 - Gel de agarose com resultado do RT-PCR Multiplex para diagnóstico molecular qualitativo



4.5 PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) e fator de correção

A quantificação absoluta dos transcritos BCR-ABL, utilizando-se o sistema TaqMan, foi realizada em termociclador Applied Biosystems® ViiA7 (LifeTechnologies), incluindo sonda específica marcada 5'FAM-3'TAMRA e *primers* para isoformas b3a2 e b2a2. O gene ABL foi utilizado como controle endógeno. Diluições seriadas de DNA plasmidial foram realizadas e utilizadas como *standards* do número de cópias para a construção de uma curva

padrão na proporção de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 . O mesmo plasmídeo é utilizado para a quantificação de *BCR-ABL* e de *ABL*, controlando qualquer variação na eficiência de quantificação do plasmídeo. A cada reação foram incluídos controles de qualidade contendo: uma amostra com um alto número de cópias *BCR-ABL* (amostra da linhagem celular K562) para avaliar a reação no ponto inicial da curva padrão; e uma amostra com baixos níveis de transcritos *BCR-ABL*, para seguimento da reação até o último ponto da curva padrão. A utilização destas amostras permite monitorar a variabilidade interensaio. Além destas, três tipos diferentes de controles negativos para avaliação da qualidade da reação foram utilizados: NTC (*No Template Control*), amostra de c-DNA de indivíduo saudável ou linhagem celular negativa para *BCR-ABL* que avalia a sensibilidade do ensaio; NAC (*No Amplification Control*) amostra contendo DNA de linhagem positiva para *BCR-ABL*, utilizada para verificar a qualidade da amplificação; e branco que é um controle que contém só o mix e avalia a contaminação do ensaio. Os resultados obtidos por qRT-PCR foram considerados representativos quando o número de cópias do gene *ABL* detectado foi ≥ 10.000 . Um resultado de qRT-PCR foi avaliado como molecularmente indetectável quando não foram detectados transcritos *BCR-ABL* em uma amostra com um número de cópias do *ABL* considerado representativo. Os níveis de *BCR-ABL* foram calculados pela relação *BCR-ABL/ABL%* e convertidos para uma EI pela aplicação do fator de correção específico do laboratório de BioMol obtido através do “Programa Internacional de Padronização de Ensaio de qRT-PCR para *BCR-ABL*” liderado pela Dra Susan Branford, do Centro de Biologia do Câncer, Universidade de Adelaide, Austrália (BRANFORD et al., 2008). Este processo é repetido anualmente, a fim de monitorar a estabilidade do fator de correção do LabBioMol e de avaliar a qualidade de toda a plataforma da LMC.

4.6 Definições de resposta ao tratamento

Após a avaliação molecular por qRT-PCR, os pacientes com amostras seriadas e acompanhamento de no mínimo 12 meses puderam ser classificados como respondedores ótimos ou não respondedores conforme critérios definidos pela ELN 2013 já descritos na seção 1.4.1.

4.7 Padronização do ensaio de quantificação de transcritos BCR-ABL por PCR em Tempo Real (RT-qPCR) utilizando *GUS* como controle endógeno

Para a padronização do ensaio de quantificação absoluta de transcritos BCR-ABL, tendo *GUS* como gene controle endógeno, foi utilizada a química TaqMan® ou método da atividade 5' nuclease, com *primers* e sondas fluorescentes específicas para o gene alvo (Tabela 1). Em reação de qRT-PCR multiplex, no termociclador Applied Biosystems® ViiA7 (LifeTechnologies). O método de análise escolhido foi a quantificação absoluta, para quantificar amostras desconhecidas interpolando suas quantidades em relação a uma curva padrão de DNA plasmidial. Ao método utilizado foram introduzidas pequenas modificações em relação ao protocolo EAC previamente publicado (BEILLARD et al., 2003), onde foram utilizados os *primers* e a sonda conforme proposto por Müller et al. (2008).

Tabela 1 – Sequência de *primers* e sonda utilizados no qRT-PCR

	Sequencia
ENR1162	5' -CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA-3'
ENF1102	5' -AATGAGCTCTCCAACCACATATTTTC-3'
Sonda	5'-TGSTCCA GACCCAGATGGTACTGCT-F3'

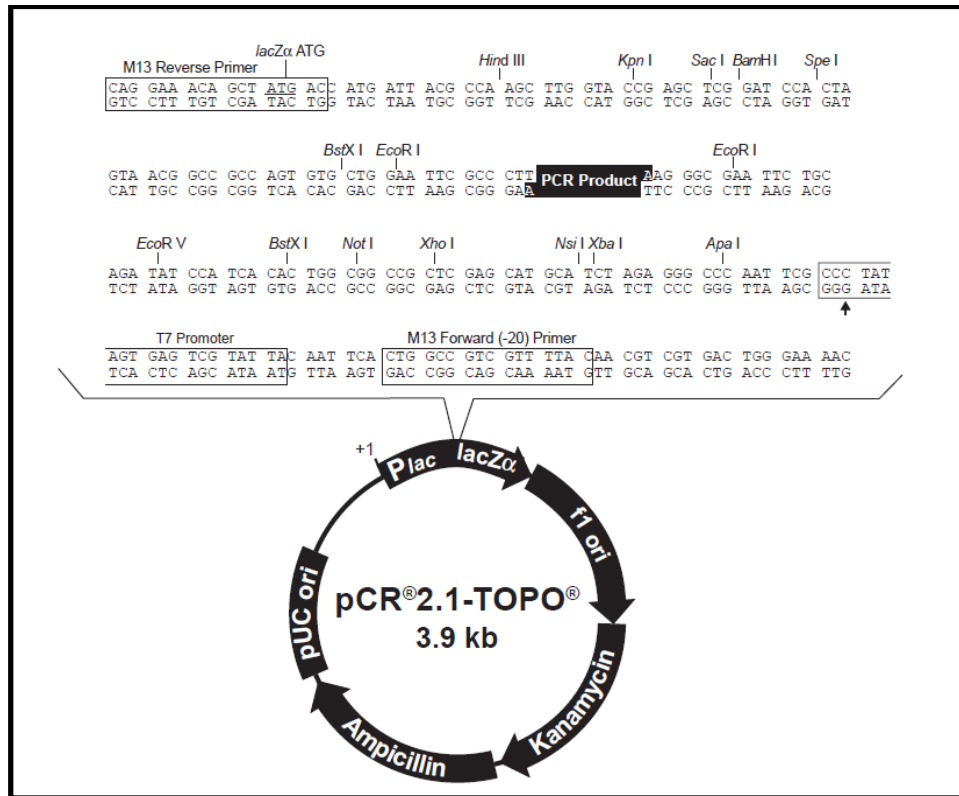
Legenda: ENR1162=*primer reverse*. ENF1102=*primer forward*.

4.8 Preparação do plasmídeo pME-2

O plasmídeo pME-2 foi gentilmente cedido pelo Dr. Martin Muller, da Universidade de Heidelberg, Mannheim, Alemanha. O pME-2 foi construído a partir do vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen-Life Technologies) (Figura 12). O pME-2 apresenta resistência à ampicilina e kanamicina. No sítio múltiplo de clonagem (*Multiple cloning site*), foi clonado um inserto com a sequência referente ao gene controle *GUS* e a sequência b3a2/e14a2, do transcrito BCR-ABL, derivada da linha celular K562. O plasmídeo foi construído com o intuito de facilitar a padronização do protocolo de qRT-PCR e possibilita o uso de três genes controles diferentes: *GUS*; *ABL* ou *BCR*. Este plasmídeo foi expandido em bactérias e utilizado para padronizar o qRT-PCR p210 com o gene *GUS* como controle. Os

procedimentos para a transformação de bactérias e construção da curva padrão se encontram relacionados na Figura 12.

Figura 12 - Mapa do vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen-Life Technologies)



4.8.1 Construção de Curva Padrão com o plasmídeo pME-2 para a quantificação absoluta

O preparo de uma curva padrão para quantificação absoluta requer que as quantidades absolutas (número de cópias) dos padrões sejam inicialmente conhecidas através de algum método independente. A seguir, são detalhados os passos seguidos para a construção e quantificação das cópias da amostra primária, a partir da qual serão gerados pontos para a construção de uma curva padrão com o plasmídeo pME-2:

- o plasmídeo pME-2 foi utilizado para transformar bactéria (TOP5, *E. coli*) competente através de choque térmico (CaCl_2);
- as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-Agar suplementado com Ampicilina (100mg/mL); Após crescimento durante

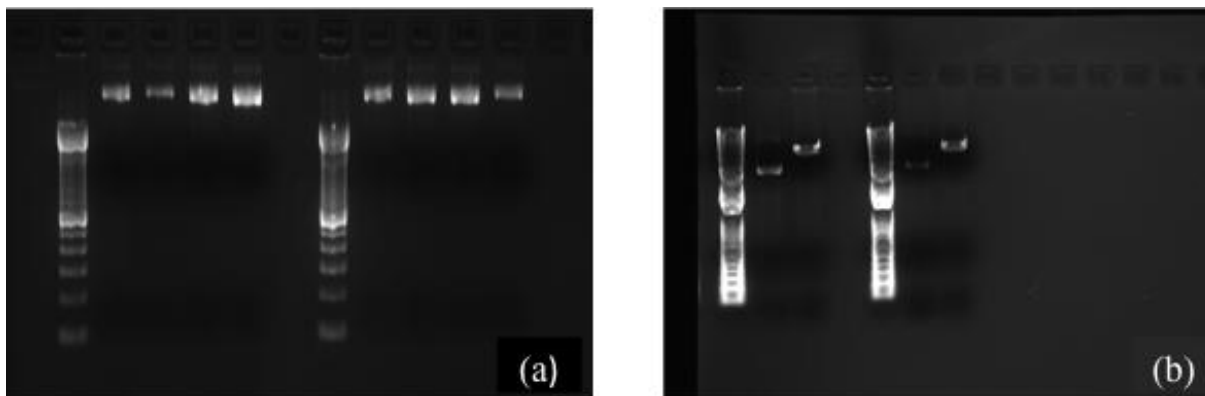
12hs/37°C, foram selecionadas cerca de 5 a 10 colônias, com o objetivo de isolar o DNA plasmidial por meio de miniprep, utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, seguindo as instruções do fabricante (Figura 13, legenda a);

- c) a presença do inserto (segmento alvo) nas colônias selecionadas foi verificada por PCR multiplex para *BCR-ABL*;
- d) o plasmídeo foi linearizado por meio de digestão com enzima de restrição (SpeI) (Figura 13, legenda b);
- e) o produto linearizado foi purificado a partir de gel de agarose 0,8% utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, seguindo as instruções do fabricante;
- f) o produto purificado foi quantificado em nanodrop A_{260nm}, obtendo o resultado em ng/uL;
- g) para converter a concentração obtida em ng/uL para n° moléculas/uL foram utilizados os seguintes parâmetros: PM médio de 1 pb de DNA = 649 g/mol; 1 mol = 6,02 x 10²³ moléculas.

Foram realizadas diluições seriadas de 10¹-10⁶ cópias de plasmídeo, utilizando como diluente concentrações definidas do carreador Yeast tRNA 100 ng/uL (Ambion P/N AM7119). As diluições seriadas foram preparadas a partir de uma solução estoque contendo 10⁹ moléculas. As diluições seriadas para a curva de calibração são armazenadas a -20 °C. Uma vez descongelados os estoques estes são mantidos à 4°C por um período máximo de uma semana. Um novo *batch* é preparado toda vez que uma mudança de Cq (número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção) de 0,5–1,0 de uma amostra controle (amostra com alto e baixo número de cópias) é detectada.

Estas diluições seriadas de DNA plasmidial foram utilizadas como standards do número de cópias mediante construção de uma curva padrão, tanto para o gene alvo (*BCR-ABL*) quanto para o endógeno (*GUS*). A padronização e o controle do ensaio de quantificação absoluta seguiram as recomendações propostas pelas MIQEs (do inglês *Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments* – informações mínimas para publicação de experimentos com PCR quantitativo em tempo real) e serão relatadas nos resultados (BUSTIN et al., 2009). As seguintes informações do ensaio foram avaliadas para a padronização: eficiência da reação; sensibilidade; limite de detecção (LOD); *slope* (inclinação da reta); *intercept* (o ponto em que cruza o eixo y) e R².

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose para visualização



Legenda: (a) DNA plasmidial; (b) plasmídeo linearizado.

4.9 Análise estatística

As informações consideradas relevantes para a análise, tais como: sexo, idade, data do diagnóstico, fase da doença ao diagnóstico, índice Sokal, tempo e tipo de tratamento prévio aos ITK, data e tempo para início da terapia com ITK, entre outros, foram obtidas dos registros do arquivo médico dos serviços de hematologia mediante uma ficha de coleta de dados elaborada para o presente estudo (APÊNDICE).

Para a análise estatística foi criado um banco de dados específico para estudo com as informações clínicas, de citogenética e de biologia molecular, nos programas Excel® (Microsoft) e SPSS 18.0.

As variáveis categóricas foram descritas utilizando-se proporções, e as contínuas através da mediana. A comparação dos valores entre os diferentes grupos foi realizada pelos testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Valores de probabilidade (p) < 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos. As análises de sobrevida global (SG), sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida livre de evento (SLE) foram realizadas pelo método de Kaplan e Meier (1958) e comparadas com o teste de *log-rank*. A sobrevida livre de progressão (SLP) foi definida pela ausência de fase acelerada, crise blástica ou morte por qualquer motivo; sobrevida global (SG) pela ausência de morte por qualquer motivo. A análise estatística foi realizada por meio do programa SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA, 2004).

A análise foi baseada nos marcos de resposta ótima, citogenética e molecular, aos 3 e 6 meses, de acordo as recomendações do consórcio ELN 2013. Pacientes com avaliação de respostas nos períodos entre 1,5-4,5 meses ou 4,5-7,5 meses foram incluídos para a análise de respostas relativas aos três e seis meses, respectivamente. Todos os testes estatísticos foram calculados com o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e GenEx® (Multid Analyses AB, Europe's prime software).

5 RESULTADOS

5.1 Agrupamento dos dados clínicos dos pacientes

A partir de um banco de dados, existente no laboratório, no sistema de gerenciamento Microsoft Office Access[®] foram relacionadas 7823 amostras de 1325 pacientes, cujas amostras de SP e MO foram encaminhadas para a pesquisa do gene de fusão *BCR-ABL* ao diagnóstico ou para a avaliação molecular da resposta ao tratamento instituído. A coorte central deste estudo foi proveniente do serviço de hematologia do INCA, além dos 31 centros colaboradores, incluindo o HUPE/UERJ, conforme anteriormente relacionado (Quadro 5, f. 39). As amostras de pacientes encaminhadas para avaliação diagnóstica foram submetidas a PCR multiplex para detecção de transcritos *BCR-ABL*, o resultado deste PCR quando positivo, estabeleceu o diagnóstico de LMC.

No presente estudo foi avaliada uma coorte retrospectiva de 220 pacientes com LMC. O delineamento deste subgrupo se deu em função da existência de dados clínicos, resultados moleculares e tempo de seguimento adequado aos objetivos deste estudo. Os 220 casos incluídos neste estudo são apresentados na Tabela 2. O grupo estudado incluiu 126 homens e 94 mulheres, com uma mediana de idade de 45 anos (18-91). Cento e nove pacientes utilizaram IM como primeira linha de tratamento, 97 (206) receberam rIFN- α antes do IM. Ao início do tratamento, 194 pacientes se encontravam em FC e 26 em FA.

A avaliação do índice Sokal, a partir do dado disponível no prontuário ou calculado pela aplicação da fórmula dada no quadro 2 da seção 1.1.2, no grupo de estudo discriminou 100 pacientes em baixo risco, 52 em risco intermediário, 40 em alto risco sendo 28 pacientes não classificados porque a informação não foi encontrada. O tempo médio de uso do IM foi de 54 meses (6 - 149), com 92% dos casos utilizando o inibidor por um tempo >12 meses, sendo que 155 pacientes continuam com IM (79%). Após a suspensão do imatinibe, 23% dos pacientes iniciaram tratamento com ITK-2G (Dasatinibe ou Nilotinibe).

Tabela 2 - Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados

	N (intervalo)
Idade ao diagnóstico, anos	45 (18-91)
Sexo	
Masculino	126
Feminino	94
Fase ao início do IM	
LMC-FC	194
LMC-FA	26
Tratamento prévio ao IM	
Nenhum	109
INF- α	97
Desconhecido	14
Índice Sokal	
Alto	40
Intermediário	52
Baixo	100
Desconhecido	28
Tempo de acompanhamento (Dx até último dado disponível), meses	43 (6-220)
Tempo de uso de IM, meses	30 (6-123)
Tempo de uso de rINF α , meses	3 (1-108)

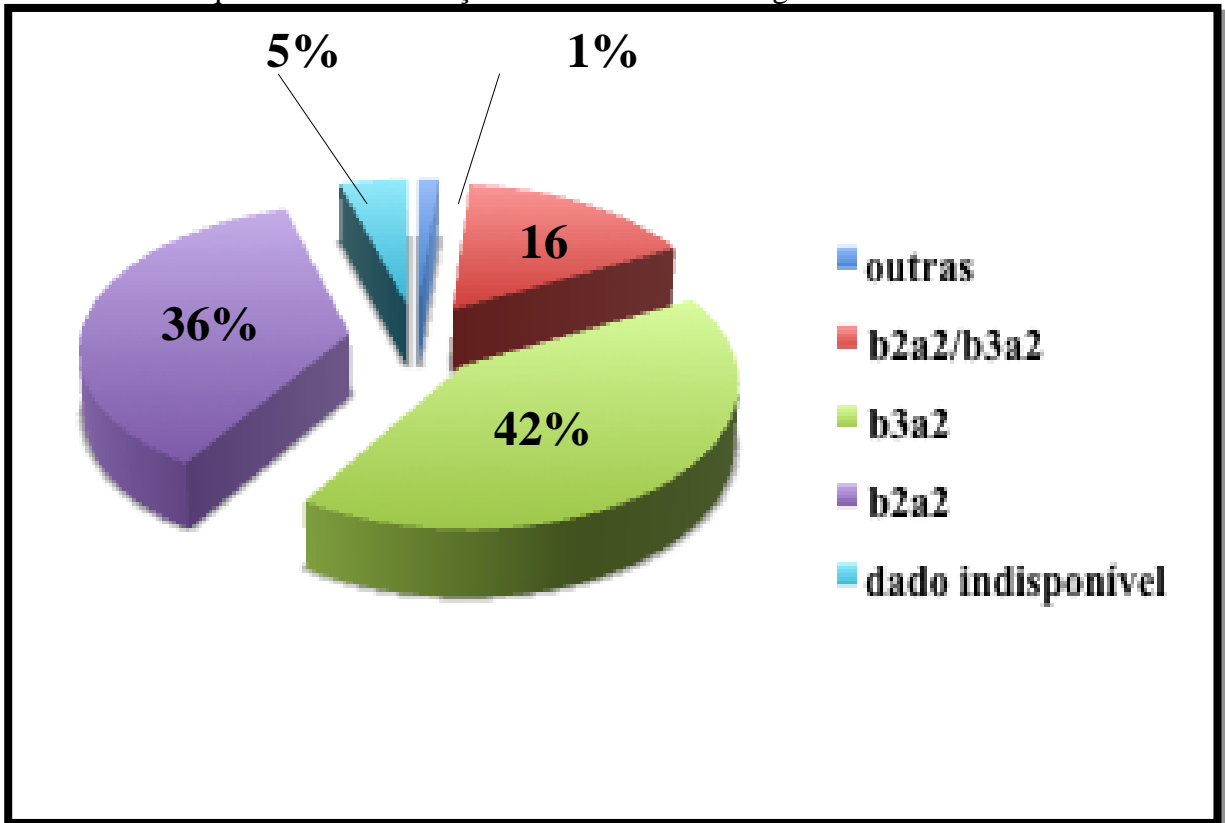
Legenda: diagnóstico (Dx); imatinibe (IM): leucemia mieloide crônica em fase crônica (LMC-FC); leucemia mieloide crônica em fase acelerada (LMC-FA); interferon (rINF α).

Nota: N= 220.

5.2 PCR qualitativa para a identificação de BCR-ABL

Como anteriormente apresentado, o PCR multiplex define o tipo de isoforma do transcrito BCR-ABL. A frequência da distribuição das isoformas encontradas foi estudada em pacientes ao diagnóstico. O resultado desta avaliação mostrou que a isoforma e14a2 (b3a2) foi a mais frequente (42%), seguida da isoforma e13a2 (b2a2) presente em 36% pacientes, sendo que 16% dos pacientes apresentaram ambas as isoformas (Gráfico 1). As isoformas e14a2 e e13a2 codificam a proteína quimérica de 210 kDa (P210^{BCR-ABL}).

Gráfico 1 - Frequência da distribuição das isoformas ao diagnóstico



Legenda: Outras=e1a2 e e19a2.

O possível valor prognóstico atribuído pelas isoformas foi avaliado tendo como parâmetro o marco de resposta molecular maior ($\text{BCR-ABL} \leq 0.1\%$) aos 12 meses. Para isso, um subgrupo de 209 pacientes foi selecionado do grupo original de acordo com a disponibilidade do resultado molecular aos 12 meses. Aos 12 meses de tratamento com IM 48,8% dos pacientes b3a2 alcançaram uma RMM em comparação a 25% de pacientes portadores da isoforma b2a2 ($p = 0,085$).

Além disso, a isoforma variante envolvendo quebra no éxon 19 do *BCR* (e19a2) que codifica a $\text{P230}^{\text{BCR-ABL}}$ foi observada em um paciente. É de se ressaltar este achado porque o PCR quantitativo para avaliação da resposta terapêutica utiliza *primers* capazes de detectar somente as isoformas e14a2 e e13a2. Portanto, um paciente portador de uma isoforma variante, como a e19a2, pode ser considerado erroneamente um respondedor precoce e ótimo. De fato, a resposta molecular completa obtida por um paciente deste tipo, reflete o fato do qRT-PCR hoje utilizado não ser capaz de detectar a isoforma variante.

5.3 Correlação entre as diferentes categorias de resposta citogenética e níveis de transcritos BCR-ABL/ABL^{EI}

Assim como na RM, o valor prognóstico da RCg utiliza a velocidade de decaimento da carga leucêmica como parâmetro preditivo de resposta. Como discutido, a correlação entre RCg e níveis de transcritos BCR-ABL deveria ser validada em laboratórios envolvidos no monitoramento da LMC. Esta comparação é importante, porque a RCg vinha sendo utilizada, antes da introdução dos ITK, como o padrão ouro da resposta terapêutica. Mesmo após a introdução dos ITK, até a utilização do parâmetro dos níveis de BCR-ABL aos 3 meses \leq 10%, a obtenção de uma RCg completa aos 12 meses era o único parâmetro preditivo de sobrevida global (BACCARANI et al., 2009). Assim, pela importância desta avaliação e por ainda hoje não existirem dados consistentes na literatura que permitam a conversão das respostas citogenéticas em uma resposta molecular equivalente esta comparação foi realizada.

Para esta análise, 204 pacientes em uso de IM puderam ser avaliados por possuírem os dados citogenéticos e moleculares necessários. Os níveis de transcritos BCR-ABL na escala internacional (BCR-ABL/ABL^{EI}) foram determinados por qRT-PCR em 307 amostras de SP enquanto o número de células positivas para o cromossomo Ph em amostras de medula óssea por análise citogenética. Amostras seriadas ao longo do tratamento apresentando diferentes profundidades de resposta foram utilizadas para esta comparação.

Os níveis de transcritos BCR-ABL/ABL^{EI} dos pacientes tratados com IM, foram agrupados em relação a diferentes padrões de RCg. Para esta comparação utilizamos amostras com resultados da análise citogenética que dispunham também de quantificação dos níveis de transcritos BCR-ABL. As categorias de RCg foram escolhidas de acordo com as utilizadas como marco de resposta pelos critérios da ELN 2009/2013. Quatro categorias de resposta foram utilizadas: ausência de resposta (número de células Ph+ >95%); RCgMe (entre 36-95%), RCgP (<35%) e RCgC (0% células Ph+).

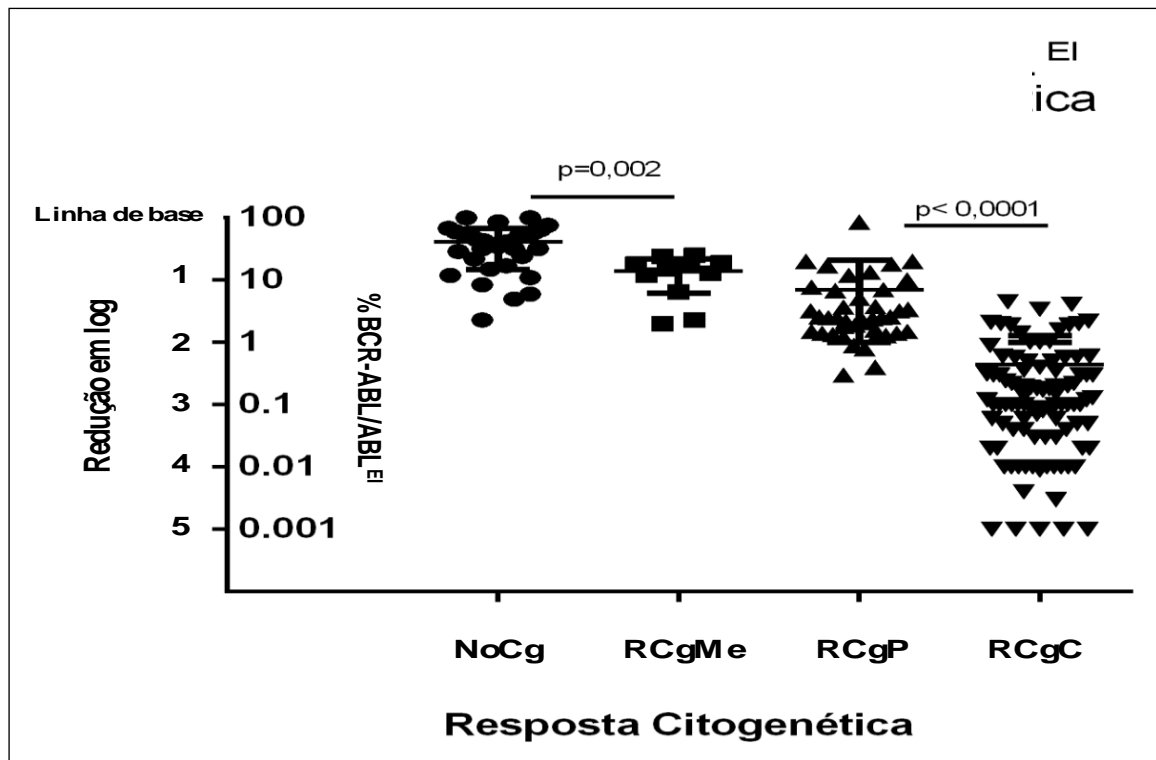
A análise das quatro diferentes categorias de RCg evidenciou variações dos níveis de transcritos BCR-ABL características a cada uma das categorias distribuídas ao longo de uma variação dinâmica logarítmica de 100 a 0,001 BCR-ABL/ABL%. O Gráfico 2 mostra a comparação dos valores de transcritos BCR-ABL/ABL^{EI} no momento da resposta citogenética. A média dos níveis de transcritos BCR-ABL/ABL^{EI} em pacientes com ausência resposta citogenética foi de 40% (n = 32), em pacientes com RCgMe de 15 % (n = 12). É importante ressaltar, que pela falta de linearidade em valores de BCR-ABL acima de 10%

quando usado o gene controle ABL, para estas duas categorias podemos equalizar os níveis de BCR-ABL/ABL^{EI} como acima de 10%. Pacientes com RCgP apresentaram níveis médios de 2,5 % (n = 40) com níveis de BCR-ABL/ABL^{EI} ≤ 10% e pacientes com RCgC de 0,6 % (n = 97) ou níveis de BCR-ABL/ABL^{EI} < 1%.

A média dos níveis de transcritos BCR-ABL/ABL^{EI} dos pacientes sem resposta citogenética foi mais alta do que a de pacientes com RCgMe (p= 0,002), e de pacientes com RCgP mais alta do que a de pacientes com RCgC (p < 0,0001). Quando comparados níveis de transcritos BCR-ABL/ABL^{EI} entre o grupo RCgMe x RCgP não foi observada diferença significativa entre as médias (Gráfico 2, a seguir).

No grupo de não respondedores, apenas quatro pacientes apresentaram valores de BCR-ABL/ABL^{EI} < 10% (4/32, 12,5%), a maioria tinha BCR-ABL/ABL^{EI} com valores ≥ 10% (28/32; 87,5%). Para o grupo de pacientes com RCgP, a maioria das amostras (35/40, 87,5%) apresentou uma redução > 1 log abaixo da linha de base (BCR-ABL/ABL^{EI} ≤ 10%), e apenas um paciente teve BCR-ABL/ABL^{EI} valores > 10% (5/40, 12,5%). Então, podemos dizer que, para este estudo, a RCgP está relacionada com uma redução de 1 log da em relação a linha de base dos níveis de transcritos BCR-ABL ao diagnóstico.

Todos os pacientes com RCgC tiveram uma redução de 1 log em relação a EI de referência, ou seja, BCR-ABL/ABL^{EI} < 10% . Para este grupo foi observado que a maioria (> 70 %, n = 68) demonstrou uma redução de 3 log; 13 % apresentaram uma redução de 4 log (n = 13) e 5 %, uma redução de 5 log (n = 5). Apenas quatro amostras com uma redução > 2 logs (BCR-ABL/ABL^{EI} > 1 %) foram associadas a RCgC, entretanto todos apresentaram valores <10 % de células Ph+. Ou seja, uma redução > 2 logs em RM foi equivalente a RCgC. Estes resultados podem ser analisados no Gráfico 2, a seguir.

Gráfico 2 – Valores de transcritos de BCR-ABL^{EI} no momento da Resposta Citogenética

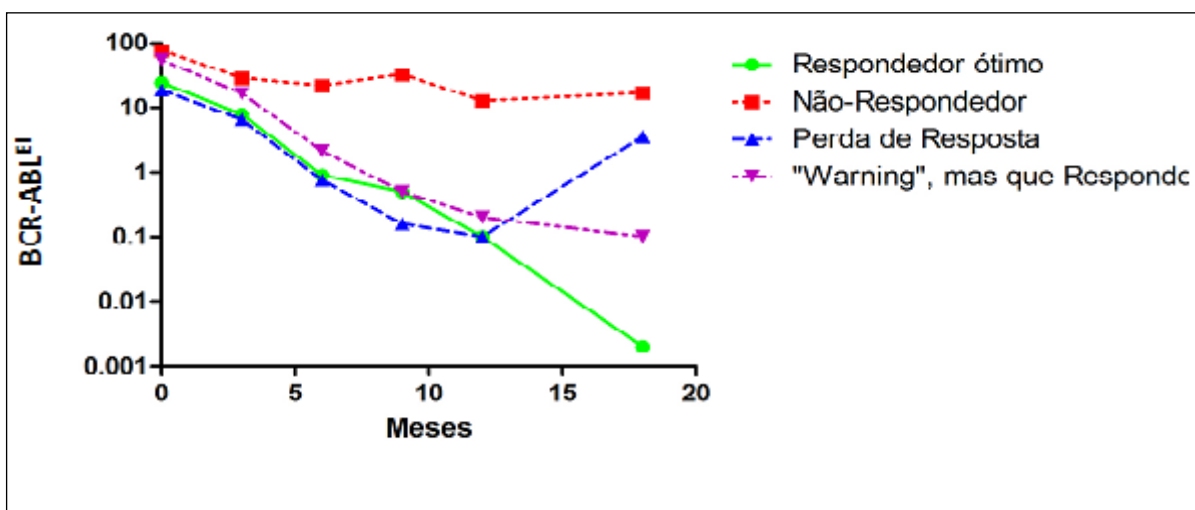
Legenda: ausência de resposta citogenética (NoCg); resposta citogenética menor (RCgMe); resposta citogenética parcial (RCgP); resposta citogenética completa (RCgC).

5.3.1 Resposta Molecular aos três meses: marcador preditivo de maior valor prognóstico independente para identificação precoce de falha terapêutica

Como apresentado anteriormente, a determinação da resposta molecular, pela aferição dos níveis de transcritos BCR-ABL por qRT-PCR, é hoje a base do monitoramento da resposta terapêutica porque existe uma grande proporção de pacientes que atingem uma RCgC (zero células Ph+) ao longo dos 6-9 meses de tratamento. Assim, a resposta molecular convertida para uma escala internacional (EI), tem sido a resposta de maior aplicação como biomarcador preditivo de sobrevida global e livre de eventos. A predição é obtida pelo tipo de resposta alcançada ao longo do tratamento com o ITK, o marco da resposta molecular mais preditivo para discriminar entre um paciente destinado a responder de maneira ótima ou falhar é a quantidade de transcritos BCR-ABL aos três meses. Desta maneira, do grupo original foram selecionados aqueles pacientes com dados RT-qPCR aos três e aos 12 meses (N=158). A RM foi estabelecida de acordo aos níveis de BCR-ABL/ABL^{EI}, obtidos por qRT-PCR, após

aplicação de um fator de correção específico ao LabBiomol para a conversão em EI. Diferentes padrões de resposta foram analisados ao longo do tratamento e discriminados de acordo a profundidade da resposta obtida em função do tempo de obtenção em respondedores ótimos, não respondedores (falha) ou em um grupo intermediário (*warning*) de acordo aos critérios da ELN 2013. A variação dos níveis de transcritos BCR-ABL foi estudada em amostras seriadas ao longo do acompanhamento. Como resultado, foram observados diferentes padrões de resposta. O Gráfico 3 é ilustrativo dos padrões encontrados para cada tipo de respondedor.

Gráfico 3 – Níveis dos transcritos de BCR-ABL^{EI} ao longo do tratamento



Legenda: Cada linha representa a resposta molecular de um paciente ao longo do tratamento com IM. Em verde: respondedor ótimo, apresenta níveis de *BCR-ABL* <10% aos 3 meses e atinge RMM (*BCR-ABL* <0,1%) aos 12 meses; Em vermelho: não respondedor ou falha, apresenta níveis de *BCR-ABL* >10% aos 3 meses e cursa com uma oscilação dos níveis de transcritos *BCR-ABL* acima de 10% ao longo do tratamento; Em fúccia: "warning" paciente apresenta cinética decrescente de transcritos *BCR-ABL* sem atingir os marcos de resposta ótima aos 3 e 12 meses; Em azul: perda de resposta, paciente alcança RMM aos 12 meses com perda subsequente da resposta.

5.4 Padronização do qRT-PCR para a detecção de transcritos BCR-ABL utilizando *GUS* como gene controle

Tendo em vista a avaliação da RM aos três meses de tratamento, a padronização da quantificação de transcritos BCR-ABL utilizando-se o *GUS* como gene controle teve início com a construção de padrões para a aferição do número de cópias em uma reação de

quantificação absoluta por qRT-PCR. Estes padrões são utilizados para a construção de uma curva padrão, tanto para o gene alvo quanto para o endógeno. A construção dos padrões foi realizada a partir da clonagem de um plasmídeo original, cedido pelo Dr. Martin Muller, contendo o inserto *BCR-ABL*, *ABL* e *GUS*, como referido nos métodos seção 3.8.

Para a construção da curva padrão, foram realizadas seis diluições, em que o número absoluto de cópias do gene alvo e do constitutivo eram conhecidos: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 . Este mesmo padrão de diluição foi utilizado para todos os genes: *ABL*, *GUS* e *BCR-ABL*. A correlação entre os valores obtidos e os valores teóricos esperados a partir da diluição seriada de amostras padrão com o número de cópias conhecido foi utilizada para a padronização do ensaio. Uma vez a curva criada, esta foi utilizada para avaliar a eficiência e o limite de detecção do ensaio quantitativo.

A padronização e o controle do ensaio de quantificação absoluta seguiram as recomendações propostas pelas MIQEs. Foram calculadas as seguintes informações técnicas do ensaio: eficiência da reação, sensibilidade do ensaio, limite de detecção (LOD), *slope*, *intercept* e R^2 (BUSTIN et al., 2009).

5.4.1 Teste de variabilidade intraensaio e interensaio

Para a variação intraensaio foi considerada a diferença para cada uma das replicatas, enquanto que a variação interensaio foi mensurada comparando-se cada ensaio. Foram realizados seis ensaios em dias consecutivos, cada um deles com 12 replicatas para cada ponto de diluição, permitindo assim a avaliação da variabilidade inter e intraensaio, respectivamente (Figura 14, a seguir).

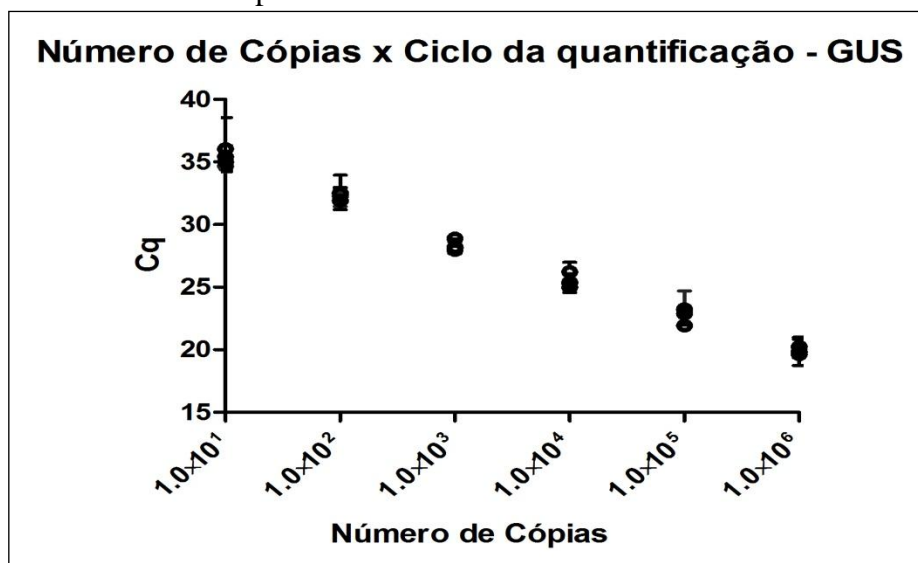
Figura 14 - Desenho esquemático da placa utilizada no ensaio

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+06
B	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+05
C	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04
D	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03	1,00E+03
E	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02
F	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01	1,00E+01
G	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco
H	NAC	NAC	NAC	NAC	NAC	NAC	NAC	NAC	NAC	NAC	NAC	NAC

Legenda: Branco=*mix* de reação sem cDNA; NAC=do inglês *Non Amplification Control* – controle de não amplificação; 1,00E+06=diluição do plasmídeo contendo 10^6 cópias dos genes-alvos; 1,00E+05= 10^5 cópias; 1,00E+04= 10^4 cópias; 1,00E+03= 10^3 ; 1,00E+02= 10^2 cópias; 1,00E+01=10 cópias. O esquema acima representa uma placa de 96 poços e cada combinação ente um número (colunas) e uma letra (linhas) representa um poço onde ocorre a reação de PCR. Em cada poço é quantificada um replicata da diluição do plasmídeo que recebeu.

A avaliação dos parâmetros da equação da reta e reação de qRT-PCR em tempo real (Gráfico 4). A diferença admitida entre a menor e a maior replicata da mesma diluição foi < 0,5 Cq. Nenhuma replicata foi descartada. A fim de avaliar a especificidade do ensaio, foram incluídos dois controle negativos: Branco e NAC (do inglês *Non Amplification Control* – controle de não amplificação). O Branco tem como objetivo controlar a presença de contaminantes externos na reação, enquanto que o NAC corresponde ao DNA da linhagem positiva para LMC, K562, mostrando que os *primers* e sonda desenhados para este ensaio são específicos do cDNA.

Gráfico 4 - Ensaio para avaliar a variabilidade intra e interensaio



Nota: Para cada ponto foi calculada a média e o desvio padrão. Cada círculo do gráfico representa uma replicata e a barra equivale ao desvio padrão.

5.4.2 Concentração ideal de primers e sondas para o GUS

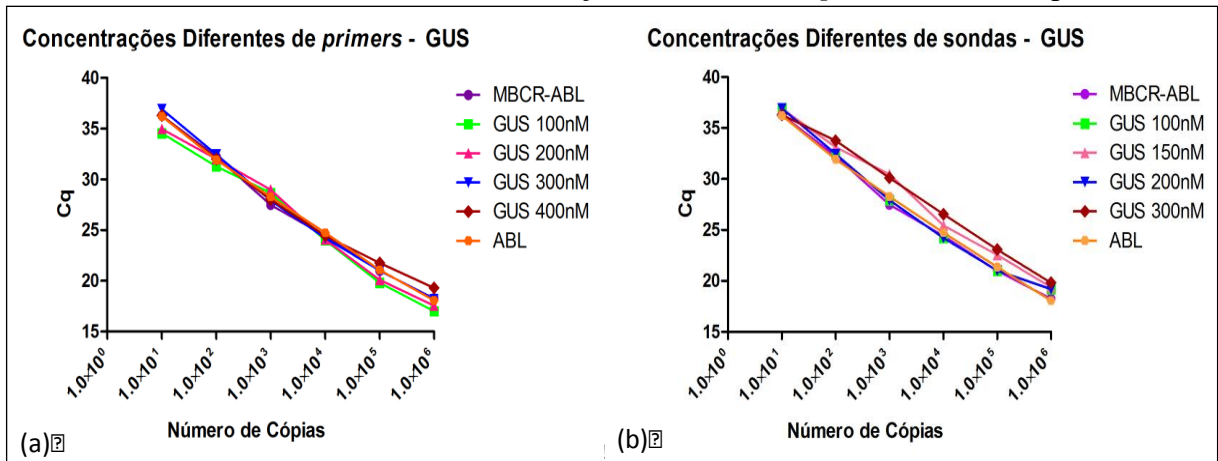
Foram testadas diferentes combinações de concentrações de *primers* e sondas e a melhor combinação foi definida através dos parâmetros da reta. Para este ensaio, foram testadas apenas seis replicatas para cada um dos pontos da diluição. Partiu-se de concentrações já descritas na literatura (BEILLARD et al., 2003) para testar nossa reação. Inicialmente foram variadas as concentrações de *primers*: 100nM, 200nM, 300nM e 400nM e mantida a sonda a 100nM. Visto que, a melhor concentração dos *primers* foi de 300nM, a sonda foi variada nas seguintes diluições: 100nM, 150nM, 200nM e 300nM. A concentração final na reação de 300nM de *primer* e 100nM de sonda foi a que melhor atendeu aos parâmetros da reta (Figura 15).

Figura 15 - Parâmetros para a construção da curva padrão, nas diferentes concentrações de *primers* e sondas

Primer x sonda	Slope	Intercept	Eficiência	R ²	[] Primers			
					100nM	200nM	300nM	400nM
100nM x 100nM	-3,51	39,08	93%	0,9109				
200nM x 100nM	-3,55	38,88	91%	0,9098				
300nM x 100nM	-3,35	39,98	99%	0,9997	x	x	x	x
400nM x 100nM	-3,34	39,01	99%	0,9993			x	-
300nM x 150nM	-3,61	37,09	89%	0,8901			x	-
300nM x 200nM	-3,44	39,15	95%	0,9912			x	-
300nM x 300nM	-3,51	39,26	93%	0,9909			x	-

Legenda: Em verde, está demonstrada a combinação de concentrações de *primers* e sonda que obteve o melhor resultado.

As diferentes concentrações de *primers* e sonda do gene *GUS* foram comparadas com as diluições já padronizadas anteriormente no LabBioMol para os genes *ABL* e *BCR-ABL*. Conforme mostrado no Gráfico 5, legendas a e b, as diluições mais semelhantes ao genes *ABL* e *BCR-ABL* foram a de 300nM de *primers* e 100nM de sonda.

Gráfico 5 - Curva das diferentes concentrações de sondas e *primers* testadas para o *GUS*

Legenda: Foram testadas as diferentes concentrações de *primers* (a) e sonda (b) para o gene *GUS* em uma concentração de 300nM de *primer* e 100nM de sonda e comparou-se os resultados com a reação para os genes *ABL* e *BCR-ABL*, em todas as diluições do plasmídeo.

A partir desta padronização foram calculadas as seguintes informações técnicas do ensaio: eficiência da reação 98% (desvio padrão ± 2 Cq); *slope*: -3.43 (-3,36 a - 3,49), *intercept* 41,1 (40,8- 41,6) e R^2 : 0,997 (0,995 - 0,999).

5.4.3 Avaliação dos níveis de BCR-ABL usando o gene *GUS* como gene controle

Com o estudo atual, buscava-se estabelecer se altos níveis de transcritos BCR-ABL ao diagnóstico estariam associados a respostas desfavoráveis ao IM. Para tal, foram avaliados os níveis de transcritos de BCR-ABL de pacientes com LMC ao diagnóstico em relação a obtenção ou não da RMM aos 12 meses (resposta ótima). A avaliação dos níveis de carga leucêmica ao diagnóstico por meio da determinação dos níveis de transcritos BCR-ABL/*GUS* e BCR-ABL/*ABL* foi realizada por qRT-PCR.

Dos 220 pacientes do grupo original, 31 possuíam todos os critérios de inclusão para esta avaliação: a) amostra antes do início do IM; b) amostra aos três meses após o início do IM; c) pelo menos 24 meses de acompanhamento molecular. As principais características clínicas destes pacientes estão descritas na Tabela 3, a seguir. Destes 31 pacientes, 46,4% foram classificados como não respondedores e 53,6% como respondedores ótimos, segundo os critérios do ELN 2013 de alcançar a RMM aos 12 meses. Nesta análise, os dados dos

níveis de BCR-ABL, em função do gene controle *GUS* ou *ABL*, foram registrados de acordo com o valor bruto do qRT-PCR, ou seja, não foram convertidos a EI.

Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados para o *GUS*

	N = 31 (intervalo)
Idade ao diagnóstico, anos	48 (30-72)
Sexo	
Masculino	21
Feminino	10
Classificação de risco, Sokal	
Baixo	5
Intermediário	5
Alto	3
Desconhecido	18
Tratamento prévio ao IM	
Nenhum*	18
rIFN α	13
Tempo médio de acompanhamento, meses	40,6 (24,2 – 104,5)

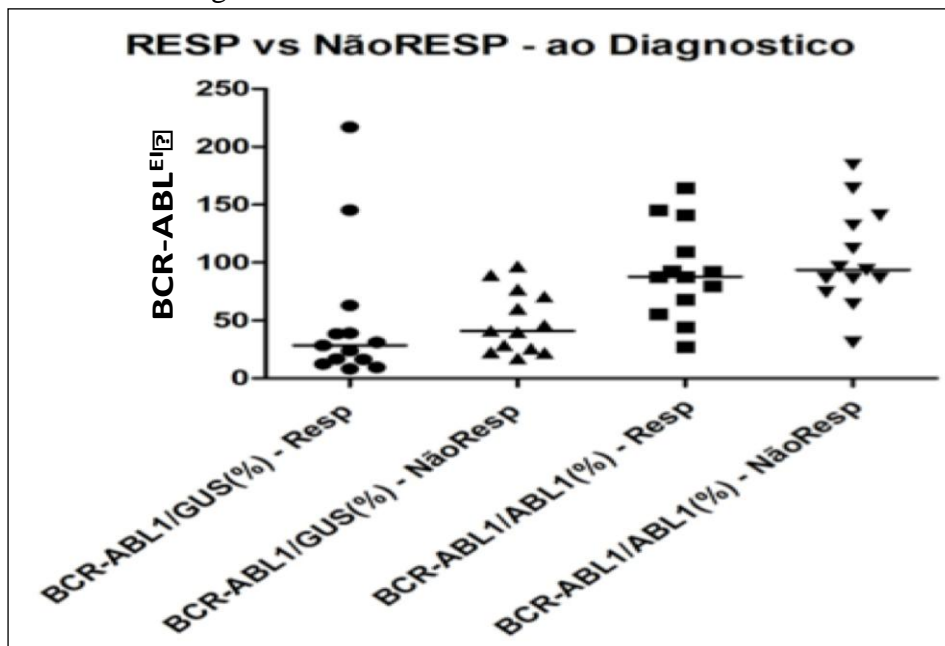
Legenda: interferon-alfa recombinante (rIFN α).

A mediana de transcritos BCR-ABL/ABL% ao diagnóstico foi de 87,8 (16,24 – 184,46) e de transcritos BCR-ABL/GUS% de 29,8 (5,76 – 217), enquanto que a mediana dos transcritos BCR-ABL/ABL% aos 3 meses foi 7,1 (0,05 - 307,2) e de transcritos BCR-ABL/GUS% de 21,94 (0,2 – 85,2). Dois pacientes apresentaram níveis do transcrito BCR-ABL indeterminado ao diagnóstico por possuírem a isoforma e1a2, típica da LLA Ph+, ou a isoforma variante (e19a2) não detectadas pela metodologia, e foram utilizados como controles negativos da reação.

Ao medirmos os níveis de transcritos BCR-ABL ao diagnóstico, os pacientes classificados como respondedores ótimos (N=14) tiveram níveis de BCR-ABL/ABL% de 87,84 (26,8 – 164,5) e níveis de BCR-ABL/GUS% de 28,38 (8,2 – 217). Os pacientes classificados como não respondedores (N=13) tiveram níveis de BCR-ABL/ABL% de 93,72 (30,87 – 184,5) e níveis de BCR-ABL/GUS% de 40,92 (17,21 – 96,85). Para esta classificação, além dos dois casos que possuíam isoformas não detectadas pela metodologia, mais dois pacientes não puderam ser classificados em grupos de resposta, pois não possuíam amostras referentes aos 12 meses de tratamento. A comparação entre as medianas de respondedores e não respondedores utilizando *GUS* e *ABL*, tiveram valor de probabilidade estatística (p) respectivamente <0,001 e 0,89. Observamos então, que a comparação entre as

medianas no grupo que utilizou *ABL* pra quantificação dos níveis de transcritos BCR-ABL ao diagnóstico não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de respondedor e não respondedor (Gráfico 6). Em contraste, níveis mais elevados de transcritos *BCR-ABL/GUS* foram associados a uma probabilidade menor de atingir uma resposta ótima podendo assim distinguir os dois grupos de pacientes (resposta ótima vs *warning* ou não respondedor ótimo $p < 0,001$). A mediana de BCR-ABL/GUS ao diagnóstico entre o grupo de respondedores ótima foi de 28,38%, sendo este o nosso limiar de definição de quantidade de transcritos que separam estatisticamente esses dois grupos. Ou seja, caso o pacientes possua transcritos abaixo de 28,38%, ele possui uma probabilidade maior de atingir a RMM aos 12 meses.

Gráfico 6 - Comparação dos níveis de BCR-ABL/GC% entre grupos de respondedores (Resp) e não respondedores (NãoResp) ao diagnóstico



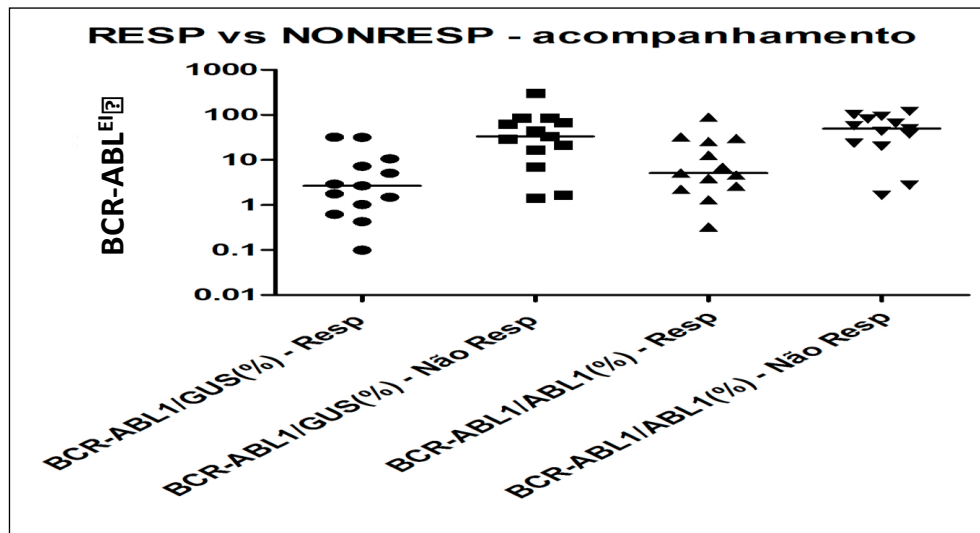
Nota: As medianas dos grupos de respondedores e não respondedores foram comparadas pelo teste de Mann Whitney não pareado bicaudal (95%IC, $p < 0,05$).

Em seguida, foi avaliada a existência de uma associação entre os níveis de BCR-ABL/GUS ou BCR-ABL/ABL ao diagnóstico e a obtenção de uma resposta molecular ótima aos três meses (níveis de BCR-ABL $\leq 10\%$). Ao medirmos os níveis de transcritos BCR-ABL após três meses do início do IM, os pacientes que atingiram uma resposta ótima aos 12 meses (RMM) apresentavam níveis de BCR-ABL/ABL% de 5,1 (0,32 – 89,2) e níveis de BCR-ABL/GUS% de 2,66 (0,099 – 31,93). A mediana dos níveis de transcritos BCR-ABL/GC

tanto ABL quanto GUS aos três meses no grupo de pacientes respondedores foi abaixo de 10%. No grupo não respondedor, os níveis de BCR-ABL/ABL% foi de 49,83 (1,63 – 120,7) e de BCR-ABL/GUS% de 33,36 (1,42 – 307,2) (Gráfico 7).

Ao compararmos os dois grupos de resposta, utilizando *ABL* e *GUS*, observamos uma diferença significativa entre os respondedores e não respondedores ($p=0,0053$ e $p=0,013$, respectivamente), demonstrando que os valores encontrados aos três meses são biomarcadores preditivos de resposta. Ao compararmos os resultados encontrados usando *ABL* e *GUS* dentro de um mesmo grupo (respondedores e não respondedores) não foi observada diferença significativamente estatística ($p=0,2$ e $p=0,58$, respectivamente).

Gráfico 7 - Comparação dos níveis de BCR-ABL/GC% entre grupos de respondedores (Resp) e não respondedores (NãoResp) após três meses do início do tratamento com IM



Nota: As medianas dos grupos de respondedores e não respondedores foram comparadas pelo teste de Mann Whitney não pareado bicaudal (95% IC, $p<0,05$).

5.5 Subcoorte para caracterização dos pacientes tratados no HUPE/UERJ

Como descrito anteriormente na seção 4.1, a coorte central deste estudo foi proveniente do serviço de hematologia de 31 centros colaboradores. No entanto, não estavam disponíveis até o momento os dados das amostras dos pacientes do HUPE/UERJ para todas as análises, de forma que se tornou necessário um recorte particular, com a seleção de algumas variáveis. O grupo de pacientes do centro HUPE/UERJ, passível de estudo de acordo ao

tempo de seguimento e disponibilidade de informação, foi composta por 21 pacientes com diagnóstico de LMC estabelecido.

A Tabela 4 apresenta as características clínicas e demográficas dos pacientes provenientes do HUPE.

Tabela 4 – Características clínicas e demográficas dos pacientes com LMC dos pacientes do HUPE/UERJ

	N (intervalo) = 21
Idade ao diagnóstico, anos	46 (13-80)
Sexo	
Feminino	9
Masculino	12
Tempo de uso de ITK, meses	38,8 (6-71)
Troca de ITK	4
Dasatinibe	1
Nilotinibe	3
Motivo da troca de ITK	
Toxicidade	3
Falha	1

Legenda: Leucemia Mieloide Crônica (LMC); Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE); Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ); inibidor de tirosina quinase (ITK).

A análise de amostras seriadas não permitiu uma avaliação dos marcos de resposta aos 3 e 12 meses. Assim, como uma primeira abordagem para este grupo, uma comparação entre os níveis de transcritos BCR-ABL/ABL^{EI} da primeira amostra enviada e a última amostra disponível no laboratório foi realizada. A média de seguimento destes pacientes foi de 15 meses sendo que um decaimento de pelo menos 1 log nos níveis de transcritos BCR-ABL foi observado ($p = 0,028$ teste long-rank) (Tabela 5). Os pacientes que atingiram a RMM, em qualquer tempo, não a perderam, apresentando estabilidade na RMM. Da mesma forma, a melhor resposta alcançada por um paciente não foi perdida.

Tabela 5 – Estatísticas das variáveis relacionadas à RM da subcoorte dos pacientes do HUPE/UERJ

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Níveis de transcritos BCR-ABL ^{EI} da 1ª RM	17.00	0.02	123.74	10.20	30.35
Níveis de transcritos BCR-ABL ^{EI} da última RM	16.00	0.00	81.21	5.80	20.14
Tempo de acompanhamento desde início IM/ITK, meses	11.00	6.00	71.00	38.82	24.52
Tempo entre 1ª RM e última RM, meses	17.00	2.00	54.00	15.06	16.49

Legenda: Resposta Molecular (RM); Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE); Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ); Mesilato de Imatinibe (IM); Inibidor de tirosina quinase (ITK).

6 DISCUSSÃO

O significado clínico do tipo de transcrito BCR-ABL em pacientes LMC ainda é desconhecido. De acordo com Lucas et al. (2009), o conhecimento do tipo de transcrito pode constituir uma informação prognóstica adicional. Neste estudo foi demonstrado que os pacientes que expressavam a isoforma e14a2 (b3a2) alcançaram com maior frequência e em menor tempo a RCgC quando comparados aos pacientes portadores da isoforma e13a2 (b2a2). O valor prognóstico adverso atribuído pela presença da isoforma b3a2, foi associado a uma maior atividade de tirosina-quinase de BCR-ABL. A definição de uma RCgC foi estabelecida pela equivalência com níveis de transcritos BCR-ABL $\leq 1\%$. Em contraste, em outro estudo elaborado por Vega-Ruiz et al. (2007), foram analisados 480 pacientes e foram encontrados níveis significativamente mais baixos de transcritos BCR-ABL no grupo e14a2 aos 3, 6 e 9 meses após o início do IM. Estes resultados, podem ser entendidos pelo favorecimento de uma amplificação preferencial de um transcrito de tamanho menor em uma reação de PCR. Esta avaliação é concordante com o fato de que quando avaliada a obtenção da RCgC em pacientes e14a2 e e13a2 não foram encontradas diferenças na obtenção desta resposta. Os resultados apresentados em nosso estudo, assim como o estudo recente de Hanfstein et al. (2014a), onde uma diferença na incidência cumulativa da RCgC não foi encontrada entre pacientes portadores das isoformas e14a2 ou e13a2, também não apontam para um valor prognóstico diferenciado entre as duas isoformas. Desta forma, parece correto afirmar que diferentes isoformas de *BCR-ABL*, presentes ao diagnóstico, não atribuem valor prognóstico diferenciado (HANFSTEIN et al., 2014a).

Uma outra análise, foi estabelecer uma correlação entre a % de células Ph+ e níveis de transcritos *BCR-ABL*^{Et}. Sabe-se que a monitorização da resposta por PCR em tempo real oferece vantagens sobre a citogenética e pode ser mais aceitável pelos pacientes por utilizar amostras de SP. Um estudo feito em 2002 observou que todas as amostras com RCgC estavam associados a uma taxa de *BCR-ABL/ABL* $< 1\%$ e em uma análise seriada nenhum paciente apresentou tendências discordantes entre positividade do cromossomo Ph e a relação *BCR-ABL/ABL*. Os pacientes que atingiam uma RCgP (36-65% Ph+) apresentaram uma proporção *BCR-ABL/ABL* $> 11\%$ após seis meses de tratamento. Todos os pacientes com ausência de resposta citogenética ($>95\%$ cromossomo Ph+), mostraram uma relação *BCR-ABL/ABL* que foi consistentemente maior do que 12% (WANG et al., 2002). Nossos resultados corroboram os níveis de associação encontrados entre as respostas citogenética e

molecular. Uma vez estabelecida esta correlação, pacientes sem resultados da avaliação citogenética puderam ser avaliados somente com os dados moleculares.

A disponibilidade atual, de várias modalidades terapêuticas para o tratamento da LMC implica na existência de parâmetros precoces preditivos da resposta terapêutica futura. Desta forma, utilizamos os marcos de resposta ótima atuais precoce ($BCR-ABL^{EI} \leq 10\%$ aos três meses ou $< 1\%$ aos 6 meses e $\leq 0,1\%$ aos 12 meses após o início do tratamento) para avaliar o valor preditivo dos níveis de transcritos $BCR-ABL$ obtidos com o uso do gene controle GUS . A determinação de elevados níveis de $BCR-ABL/GUS$ ao diagnóstico se correlacionou com uma baixa probabilidade de obtenção de resposta ótima ($p < 0,001$) e baixas taxas de RCgC após 12 meses de IM ($p < 0,001$). Além disso, altas taxas de $BCR-ABL/GUS$ foram associadas à baixa probabilidade de SLE ($p < 0,001$) e SLP ($p = 0,01$) (VIGNERI et al., 2013). Como esperado, devido à perda de linearidade na reação de quantificação, em níveis de alta carga leucêmica, o uso do ABL como gene controle (GC) para quantificação de níveis de transcritos ao diagnóstico, não apresentou valor preditivo. Desta forma, em relação à utilização de um biomarcador preditivo, o gene GUS é um gene controle adequado para a quantificação de $BCR-ABL$ ao diagnóstico. De fato, quando comparado aos genes controles BCR e ABL , o gene GUS preenche todos os critérios necessários para atuação adequada de um gene controle, a saber: a) níveis adequados de expressão em amostras do diagnóstico de pacientes com LMC; b) expressão similar em pacientes com LMC e não LMC; c) cinética de degradação de RNA similar a do gene de fusão $BCR-ABL$. Além disso, não apresenta perda de linearidade na reação de quantificação, em níveis de alta carga leucêmica, como se observa com o uso do ABL e do BCR como genes controles. Assim, o gene GUS é o único controle que permite a avaliação da questão sobre os níveis reais de carga leucêmica de um paciente ao diagnóstico serem preditivos da resposta terapêutica futura a um ITK (LEE et al., 2006).

Em um estudo publicado recentemente, o gene GUS foi utilizado como referência a fim de obter dados precisos da quantificação de $BCR-ABL$ ao diagnóstico. O objetivo foi investigar o impacto das mudanças nos níveis de transcritos durante os três primeiros meses de tratamento e os autores concluíram que os pacientes com risco de progressão de doença podem ser identificados com precisão quando avaliados após três meses de uso do IM pela falta da redução de pelo menos 0,5 log dos transcritos $BCR-ABL$ ao diagnóstico (HANFSTEIN et al., 2014b). Outros estudos recentes mostraram que os pacientes com níveis de transcritos $BCR-ABL \leq 10\%$ em um intervalo de três meses de tratamento tiveram maiores

taxas de RCgC e respostas ótimas em relação aos pacientes do grupo com > 10% (HANFSTEIN et al., 2010; HUGHES et al., 2010; KAGITA et al., 2014).

Os resultados deste estudo estão em consonância com os de Hanfstein et al. (2014b) e um manuscrito está em fase de finalização para publicação.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A maior frequência de respondedores relacionada à presença do transcrito b3a2 foi confirmada em relação ao b2a2, não foi encontrado valor prognóstico diferenciado entre as duas isoformas.

Uma associação entre RCg e RM foi encontrada. Na ausência de resposta citogenética (> 95% Ph +) os níveis médios de equivalência BCR-ABL^{EI} foi $\geq 10\%$. Na resposta citogenética parcial (RCgP) BCR-ABL^{EI} <10%, ou redução de pelo menos 1 log, e resposta citogenética completa (RCC), equivalente a redução de aproximadamente 2 log nos níveis de BCR-ABL^{EI} (<1-2% em EI).

A obtenção de baixos níveis de BCR-ABL/GUS ao diagnóstico e aos três meses foi associada a uma maior probabilidade de obtenção da RMM aos 12 meses. Um seguimento de longo prazo deve ser feito para avaliar se este resultado neste grupo de pacientes possui impacto na SG e SLE.

O uso do *GUS* como gene controle da reação de quantificação dos níveis de transcritos em ao diagnóstico e aos três meses de tratamento determina um valor real da carga leucêmica. Os estudos devem ser estendidos a um grupo maior de pacientes e comparados aos resultados já obtidos com a técnica utilizada a fim de parametrizar o cálculo do decaimento dos níveis de transcritos ao longo do tratamento.

REFERÊNCIAS

BACCARANI, M. 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, Sept. 2006.

BACCARANI, M. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 35, p. 6041–6051, Dec. 2009.

_____. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 872–884, Jun. 2013.

_____. Treatment recommendations for chronic myeloid leukemia. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v. 6, n. 1, Jan. 2014. Disponível em: <<http://www.mjhid.org/article/view/12497>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

BACCARANI, M.; PANE, F. A critical history of chronic myeloid leukemia. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v. 6, n. 1, Jan. 2014.

BEILLARD, E. et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. **Leukemia**, v. 17, n. 12, p. 2474–286, Dec. 2003.

BRANFORD, S. et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. **Blood**, v. 112, n. 8, p. 3330-3338, 2008.

BRECCIA, M.; ALIMENA, G. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors and new approaches to target leukemic stem cells: treatment-free remission as a new goal in chronic myeloid leukemia. **Cancer Lett**, v. 347, n 1, p. 22-28, May 2014.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem.**, v. 55, n. 4, p. 611–622, Apr. 2009.

CROSS, N. C. P. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 22, n. 3, p. 355–365, Sept. 2009.

CROSS, N. C. P. et al. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders. **Leukemia**, v. 8, p. 186–189, 1994.

_____. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 26, n. 10, p. 2172–2175, Apr. 2012.

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, Feb. 1990.

DEININGER, M. W. Milestones and monitoring in patients with CML treated with imatinib. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 419-426, 2008.

DEININGER, M. W. et al. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) treated with imatinib. **Blood**, v. 1126, 2009.

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

FADERL, S. et al. The biology of chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 3, p. 164–172, Jul. 1999.

GABERT, J. et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. **Leukemia**, v. 17, n. 12, p. 2318–2357, Dec. 2003.

HANFSTEIN, B. et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. **Haematol.**, 2014a. [Epub ahead of print].

_____. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 2096–2102, Mar. 2012.

_____. Molecular and cytogenetic response after 3 months of imatinib treatment is predictive for the risk of disease progression and death in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients - a follow-up analysis of the German CML Study IV. **ASH Annual Meeting Abstracts**, n. 118, p. 783, 2011.

_____. Molecular response after 3 months of 1st line imatinib therapy is predictive for treatment failure and disease progression with chronic phase chronic myeloid leukemia: a follow-up analysis of the German CML Study IV. **Annual Meeting Abstracts**, n. 30, 2010.

_____. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. **Leukemia**, 2014b. [Epub ahead of print]

HASFORD, J. et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, n. 11, p. 850-858, Jun. 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.

HAZNEDAROGLU, I. C. Monitoring the response to Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Treatment in Chronic Myeloid Leukemia (CML). **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v. 6, n. 1, Dec. 2013. Disponível em: <<http://www.mjhid.org/article/view/12448>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 370, n. 9584, p. 342-350, Jul. 2007.

HOCHHAUS, A. Advances in the treatment of haematological malignancies: optimal sequence of CML treatment. **Annals Oncology**, v. 18, Suppl. 9, p. 58-63, 2007a.

_____. Dasatinib for the treatment of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia after imatinib failure. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 8, n. 18, p. 3257-3264, Dec. 2007b.

HOCHHAUS, A. Management of Bcr-Abl-positive leukemias with dasatinib. **Expert. Rev. Anticancer. Ther.**, v. 7, n. 11, p. 1529-1536, Nov. 2007c.

HOCHHAUS, A. et al. Dasatinib and imatinib-induced reductions in BCR-ABL transcript levels below 10% at 3 months are associated with improved responses in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (cml-cp): analysis of molecular response kinetics in the DASISION Trial. **ASH Annual Meeting Abstracts**, v. 118, p. 2767, 2011.

_____. Enest1st: nilotinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (cml-cp): a european and eutos clinical initiative for standardization of molecular response. **EHA European Annual Meeting Abstracts**, n. 0188, 2012.

HUGHES, T. P. et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3758-3765, Nov. 2010.

_____. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 28-37, Jul. 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Brasília, DF, 2014 p. 124.

JABBOUR, E. et al. Suboptimal responses in chronic myeloid leukemia: implications and management strategies. **Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1181-1191, Mar. 2012.

KAGITA, S. et al. Early molecular response in chronic myeloid leukemia patients predicts future response status. **Tumor Biol.**, v. 35, p. 4443-4446, 2014.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J. Amer. Statist. Assn.**, v. 53, p. 457–481, 1958.

LEE, J. W. et al. β -Glucuronidase is an optimal normalization control gene for molecular monitoring of chronic myelogenous leukemia. **J. Molec. Diag.**, v. 8, n. 3, p. 385–389, Jul. 2006.

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. **Haematol.**, v. 94, n. 10, p. 1362–1367, Oct. 2009.

MAHON, F. X. et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. **Lancet Oncol.**, v. 11, n. 11, p. 1029–1035, Nov. 2010.

MARIN, D. Management of the new patient with CML in chronic phase. **Current Hematol. Malignancy Reports**, v. 8, n. 1, p. 37–42, Feb. 2013.

MARIN, D. et al. The predictive value of early molecular response in chronic phase cml patients treated with dasatinib first line therapy. **ASH Annual Meeting Abstracts**, n. 118, p. 785, 2011.

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

MÜLLER, M. C. et al. Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 37 international laboratories. **Leukemia**, v. 22, n. 1, p. 96–102, Oct. 2007.

_____. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. **Leukemia.**, v. 23, n. 11, p. 1957–1963, Nov. 2008.

NICOLINI, F. E. et al. The month three major molecular response in chronic phase chronic myeloid leukemia on imatinib400, nilotinib and dasatinib is a major prognostic factor for failure-free and progression-free survival. **ASH Annual Meeting Abstracts**, v. 118, p. 1684, 2011.

NOWEFL, P. C.; HUNGERFORD, D. N. P. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, 1960.

O'BRIEN, S. G. et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 11, p. 994–1004, Mar. 2003.

OEHLER, V. G. Update on current monitoring recommendations in chronic myeloid leukemia: practical points for clinical practice. Hematology. **Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, v. 2103, p. 176–183, 2013.

OTAZÚ, I. B. et al. Detection of BCR-ABL transcripts by multiplex and nested PCR in different haematological disorders. **Leuk Lymphoma**, v. 37, n. 1-2, p. 205-211, 2003.

ROSS, D. M.; HUGHES, T. P. How I determine if and when to recommend stopping tyrosine kinase inhibitor treatment for chronic myeloid leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 166, n. 1, p. 3-11, 2014.

ROWLEY, J. D. Identificaton of a translocation with quinacrine fluorecence in a patient with acute leukemia. **Ann. Genet.**, v. 16, n. 2, p. 109-112, Jun. 1973.

SACHA, T. Imatinib: an overview. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v. 6, n. 1, Dec. 2013. Disponível em: <<http://www.mjhid.org/article/view/12506>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

SALESSE, S.; VERFAILLIE, C. M. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. **Oncogene**, v. 21, n. 56, p. 8547–8559, Dec. 2002.

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

SOUZA, C. A. et al. Chronic myeloid leukemia treatment guidelines: Brazilian Association of Hematology, Hemotherapy and Cell Therapy. Brazilian Medical Association Guidelines Project - 2012. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.**, v. 34, n. 5, p. 367–382, 2012.

THIJSSEN, S. et al. Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. **Leukemia**, v. 13, n. 11, p. 1646–1674, Nov. 1999.

TRELA, E.; GLOWACKI, S.; BŁASIAK, J. Therapy of chronic myeloid leukemia: twilight of the Imatinib Era? **ISRN Oncology**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937–951, Jul. 2009.

VEGA-RUIZ, A. et al. Better Molecular Response to Imatinib for Patients (pts) with Chronic Myeloid Leukemia (CML) in Chronic Phase (CP) Carrying the b3a2 Transcript Compared to b2a2. **ASH Annual Meeting Abstracts**, v. 110, n. 11, p. 1939, 2007.

VIGNERI, P. G. et al. High BCR-ABL/GUS^{El} Levels at diagnosis are associated with unfavorable responses to imatinib. **ASH Annual Meeting Abstracts**, 2013.

WANG, L. et al. Serial monitoring of BCR–ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. **British J. Haematol.**, v. 118, p. 771-777, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. **World cancer report 2008**. Geneva, 2008. 510 p.

APÊNDICE – Ficha de coleta de dados – Grupo de Pesquisa LMC

FICHA DE COLETA DE DADOS - GRUPO DE PESQUISA LMC

DADOS GERAIS

Nome: _____ Matrícula: _____ Data: __ / __ / __

Instituição:

- INCA
 HUCFF
 HUPE
 HUGG

 HSRC-ES HUAP OUTRO: _____Sexo: Fem Masc

Raça: _____

Data de nascimento: __ / __ / ____

Data de diagnóstico: __ / __ / ____

Profissão: _____

Escolaridade: _____

EXAMES AO DIAGNÓSTICO

Data: __ / __ / ____

Hemograma:

Hemácias	
Hemoglobina	
Leucócitos	
Blastos %	
Bastões %	
Eosinófilos %	
Basófilos %	
Plaquetas	

Blastos %	
Promielócitos %	

Conclusão:

Mielograma:**DADOS CLÍNICOS AO DIAGNÓSTICO**Fase da doença: Fase Crônica Fase Acelerada Crise BlásticaBaço palpável ao diagnóstico: Não Sim

Tamanho do baço à palpação: ____ cm do RCE

EXAMES ESPECÍFICOS AO DIAGNÓSTICO

Citogenética: Sim Não realizado

Cromossomo Filadélfia: Não Sim ___% Sem mitose

Rearranjo bcr-abl: Sim Não realizado

Isoforma: b2a2 b3a2 b2a2/b3a2 e1a2

TRATAMENTO E COMPLICAÇÕES

Usou Hydrea? Sim Não Início: ___/___/___ Fim: ___/___/___

Usou INF? Sim Não Início: ___/___/___ Fim: ___/___/___

Motivo da suspensão: _____

Quimioterapia? Sim Não Qual medicamento? _____

Início: ___/___/___ Fim: ___/___/___

Motivo da suspensão: _____

Fez TMO? Sim Não Data: ___/___/___

Tipo: Aparentado Não-aparentado

Recaída do TMO? Sim Não Manejo/Tratamento pós recaída: _____

Usou Imatinibe? Sim Não

Início: ___/___/___ Dose: _____mg/dia

Usou Dasatinibe? Sim Não Início: ___/___/___ Fim: ___/___/___

Motivo da suspensão: _____

Usou Nilotinibe? Sim Não Início: ___/___/___ Fim: ___/___/___

Motivo da suspensão: _____

DADOS ESPECÍFICOS AO INÍCIO DO IMATINIBE

Fase da doença: Fase Crônica Fase Acelerada Crise Blática

Baço palpável: Não Sim

Tamanho do baço à palpação: ____ cm do RCE

Hemograma:

Hemácias	
Hemoglobina	
Leucócitos	
Blastos %	
Bastões %	
Eosinófilos %	

Basófilos %	
Plaquetas	

Mielograma:

Blastos %	
Promielócitos %	

Conclusão: _____

Citogenética: () Sim () Não realizado

Cromossomo Filadélfia: () Não () Sim ____% () Sem mitose

Rearranjo bcr-abl: () Sim () Não realizado

Isoforma: (1) b2a2 (2) b3a2 (3) b2a2/b3a2 (4) e1a2

Fim: __ / __ / __ Motivo da suspensão: _____

Reinício: __ / __ / __ Dose: ____mg Fim: __ / __ / __ Motivo: _____

Reinício: __ / __ / __ Dose: ____mg Fim: __ / __ / __ Motivo: _____

Reinício: __ / __ / __ Dose: ____mg Fim: __ / __ / __ Motivo: _____

Reinício: __ / __ / __ Dose: ____mg Fim: __ / __ / __ Motivo: _____

Suspensão definitiva: __ / __ / __ Motivo da suspensão: _____

Resposta Hematológica Completa: () Sim () Não Data: __ / __ / __

Citogenética (Cg):

Cg aos 3 meses: () Sim ____% ph+ () Não Realizado () Sem Mitose Data: __ / __ / __

Cg aos 6 meses: () Sim ____% ph+ () Não Realizado () Sem Mitose Data: __ / __ / __

Cg aos 9 meses: () Sim ____% ph+ () Não Realizado () Sem Mitose Data: __ / __ / __

Cg aos 12 meses: () Sim ____% ph+ () Não Realizado () Sem Mitose Data: __ / __ / __

Cg aos 15 meses: () Sim ____% ph+ () Não Realizado () Sem Mitose Data: __ / __ / __

Cg aos 18 meses: () Sim ____% ph+ () Não Realizado () Sem Mitose Data: __ / __ / __

Cg aos 21 meses: () Sim ____% ph+ () Não Realizado () Sem Mitose Data: __ / __ / __

Cg aos 24 meses: () Sim ___% ph+ () Não Realizado () Sem Mitose Data: __/__/__

Cg >24 meses: () Sim ___% ph+ () Não Realizado () Sem Mitose Data: __/__/__

Biologia Molecular (BioMol):

BioMol aos 3 meses: () Sim () Não realizado () Não amplificou Data __/__/__

Se sim:

() Multi + () Multi - () Nested + () Nested - Isoforma: _____ Quantitativo: ___

BioMol aos 6 meses: () Sim () Não realizado () Não amplificou Data __/__/__

Se sim:

() Multi + () Multi - () Nested + () Nested - Isoforma: _____ Quantitativo: ___

BioMol aos 9 meses: () Sim () Não realizado () Não amplificou Data __/__/__

Se sim:

() Multi + () Multi - () Nested + () Nested - Isoforma: _____ Quantitativo: ___

BioMol aos 12 meses: () Sim () Não realizado () Não amplificou Data __/__/__

Se sim:

() Multi + () Multi - () Nested + () Nested - Isoforma: _____ Quantitativo: ___

BioMol aos 15 meses: () Sim () Não realizado () Não amplificou Data __/__/__

Se sim:

() Multi + () Multi - () Nested + () Nested - Isoforma: _____ Quantitativo: ___

BioMol aos 18 meses: () Sim () Não realizado () Não amplificou Data __/__/__

Se sim:

() Multi + () Multi - () Nested + () Nested - Isoforma: _____ Quantitativo: ___

BioMol aos 21 meses: () Sim () Não realizado () Não amplificou Data __/__/__

Se sim:

() Multi + () Multi - () Nested + () Nested - Isoforma: _____ Quantitativo: ___

BioMol aos 24 meses: () Sim () Não realizado () Não amplificou Data __/__/__

Se sim:

() Multi + () Multi - () Nested + () Nested - Isoforma: _____ Quantitativo: ___

BioMol > 24 meses: () Sim () Não realizado () Não amplificou Data __/__/__

Se sim:

() Multi + () Multi - () Nested + () Nested - Isoforma: _____ Quantitativo: ___

FOLLOW UP

Ocorreu transformação leucêmica? () Não () Sim

() FA () CB Data: __/__/__

Análise de mutação: () Sim () Não

Data da análise: __/__/__ Mutação: () Sim () Não Tipo: _____

Última consulta: __/__/__

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética - INCA



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

Memo 040/05-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 12 de julho de 2005

Dra. Ilana Zalberg Renault
Pesquisadora Principal

Ref.: **Prot. 100/04** – Monitorização molecular da resposta terapêutica na leucemia mielóide crônica

Prezada Doutora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após reanálise decidiu **aprovar** o Protocolo intitulado: Monitorização molecular da resposta terapêutica na leucemia mielóide crônica, bem como seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em 12 de julho de 2005

Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas à análise, registro e arquivamento.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador Substituto do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



Rio de Janeiro, 15 de fevereiro de 2011.

A(o): Dra. Ilana Zalcberg Renault
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 129/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Abordagem molecular para avaliação dos mecanismos genéticos e epigenéticos subjacentes à resistência de pacientes com leucemia mielóide crônica submetidos ao tratamento de inibidores tirosina quinase

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **aprovou** após re-análise o estudo intitulado: **Abordagem molecular para avaliação dos mecanismos genéticos e epigenéticos subjacentes à resistência de pacientes com leucemia mielóide crônica submetidos ao tratamento de inibidores tirosina quinase**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para análise retrospectiva de amostras versão 2** e **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta prospectiva de amostras versão 2**, em 7 de fevereiro de 2011.

Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo, os primeiros estão previstos para as seguintes datas: agosto/2011 e fevereiro/2012.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

C/c – Dra. Eliana Abdelhay – Chefe do Serviço de Atividades Laboratoriais/CEMO
Dr. Luis Fernando Bouzas – Diretor do CEMO